PUESTA A PUNTO DE METODOLOGÍAS RÁPIDAS PARA LA DETECCIÓN Y DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS EN MATRICES AMBIENTALES

***Development of fast methodologies for
the detection and determination of
organic compounds in environmental
matrices***

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

**PUESTA A PUNTO DE METODOLOGÍAS RÁPIDAS PARA
LA DETECCIÓN Y DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS
ORGÁNICOS EN MATRICES AMBIENTALES**

*DEVELOPMENT OF FAST METHODOLOGIES FOR THE
DETECTION AND DETERMINATION OF ORGANIC
COMPOUNDS IN ENVIRONMENTAL MATRICES*

SARA HERRERO MARTÍN

2010

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

PUESTA A PUNTO DE METODOLOGÍAS RÁPIDAS PARA LA DETECCIÓN Y DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS EN MATRICES AMBIENTALES

*DEVELOPMENT OF FAST METHODOLOGIES FOR THE
DETECTION AND DETERMINATION OF ORGANIC
COMPOUNDS IN ENVIRONMENTAL MATRICES*

Memoria que para optar al grado de Doctor por la Universidad de
Salamanca presenta la licenciada Sara Herrero Martín

Salamanca, 18 de Mayo de 2010

Firma manuscrita de Sara Herrero Martín en tinta azul, con el nombre "Sara Herrero" claramente legible.

Fdo.: Sara Herrero Martín

D. José Luis Pérez Pavón, Catedrático de la Universidad de Salamanca y D. Carmelo García Pinto, Profesor Titular de la Universidad de Salamanca, directores del trabajo **«Puesta a punto de metodologías rápidas para la detección y determinación de compuestos orgánicos en matrices ambientales»** realizado por la licenciada en Ciencias Ambientales Sara Herrero Martín para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, autorizan la presentación del mismo, al considerar que se han alcanzado los objetivos inicialmente previstos.

Salamanca, 18 de Mayo de 2010

Fdo.: José Luis Pérez Pavón

Fdo.: Carmelo García Pinto

Dña. Concepción García Moreno, Catedrático de Universidad y Directora del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Salamanca.

INFORMA:

Que la memoria «**Puesta a punto de metodologías rápidas para la detección y determinación de compuestos orgánicos en matrices ambientales**», que para optar al grado de Doctor presenta la licenciada Sara Herrero Martín, ha sido realizado bajo la dirección de los Doctores D. José Luis Pérez Pavón y D. Carmelo García Pinto en el Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo el presente informe en Salamanca, a 18 de Mayo de 2010.

A circular official stamp of the University of Salamanca is visible, partially obscured by a large, stylized handwritten signature in blue ink. The stamp contains the text "UNIVERSIDAD DE SALAMANCA" and "DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA".

Fdo.: Concepción García Moreno

Deseo expresar mi agradecimiento a la Universidad de Salamanca por la concesión de una beca Predoctoral de Investigación (2005-2007) y al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de una beca de Formación de Profesorado Universitario (2007-2009).

El trabajo realizado en el Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología ha sido financiado por los proyectos: CTQ2004-01379/BQU Ministerio de Educación y Ciencia (2004-2007); SA112A08, Junta de Castilla y León (2008-2010); CTQ2007-63157/BQU, Ministerio de Educación y Ciencia (2008-2010) y Grupo de Excelencia GR87, Junta de Castilla y León (2009-2011).

Mi más sincero y profundo agradecimiento...

...a los directores de esta Tesis, José Luis Pérez Pavón y Carmelo García Pinto, por la idea novedosa y original de este trabajo y por su grado de implicación, apoyo y orientación en el desarrollo del mismo. También me gustaría agradecerles todo lo que me han transmitido a lo largo de estos años, tanto en el ámbito profesional como en el personal.

...al resto de miembros del grupo de investigación al que pertenezco, porque me siento afortunada por formar parte de un equipo arriesgado e innovador. Quiero expresar mi gratitud a Bernardo por estar siempre dispuesto a ayudarme, por sus múltiples consejos y por cuidar de mí. A Esther le agradezco especialmente su amabilidad, su colaboración en la elaboración de las traducciones al inglés y su inestimable ayuda durante mi etapa docente. También quiero expresar un agradecimiento especial a Miguel por su gran ayuda y orientación durante mi primera etapa en el Departamento, por su disposición en todo momento y por todo lo que me ha enseñado. A Ana le agradezco su complicidad, cercanía y el tiempo compartido durante estos años. A todos ellos les agradezco sinceramente su amistad.

...a todos los miembros del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología por haberme hecho sentir “como en casa”. A Jesús Hernández Méndez le estoy especialmente agradecida porque es, en parte, responsable de que hoy esté aquí, ya que me orientó y me dio la posibilidad de entrar a formar parte del Departamento.

...a todos los compañeros con los que he compartido laboratorio porque la experiencia de conocerlos ha sido muy gratificante. Gracias por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos y por vuestra amistad. Nunca olvidaré esta etapa de mi vida.

GRACIAS

Special thanks should be given to Prof. Dr. Marja-Liisa Riekkola and Dr. Tuulia Hyötyläinen for the opportunity to work with them in the Laboratory of Analytical Chemistry of the University of Helsinki (Finland) and for their invaluable help, collaboration and support during the development of the research.

I would like to thank Totti Laitinen, Jevgeni Parshintsev and Kari Hartonen for their collaboration and inestimable help at any situation. I am also grateful to Matti Jussila for his great help with computer matters.

I am most grateful to all the personnel of the laboratory for their hospitality and kindness during my research stay.

THANKS

A mi familia, amigos y a Dani,
gracias por vuestra compañía, cariño y apoyo incondicional

ABREVIATURAS/ABBREVIATIONS

ANOVA	Análisis de varianza <i>Analysis of variance</i>
μ-ECD	Micro detector de captura electrónica <i>Micro electron-capture detector</i>
12DCB	1,2-diclorobenceno <i>1,2-dichlorobenzene</i>
1D-GC	Cromatografía de gases en una dimensión <i>One dimensional gas chromatography</i>
AOAC	Asociación de Comunidades Analíticas <i>Association of Analytical Communities</i>
BDCM	Bromodiclorometano <i>Bromodichloromethane</i>
BMF	Bromoformo <i>Bromoform</i>
BTEX	Benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos <i>Benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes</i>
CERCLA	Ley de Responsabilidad, Compensación y Recuperación Ambiental <i>Comprehensive Environmental Response, Compensation and Liability Act</i>
CFM	Cloroformo <i>Chloroform</i>
CLSA	Análisis por extracción en bucle cerrado <i>Close loop stripping analysis</i>
CMS	Muestreo capilar a través de membrana <i>Capillary membrane sampling</i>
CPC	Contador de partículas de condensación <i>Condensation particle counter</i>
CRM	Material de referencia certificado <i>Certified reference material</i>

DBCM	Dibromoclorometano <i>Dichloromethane</i>
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva <i>Dispersive liquid-liquid microextraction</i>
DMA	Analizador de movilidad diferencial <i>Differential mobility analyzer</i>
d-SPE	Extracción en fase sólida dispersiva <i>Dispersive solid phase microextraction</i>
EtOAc	Acetato de etilo <i>Ethyl acetate</i>
FGC	Cromatografía de gases rápida <i>Fast gas chromatography</i>
FID	Detector de ionización en llama <i>Flame ionization detector</i>
GC	Cromatografía de gases <i>Gas chromatography</i>
GC X GC	Cromatografía de gases en dos dimensiones completa <i>Comprehensive two dimensional gas chromatography</i>
GCB	Negro de carbón grafitado <i>Graphitized carbon black</i>
GC-GC ó 2D GC	Cromatografía de gases en dos dimensiones <i>Two dimensional gas chromatography</i>
HAAs	Ácidos Haloacéticos <i>Haloacetic acids</i>
HCB	Hexaclorobenceno <i>Hexachlorobenzene</i>
IARC	Agencia Internacional de Investigación del Cáncer <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IS	Estándar interno <i>Internal standard</i>
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección

LLE	Extracción líquido-líquido <i>Liquid-liquid extraction</i>
LPME	Microextracción en fase líquida <i>Liquid phase microextraction</i>
LVI	Inyección de grandes volúmenes de muestra <i>Large volume injection</i>
MACH™	Módulo de calentamiento de columna acelerado <i>Modular accelerated column heater</i>
MAE	Extracción asistida con microondas <i>Microwave assisted extraction</i>
MASE	Extracción con disolvente soportado en membrana <i>Membrane-assisted solvent extraction</i>
MDGC	Cromatografía de gases multidimensional <i>Multidimensional gas chromatography</i>
MeCN	Acetonitrilo <i>Acetonitrile</i>
MEPS	Microextracción mediante adsorbente empaquetado <i>Microextraction by packed sorbent</i>
MIMS	Espectrometría de Masas con introducción a través de Membrana <i>Membrane introduction mass spectrometry</i>
MRM	Método multi-residuo <i>Multiresidue method</i>
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología <i>National Institute of Standards and Technology</i>
P&T	Purga y Trampa <i>Purge and trap</i>
PAM	Purga y membrana <i>Purge and membrane</i>
PHAs	Hidrocarburos policíclicos aromáticos <i>Polycyclic aromatic hydrocarbons</i>
PLE	Extracción líquida a presión <i>Pressurized liquid extraction</i>

PM	Materia de partículas <i>Particulate Matter</i>
PSA	Amina primaria-secundaria <i>Primary-secondary amine</i>
PTFE	Politetrafluoroetileno <i>Politetrafluoroethylene</i>
PTV	Inyector de temperatura programada <i>Programmed temperature vaporizer</i>
QMS	Espectrómetro de masas cuadrupolar <i>Quadrupole mass spectrometer</i>
QuEChERS	Rápido, sencillo, barato, eficaz, robusto y seguro <i>Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe</i>
RSD	Desviación estándar relativa <i>Relative standard deviation</i>
S/N	Señal/ Ruido <i>Signal/Noise</i>
SBSE	Extracción por adsorción en barra agitadora <i>Stir bar sorptive extraction</i>
SDME	Microextracción en una gota <i>Single drop microextraction</i>
SFE	Extracción con fluidos supercríticos <i>Supercritical fluid extraction</i>
SHS	Generación de espacio de cabeza estática <i>Static headspace</i>
SIM	Seguimiento de iones seleccionados <i>Selected ion monitoring</i>
SLM	Disolvente soportado en membrana <i>Supported liquid membrane</i>
SME	Microextracción con disolvente <i>Solvent microextraction</i>
SPME	Microextracción en fase sólida <i>Solid phase microextraction</i>

TD	Desorción térmica <i>Thermal desorption</i>
THMs	Trihalometanos <i>Trihalomethanes</i>
TOF-MS	Espectrómetro de masas de tiempo de vuelo <i>Time of flight mass spectrometer</i>
TTHMs	Trihalometanos totales <i>Total trihalomethanes</i>
USEPA	Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos de América <i>United States Environmental Protection Agency</i>
VOCs	Compuestos orgánicos volátiles <i>Volatile organic compounds</i>

ÍNDICE

ABREVIATURAS/ABBREVIATIONS

I. OBJETO	1
-----------------	---

II. INTRODUCCIÓN	7
------------------------	---

1. TÉCNICAS DE PRETRATAMIENTO DE MUESTRA.....	12
---	----

1.1. <u>Generación de espacio de cabeza</u>	12
---	----

1.2. <u>QuEChERS</u>	17
----------------------------	----

2. ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	25
--	----

2.1. <u>Inyección de las muestras: inyector de temperatura programada (PTV)</u>	25
---	----

2.1.1. Inyección de muestras líquidas	25
---	----

2.1.2. Acoplamiento HS-PTV	30
----------------------------------	----

2.1.2.1. Diferencias entre inyección en caliente y en frío	32
--	----

2.1.2.2. Modos de inyección permitidos por el PTV	34
--	----

2.1.2.2.1. <i>Inyección split</i>	34
---	----

2.1.2.2.2. <i>Inyección splitless</i>	36
---	----

2.1.2.2.3. <i>Inyección solvent vent</i>	37
--	----

2.2. <u>Separación cromatográfica</u>	39
---	----

2.2.1. Cromatografía de gases rápida	39
--	----

2.2.2. Cromatografía de gases en dos dimensiones completa	42
---	----

III. CONFIGURACIONES INSTRUMENTALES UTILIZADAS	61
--	----

1. CROMATÓGRAFO DE GASES CON INYECTOR DE TEMPERATURA PROGRAMADA Y ESPECTRÓMETRO DE MASAS CUADRUPOLO	63
---	----

1.1. <u>Cromatógrafo de gases</u>	63
---	----

1.2. <u>Inyector de temperatura programada</u>	63
--	----

1.3. <u>Espectrómetro de masas</u>	65
--	----

1.4. <u>Módulos de introducción de muestra</u>	65
1.4.1. Generador de espacio de cabeza	65
1.4.2. Auto-muestreado CombiPAL.....	69
2. CROMATÓGRAFO DE GASES CON INYECTOR DE TEMPERATURA PROGRAMADA Y DETECTOR DE CAPTURA ELECTRÓNICA	72
2.1. <u>Cromatógrafo de gases</u>	72
2.2. <u>Inyector de temperatura programada</u>	72
2.3. <u>Detector de captura electrónica</u>	72
2.4. <u>Sistema de inyección de muestras líquidas</u>	73
3. CROMATÓGRAFO DE GASES (GC X GC) CON INYECTOR SPLIT/SPLITLESS Y ESPECTRÓMETRO DE MASAS DE TIEMPO DE VUELO.....	75
3.1. <u>Cromatógrafo de gases</u>	75
3.2. <u>Espectrómetro de masas de tiempo de vuelo</u>	76
3.3. <u>Sistema de inyección de muestras líquidas</u>	76

IV. Determinación de trihalometanos en aguas mediante el acoplamiento de un generador de espacio de cabeza con un inyector de temperatura programada	79
1. INTRODUCCIÓN.....	81
2. OBJETIVOS.....	85
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	87
3.1. <u>Reactivos</u>	87
3.2. <u>Disoluciones estándar y muestras</u>	87
3.3. <u>Instrumentación HS-PTV-GC-MS</u>	88
3.4. <u>Procedimientos HS-PTV-GC-MS</u>	89
3.4.1. Generador de espacio de cabeza	89
3.4.2. Inyector de temperatura programada	89
3.4.3. Cromatógrafo de gases	90

3.4.4. Espectrómetro de masas.....	90
3.5. <u>Análisis de datos</u>	90
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	91
4.1. <u>Optimización de las condiciones experimentales del sistema HS-PTV-GC-MS</u>	91
4.1.1. Optimización de la separación cromatográfica.....	91
4.1.2. Estudio de los modos de inyección.....	92
4.1.3. Modos de adquisición de datos.....	103
4.2. <u>Calibración</u>	106
4.3. <u>Determinación de trihalometanos en diferentes matrices acuosas</u>	111
5. CONCLUSIONES	115
6. BIBLIOGRAFÍA.....	116
PUBLISHED ARTICLE IV₁	119
PUBLISHED ARTICLE IV₂	129

V. Método basado en el uso de un inyector de temperatura programada para la determinación de trihalometanos y benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos en suelos	149
1. INTRODUCCIÓN.....	151
2. OBJETIVOS.....	155
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	156
3.1. <u>Reactivos</u>	156
3.2. <u>Disoluciones estándar y muestras</u>	156
3.2.1. Muestras acuosas.....	156
3.2.2. Muestras de suelos.....	156
3.2.2.1. Suelos dopados	156
3.2.2.2. Materiales de referencia certificados	157
3.3. <u>Instrumentación HS-PTV-GC-MS</u>	158

3.4. <u>Procedimientos HS-PTV-GC-MS</u>	159
3.4.1. Muestreo de espacio de cabeza	159
3.4.2. Inyección a temperatura programada	159
3.4.3. Cromatografía de gases	161
3.4.4. Espectrometría de masas	161
3.5. <u>Análisis de datos</u>	165
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	166
4.1. <u>Optimización de las condiciones experimentales con disoluciones acuosas</u>	166
4.1.1. Parámetros del acoplamiento HS-PTV	166
4.1.2. Parámetros de cromatografía de gases	168
4.1.3. Condiciones del espectrómetro de masas	168
4.1.4. Tiempo de análisis	170
4.2. <u>Análisis de muestras de suelos</u>	171
4.2.1. Adición de agua y cloruro sódico	171
4.2.2. Efecto de matriz	175
4.2.3. Características analíticas del método	177
4.2.4. Determinación de los compuestos objeto de estudio en tres matrices diferentes de suelos con contenidos certificados	179
5. CONCLUSIONES	183
6. BIBLIOGRAFÍA	184
PUBLISHED ARTICLE V	189

VI. Propuesta de una versión simplificada de la metodología QuEChERS para la determinación de compuestos clorados en suelos	199
1. INTRODUCCIÓN	201
2. OBJETIVOS	204
3. PARTE EXPERIMENTAL	206

3.1. <u>Reactivos</u>	206
3.2. <u>Disoluciones estándar y muestras</u>	206
3.2.1. Disoluciones estándar.....	206
3.2.2. Muestras de suelos.....	206
3.3. <u>Instrumentación GC-μECD</u>	207
3.4. <u>Procedimiento analítico</u>	208
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	211
4.1. <u>Optimización de las variables involucradas en el método de extracción</u>	211
4.1.1. Selección del disolvente de extracción	211
4.1.1.1. Estudio de los dos disolventes en relación a su adecuación para el análisis cromatográfico.....	213
4.1.1.2. Estudio de los dos disolventes en relación a su eficacia en la extracción de compuestos de matrices de suelo	219
4.1.2. Adición de agua sobre las muestras.....	221
4.1.3. Selección de la relación g de muestra:mL de disolvente	222
4.1.4. Adición de diferentes combinaciones de sales.....	223
4.2. <u>Recuperaciones y reproducibilidad obtenidas con el método de extracción optimizado</u>	224
5. CONCLUSIONES	227
6. BIBLIOGRAFÍA.....	228
PUBLISHED ARTICLE VI	231

VII. Determinación de trihalometanos en suelos mediante QuEChERS simplificado-cromatografía de gases rápida-detección de captura electrónica	241
1. INTRODUCCIÓN.....	243
2. OBJETIVOS.....	245
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	246

3.1. <u>Reactivos</u>	246
3.2. <u>Disoluciones estándar y muestras</u>	246
3.2.1. Disoluciones estándar.....	246
3.2.2. Muestras	247
3.2.2.1. Suelos dopados.....	247
3.2.2.2. Materiales de referencia certificados	248
3.2.2.3. Muestras de agua	248
3.3. <u>Instrumentación</u>	248
3.4. <u>Procedimientos analíticos</u>	249
3.4.1. Pretratamiento de la muestra (QuEChERS)	249
3.4.2. Análisis mediante GC- μ ECD.....	251
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	252
4.1. <u>Variables involucradas en el proceso de extracción</u>	252
4.2. <u>Variables del análisis cromatográfico</u>	257
4.2.1. Parámetros cromatográficos	257
4.2.2. Parámetros del μ ECD	258
4.2.3. Condiciones cromatográficas optimizadas.....	259
4.3. <u>Estudio del efecto de matriz</u>	259
4.4. <u>Recuperaciones en diferentes matrices</u>	263
4.5. <u>Características analíticas del método en suelo de jardín contaminados</u>	264
4.6. <u>Determinación de THMs en dos materiales de referencia certificados</u>	266
5. CONCLUSIONES	268
6. BIBLIOGRAFÍA.....	269
ARTICLE SUBMITTED FOR PUBLICATION VII	273

VIII. Aplicación del método QuEChERS simplificado-cromatografía de gases rápida-espectrometría de masas para la determinación de trihalometanos y benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos en suelos.....	305
1. INTRODUCCIÓN.....	307
2. OBJETIVOS.....	310
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	311
3.1. <u>Reactivos</u>	311
3.2. <u>Disoluciones estándar y muestras</u>	313
3.2.1. Disoluciones estándar.....	313
3.2.2. Muestras de suelos.....	313
3.2.2.1. Suelos dopados	313
3.2.2.2. Materiales de referencia certificados	314
3.3. <u>Instrumentación PTV-GC-MS</u>	314
3.4. <u>Procedimientos analíticos</u>	314
3.4.1. Pretratamiento de la muestra (QuEChERS simplificado).....	314
3.4.2. Inyección a temperatura programada.....	315
3.4.3. Cromatografía de gases.....	315
3.4.4. Espectrometría de masas.....	315
3.4.5. Análisis de datos	316
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	317
4.1. <u>Optimización de las condiciones experimentales (PTV-GC-MS)</u>	317
4.1.1. Variables experimentales del PTV	317
4.1.2. Variables experimentales de la cromatografía de gases rápida	321
4.1.3. Variables experimentales del MS.....	322
4.1.4. Tiempo de análisis	323
4.2. <u>Análisis de muestras de suelos</u>	324

4.2.1. Efecto de matriz.....	324
4.2.2. Rendimiento de extracción para los compuestos en muestras de suelos	325
4.2.3. Características analíticas del método	327
4.2.4. Determinación de THMs y BTEX en materiales de referencia certificados.....	331
5. CONCLUSIONES	336
6. BIBLIOGRAFÍA.....	337
ARTICLE SUBMITTED FOR PUBLICATION VIII.....	341

IX. Determinación de compuestos orgánicos en nanopartículas de aerosoles procedentes de la combustión de madera mediante diferentes métodos basados en cromatografía de gases.....	375
1. INTRODUCCIÓN.....	379
2. OBJETIVOS.....	382
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	383
3.1. <u>Reactivos y disoluciones estándar</u>	383
3.2. <u>Sistema de muestreo</u>	383
3.3. <u>Preparación de las muestras para el análisis cromatográfico</u>	385
3.4. <u>Instrumentación y métodos</u>	386
3.4.1. GC-TOFMS y GC X GC-TOFMS	386
3.4.2. GC-QMS	388
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	390
4.1. <u>Características analíticas de los métodos</u>	390
4.1.1. GC X GC- TOFMS	391
4.1.2. GC-TOFMS.....	395
4.1.3. GC-QMS	397
4.2. <u>Comparación de las características analíticas de las técnicas cromatográficas</u>	398

4.3. <u>Comparación de las técnicas en la determinación de los compuestos de interés en muestras de aerosoles</u>	401
5. CONCLUSIONES	411
6. BIBLIOGRAFÍA.....	412
PUBLISHED ARTICLE IX	415
<hr/>	
X. CONCLUSIONES GENERALES	429
<hr/>	
XI. VERSIÓN RESUMIDA EN INGLÉS/<i>SUMMARY IN ENGLISH</i> .	433
 ANEXO I: Informes sobre el trabajo realizado/ APPENDIX I: Reports on developed work	
1. Prof. Bo Kalberg	
2. Dr. Anca-Iulia Stoica	

I

OBJETO

El objetivo general de este trabajo consiste en proponer y desarrollar nuevas metodologías rápidas, sensibles y con mínimo tratamiento de la muestra, basadas en cromatografía de gases, para la determinación de compuestos orgánicos a niveles de trazas en diferentes matrices ambientales.

La presencia de contaminantes en las matrices ambientales se ha convertido, durante los últimos años, en uno de los temas de mayor relevancia y preocupación a nivel mundial. Esto ha sido debido, entre otras cosas, al mayor conocimiento que se tiene actualmente sobre la persistencia, el carácter bioacumulativo, y los efectos tóxicos y carcinogénicos de muchas de las sustancias que están presentes en estas matrices. Como consecuencia, han surgido nuevas reglamentaciones ambientales, que establecen niveles máximos permitidos de estas sustancias, los cuales tienden a ser cada vez más restrictivos. En este contexto, es indiscutible la necesidad de desarrollar nuevos métodos analíticos, capaces de determinar los contaminantes a los niveles de concentración especificados por la ley y que al mismo tiempo se ajusten a la nueva tendencia en química analítica de minimización del uso de disolventes orgánicos, simplificación y automatización de los métodos. Dentro de esta tendencia se engloban las metodologías propuestas en este trabajo.

En cuanto a las muestras estudiadas, con el fin de abarcar una muestra representativa de la problemática medioambiental actual, se han considerado diferentes matrices ambientales: aguas, suelos y aerosoles.

Respecto a los analitos determinados, se han seleccionado, en cada caso, compuestos que son contaminantes habituales de la matriz objeto de estudio y que han sido considerados como contaminantes prioritarios por los principales organismos oficiales.

Los objetivos metodológicos de este trabajo se centran en el estudio de las posibilidades analíticas de:

- El acoplamiento de un generador de espacio de cabeza con un inyector de temperatura programada.
- El uso combinado de cromatografía de gases rápida con la introducción de muestra mediante el modo de inyección con eliminación del disolvente, permitido por el inyector de temperatura programada.
- La aplicación de la técnica de pretratamiento de muestra conocida como QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*) en la extracción de compuestos orgánicos en muestras de suelos.
- El uso combinado de mínimo tratamiento de la muestra con un método de separación altamente eficaz (cromatografía de gases en dos dimensiones completa (GC X GC)) en el análisis de muestras complejas.

Con el fin de estudiar las posibilidades analíticas de las metodologías propuestas, se han puesto a punto varios métodos destinados a la resolución de problemas ambientales concretos:

- Determinación de trihalometanos (THMs) en aguas mediante el acoplamiento de un generador de espacio de cabeza con un inyector de temperatura programada.
- Determinación de THMs y benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX) en muestras de suelos mediante generación de espacio de cabeza-inyección a temperatura programada-cromatografía de gases rápida-espectrometría de masas.
- Desarrollo de una simplificación del método QuEChERS para la extracción de compuestos clorados en muestras de suelos.

-
- Determinación de THMs en muestras de suelos mediante QuEChERS simplificado-cromatografía de gases rápida y detección mediante captura electrónica.
 - Determinación de THMs y BTEX en muestras de suelos mediante QuEChERS simplificado-cromatografía de gases rápida y detección mediante espectrometría de masas.
 - Determinación de compuestos orgánicos en nanopartículas de aerosoles procedentes de la combustión de madera mediante diferentes métodos cromatográficos.

II

INTRODUCCIÓN

La cromatografía de gases (*gas chromatography*, GC) es un método muy consolidado para el análisis de compuestos volátiles y semi-volátiles. Durante las últimas décadas se ha invertido mucho esfuerzo en el desarrollo de la técnica y hoy día es posible la separación de analitos en concentraciones a nivel de trazas, en tiempos de análisis muy cortos. Sin embargo, debido a la complejidad y diversidad de las muestras en las que se pretende determinar este tipo de compuestos, en muchas ocasiones, la etapa más crítica de un análisis mediante cromatografía de gases es la de preparación de la muestra.

La finalidad de la etapa de pretratamiento de la muestra es la de separar los compuestos objeto de estudio de la matriz en la que se encuentran y, en los casos en los que es necesario, preconcentrarlos hasta un nivel que pueda ser detectado por el método analítico. Algunas veces, cuando se trata de muestras complejas, esta etapa también incluye procedimientos de limpieza de los extractos con el fin de facilitar el análisis y evitar el deterioro del sistema cromatográfico y del detector utilizados. Estas técnicas de preparación de la muestra, que incluyen múltiples pasos, requieren tiempos prolongados, que en muchos casos superan el tiempo que se emplea posteriormente para el análisis mediante cromatografía de gases. Además, los métodos clásicos de pretratamiento de muestra habitualmente requieren el uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos, mucha manipulación de los extractos y constituyen una de las principales fuentes de error del método analítico.

En las últimas décadas, debido a la creciente preocupación social por el medio ambiente y la contaminación, así como a la implantación de nuevas reglamentaciones ambientales más restrictivas, ha surgido una nueva tendencia en Química Analítica que trata de restringir el uso de disolventes orgánicos. Como consecuencia, la utilización de técnicas que no utilizan disolventes, o utilizan volúmenes muy pequeños de los mismos, empezó a

extenderse y a afianzarse en muchos de los métodos analíticos propuestos en bibliografía y en los establecidos por los organismos oficiales.

Entre las técnicas que utilizan pequeños volúmenes de disolvente pueden citarse: extracción con fluidos supercríticos (*supercritical fluid extraction*, SFE), extracción líquida a presión (*pressurized liquid extraction*, PLE) y extracción con disolvente asistida por microondas (*microwave assisted extraction*, MAE). También han surgido técnicas basadas en la miniaturización de la técnica de extracción líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*, LLE), conocidas como microextracción con disolventes (*solvent microextraction*, SME) o microextracción en fase líquida (*liquid phase microextraction*, LPME). Dentro de éstas se pueden citar técnicas como la de microextracción en una gota (*single-drop microextraction*, SDME), extracción con disolvente soportado en membrana (*membrane assisted solvent extraction*, MASE), la técnica de microextracción líquido-líquido dispersiva (*dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME) o el método de extracción QuEChERS (*quick, easy, cheap, efficient, rugged and safe*).

También se han desarrollado técnicas que no requieren el uso de disolventes, como microextracción en fase sólida (*solid phase micro extraction*, SPME), microextracción mediante adsorbente empaquetado (*microextraction by packed sorbent*, MEPS), extracción por adsorción en barra agitadora (*stir bar sortive extraction*, SBSE) o introducción en espectrometría de masas a través de membrana (*membrane introduction mass spectrometry*, MIMS). Otra técnica cuya aplicación se ha extendido en los últimos años es la de generación de espacio de cabeza, bien sea en las modalidades clásicas de generación de espacio de cabeza estático (*static headspace*, SHS) y Purga y Trampa (*Purge and Trap*, P&T), en la modalidad más reciente de HS-SPME, o en las nuevas posibilidades de acoplamiento de HS con las técnicas de SDME o MASE.

A pesar de que la aceptación de estas nuevas técnicas de pretratamiento ha sido muy lenta, aportan numerosas ventajas respecto a los procedimientos clásicos, ya que, además de consumir menor cantidad de disolventes, requieren volúmenes de muestra más pequeños, son mucho más rápidas, más selectivas y más fácilmente automatizables.

Los objetivos de esta Tesis Doctoral se enmarcan dentro de esta nueva tendencia. A lo largo de esta memoria se propondrán diferentes metodologías, rápidas, sensibles y con mínimo tratamiento de muestra, para la determinación de compuestos orgánicos en diferentes matrices ambientales.

En este apartado se resumirán los orígenes y evolución las de las técnicas de pretratamiento de muestra utilizadas a lo largo de la memoria. También se describirán los aspectos más relevantes del análisis cromatográfico, en lo que se refiere a los sistemas de inyección de muestra utilizados y a las diferentes modalidades de cromatografía de gases empleadas en el desarrollo de las diferentes aplicaciones.

1. TÉCNICAS DE PRETRATAMIENTO DE MUESTRA

1.1. Generación de espacio de cabeza

La generación de espacio de cabeza (HS) es una técnica utilizada para la separación de los compuestos volátiles de una muestra. Se denomina espacio de cabeza a la fase gaseosa en contacto con la muestra (líquida o sólida). Puede acoplarse a diversas técnicas analíticas de separación y medida, pero se ha utilizado principalmente acoplada a cromatografía de gases (GC), debido a que ésta es una técnica muy apropiada para el análisis de muestras gaseosas [1].

El procedimiento de generación del espacio de cabeza puede llevarse a cabo de forma estática y dinámica.

En HS estático (SHS) la muestra se introduce en un vial dejando un volumen libre sobre ella. El vial se cierra herméticamente y se introduce en un horno, de modo que los volátiles se separan de la matriz y al cabo de un tiempo se establece el equilibrio entre ambas fases. Una vez alcanzado el equilibrio, una porción de los volátiles generados se inyecta en el cromatógrafo de gases.

A partir de esta modalidad, a la que también se ha denominado HS “en un paso”, se han desarrollado diversas modificaciones, entre las que puede citarse la inclusión de trampas de adsorción o de trampas que contienen un disolvente orgánico, cuyo propósito es separar los analitos volátiles de interés del resto de los compuestos de la fase gaseosa.

En 1989 Pawliszyn y su grupo de investigación introdujeron la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) [2,3]. Una fibra de sílice fundida, cuya superficie externa está recubierta con una fase estacionaria inmovilizada, se introduce en el vial que contiene la muestra. Al cabo de un tiempo los volátiles quedan adsorbidos en la fibra, ésta se introduce en la cámara de vaporización del inyector del cromatógrafo de gases y los

analitos son transferidos a la columna cromatográfica por desorción térmica. La fibra puede sumergirse en el líquido o permanecer en el espacio de cabeza sobre la muestra líquida o sólida. En el caso en que esta técnica se utilice para extraer los volátiles del espacio de cabeza de la muestra se denomina HS-SPME. Este acoplamiento se utilizó por primera vez en 1993 [4] y desde entonces ha sido empleado para resolver numerosos problemas analíticos.

En los últimos años, la modalidad SHS se ha utilizado combinada con técnicas de microextracción en fase líquida, como SDME [5] o MASE [6]. En estos casos, la gota de disolvente orgánico o la membrana en la que está soportado el disolvente se sitúan suspendidas sobre la muestra, durante el proceso de generación de espacio de cabeza, de manera que se establece un equilibrio de distribución de los analíticos entre la fase gaseosa y el disolvente orgánico. Finalmente, el disolvente con los analitos preconcentrados se inyecta en el cromatógrafo de gases para proceder a su análisis.

El modo de generación de espacio de cabeza continuo o dinámico fue sugerido por primera vez en 1962 por Swinnerton y colaboradores [7,8]. Bellar y Lichtenberg [9] desarrollaron la técnica y la denominaron Purga y Trampa (P&T). En esta modalidad no se establece el equilibrio entre las dos fases del vial, sino que la separación de los volátiles se lleva a cabo retirando continuamente la fase gaseosa, hasta que todos los analitos volátiles han sido extraídos de la muestra. Se utiliza un flujo de gas inerte sobre la muestra sólida o líquida, o bien se hace burbujear el gas a través de la muestra líquida. Los volátiles purgados están diluidos en el gas extractante y es necesario focalizarlos en una trampa antes de introducirlos en la columna cromatográfica. Esta focalización puede hacerse mediante trampa fría, aunque generalmente se ha utilizado un cartucho empaquetado con un material adsorbente, a partir del cual los volátiles se transfieren a la columna cromatográfica por desorción térmica.

Con la generación de espacio de cabeza se pueden analizar los compuestos volátiles de una muestra sin interferencias de los compuestos no volátiles de la matriz. Se trata de un proceso de extracción sencillo, que minimiza la etapa de pretratamiento de la muestra, reduciendo considerablemente los errores asociados a la misma, el tiempo y el coste del análisis.

El método HS estático es la alternativa más sencilla, con mayor grado de automatización y la más rápida. El acoplamiento de esta modalidad estática presenta, a veces, la desventaja del ancho de banda inicial cuando se introducen volúmenes grandes de muestra para aumentar la sensibilidad. Se han descrito algunas modificaciones en las que se reduce este problema mediante técnicas de enfoque criogénico [1], con las que se consiguen niveles de sensibilidad del mismo orden que los obtenidos con las técnicas de Purga y Trampa y HS-SPME.

La sensibilidad de la metodología HS-GC depende, aparte del detector, de la capacidad de la columna cromatográfica, que a su vez está condicionada por el ancho de banda inicial y la consiguiente disminución de la resolución cromatográfica [10].

El espacio de cabeza está constituido por una muestra gaseosa más o menos diluida. El problema que se plantea al introducir la muestra en el cromatógrafo de gases es cómo introducir el mayor volumen de muestra posible, para alcanzar los niveles de sensibilidad deseados, y además hacerlo de forma rápida para reducir el ancho de banda inicial del cromatograma.

Cuando se acopla un generador de espacio de cabeza con un cromatógrafo de gases mediante un inyector convencional se pueden utilizar los modos de inyección habituales en GC:

- Inyección con división (*split*), con la que se inyecta en la columna cromatográfica una porción de los volátiles generados en el HS de

forma rápida. Con este método a veces no se alcanza la sensibilidad necesaria para el análisis a nivel de trazas.

- Inyección sin división (*splitless*), con la que se introduce en la columna cromatográfica prácticamente la totalidad de volátiles procedentes del HS. Esto hace que la sensibilidad sea mayor, pero la velocidad de inyección es lenta, por lo que la resolución de la zona inicial del cromatograma es baja.

En el libro publicado por el grupo de investigación de Bruno Kolb [1] se ponen de manifiesto algunas técnicas que se han empleado para solucionar los problemas planteados. Se trata de técnicas de enriquecimiento por trampa criogénica. Con estas técnicas se consigue la preconcentración de los analitos y su posterior introducción rápida en la columna cromatográfica.

Los primeros dispositivos consistían en trampas con forma de U, fabricadas con metal o vidrio, que se introducían en un baño de nitrógeno líquido o argón. Una vez conseguida la condensación de los analitos en el interior del tubo, el líquido criogénico era retirado manualmente del baño antes de que la trampa fuera calentada, en la mayoría de los casos eléctricamente, para conseguir la evaporación de los analitos condensados. Posteriormente, surgen algunos avances para evitar la eliminación manual del líquido criogénico. En lugar de un baño se utiliza un tubo de teflón que rodea la trampa en forma de U y un flujo de agua caliente desplaza al nitrógeno líquido una vez finalizada la preconcentración de los compuestos.

Más adelante surgen trampas en las que el enfriamiento se consigue mediante una corriente de gas y la posterior vaporización de los analitos sustituyendo el flujo de gas frío por uno de gas caliente. Con el fin de evitar la corriente de gas caliente necesaria para conseguir la vaporización, surge la idea de introducir el dispositivo en el interior del cromatógrafo de gases, de modo que, una vez que el flujo de gas frío deja de circular, la trampa adquiere rápidamente la temperatura del horno del GC.

Esta estrategia se ha llevado a cabo, principalmente, enfriando la parte inicial de la columna cromatográfica mediante una corriente de nitrógeno gas (previamente enfriado en el exterior del cromatógrafo), que se hace circular a través de un tubo de teflón que rodea la parte inicial de la columna. También se han utilizado flujos de N₂ líquido o CO₂ líquido. La muestra condensa en cabeza de columna y posteriormente se aumenta progresivamente la temperatura para que el disolvente eluya rápidamente, mientras que los analitos, con mayor punto de ebullición, permanecen en una banda estrecha.

Este sistema tiene diversas limitaciones. Primero, el flujo a través de la región enfriada está limitado por el flujo en columna. En segundo lugar, el atrapamiento en cabeza de columna a baja temperatura no retiene únicamente los analitos, si no que también se atrapan impurezas o materiales indeseables, por lo que frecuentemente hay que cortar secciones de columna para eliminar este material interferente. Por último, cuando la preconcentración se produce a temperaturas bajo cero pueden producirse problemas de bloqueo del flujo en columnas capilares por congelación de agua [11,12,13].

Una alternativa es el uso de pre-columnas, que consisten en una sección de columna cromatográfica desactivada que se conecta a la parte inicial de la columna en la que se va a realizar la separación de los compuestos. Estos dispositivos son más fácilmente reemplazables, aunque requieren una conexión apropiada a la columna cromatográfica.

Además del bloqueo del flujo en columna por formación de hielo, la presencia de agua en GC puede dar lugar a distorsión de la forma de pico, particularmente de aquellos compuestos con menor tiempo de retención que eluyen junto con el agua. Para resolverlo se han desarrollado diversas técnicas para eliminar el exceso de vapor de agua antes de introducir la muestra en la columna cromatográfica. En la técnica de HS dinámico se

utilizan membranas semipermeables y condensadores de reflujo. Cuando se utiliza HS estático, el volumen de vapor de agua generado es menor y suele eliminarse mediante adsorción química selectiva sobre una sal inerte higroscópica [10].

El principal problema de las trampas criogénicas utilizadas es que suelen ser de fabricación manual y requieren una alta cualificación para ser manejadas de forma adecuada. Esto pone de manifiesto la necesidad de dispositivos disponibles en el mercado y fácilmente automatizables que sean capaces de solucionar los problemas del acoplamiento HS-GC, para conseguir niveles de sensibilidad apropiados para el análisis de trazas, sin comprometer la resolución de la zona inicial del cromatograma.

Una posible alternativa es la utilización de los dispositivos comerciales denominados inyector de temperatura programada (*Programmed temperature vaporizers*, PTVs). Esta es la vía que se tratará de poner a punto en este trabajo.

1.2. QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*)

La técnica de extracción líquido-líquido (LLE) es una de las técnicas de preparación de muestra más consolidadas en los laboratorios de análisis. La versión clásica se ha utilizado durante muchos años, y aún hoy sigue siendo uno de los métodos de rutina más empleados. Es un procedimiento sencillo, que no requiere equipamiento específico y supone un pequeño coste. Sin embargo, implica mucha manipulación de la muestra, tiempos de análisis prolongados y utiliza grandes cantidades de disolventes orgánicos cuyo uso está cada vez más restringido. Como se ha citado anteriormente en esta memoria, la tendencia actual consiste en desarrollar versiones miniaturizadas del procedimiento convencional a las que se ha denominado técnicas de microextracción con disolventes (SME).

El fundamento de LLE consiste en la separación de compuestos que tienen solubilidades diferentes en dos líquidos inmiscibles. Generalmente se

ha aplicado para la extracción de compuestos orgánicos en agua o matrices acuosas (frutas, verduras, fluidos biológicos...). Como disolvente de extracción se utiliza un disolvente orgánico apolar (inmiscible con el agua) de manera que los compuestos no polares, con mayor afinidad por la fase orgánica, se extraen en esta fase. El inconveniente de utilizar disolventes no polares es que la eficacia de la técnica para la extracción de compuestos orgánicos altamente polares es muy limitada. Sin embargo, el uso de disolventes más polares, parcial o totalmente, miscibles con el agua no es posible ya que no se consigue una adecuada separación de fases.

Para solucionar este inconveniente y poder ampliar la aplicación de la técnica LLE a la extracción de compuestos polares, se ha utilizado la adición de sales. El procedimiento consiste en añadir una alta concentración de sales sobre la mezcla de agua con un disolvente orgánico miscible o parcialmente miscible y, por la solvatación de los iones de las sales con las moléculas de agua, se consigue la separación de las dos fases miscibles (acuosa/orgánica) [14]. Este fenómeno se conoce como separación de fases inducida por sales y el procedimiento de extracción basado en este principio se denominó extracción líquido-líquido asistida por sales (*salting-out assisted liquid-liquid extraction*, SALLE) [15].

La principal desventaja de la técnica SALLE radica en que el extracto orgánico obtenido suele contener muchos compuestos polares co-extraídos de la matriz que, en muchas ocasiones, interfieren en la determinación de los compuestos objeto de estudio. Este hecho hace que, en la mayoría de los casos, sea necesario someter al extracto orgánico a diversas etapas de limpieza antes de llevar a cabo el procedimiento de determinación [15]. Otra posibilidad es la de analizar directamente el extracto, utilizando un detector altamente selectivo.

Las aplicaciones de esta técnica de extracción se han centrado especialmente en el área del análisis de pesticidas. El primer método multi-

residuo (MRM, *multiresidue method*) que se desarrolló para el análisis de pesticidas en matrices alimenticias data de 1963 y es el denominado método Mills. La extracción de los compuestos se conseguía con acetonitrilo, y para lograr la separación de fases (acetonitrilo/agua) se utilizaron éter de petróleo y cloruro sódico [16].

También se desarrollaron métodos que utilizaban acetona, como disolvente de extracción, en lugar de acetonitrilo (MeCN) [17-19]. En todos ellos se utilizó un disolvente no polar (diclorometano o éter de petróleo) y cloruro sódico para lograr la separación de fases.

Los métodos citados, junto con las numerosas variaciones que se han desarrollado a partir de ellos, siguen utilizándose hoy día para el análisis de pesticidas en muchos laboratorios de todo el mundo.

A partir de los años 70, como consecuencia de los problemas para la salud humana y el medio ambiente, relacionados con el uso de disolventes clorados, se desarrollaron nuevos métodos basados en SALLE en los que se conseguía la separación de fases simplemente añadiendo sales, es decir sin necesidad de utilizar disolventes apolares para inducir la separación de fases.

Algunas de las investigaciones se centraron en el sistema acetona-agua. Luke y colaboradores consiguieron la separación de ambas fases añadiendo una combinación de fructosa, sulfato de magnesio y cloruro sódico [20]. Otros autores lograron esta separación de fases utilizando diferentes combinaciones de sales [21,22]. Sin embargo, todos estos procedimientos tienen diversos inconvenientes debido a que la acetona es demasiado miscible con el agua como para lograr una adecuada separación de fases sin la adición de disolventes apolares.

Otros estudios evaluaron el sistema acetonitrilo-agua. El acetonitrilo es menos miscible con el agua que la acetona, por lo que es posible lograr una separación de fases satisfactoria con la adición de la cantidad adecuada de

sales. Lee y colaboradores utilizaron cloruro sódico para este propósito [23] y desde entonces se han publicado numerosos artículos que utilizan este método o pequeñas variaciones del mismo para la determinación de pesticidas en diferentes matrices [24-28].

Otro disolvente que se ha utilizado en el análisis de pesticidas es el acetato de etilo (EtOAc) [29-33]. Éste, tiene la ventaja de ser lo suficientemente miscible con el agua como para lograr una adecuada penetración en los tejidos vegetales [34] y además, su solubilidad en agua es menor que la de los otros disolventes citados, por lo que la separación de fases se consigue fácilmente con la adición de una sal desecante, capaz de eliminar el agua que queda en la fase orgánica [35,36].

Durante los últimos 40 años también se han desarrollado, aunque en mucha menor proporción, algunos métodos basados en SALLE que se han aplicado a la determinación de compuestos que no son pesticidas. Matkovich y Christian aplicaron la separación inducida por sales del sistema acetona-agua en la extracción de quelatos metálicos [37]. Leggett y colaboradores realizaron un estudio en el que utilizaban el sistema acetonitrilo-agua con separación de fases inducida por cloruro sódico para la determinación de concentraciones traza de explosivos en agua [38]. Además, la USEPA ha propuesto un método (8330B) para la determinación de compuestos nitroaromáticos, nitroaminas y ésteres de nitrato, basado en la separación de fases acetonitrilo-agua inducida con cloruro sódico [39].

En el año 2003, Anastassiades y Lehotay [35] modificaron la técnica SALLE para adaptarla a las exigencias medioambientales y analíticas vigentes. El nuevo método mantiene la simplicidad y eficacia del procedimiento convencional pero utiliza la menor cantidad posible de muestra, así como una pequeña cantidad de disolventes orgánicos y material básico de laboratorio. La técnica se diseñó para la extracción de una amplia gama de pesticidas en matrices de frutas y verduras y se le

asignó el nombre acrónimo de QuEChERS, que hace referencia a sus principales ventajas: rápido, sencillo, barato, eficaz, robusto y seguro.

En el desarrollo del método se estudiaron diferentes disolventes de extracción (acetato de etilo, acetonitrilo y acetona), y con todos ellos se obtenían altas recuperaciones de los pesticidas de interés. Finalmente, se seleccionó el acetonitrilo debido a que presentaba mayor selectividad en la extracción de estos compuestos. Sin embargo, trabajando con otras matrices u otro tipo de compuestos cualquiera de los disolventes citados podría ser adecuado. También se estudiaron diferentes combinaciones de sales para lograr la separación de fases, seleccionando una mezcla de NaCl y MgSO₄ (1:4) que era la más apropiada para lograr altas recuperaciones de los pesticidas más polares, al mismo tiempo que se evitaba la co-extracción de muchos compuestos polares de la matriz.

Además, los autores del método también simplificaron el procedimiento de limpieza que se empleaba tras la etapa de extracción. El nuevo procedimiento de limpieza se denominó extracción en fase sólida dispersiva (*dispersive solid phase extraction*, d-SPE). El proceso consiste en añadir un determinado volumen del extracto orgánico en un vial que contiene una pequeña cantidad de un material adsorbente, generalmente se ha utilizado amina primaria-secundaria (*primary secondary amine*, PSA). La mezcla se agita con un Vortex de manera que, idealmente, los compuestos interferentes de la matriz quedan retenidos en el adsorbente, mientras que los analitos objeto de estudio permanecen en el extracto. El siguiente paso es la eliminación del material adsorbente, mediante filtrado o centrifugación, y tras esta etapa el extracto orgánico queda listo para su análisis. Este procedimiento ha demostrado ser altamente eficaz en la eliminación de gran parte de los compuestos lipídicos co-extraídos de la matriz. Además, es más rápido, más sencillo y requiere menos disolventes y materiales que el proceso de SPE convencional.

En la figura 1 se han representado de forma detallada las diferentes etapas del proceso completo (extracción + limpieza) desarrollado inicialmente para la extracción de pesticidas en matrices de frutas y verduras.

Figura 1: Etapas del procedimiento QuEChERS original

A partir del procedimiento original, han surgido diversas modificaciones como la utilización de diferentes disoluciones tamponadas para mejorar la eficacia de la extracción de compuestos con propiedades ácido-base [40-43]. Otra variación que ha surgido es la adición de agua sobre muestras secas,

con el fin de obtener la humedad adecuada [44-48]. En la etapa de limpieza, mediante d-SPE, también se han desarrollado algunas modificaciones relacionadas con el uso de diferentes materiales adsorbentes. En el caso de matrices con alto contenido en grasas, se ha recomendado el uso de C₁₈, junto con la PSA, ya que proporciona una limpieza adicional de los compuestos lipídicos co-extraídos [41,49]. Por otro lado, el uso de negro de carbón grafitado (GCB) ha demostrado su eficacia en la eliminación de clorofilas de los extractos [49]. También se han desarrollado algunas aplicaciones en las que se utiliza el procedimiento de limpieza mediante SPE clásica, en cartuchos [50-52].

El método ha recibido gran aceptación a nivel mundial y ha sido validado en estudios interlaboratorios para numerosos pesticidas en diversas matrices de alimentos [53-64]. Recientemente, ha recibido la distinción de Método Oficial de la AOAC Internacional (*Association of Analytical Communities*) [65].

A pesar de que originalmente QuEChERS surgió como un método particular para el análisis de pesticidas en matrices alimentarias, su eficacia y flexibilidad lo han convertido en una potente herramienta, que está empezando a ser utilizada para la determinación de otro tipo de compuestos y con otras matrices. Entre otros ejemplos pueden citarse: la determinación de compuestos farmacéuticos en sangre [66], antibióticos β -lactámicos [67,68] o fármacos en fluidos de animales [68-72].

El uso de QuEChERS con matrices de suelos ha sido muy limitado hasta la fecha [73,74] y en ambas publicaciones el método se aplica a la determinación de pesticidas. Sin embargo, la aplicación de esta técnica a la extracción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) en suelos no se ha propuesto hasta el momento.

En la presente memoria se pondrá a punto una modificación del método QuEChERS, adaptada a muestras de suelos, para la extracción de VOCs de dichas matrices.

2. ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES

En este apartado se detallarán los aspectos relacionados con la inyección de la muestra y las diferentes modalidades de cromatografía de gases empleadas.

El inyector utilizado en la mayor parte de las metodologías propuestas es un PTV. En las aplicaciones en las que el pretratamiento de la muestra se ha llevado a cabo mediante el método QuEChERS, los extractos orgánicos obtenidos se inyectaron directamente en el PTV. También se ha utilizado el acoplamiento SHS-PTV, muy poco estudiado hasta el momento, cuyas características más importantes se describirán en ese apartado.

En lo referente al análisis cromatográfico, se describirán los principales aspectos de la cromatografía de gases rápida (modalidad empleada en la mayor parte de las aplicaciones desarrolladas) y de la cromatografía de gases en dos dimensiones completa (utilizada en el análisis de una mezcla compleja).

2.1. Inyección de las muestras: inyector de temperatura programada (PTV)

2.1.1. Inyección de muestras líquidas

El concepto de introducción de muestra a temperatura programada fue descrito por K. Abel en 1964 [75]. En 1979 Vogt y colaboradores presentaron por primera vez un sistema de inyección PTV [76,77].

A principios de los ochenta, los grupos de Poy [78] y Schomburg [79] exploraron las posibilidades de la inyección en frío y desarrollaron sistemas de inyección universales.

A partir de este momento, diversos autores han realizado investigaciones metodológicas en el uso del inyector PTV. El número de publicaciones sobre este tipo de inyector pone de manifiesto su interés y

potencial para la introducción de muestras en cromatografía de gases, como puede verse en la revisión bibliográfica realizada por Engewald y colaboradores en 1999 [80].

Tradicionalmente se ha utilizado para la inyección de muestras líquidas, aplicación en la que aporta nuevas posibilidades y ventajas respecto a los inyectores convencionales.

Las técnicas convencionales de inyección de muestras líquidas en cromatografía de gases pueden dividirse en técnicas con evaporación previa y técnicas de inyección en columna.

En las técnicas con evaporación previa, la cámara de vaporización del inyector (*liner*) se mantiene a alta temperatura (generalmente en el margen de 250 °C a 350 °C) para facilitar la evaporación rápida de la muestra. Estos inyectores permiten dos modos de inyección: inyección con división de muestra (*split*) e inyección sin división (*splitless*).

La técnica de inyección en columna se utiliza generalmente con muestras que se descomponen por encima de su punto de ebullición [81]. La disolución se inyecta directamente en la columna, sin pasar por un inyector caliente, con lo que se consigue evitar la degradación térmica y la discriminación de los analitos, que pueden ocurrir en la cámara de vaporización. Desafortunadamente, en el caso de muestras con una cantidad considerable de analitos no volátiles, o en muestras con alto contenido de agua, se produce una disminución de la eficacia y estabilidad de la separación cromatográfica [80,82,83]. Además, la retención de impurezas en la columna cromatográfica acorta la vida de la misma. Esta técnica se ha utilizado para la inyección de grandes volúmenes de muestras líquidas (>2µL) en GC mediante el uso de pre-columnas. En este dispositivo se produce la separación del disolvente y los analitos, a una temperatura apropiada, seguida de la transferencia de los analitos a la columna cromatográfica. Además de posibilitar la inyección de grandes volúmenes,

la pre-columna retiene parte de las impurezas de la muestra. Sin embargo, una porción de ellas sigue pasando a la columna cromatográfica, por lo que este modo de inyección no se considera apropiado para el análisis de muestras con concentraciones altas de analitos no volátiles [82,84].

El PTV consta de los mismos elementos que un inyector tradicional, pero está equipado de un sistema de enfriamiento y calentamiento muy eficiente (figura 2), gracias al cual la temperatura del inyector se controla de forma programada durante la inyección de la muestra. Esta característica hace que el PTV permita una gran variedad de modos de inyección entre los que se encuentran los clásicos *split/splitless*:

- Inyección *split* en caliente.
- Inyección *split* en frío.
- Inyección *splitless* en caliente.
- Inyección *splitless* en frío.
- Inyección con purga de disolvente (*solvent vent*).

Figura 2: Inyector de temperatura programada (PTV)

También es posible, utilizando el *liner* apropiado, la introducción de muestras líquidas en columna. Los resultados son comparables a los obtenidos con este mismo modo de inyección en un inyector convencional, pero con la ventaja de que el PTV permite trabajar más fácilmente con muestras con alto contenido en componentes no volátiles, gracias al control programado de temperatura [80,85].

Una de las ventajas del PTV respecto a los inyectores convencionales son los modos de inyección en frío. El inyector se encuentra a baja temperatura en el momento que la muestra líquida es inyectada, y una vez finalizada la inyección, el *liner* se calienta progresivamente, controlando la evaporación de compuestos con distintos puntos de ebullición. Con la inyección en frío se elimina la discriminación debida a las diferencias en los puntos de ebullición de los analitos [78,79,84,86], que puede ocurrir con las técnicas de inyección convencionales en caliente. Por otro lado, la degradación térmica aparece en menor proporción, ya que, los compuestos no reciben un choque brusco de temperatura y sólo es necesario calentarlos a la menor temperatura requerida para que sean transferidos a la columna cromatográfica [84,86].

La principal ventaja del inyector PTV es la posibilidad de inyectar grandes volúmenes de muestra (*large volumen injection, LVI*) [76,77]. Con este dispositivo es posible introducir en el sistema cromatográfico volúmenes de muestra superiores a 100 μL . Esto es una gran ventaja, ya que, se consigue mejorar significativamente la sensibilidad del método analítico respecto a los inyectores convencionales, en los que se introducen volúmenes de muestra de 1 a 2 μL [82,85]. Esta característica es posible gracias a la eliminación o purga del disolvente a baja temperatura, antes de transferir la muestra a la columna cromatográfica. Este modo de inyección se conoce con el nombre de *solvent vent*. En condiciones generales, el PTV se programa de modo que, en el momento en que la muestra es inyectada, el *liner* está a una temperatura ligeramente inferior al punto de ebullición del

disolvente y la válvula de desecho está abierta. Como consecuencia, el disolvente se elimina a través de dicha válvula mientras que los analitos, de mayor punto de ebullición, permanecen condensados en el *liner*. Una vez eliminado el disolvente, la válvula de desecho se cierra y los analitos son transferidos a la columna mediante un rápido calentamiento del *liner* [80].

Para aumentar la retención de los analitos en el *liner* durante la purga del disolvente y minimizar las pérdidas de los mismos, se han utilizado diferentes materiales adsorbentes empaquetados. En los primeros estudios realizados por Herraiz [87] y colaboradores se utilizaron Tenax® y lana de vidrio. Más adelante se estudiaron otras alternativas como el politetrafluoroetileno (PTFE) y la poliimida [88]. Hoy día existen *liners* empaquetados comercialmente disponibles. Entre ellos, los más comunes son los empaquetados con: lana de vidrio, lana de cuarzo, Tenax-TA®, polidimetilsiloxano, Carbotrap B y Carbotrap C. También están disponibles *liners* vacíos con diferentes configuraciones: recto convencional, con configuración en zig-zag o recto con muesca.

A partir del modo de inyección *solvent vent* han surgido nuevas modificaciones, cuya finalidad es la de posibilitar la inyección de volúmenes de muestra aún mayores.

Una posibilidad es la de repetir varias veces la inyección de la muestra, mediante un proceso denominado inyección múltiple. En este caso la evaporación del disolvente se produce varias veces consecutivamente y al final de las inyecciones, el PTV se calienta hasta la temperatura requerida para que todos los analitos pasen a la columna cromatográfica.

Otra alternativa a la técnica de inyecciones múltiples consiste en la inyección a velocidad controlada. En este caso, se sustituye la introducción repetida de pequeñas porciones de muestra por un proceso continuo. La inyección y la evaporación tienen lugar de manera simultánea, ya que, se mantiene un equilibrio entre la muestra inyectada en estado líquido y el

disolvente eliminado en fase vapor. Con esta técnica el volumen de inyección puede ser superior a 1000 μl [84].

Las ventajas del PTV, junto a la disponibilidad comercial de este tipo de inyector, han hecho que sea altamente atractivo para análisis de compuestos a nivel de trazas. La principal aplicación de los inyectores PTV ha sido la inyección de grandes volúmenes de muestras líquidas, operando en el modo de inyección con purga del disolvente.

Esta metodología se ha aplicado recientemente en la determinación de cannabinoides en fluidos biológicos [89], fenoles [90], compuestos polibromados [91], hidrocarburos policíclicos aromáticos (PHAs) [92,93], pentaclorobencil hidroxilamina [94] y pesticidas [85,95] entre otros.

Se han desarrollado otras aplicaciones del PTV, como la posibilidad de utilizarlo como mecanismo de preparación de muestra, mediante la combinación con técnicas de microextracción o con procesos de derivatización, simplificando así esta etapa y consiguiendo el acoplamiento en línea de GC con los procesos de pretratamiento de la muestra. Además, permite la inyección directa de muestras acuosas mediante el uso de adsorbentes hidrofóbicos en el interior del *liner* [80].

2.1.2. Acoplamiento HS-PTV

En la bibliografía consultada apenas se han encontrado trabajos en los que se utilice la configuración instrumental SHS-PTV-GC. Los dispositivos que se han utilizado más frecuentemente, con el fin de conseguir el enfoque criogénico del espacio de cabeza, son de fabricación manual y poco automatizables (como se detalló en el apartado 1.1.). Se han encontrado algunas notas sobre el acoplamiento de este tipo de dispositivos en los informes técnicos de las casas comerciales [96]. Además, en un artículo publicado en 1993 por J. Efer y colaboradores, se utilizaba esta configuración para la determinación de Ethephon (ácido 2-

cloroetilfosfónico), un regulador del crecimiento de plantas, en agua de consumo. El HS utilizado tenía un sistema de inyección manual, de forma que los volátiles se extraían del vial mediante una jeringa y posteriormente se inyectaban en el *liner* del PTV [97].

En relación con el HS dinámico tampoco se han encontrado muchas aplicaciones del acoplamiento P&T-PTV en la bibliografía consultada. El único estudio que se ha encontrado es el realizado en 1998 por R. Eiden y colaboradores, que proponen la determinación automática de compuestos organoestánicos en agua mediante P&T-PTV-GC-MS [98].

Uno de los objetivos de esta memoria es el de estudiar las posibilidades del acoplamiento SHS-PTV. En este trabajo, el acoplamiento de ambos módulos se realizó mediante una línea de transferencia inerte termostatada. La investigación se ha centrado en el estudio detallado de las características de este acoplamiento en concreto. Sin embargo, cabe destacar la existencia de otras posibilidades en el acoplamiento SHS-PTV, como es la inyección del espacio de cabeza en el PTV mediante una jeringa. En la figura 3 se ha representado un esquema de la configuración HS-PTV utilizada en este trabajo.

Figura 3: Esquema del acoplamiento HS-PTV utilizado en este trabajo

El control programado de la temperatura permite seleccionar la temperatura del inyector durante el tiempo en que el espacio de cabeza está siendo transferido al inyector, por lo que, de manera general, se puede considerar que la introducción de la muestra se puede realizar en frío o en caliente. Por otro lado, dentro de cada una de estas dos modalidades es posible seleccionar diferentes modos de inyección. En los apartados que siguen se describirán las principales diferencias entre la introducción de muestra en caliente y en frío, así como cada uno de los modos de inyección permitidos por el PTV.

2.1.2.1. Diferencias entre introducción de espacio de cabeza en caliente y en frío

La secuencia de etapas implicadas en el análisis de una muestra mediante HS-PTV-GC, una vez transcurrido el tiempo necesario para la generación de espacio de cabeza, se recoge en las figuras 4a y 4b, que

corresponden a un proceso de introducción de muestra en caliente y en frío, respectivamente. Se han representado los perfiles típicos de temperaturas para la línea de transferencia, el *liner* del PTV y la columna cromatográfica.

Figura 4: Secuencia de procesos en un proceso de introducción de muestra en caliente (a) y en frío (b)

La primera etapa es común en ambas modalidades de introducción de muestra. La muestra procedente del espacio de cabeza es conducida hasta el PTV a través de la línea de transferencia, calentada a alta temperatura para evitar la condensación de los analitos a lo largo de la misma.

En el instante en que comienza la transferencia del espacio de cabeza, se activan las rampas de temperaturas del PTV y del horno del cromatógrafo de gases.

La transferencia de la muestra del PTV al GC será distinta en función de que se trate de una inyección en caliente o en frío. En un proceso de introducción de muestra en caliente (figura 4a), el inyector se comporta como una parte más de la línea de transferencia. Se mantiene a alta

temperatura (superior a 200 °C) durante el tiempo de análisis, por lo que, no se produce retención de los analitos en el *liner*. A medida que éstos van llegando al inyector lo atraviesan, pasando a la columna del cromatógrafo de gases según el modo de inyección seleccionado. El proceso de transferencia del espacio de cabeza y el de transferencia de la muestra desde el PTV al cromatógrafo de gases se solapan en el tiempo, por tanto, la transferencia de la muestra a la columna cromatográfica es progresiva y lenta.

En un proceso de introducción de muestra en frío (figura 4b), el inyector está a baja temperatura durante el tiempo de transferencia de la muestra desde el generador de espacio de cabeza hasta el PTV, por lo que los volátiles condensan en el *liner*. Una vez transcurrido el tiempo de transferencia del espacio de cabeza, el inyector se calienta rápidamente, transfiriendo los analitos a la columna, dónde tiene lugar la separación cromatográfica. Por tanto, se consigue una focalización de los analitos en el *liner* y la transferencia de la muestra desde el PTV al GC es mucho más rápida que en el caso de la inyección en caliente.

2.1.2.2. Modos de inyección permitidos por el PTV

Además de programar la rampa de temperaturas del *liner*, el PTV permite seleccionar distintos modos de inyección. La diferencia entre estos modos de inyección radica en el tiempo que permanece abierta la válvula de desecho (también denominada válvula de *split*) y el flujo de gas portador que circula a través de ella, factores ambos que determinan el volumen de muestra inyectado en la columna cromatográfica.

2.1.2.2.1. Inyección *split*

La válvula de desecho está abierta durante todo el proceso. Una porción de los volátiles que llegan al inyector pasa a la columna cromatográfica, mientras que el resto se elimina a través de la válvula de desecho. La fracción de muestra que entra en columna viene determinada por la relación

de división o relación de *split* y está determinada por el flujo de gas portador que circula en la columna y el flujo a través de la válvula de desecho [99]. La relación de división puede oscilar de 1:50 a 1:6000 y el volumen de muestra inyectado en columna es $\leq 1\mu\text{l}$.

Esta técnica tiene el inconveniente de que el volumen de muestra inyectado en columna es muy pequeño, por lo que no es apropiada para el análisis a nivel de trazas, aunque es muy útil cuando los analitos constituyen más del 0,1% de la muestra. Los volátiles circulan a gran velocidad en el *liner*, arrastrados por el flujo de gas portador, por lo que la inyección es rápida y el ancho de banda inicial pequeño.

Inyección split en caliente

La válvula de desecho está abierta durante todo el tiempo de análisis y el *liner* del PTV se mantiene a alta temperatura. Los analitos atraviesan el *liner* a medida que van llegando a través de la línea de transferencia, pasando a la columna cromatográfica según la relación de división seleccionada (figura 5a).

Inyección split en frío

La diferencia respecto al modo de inyección anterior es la preconcentración de los analitos en el *liner* a baja temperatura antes de ser transferidos de forma rápida a la columna cromatográfica (figura 5b).

Figura 5: Inyección split en caliente (a) y split en frío (b)

2.1.2.2.2. Inyección splitless

La válvula de desecho está cerrada durante el tiempo en que tienen lugar los procesos de transferencia del espacio de cabeza al PTV y de transferencia de la muestra desde el PTV al GC, por lo que los analitos pasan a la columna cromatográfica sin división de muestra. Una vez transcurrido este tiempo, denominado *tiempo de splitless*, la válvula de desecho se abre y a través de ella circula un flujo rápido de gas portador, denominado flujo de limpieza, que prepara el *liner* para la próxima inyección.

Con este modo de inyección se introduce en la columna cromatográfica la mayor parte de la muestra procedente del generador de espacio de cabeza, por lo que se consiguen mejores límites de detección que con el modo de inyección *split*.

Inyección splitless en caliente

La transferencia de la muestra desde el PTV a la columna cromatográfica es muy lenta (figura 6a), ya que, la muestra es transportada a través del *liner*

con el mismo flujo que circula en columna (~ 1 mL/min). Esto hace que el ancho de banda inicial del cromatograma sea grande.

Inyección splitless en frío

Con este modo de inyección se evita el principal problema de la inyección sin división en caliente. Los analitos se preconcentran en el *liner* y la transferencia de los mismos a la columna cromatográfica es rápida, por lo que se consigue reducir el ancho de banda inicial y mejorar la forma de los picos, sin los problemas que conlleva realizar este proceso en la propia columna cromatográfica (figura 6b).

Figura 6: Inyección splitless en caliente (a) y splitless en frío (b)

2.1.2.2.3. Inyección solvent vent

Esta técnica combina la inyección en frío con la vaporización controlada del disolvente. El *liner* se encuentra a baja temperatura durante el proceso de transferencia de la muestra desde el HS al PTV y la válvula de desecho se encuentra abierta. De este modo, el disolvente en que van disueltos los analitos se purga a través de dicha válvula mientras que éstos quedan retenidos en el *liner*. El tiempo durante el cual la válvula de desecho permanece abierta se denomina tiempo de purga. Una vez que ha

terminado la transferencia del espacio de cabeza, la válvula de desecho se cierra y el *liner* se calienta rápidamente transfiriendo los analitos a la columna cromatográfica en el modo de inyección *splitless*. Al cabo de un tiempo, que se considera adecuado para que todos los analitos hayan sido transferidos a la columna cromatográfica, la válvula de desecho se abre nuevamente y el flujo de gas portador que circula a través del *liner* arrastra los posibles restos de analitos que pudieran quedar, preparándolo para una nueva inyección (figura 7).

Figura 7: Inyección solvent vent

De manera general, la finalidad de la purga es la eliminación del disolvente a baja temperatura, por lo que es necesario que el punto de ebullición de los analitos sea mayor que el del disolvente. Cuanto mayor sea esta diferencia mejor funciona la técnica [95].

La técnica también puede ser aplicada incluso con analitos de bajo punto de ebullición (inferior al del disolvente); se consiguen buenos resultados,

tanto de sensibilidad como de reproducibilidad, utilizando *liners* empaquetados con adsorbentes apropiados que retengan los analitos durante el proceso de purga del disolvente [100,101].

En el caso de matrices ambientales, como el agua o los suelos, el principal componente del espacio de cabeza es el vapor de agua. En estos casos es muy útil el uso de *liners* empaquetados con Tenax-TA®, un polímero hidrofóbico especialmente diseñado para retener compuestos orgánicos, mientras el vapor de agua se elimina por la válvula de desecho.

Con este modo de inyección se resuelven los problemas del acoplamiento HS-GC, ya que aporta las ventajas de la inyección en frío (focalización de los compuestos en el inyector y rápida transferencia de los mismos a la columna cromatográfica) y además da lugar a mejores niveles de sensibilidad, gracias a la eliminación del disolvente antes de la introducción de los analitos en la columna [100-104].

2.2. Separación cromatográfica

2.2.1 Cromatografía de gases rápida

Desde la primera descripción de cromatografía gas-líquido, realizada por James y Martin en 1952 [105], la cromatografía de gases ha experimentado un gran desarrollo, tanto desde el punto de vista técnico como de las numerosas aplicaciones que se han desarrollado.

El principal avance que revolucionó la cromatografía de gases fue la introducción de columnas tubulares abiertas o capilares en 1958 [106]. Éstas ofrecen mayor resolución, mayor rapidez de análisis y mayor sensibilidad que las columnas empaquetadas utilizadas hasta entonces, aunque tienen menor capacidad de muestra. La cromatografía de gases capilar es el método más eficiente para el análisis de compuestos volátiles y semi-volátiles [107].

El principal objetivo de la cromatografía de gases, desde que surgió, es el de alcanzar la resolución deseada de los compuestos de una muestra en el menor tiempo posible. En cromatografía de gases capilar convencional (columnas con diámetro interno de 0.2 a 0.32 mm) el tiempo empleado en el análisis de una muestra se encuentra en el margen de 10 a 60 minutos, dependiendo del tipo de muestra, del número de compuestos a analizar y de las condiciones experimentales seleccionadas.

Dentro de la tendencia de reducir el tiempo de análisis, surge la cromatografía de gases rápida (*fast gas chromatography*, FGC). Los primeros estudios sobre el potencial de columnas capilares con pequeño diámetro interno (~0.1 mm) para conseguir separaciones rápidas datan de 1962 [108], pero fue en los 90 cuando empezaron a utilizarse de forma generalizada en los laboratorios de análisis.

La reducción del tiempo de análisis conseguida con cromatografía de gases rápida implica un aumento en la capacidad de procesamiento de muestras. Esto se traduce en un ahorro en tiempo y dinero por muestra analizada y en un incremento en la productividad de los laboratorios.

Dentro de las aplicaciones más importantes de la cromatografía de gases rápida se encuentran el control de procesos en línea y el control de calidad de alimentos, así como su uso en situaciones en las que los resultados del análisis se requieren lo antes posible.

Otra ventaja de la cromatografía de gases rápida es que permite realizar un mayor número de réplicas de cada muestra en el mismo tiempo que se realiza el análisis de una muestra en cromatografía convencional. Esto se traduce en mayor cantidad de datos analíticos y, por tanto, mayor precisión de los resultados [109,110].

El tiempo de análisis de una separación mediante FGC depende fundamentalmente de la complejidad de la mezcla, de la modalidad de trabajo y del detector que se utilice. Para muestras muy complejas el tiempo

mínimo para obtener la separación es del orden de minutos, mientras que para otras mezclas sencillas la separación puede realizarse en milisegundos.

Se han sugerido diversas clasificaciones de cromatografía de gases rápida en función del tiempo requerido para la separación de los compuestos de la mezcla o la anchura de los picos a media altura [105,107,108]:

Cromatografía de gases rápida: separaciones en el intervalo de minutos (1-10 min); anchura de pico a media altura 1-3 s.

Cromatografía de gases muy rápida: separaciones en el intervalo de segundos (0.1-1 min); anchura de pico a media altura 30-200 ms.

Cromatografía de gases ultra-rápida: separaciones en el intervalo de subsegundos (<0.1 min); anchura de pico a media altura 5-30 ms.

Sin embargo, una de las mayores limitaciones para el uso de columnas capilares estrechas ha sido la falta de instrumentación compatible para el análisis de compuestos a nivel de trazas. Este tipo de columnas, debido a su pequeño diámetro interno, requiere bajos volúmenes de inyección para evitar la distorsión de los picos iniciales del cromatograma, lo cual afecta negativamente a la sensibilidad del método analítico [95,111,112].

El inyector PTV permite introducir grandes volúmenes de muestra en columnas capilares estrechas gracias a la eliminación del disolvente a baja temperatura. La combinación de GC rápida con PTV permite obtener separaciones rápidas con resultados de resolución y sensibilidad superiores a los obtenidos en GC convencional, ya que la definición de los picos es mejor y los valores de relación Señal/Ruido (*signal/noise*, S/N) son superiores en GC rápida [112,113].

Esta configuración se ha convertido en una herramienta importante en el campo del análisis medioambiental, solucionando los problemas de la cromatografía de gases clásica y los inyectores tradicionales de introducción

de muestras en GC [95,111-116]. En los últimos años nuestro grupo de investigación ha desarrollado numerosas aplicaciones en las que se demuestran las posibilidades de este acoplamiento [100-104].

2.2.2. Cromatografía en dos dimensiones completa

Como ya se ha mencionado en apartados anteriores, la cromatografía de gases ha experimentando un gran avance en la últimas décadas. Las columnas capilares disponibles en el mercado son capaces de separar del orden de 100 a 150 compuestos a partir de una única inyección. Este tipo de análisis, en el que se utiliza una sola columna cromatográfica, se puede denominar cromatografía de gases en una dimensión (1D-GC).

A pesar de la alta capacidad de separación de la técnica, que es muy superior a la de otras técnicas cromatográficas, en algunas ocasiones no se alcanza la resolución necesaria como para separar todos los componentes de muestras altamente complejas (aceites, productos petroquímicos, humo de tabaco, muestras ambientales). Con esta técnica la resolución de los compuestos se limita al poder de separación de una sola columna y muchos analitos aparecen solapados en el cromatograma, lo que genera dificultades en la identificación y falta de precisión en la cuantificación, incluso cuando se utiliza como detector un espectrómetro de masas [117,118].

Ante este problema se pueden plantear dos posibles soluciones. La vía tradicional consiste en someter la muestra a diferentes procedimientos de pretratamiento y limpieza, antes de realizar el análisis cromatográfico. Con esta estrategia se pretende evitar la presencia de elementos interferentes de la matriz, que pueden co-eluir con los analitos objeto de estudio. Entre los procedimientos de pretratamiento de muestra aplicados en este tipo de análisis, son muy comunes procedimientos de extracción en fase sólida (SPE) y el fraccionamiento de los extractos en columnas de sílice o alúmina. El principal inconveniente de estos procedimientos es que requieren tiempos prolongados, mucha manipulación de muestra y por consiguiente

aumentan las posibilidades de cometer errores debido a posibles pérdidas, contaminación o alteración química de la muestra.

Una alternativa mucho más atractiva es el uso combinado de mínimo tratamiento de la muestra con un método de separación altamente eficaz. Dentro de esta tendencia surgió la denominada cromatografía de gases multidimensional, abreviada como MDGC, GC-GC ó 2D-GC [119]. Esta técnica consiste en la combinación de dos o más columnas con diferente selectividad, y ha sido aplicada de manera satisfactoria en la resolución de una gran variedad de problemas [120]. En esta modalidad de cromatografía, una, o unas pocas fracciones del eluyente de la primera columna (primera dimensión) son sometidas a una nueva separación en la segunda columna (segunda dimensión), por lo que se aumenta de forma significativa el poder resolutivo de la técnica con respecto a la separación lograda mediante el análisis en una sola dimensión. En la figura 8 se muestra un esquema básico de un sistema de GC-GC convencional.

Figura 8: Representación esquemática de un sistema de GC-GC convencional

La división del eluyente de la primera columna y su transferencia a la segunda columna es un proceso crítico. Se han utilizado sistemas basados en válvulas, los cuales tienen una serie de inconvenientes como son

problemas de efecto memoria, o problemas de dispersión y ensanchamiento de los picos. Otra posibilidad es el uso de un sistema que consiste en un interruptor neumático, basado en el equilibrio de presiones, que fue desarrollado por Deans en 1968 [121].

En algunas ocasiones, cuando se analizan en la segunda dimensión varias fracciones del eluyente de la primera columna, han surgido problemas porque los componentes de las diferentes fracciones se entremezclan en la segunda columna. Para solucionar este problema, se ha utilizado un sistema en el se colocan una serie de trampas de adsorción, en paralelo, al final de la primera columna, de manera que cada una de las fracciones de eluyente seleccionadas se almacena en una trampa hasta que el análisis de la fracción anterior en la segunda columna ha finalizado. También se ha utilizado la configuración en la que se coloca una trampa criogénica que retiene y focaliza cada fracción del eluyente, antes de introducirla en la segunda columna. Otra posibilidad que se ha desarrollado para incrementar el número de fracciones de eluyente analizadas mediante un segundo mecanismo de separación consiste en conectar a la primera columna, en la que tiene lugar la separación principal, varias columnas con sus respectivos detectores [120,122,123].

Como consecuencia, GC-GC es una técnica muy útil cuando lo que se requiere es información de algunas fracciones de la muestra, que contienen todos los analitos de interés. Sin embargo, cuando se requiere información completa de la composición de la muestra, esta técnica presenta ciertas limitaciones [122,123,124].

En los últimos años ha surgido una nueva alternativa de MDGC en la que, gracias al uso de un sofisticado sistema capaz de dividir el eluyente en fracciones muy pequeñas y a una columna cromatográfica muy corta y estrecha en la segunda dimensión, capaz de analizar estas fracciones en tiempos muy cortos, es posible someter la muestra completa a una separación en dos dimensiones. Esta modalidad se ha denominado

cromatografía en dos dimensiones completa (GC X GC). La interfase que conecta las dos columnas se denomina modulador y sus funciones son: acumular y atrapar fracciones estrechas y adyacentes del eluyente de la primera columna, focalizarlas y transferirlas de forma rápida a la segunda columna. En la figura 9 se ha representado un esquema simplificado de un sistema GC X GC.

Figura 9: Representación esquemática de un equipo de GC X GC

En muchos casos las dos columnas se encuentran en el mismo horno, sin embargo, en los instrumentos más modernos la segunda columna suele estar localizada en un horno particular, situado en el interior del horno principal, que permite lograr un control más flexible de la temperatura en la segunda dimensión.

De manera general, las muestras se separan primero en una columna cromatográfica de alta resolución- típicamente 15-30 m x 0.25-0.32 mm i.d. x 0.1-1 μm de espesor de fase estacionaria- conteniendo una fase estacionaria no polar. Tras la modulación, cada fracción individual se inyecta en una columna más estrecha, con dimensiones típicas de 0.5-2 m x 0.1 mm i.d. x 0.1 μm , que contiene una fase estacionaria de polaridad media. Con el fin de mantener la separación conseguida en la primera dimensión, las fracciones

de eluyente no deben ser superiores a un cuarto de la anchura de pico (5-30 s), es decir se recomiendan al menos tres o cuatro modulaciones por pico. Esto hace que las rampas de temperaturas que se utilizan en la primera columna (de 1 a 5 °C/min) sean más lentas que las habituales en 1D-GC. En esta primera columna, no polar, los analitos se separan en función de su punto de ebullición. De esta manera, cada fracción de eluyente de la primera columna contiene analitos de volatilidades muy similares. La separación de los analitos en la segunda columna es muy corta, de 1 a 10 s, por lo que tiene lugar en condiciones esencialmente isotérmicas. Los analitos de cada fracción, con puntos de ebullición similares, se separan en la segunda columna en función de sus interacciones específicas con la fase estacionaria de polaridad media. El corto tiempo que requiere la separación de los compuestos en la segunda columna hace que sea posible someter a toda la muestra a una separación de 2D, en el mismo tiempo en que se desarrolla el análisis en una dimensión [125-127]. Es decir, con GC X GC se consigue un poder resolutivo superior al de cualquier otra técnica en la que se acoplan varios sistemas de separación y de forma mucho más rápida y sencilla.

El registro que se obtiene tras un análisis mediante GC X GC consiste en una serie de cromatogramas, correspondientes a cada una de las fracciones de eluyente analizadas en la segunda dimensión, que aparecen alineados uno detrás de otro (figura 10, fase 1, *modulation*). Estas fracciones alineadas, se transforman en un cromatograma en 2D, en el que una dimensión representa el tiempo de retención en la primera columna y la otra, el tiempo de retención en la segunda columna (figura 10, fase 2, *transformation*). La visualización (figura 10, fase 3, *visualization*), normalmente, se realiza mediante la representación del cromatograma en un plano, en el que líneas de contorno o una escala de colores representan la intensidad de la señal. En algunas ocasiones también se utilizan representaciones en tres dimensiones, en las que el eje z representa la señal del detector.

Figura 10: Generación y visualización de un cromatograma GC X GC (Ref [99])

La combinación de columnas, que se ha descrito, en la que los analitos se separan por dos mecanismos completamente diferentes en cada una de las dimensiones, da lugar a una separación ortogonal de los compuestos. Una de las principales ventajas de la ortogonalidad es que en el cromatograma en 2D se pueden observar estructuras ordenadas formadas por los diferentes grupos de compuestos presentes en la muestra. Estos cromatogramas son muy útiles cuando las muestras contienen compuestos estructuralmente relacionados como homólogos o isómeros. La utilidad de esta característica se ha puesto de manifiesto en numerosas aplicaciones [128-130]. También se han utilizado otras combinaciones de columnas no-

ortogonales con muy buenos resultados [130-133]. Otra posibilidad es utilizar fases estacionarias enantioselectivas (ciclodextrina) [134], las cuales se han aplicado en la separación de pares de enantiómeros de numerosas clases de monoterpenos en aceites esenciales [135-137].

Como se ha descrito anteriormente, el componente más esencial de un equipo de GC X GC es el modulador. Desde que surgió la técnica, se han desarrollado numerosos tipos de moduladores que se pueden clasificar en tres grandes categorías: moduladores de desorción térmica, moduladores criogénicos y moduladores basados en una válvula [138]. Hoy en día prácticamente sólo se utilizan los moduladores de tipo criogénico. Dentro de éstos, en los últimos años han surgido modelos que se basan en el uso de chorros de nitrógeno líquido o dióxido de carbono líquido. Entre los posibles modelos que se han desarrollado, el modulador de doble chorro, que utiliza dióxido de carbono líquido para enfriar, es el más utilizado y ha demostrado ser una interfase muy robusta para prácticamente todo tipo de aplicaciones [137]. En la figura 11 se ha representado el funcionamiento de este tipo de modulador.

Figura 11: Funcionamiento esquematizado de un modulador criogénico de doble chorro (adaptada de ref [100]).

S0: esquema de un modulador criogénico de doble chorro. S1: El chorro de la derecha atrapa los analitos que eluyen de la primera columna. S2: El chorro de la derecha se apaga y el punto frío se calienta rápidamente, transfiriendo los analitos a la 2ª columna; simultáneamente el chorro de la izquierda se activa para evitar que la siguiente fracción de muestra pase también a la segunda dimensión. S3: Comienzo del siguiente ciclo de modulación.

La separación muy rápida de los compuestos, que tiene lugar en la segunda columna, da lugar a picos extremadamente estrechos, con anchuras de pico de 50 a 600 ms en la base. Como consecuencia, es necesario el uso de detectores con una frecuencia de adquisición de datos como mínimo de 100 espectros/s. Durante los primeros años el detector más

utilizado fue el de ionización en llama (*flame ionization detector*, FID), aunque también se utilizaron detectores selectivos de elementos, como el de captura electrónica (ECD), el de emisión atómica (*atomic emission detector*, AED) o detectores de quimioluminiscencia de azufre o nitrógeno (*sulfur chemiluminescence detector*, SCD; *nitrogen chemiluminescence detector*, NCD). Estos detectores permiten la cuantificación de los compuestos, pero no proporcionan información estructural de los mismos, imprescindible cuando lo que se pretende es identificar o confirmar la presencia de compuestos desconocidos. Debido a esto, el uso de espectrómetros de masas está muy recomendado en estas situaciones. El detector de masas de tipo cuadrupolar (*quadrupole mass spectrometer*, QMS) se ha utilizado en algunas aplicaciones obteniendo resultados aceptables cuando se usa en el modo SIM, con el que se puede conseguir una frecuencia de adquisición de datos de 30 Hz [137]. Sin embargo, el detector de masas más utilizado en este tipo de aplicación es el de tiempo de vuelo (*time of flight mass spectrometer*, TOFMS), que puede adquirir espectros con una frecuencia de 100 a 500 Hz, por lo que es capaz de reconstruir de forma precisa los picos procedentes de la segunda columna [122,124,135].

Como consecuencia de las altas tasas de adquisición de datos alcanzadas con el TOFMS, el análisis de una muestra genera una gran cantidad de datos, cuyo manejo e interpretación es complejo y tedioso. Se ha dedicado mucho esfuerzo en conseguir simplificar esta etapa. Hoy día, la existencia de potentes programas informáticos facilita el proceso de tratamiento de los datos mediante numerosas funciones, como son: la búsqueda automática de picos, deconvolución de espectros, búsqueda automática de los espectros en la librería, combinación de picos, o integración automática de todos los picos que corresponden a un mismo compuesto en la segunda dimensión [125,127,138]. Sin embargo, a pesar de estas funciones automáticas, es necesaria la supervisión de un analista especializado para garantizar la

correcta interpretación de los datos y el uso ordenadores potentes, capaces de almacenar la gran cantidad de información que se genera.

Las principales aplicaciones de la técnica GC X GC han consistido en análisis de muestras petroquímicas, sin embargo también se ha utilizado para el análisis de muestras de alimentos, muestras ambientales, biológicas, aceites esenciales y muestras de cosméticos. Dallüge y colaboradores [125] y Adahchour y colaboradores han publicado revisiones bibliográficas en las que se describen los fundamentos de la técnica y sus principales aplicaciones [126,127,138,140,141].

Las ventajas que aporta esta técnica respecto a la cromatografía convencional en 1D, se pueden resumir en las siguientes: poder de resolución mucho mayor, característica que es muy interesante en el análisis de muestras reales, en las que se logra separar los analitos de los elementos interferentes de la matriz; mayor sensibilidad, debido a la focalización de los analitos en el modulador y a los estrechos picos obtenidos en la segunda dimensión; mayor precisión en la identificación de los compuestos, debido a la existencia de dos tiempos de retención y a la presencia de estructuras ordenadas en los cromatogramas.

3. BIBLOGRAFÍA

- [1] B. Kolb, L. S. Ettre, *Static Headspace-Gas Chromatography*, Wiley Interstice, Hoboken, New Jersey, 2006.
- [2] R. P. Belardi, J. Pawliszyn, *Water Pollution Res. J. Can.* 24 (1989) 179.
- [3] C. L. Arthur, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145.
- [4] Z. Zhang, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 65 (1993) 1843.
- [5] R.S.Zhao, W.-J. Lao, X-b. Xu, *Talanta* 62 (2004) 751.
- [6] N. Vora-adisak, P.Varanusupakul, *J. Chromatogr. A* 1121 (2006) 1.
- [7] J. Swinnerton, V. Linnenboom, C. H. Cheek, *Anal. Chem.* 34 (1962) 483.
- [8] J. Swinnerton, V. Linnenboom, C. H. Cheek, *Anal. Chem.* 34 (1962) 1509.
- [9] T. Bellar, J. Lichtenberg, *J. Am. Water Works Ass.* 66 (1974) 739.
- [10] B. Kolb, *J. Chromatogr. A* 842 (1999) 163.
- [11] H-J. Stan, M. Linkerhägner, *J. Chromatogr. A* 727 (1996) 275.
- [12] J. Zrostlíková, J. Hajslová, M. Modula, K. Mastovská, *J. Chromatogr. A* 937 (2001) 73.
- [13] B. Kolahgar, E. Pfannkock, *Technical Note* 36, Gerstel, Mülheim/Ruhr.
- [14] G.B. Frankforter, L. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.* 36 (1914) 1103.
- [15] R.E. Majors, *LCGC North America* , Jul 1 (2009).
- [16] P.A. Mills, J.H. Onley, R.A. Gaither, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 46 (1963) 186.
- [17] G. Becker, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 67 (1971) 125.
- [18] M. Luke, J.E. Froberg, H.T. Masumoto, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 58 (1975) 1020.
- [19] W. Specht, M. Tilkes, *Fresenius J. Anal. Chem.* 301 (1980) 300.
- [20] M. Luke, I. Cassias, S. Yee, *Lab. Inform. Bull.* N° 4178, Office of Regulatory Affairs, U.S. Food and Drug Administration, 1999, Rockville, MD.

-
- [21] F.J. Schench, P. Callery, P.M. Gannett, J.R. Daft, S.J. Lehotay, J. AOAC Int. 85 (2002) 1177.
- [22] C.H. Parfitt, Lab. Inform. Bull. N° 3616, Office of Regulatory Affairs, U.S. Food and Drug Administration, 1991, Rockville, MD.
- [23] S.M. Lee, M.L. Papathakis, C.F. Hsiao-Ming, J.E. Carr, Fresenius J. Anal. Chem. 339 (1991) 376.
- [24] W. Liao, T. Joe, W.G. Cusick, J. AOAC Int. 74 (1991) 554.
- [25] J. Fillion, R. Hindle, M. Lacroix, J. Selwyn, J. AOAC Int 78 (1995) 1352.
- [26] J. Cook, M.P. Beckett, B. Reliford, W. Hammock, M. Engel, J. AOAC Int. 82 (1999) 1419.
- [27] R.S. Sheridan, J.R. Melo, J. AOAC Int. 82 (1999) 982.
- [28] S.J. Leothay, A.R. Lightfield, J.A. Harman-Fetcho, D.A. Donoghue, J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 4589.
- [29] W. Krigsmann, G.C. Van de Kamp, J. Chromatogr. 177 (1968) 482.
- [30] A. Anderson, H. Palsheden, Fresenius J. Anal. Chem. 339 (1991) 365.
- [31] D.M. Holstege, D.L. Scharberg, E.R. Tor, L.C. Hart, F.D. Galey, J. AOAC Int. 77 (1994) 1263.
- [32] A.R. Fernández-Alba, A. Valverde, A. Agüera, M. Contreras, J. Chromatogr. 686 (1993) 263.
- [33] K. Barnerjee, D.P. Oulkar, S. Dasgupta, S.B. Patil, S.H. Patil, R. Savant, P.G. Adsule, J. Chromatogr. A 1173 (2007) 98.
- [34] A. Hercegová, M. Dömötör, E. Matisová, J. Chromatogr. A 1153 (2007) 54.
- [35] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, J. AOAC Int. 86 (2003) 412.
- [36] K. Mastovská, S.J. Lehotay, J. Chromatogr. A 1040 (2004) 259.
- [37] C.E. Matkovich, G.D. Christian, Anal. Chem. 45 (1973) 1915.
- [38] D.C. Leggett, T.F. Jenkins, P.H. Miyares, Anal. Chem. 62 (1990) 1355.

- [39] USEPA Method 8330B, nitroaromatics, nitramines and nitrate esters by high performance liquid chromatography (HPLC). Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 8000 series, USEPA, Washington, USA, 1998.
<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/pdfs/8330b.pdf>
- [40] S.J. Lehotay, A. De Kok, M. Hiemstra, P. Van Bodegraven, J. AOAC Int. 88 (2005) 595.
- [41] S.J. Lehotay, K. Matovská, S.J. Yun, J. AOAC Int. 88 (2005) 630.
- [42] K. Mastovská, S. J. Lehotay, J. Chromatogr. A 1040 (2004) 259.
- [43] S.J. Lehotay, K. Mastovská, A.R. Lightfield, J. AOAC Int. 88 (2005) 615.
- [44] C. Díez, W.A. Traag, P. Zommer, P. Marinero, J. Atienza, J. Chromatogr. A 1131 (2006) 11.
- [45] T.D. Nguyen, E.M. Han, M.S. Seo, S.R. Kim, M.Y. Yun, D.M. Lee, G.H. Lee, Anal. Chim. Acta 619 (2008) 67
- [46] U. Koesukwiwat, K. Sanguankaew, N. Leepipatpiboon, Anal. Chim. Acta 626 (2008) 10.
- [47] P. Payá, M. Anastassiades, D. Mack, I. Sigalova, B. Tasdelen, J. Oliva, A. Barba, Anal. Bioanal. Chem. 389 (2007) 1697.
- [48] T.D. Nguyen, B.S. Lee, B.R. Lee, D.M. Lee, G-H. Lee, Rapid. Commun. Mass Sp. 21 (2007) 3115.
- [49] www.quechers.com
- [50] F.J. Schenck, A.N. Brown, L.V. Podhorniak, A. Parker, M. Reliford, J.W. Wong, J. AOAC Int. 91 (2008) 422.
- [51] M.A. Aramendía, V. Borau, F. Lafont, A. Marinas, J.M. Marinas, J.M. Moreno, F.J. Urbano, Food Chem. 105 (2007) 855.
- [52] A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, E. Pastor-Montoro, R. Romero-González, Anal. Bioanal. Chem. 390 (2008) 947.
- [53] F.J. Schenck, J.E. Hobbs, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 73 (2004) 24.
- [54] D.A. Lambropoulou, T.A. Albanis, Anal. Bioanal. Chem. 389 (2007) 1663.

-
- [55] K. Banerjee, D.P. Oulkar, S. Dasgupta, S.B. Patil, S.H. Patil, R. Savant, P.G. Adsule, *J. Chromatogr. A* 1173 (2007) 98.
- [56] C. Lesueur, P. Knittl, M. Gartner, A. Mentler, M. Fuerhacker, *Food Control* 19 (2008) 906.
- [57] J. Hernández-Borges, J. Cabrera-Cabrera, M.A. Rodríguez-Delgado, E.M. Hernández-Suárez, V. Galán-Saúco, *Food Chemistry* 113 (2009) 313.
- [58] C.C. Leandro, R.J. Fussell, B.J. Keely, *J. Chromatogr. A* 1085 (2005) 207.
- [59] C.C. Leandro, P. Hancock, R.J. Fussell, B.J. Keely, *J. Chromatogr. A* 1103 (2006) 94.
- [60] A. Hercegová, M. Dömötörová, E. Matisová, *J. Chromatogr. A* 1153 (2007) 54.
- [61] T. Cajka, J. Hajslova, O. Lacina, K. Mastovská, S.J. Lehotay, *J. Chromatogr. A* 1186 (2008) 281.
- [62] S.C. Cunha, J.O. Fernandes, A. Alves, M.B.P.P. Oliveira, *J. Chromatogr. A* 1216 (2008) 119.
- [63] S.C. Cunha, S.J. Lehotay, K. Mastovská, J. O. Fernandes, M.B.P.P. Oliveira, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 620.
- [64] R. Romero-González, A. Garrido-Frenich, J.L. Martínez-Vidal, *Talanta* 76 (2008) 211-225.
- [65] S.J. Lehotay, *J. AOAC Int.* 90 (2007) 90.
- [66] F. Plössl, M. Giera, F. Bracher, *J. Chromatogr. A* 1135 (2006) 19.
- [67] C.K. Fagerquist, A.R. Lightfield, S.J. Lehotay, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1473.
- [68] K. Mastovská, A.R. Lightfield, *J. Chromatogr. A* 1202 (2008) 118.
- [69] A. Posyniak, J. Zmudzki, K. Mitrowska, *J. Chromatogr. A* 1087 (2005) 259.
- [70] M.M. Aguilera-Luiz, J. L. Martínez Vidal, R. Romero-González, A. Garrido Frenich, *J. Chromatogr. A* 1205 (2008) 10.

-
- [71] G. Stubbings, T. Bigwood, *Anal. Chim. Acta* 637 (2009) 68.
- [72] B. Kinsella, S.J. Lehotay, K. Mastovská, A.R. Lightfield, A. Furey, M. Danaher, *Anal. Chim. Acta* 637 (2009) 196.
- [73] C. Lesueur, M. Gartner, A. Mentler, M. Fuerhacker, *Talanta* 75 (2008) 284.
- [74] L. Chen, X-S Li, Z-Q Wang, C-P Pan, R-C Jin, *Ecotox. Environ. Safe.* 73 (2010) 73.
- [75] K. Abel, *J. Chromatogr.* 13 (1964) 14.
- [76] W. Vogt, K. Jacob, H. W. Owexer, *J. Chromatogr.* 174 (1979) 437.
- [77] W. Vogt, K. Jacob, A-B. Ohnesorge, H. W. Obwexer, *J. Chromatogr.* 186 (1979) 197.
- [78] F. Poy, S. Visani, F. Terrosi, *J. Chromatogr.* 217 (1981) 81.
- [79] G. Schomburg, H. Husmann, H. Behlau, F. Schulz, *J. Chromatogr.* 279 (1983) 251.
- [80] W. Engewald, J. Teske, J. Efer, *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 256.
- [81] K. Grob, *On-Colum Injection in Capillary Gas Chromatography*, Heidelberg, Germany, 1987.
- [82] J. Teske, W. Engewald, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 584.
- [83] H-J. Stan, H. M. Müller, *J. High Resolut. Chromatogr.* 11 (1988) 140.
- [84] Sistema de inyección refrigerado CIS4, manual de usuario, Ver. Española 1.0, Andaluza de Instrumentación, Sevilla, España, 2000.
- [85] J. Zrostlíková, J. Hajslová, M. Godula, K. Mastovská, *J. Chromatogr. A* 937 (2001) 73.
- [86] H.M. Müller, *J. High Resolut. Chromatogr.* 13 (1990) 754.
- [87] M. Herraiz, G. Reglero, E. Loyola, T. Herraiz, *J. High Resolut. Chromatogr. Comun.* 10 (1987) 598.
- [88] H.G.J. Mol, P.J.M. Hendriks, H.-G. M. Janssen, C.A. Cambers, U. A. Th. Brinkman, *J. High Resolut. Chromatogr.* 18 (1995) 124.
- [89] J. Teske, K. Putzbach, W. Engewald, R. K. Müller, *J. Chromatogr. B* 772 (2002) 299.

-
- [90] A. Vemeulen, K. Welvaert, J. Vercammen, J. Chromatogr. A 1071 (2005) 41.
- [91] A. Covaci, J. D. Boer, J. J. Ryan, S. Voorspoels, P. Schepens, Anal. Chem. 74 (2002) 790.
- [92] V. Yusà, G. Quintas, O. Pardo, A. Pastor, M. Guardia, Talanta 69 (2006) 807.
- [93] B.S. Crimmins, J. E. Baker, Atmos. Environ. 40 (2006) 6764.
- [94] V. Ferreira, L. Culleré, N. Loscos, J. Cacho, J. Chromatogr. A 1122 (2006) 255.
- [95] M. Hada, M. Takino, T. Yamagami, S. Daishima, K. Yamaguchi, J. Chromatogr. A 874 (2000) 81.
- [96] A.C. Heiden, B. Kolahgar, E. Pfannkoch, AppNote 7/2001, Gerstel, Mülheim/Ruhr.
- [97] J. Efer, S. Müller, W. Engewald, Th. Knobloch, K. Levsen, Chromatographia 37 (1993) 361.
- [98] R. Eiden, H.F. Schöller, M. Gastner, J. Chromatogr. A, 809 (1998) 151.
- [99] D.C. Harris, Análisis Químico Cuantitativo 2ª edición, China Lake, California.
- [100] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández Laespada, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1141 (2007) 123.
- [101] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1175 (2007) 106.
- [102] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, Anal. Bioanal. Chem. 349 (2009) 1463.
- [103] J.L. Pérez Pavón, A.M. Casas Ferreira, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 1192.
- [104] J.L. Pérez Pavón, A.M. Casas Ferreira, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 6728.
- [105] A.T. James, J.A.P. Martin, Biochem. J. 50 (1952) 679.

- [106] M.J.E. Golay, V.J. Coates, H.J. Noebels, I.S. Fagerson, Gas chromatography (1957 Lansing Symposium), Academic Press, New York, 1958, p. 1.
- [107] E. Matisová, M. Dömötöröová, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 199.
- [108] D.H. Desty, A. Goldup, W. T Swanton, in: N. Brenner, J. E. Callen, M.D. Weis (Eds.), Gas Chromatography, Academic Press, New York, 1962, p. 105.
- [109] P. Korytár, H-G. Janssen, E. Matisová, U. A. Th. Brinkman, Trends. Anal. Chem. 21 (2002) 558.
- [110] K. Mastovská, S. J. Lehotay, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 153.
- [111] M. Kirchner, E. Matisová, M. Dömötöröová, J. de Zeeuw, J. Chromatogr. A 1055 (2004) 159.
- [112] P. Tollbäck, J. Björklund, C. Östman, J. –Chromatogr. A 991 (2003) 241.
- [113] M. Kirchner, E. Matisová, S. Hrouzková, J. de Zeeuw, J. Chromatogr. A 1090 (2005) 126.
- [114] E. Korenková, E. Matisová, J. Slobodnik, J. Sep. Sci. 26 (2003) 241.
- [115] M. Dömötöröová, E. Matisová, J. Chromatogr. A 1207 (2008) 1.
- [116] R. Húsková, E. Matisová, S. Hrouzková, L. Svorec, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 6326.
- [117] A.C. Lewis, N. Carslaw, P.J. Marriott, R. M. Kinghorn, P. Morrison, A.L. Lee, K.d. Bartle, M.J. Pilling, Letters to Nature, 405 (2000) 778.
- [118] X. Xu, L.L. P. van Stee, J. Williams, J. Beens, M. Adahchour, R.J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman, J. Lelieveld, Atmos. Chem. Phys. 3 (2003) 665.
- [119] M. Zakaria, M.-F. Gonnord, G. Guiochon, J. Chromatogr. 271 (1983) 127.
- [120] W. Bertsch, J. High Resolut. Chromatogr. 22 (1999) 647.
- [121] D.R. Deans, Chromatographia 1 (1968) 18.
- [122] M. Herrero, E. Ibáñez, A. Cifuentes, J. Bernal, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 7110.

-
- [123] P.J. Marriott, R.M. Kinghorn, *J. Chromatogr. A* 866 (2000) 203.
- [124] W. Bertsch, *J. High Resolut. Chromatogr.* 23 (2000) 167.
- [125] J. Dallüge, J. Beens, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 69.
- [126] M. Adahchour, J. Beens, R.J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 438.
- [127] M. Adahchour, J. Beens, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 1186 (2008) 67.
- [128] H.-J. de Geus, I. Aidos, J. de Boer, J.B. Luten, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 910 (2001) 306.
- [129] P. Korytár, P.E.G. Leonards, J. de Boer, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 958 (2002) 203.
- [130] M. Adahchour, J. Beens, R.J.J. Vreuls, A.M. Batenburg, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 1054 (2004) 47.
- [131] T.C. Tran, G.A. Logan, E. Grosjean, J. Harynuk, D. Ryan, P. Marriott, *Org. Geochem.* 37 (2006) 1190.
- [132] P. Haglund, M. Harju, R.Ong, P.J. Marriot, *J. Microcol. Sep.* 13 (2001) 306.
- [133] D. Ryan, R. Shellie, P. Tranchida, A. Casilli, L.Mondello, P. Marriot, *J. Chromatogr. A* 1054 (2004) 57.
- [134] O. Trapp, *J. Chem. Inform. Comput. Sci.* 44 (2004) 1671.
- [135] R. Shellie, P.J. Marriot, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5426.
- [136] R. Shellie, P.J. Marriot, C. Cornwell, *J. Sep. Sci* 24 (2001) 823.
- [137] J. Wu, X. Lu, W. Tang, H. Kong, S. Zhou, G. Xu, *J. Chromatogr. A* 1034 (2004) 199.
- [138] M. Adahchour, J. Beens, R.J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 540.
- [139] C. Debonneville, A. Chaintreau, *J. Chromatogr. A* 1027 (2004) 109.
- [140] M. Adahchour, J. Beens, R.J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 726.

- [141] M. Adahchour, J. Beens, R.J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman, Trends Anal. Chem. 25 (2006) 821.

III

CONFIGURACIONES INSTRUMENTALES

En el desarrollo de los diferentes métodos analíticos que se han optimizado en este trabajo se han utilizado tres configuraciones instrumentales básicas: (1) un cromatógrafo de gases equipado con un inyector de temperatura programada y un espectrómetro de masas de tipo cuadrupolo (q-MS); (2) un cromatógrafo de gases con inyector de temperatura programada y detector de captura electrónica (μ -ECD) y (3) un cromatógrafo de gases (GC X GC) con detector de masas de tiempo de vuelo (TOF-MS).

1. CROMATÓGRAFO DE GASES CON INYECTOR DE TEMPERATURA PROGRAMADA Y ESPECTRÓMETRO DE MASAS CUADRUPOLO

1.1. Cromatógrafo de gases

El cromatógrafo de gases utilizado es un Agilent 6890 equipado con una columna capilar DB-VRX (20 m x 0.18 mm x 1 μ m) de Agilent Technologies (J&W Scientific Columns, USA). Las rampas máximas permitidas por el equipo son 70 °C/min de 45 a 175 °C, 45 °C/min de 175 a 300 °C y 35 °C/min de 300 a 450 °C. El gas portador utilizado es helio N50 (99.999% puro; Air Liquid).

1.2. Inyector de temperatura programada

El PTV utilizado en esta configuración es un modelo de Gerstel (CIS-4; Gerstel, Linthicum, MD, USA). Un esquema del dispositivo utilizado se muestra en la figura 1.

El cabezal del inyector utilizado no tiene *septum*, si no que cuenta con una válvula de sellado que se desplaza durante la inyección para permitir el paso de la jeringa.

El enfriamiento del *liner* se realiza mediante una corriente de CO₂ líquido, que permite alcanzar la temperatura de -78 °C. El calentamiento se

consigue a través de un hilo de calefacción, que proporciona un calentamiento lineal y homogéneo del cuerpo del inyector. La velocidad de calentamiento seleccionada puede ser desde 2 °C/s hasta 12 °C/s y permite utilizar dos rampas de temperaturas consecutivas. El control programado de la temperatura se realiza mediante un controlador electrónico.

Existen distintos modelos de *liners* disponibles, tanto vacíos (recto, recto con muesca y zig-zag) como empaquetados con diferentes materiales de relleno (Tenax- TA®, lana de vidrio, lana de cuarzo, Carbotrap B, Carbotrap C y polidimetilsiloxano). Todos ellos tienen unas dimensiones de 71 mm x 2.0 mm.

Figura 1: Inyector PTV CIS 4 de Gerstel

1.3. Espectrómetro de masas

El espectrómetro de masas cuadrupolar es un HP 5973 N de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania). La fuente de ionización es de impacto electrónico, con un voltaje de ionización de 70 eV. Las temperaturas recomendadas para la fuente de ionización y el cuadrupolo son 230 °C y 150 °C, respectivamente.

Es posible seleccionar dos modos de adquisición de datos: *scan*, en el que el detector hace un barrido de un amplio intervalo de masas, previamente especificado; y el modo de seguimiento de iones seleccionados (*selected ion monitoring*, SIM), que permite seleccionar los iones característicos de las especies de interés, de modo que para cada intervalo de tiempo sólo se registran unos pocos iones seleccionados.

La base de datos utilizada para la identificación de los compuestos es la NIST'98 (NIST/EPA/NIH Mass spectral Library, version 1.6).

1.4. Módulos de inyección de las muestras

1.4.1. Generador de espacio de cabeza

El generador de espacio de cabeza es un modelo HP 7694 de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania) equipado con un muestreador automático para 44 muestras consecutivas.

El horno puede calentarse desde 40 °C hasta 195 °C. Está formado por un carrusel circular de aluminio con 6 posiciones para equilibrar viales simultáneamente. Esto permite que el tiempo de generación de espacio de cabeza de las muestras se pueda superponer de forma que el intervalo de análisis entre ellas se reduzca considerablemente.

El sistema de muestreo consta de los siguientes elementos: una aguja de acero inoxidable con un diámetro interno de 0.5 mm, una válvula de seis vías con un bucle de níquel de 3 mL de capacidad (modelo 316-SS) y dos

válvulas solenoides (de presurización y de purga). Todo el sistema está conectado por tubos de níquel y se puede programar hasta una temperatura máxima de 200 °C.

El generador de espacio de cabeza está conectado al inyector de temperatura programada del cromatógrafo de gases mediante una línea de transferencia termostatada. Esta línea de transferencia es de un material inerte, tiene una longitud de 80 cm y puede calentarse hasta una temperatura máxima de 220 °C.

En la figura 2 se muestra la configuración instrumental formada por el acoplamiento de los diferentes módulos.

El control del cromatógrafo de gases, del PTV y del detector, así como la adquisición de datos se llevan a cabo mediante *software* específico desde un ordenador personal. El funcionamiento del generador de espacio de cabeza se programa en un controlador independiente propio.

Figura 2: Configuración instrumental HS-PTV-GC-MS.

Esta configuración instrumental se ha utilizado en la aplicación optimizada en el capítulo IV. Las condiciones experimentales de cada uno de los módulos se especificarán en dicho capítulo.

También se ha utilizado esta configuración instrumental en el desarrollo de la aplicación descrita en el capítulo V. Sin embargo, en este caso se incluyó una modificación respecto a la configuración arriba descrita. El horno convencional del cromatógrafo de gases se sustituyó por un módulo de calentamiento de columna acelerado (MACH™) de Gerstel (Linthicum, MD, USA). Este módulo se monta en la parte exterior de la puerta del cromatógrafo. Consiste en una carcasa en cuyo interior la columna cromatográfica está enrollada de forma mucho más compacta a como se dispone habitualmente en un horno convencional. Alrededor de la columna están enrollados un cable de calentamiento aislado y un sensor de temperatura. Esta disposición permite que el calor se transmita de forma muy rápida a la columna. El horno puede programarse desde temperatura ambiente hasta 400 °C con rampas de calentamiento de hasta 1800 °C/min. El enfriamiento de la columna para regresar a las condiciones iniciales también se consigue de forma muy rápida, gracias a un grupo de ventiladores situados en la parte inferior de la carcasa.

La totalidad de la longitud de la columna se encuentra enrollada en el interior de la carcasa, por lo que para conectar sus dos extremos al inyector y al detector es necesario utilizar capilares de sílice desactivada, que se unen a los extremos de la columna mediante uniones de bajo volumen muerto. El cromatógrafo de gases convencional actúa como interfase y se programa a la máxima temperatura empleada en el MACH™ con el fin de mantener los capilares de conexión a alta temperatura y así evitar la formación de puntos fríos.

En la figura 3 se muestra una imagen de esta configuración instrumental con el MACH™ montado en la parte exterior de la puerta del cromatógrafo.

Figura 3: Configuración instrumental HS-PTV-GC-MS con MACH™

En la figura 4 se muestran las fotografías de una columna sin la carcasa protectora (a) y con la carcasa (b).

Figura 4: Columna empaquetada sin carcasa (a) y con carcasa (b)

El software de control del MACH™ está integrado con el del PTV y se maneja desde el ordenador.

1.4.2. Auto-muestreador CombiPAL

Otro dispositivo para la introducción de muestras que se ha acoplado recientemente a la configuración PTV-GC-MS es el auto-muestreador CombiPAL (CTC analytics AG, Zwingen, Suiza). Este auto-muestreador aporta mayor versatilidad al equipo, ya que permite seleccionar distintas modalidades de introducción de la muestra (inyección de muestras líquidas, espacio de cabeza estático y microextracción en fase sólida). El dispositivo consiste en un brazo muestreador automático al que se pueden acoplar diferentes módulos, en los que va montada la jeringa apropiada, en función del tipo de introducción de muestra que se quiera realizar. También posee diferentes tipos de bandejas para los viales de muestra adecuados para cada aplicación. Además consta de un horno generador de espacio de cabeza, con capacidad para seis viales.

La programación del CombiPAL se hace desde un controlador independiente propio, en el que selecciona el tipo de inyección que se va a realizar y se programa un método en el que se especifican las condiciones de las diferentes variables implicadas en la inyección. A continuación se programa la secuencia de muestras.

En la figura 5 se muestra la imagen de la configuración instrumental CombiPAL-GC-PTV-MS.

Figura 5: Configuración instrumental CombiPAL-PTV-GC-MS

Este auto-muestreador se ha utilizado en el desarrollo de la aplicación descrita en el capítulo VIII. Se utilizó operando con el módulo de inyección de líquidos.

El módulo de inyección de muestras líquidas permite utilizar jeringas de diferentes tamaños (desde 0.1 μL hasta 500 μL) y tiene la posibilidad de seleccionar diferentes velocidades de inyección de muestra (desde 0.01 $\mu\text{L/s}$ hasta 250 $\mu\text{L/s}$). En la figura 6 se representa el brazo auto-muestreador con el módulo de inyección de líquidos acoplado. Además se muestra una imagen detallada del módulo de inyección de líquidos con la jeringa montada.

Figura 6: Brazo auto-muestreador del CombiPAL con módulo de inyección de líquidos

2. CROMATÓGRAFO DE GASES CON INYECTOR DE TEMPERATURA PROGRAMADA Y DETECTOR DE CAPTURA ELECTRÓNICA

2.1. Cromatógrafo de gases

El modelo de cromatógrafo de gases es un Agilent 7890 equipado con una columna capilar DB-VRX (20 m x 0.18 mm x 1 μ m) de Agilent Technologies (J&W Scientific Columns, USA). El horno del cromatógrafo permite programar hasta cinco rampas de temperatura. Las rampas máximas permitidas por el equipo son 120 °C/min hasta 70 °C, 95 °C/min de 70 a 115 °C, 65 °C/min de 115 a 175 °C, 45 °C de 175 a 300 °C y 35 °C/min de 300 a 400 °C/min. El gas portador utilizado es helio N50 (99.999 % puro; Air Liquid).

2.2. Inyector de temperatura programada

El modelo utilizado es un PTV 6890 de Agilent Technologies. Tiene las mismas especificaciones técnicas que el PTV de Gerstel, definido en el apartado anterior, y puede utilizar los mismos *liners*. La única diferencia es que en este modelo el cabezal del inyector tiene *septum*, por lo que es más similar a los inyectores *split/splitless* convencionales.

2.3. Detector de captura electrónica

El modelo utilizado es un micro-detector de captura electrónica (μ -ECD) de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania), con una fuente de radiación de Ni-63. La temperatura máxima permitida por la fuente de radiación es de 400 °C. El volumen de la zona de detección es 10 veces menor que la de cualquier otro ECD. Para facilitar el transporte de la muestra a través de la célula se utiliza una corriente de gas auxiliar que se une al eluyente de la columna. El flujo de este gas afecta a la sensibilidad del detector y a la resolución del cromatograma. Los valores habituales de flujo de gas auxiliar oscilan entre 20-60 mL/min. El gas utilizado es

nitrógeno (99.999 %; Air Liquid). La velocidad de paso de los analitos a través de la zona de detección es superior a la que se alcanza en los ECD convencionales, lo que reduce el tiempo de residencia de los analitos en la célula. Otro aspecto novedoso del detector μ -ECD es la disposición de ánodo (ánodo escondido), que está situado de tal manera que la probabilidad de que los contaminantes lleguen hasta él es mínima. Estas características del detector se traducen en una mayor sensibilidad a la vez que disminuyen las posibilidades de contaminación de la celda.

2.4. Sistema de inyección de muestras líquidas

El modelo utilizado es un Agilent 7683. La torre del inyector contiene una jeringa, que puede ser de 5 ó 10 μ L. Es posible seleccionar dos velocidades para el émbolo de la jeringa: baja (5 μ L/s) y alta (100 μ L/s).

El control de todos los módulos que componen la configuración instrumental se realiza mediante software específico desde el ordenador. La adquisición y manipulación de los datos también se realiza en el ordenador.

En la figura 7 se muestra una fotografía de esta configuración instrumental. Se ha utilizado en el desarrollo de las aplicaciones descritas en los capítulos VI y VII de esta memoria.

Figura 7: Configuración instrumental PTV-GC-ECD

3. CROMATÓGRAFO DE GASES (GC X GC) CON INYECTOR SPLIT/SPLITLESS Y ESPECTRÓMETRO DE MASAS DE TIEMPO DE VUELO

3.1. Cromatógrafo de gases

El modelo de cromatógrafo de gases es un Agilent 7890, equipado con un inyector *split/splitless* convencional. El cromatógrafo se ha modificado con la instalación de un horno secundario y de un modulador criogénico en dos etapas con cuatro chorros. La columna cromatográfica empleada en la primera dimensión es una HP-5 (29 m x 0.25 mm i.d., 0.25 μ m de espesor de fase estacionaria) de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania) y la de la segunda dimensión es una RTX-17 (79 cm x 0.1 mm x 0.1 μ m) de Restek (Bellefonte, PA, USA). Las dos columnas se conectan mediante un conector universal Silket® Treated Universal Press-Thight® (Restek). En la figura 8 se muestra una fotografía del horno del cromatógrafo de gases con el horno secundario y el modulador instalados.

Figura 8: Horno secundario y modulador instalados en el horno convencional del cromatógrafo de gases

Las rampas de temperaturas empleadas en GC X GC suelen ser de 1 a 5 °C/min durante todo el análisis. La rampa de temperaturas en los dos hornos debe ser la misma, con la diferencia de que el horno secundario está siempre unos cuantos grados (generalmente 20 °C) por encima de la temperatura del horno primario.

En el modulador, el enfriamiento se consigue con flujos de nitrógeno gas presurizado que se enfría con nitrógeno líquido, el cual es dispensado mediante un contenedor portátil Euro-Cyl 120/4.

El gas portador utilizado es helio N50 (99.999% puro; Air Liquid).

3.2. Espectrómetro de masas de tiempo de vuelo

El modelo utilizado es un LECO Pegasus® 4D de LECO (St. Joseph, MI, USA). La línea de transferencia entre el horno secundario y el detector se mantiene a la misma temperatura, o a una temperatura ligeramente superior, a la temperatura final de la columna de la segunda dimensión. La temperatura recomendada para la fuente de ionización es de 200 °C. Se utilizó ionización de impacto electrónico, con un voltaje de 70 eV. El detector permite seleccionar el intervalo de masas que se va a registrar y la frecuencia de adquisición de datos, que puede ser de hasta 500 Hz.

3.3. Sistema de inyección de muestras líquidas

El modelo utilizado es un Agilent 7683, cuyas características han sido descritas en la sección 2.3 de este apartado.

En la figura 9 se muestra una imagen de la configuración instrumental completa. Todos los módulos se controlan desde el ordenador mediante el software Pegasus® 4D (versión 3.34.). Se ha utilizado en el desarrollo de la aplicación descrita en el apartado IX.

Figura 9: Configuración instrumental GC X GC-TOFMS

La adquisición y tratamiento de los datos se hicieron mediante el software LECO® ChromaTOF®, optimizado para Pegasus® 4D (versión 3.34.). Esta versión del software de análisis de datos incluye muchas funciones que facilitan y simplifican enormemente el tratamiento de los mismos. Entre estas funciones se pueden citar: búsqueda automática de picos, deconvolución de espectros, búsqueda automática de espectros en la librería, combinación de picos e integración automática de todos los picos de la segunda dimensión que corresponden a un mismo compuesto. La base de datos de espectros utilizada es la NIST'98 (NIST/EPA/NIH Mass spectral Library, version 1.6).

IV

**DETERMINACIÓN DE THMS EN AGUAS
MEDIANTE EL ACOPLAMIENTO DE
UN GENERADOR DE ESPACIO DE CABEZA
CON UN INYECTOR DE TEMPERATURA
PROGRAMADA**

1. INTRODUCCIÓN

La práctica de cloración de los suministros de agua de consumo por motivos de salud pública comenzó en 1908 en los Estados Unidos de América y desde entonces continúa siendo el método de desinfección más utilizado y el más efectivo y económico [1]. Desafortunadamente, la cloración del agua da lugar a la formación de subproductos no deseados, tales como trihalometanos (*trihalomethanes*, THMs) y ácidos haloacéticos (*haloacetic acids*, HAAs) [2,3].

Los THMs fueron identificados por primera vez, como subproductos de la desinfección de agua, por J.J. Rook en 1974 [4]. Los compuestos que se forman más frecuentemente son cloroformo (CFM), bromodiclorometano (BDCM), dibromoclorometano (DBCM) y bromoformo (BMF) [5,6]. El cloroformo es el THM más común y también el principal subproducto de desinfección en el agua clorada. En presencia de iones bromuro se forman preferentemente los THMs bromados y la concentración de cloroformo disminuye proporcionalmente [7].

La presencia de THMs en el agua potable supone una preocupación debido a sus posibles efectos adversos para la salud. La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) ha clasificado el cloroformo y el bromodiclorometano como posibles carcinógenos en humanos (Grupo 2B), basándose en pruebas insuficientes de su carcinogenicidad en humanos pero evidencias suficientes de su carcinogenicidad en animales de laboratorio. El dibromoclorometano y el bromoformo pertenecen al Grupo 3 (no clasificables como carcinógenos en humanos), debido a que las pruebas de su carcinogenicidad son insuficientes en humanos y limitadas o insuficientes en animales de laboratorio [8].

La Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos de América (*Environmental Protection Agency*, EPA) estableció en 1998 un nivel

máximo permitido para la concentración total de THMs en las aguas potables de 80 µg/L [9]. La Unión Europea adoptó en noviembre de 1998 la directiva 98/83/CE, relativa a la calidad de las aguas de consumo humano, en la que se establece un nivel máximo de 100 µg/L [10].

El análisis de THMs y otros compuestos volátiles en el agua, a nivel de trazas, se ha realizado principalmente mediante cromatografía de gases seguida de detección por captura electrónica (ECD) o espectrometría de masas (MS). Generalmente es necesaria una etapa de pretratamiento de la muestra, en la que los compuestos se separan de la matriz y, en algunos casos, se someten a procedimientos de preconcentración para alcanzar los niveles de sensibilidad deseados. Esta etapa, además de ser la más laboriosa, es la principal fuente de error del método analítico. Recientemente se ha publicado una revisión bibliográfica en la que se describen los principales métodos empleados para la determinación de THMs en aguas [11].

La técnica de preconcentración tradicionalmente más utilizada para la determinación de THMs en aguas ha sido la extracción líquido-líquido (LLE) [12-15]. Este procedimiento es muy laborioso, lento y generalmente requiere del uso de grandes cantidades de disolvente. En los últimos se han desarrollado técnicas que consisten en variaciones de LLE, con el fin de solucionar los problemas asociados a la misma. Estas nuevas estrategias se han denominado técnicas de microextracción con disolvente (SME) o técnicas de microextracción en fase líquida (LPME). Una de estas técnicas es la denominada microextracción en una gota (SDME), que ha sido aplicada al estudio de este tipo de contaminación, ya sea de forma directa [16] o en la configuración HS-SDME [17]. Otra posibilidad de LPME es el uso de disolventes soportados en membranas (*supported liquid membrane, SLM*) [18], o la técnica desarrollada recientemente y conocida como microextracción líquido-líquido dispersiva (*dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME*) [19].

Otra técnica muy empleada para la extracción de compuestos volátiles de diversas matrices es la generación de espacio de cabeza en sus distintas modalidades. La metodología HS estático-GC ha sido ampliamente aplicada a la determinación de THMs en aguas [12,13,20-22]. La principal ventaja de esta configuración es que el tratamiento de la muestra se reduce al mínimo, evitando así los posibles errores asociados a esta etapa. El acoplamiento de esta modalidad estática presenta, a veces, el inconveniente del ancho de banda inicial cuando se introducen volúmenes grandes de muestra para aumentar la sensibilidad.

Con las técnicas de HS en dos pasos, que incluyen una etapa previa de preconcentración de los analitos, se consiguen mejores niveles de sensibilidad. Se han utilizado tanto HS-SPME (microextracción en fase sólida) [23-26] como purga y trampa (P&T) [12,13,21,27-30].

Otras técnicas aplicadas a la determinación de estos compuestos son muestreo capilar a través de membrana (*capillary membrane sampling, CMS*) [31-33] y el análisis por extracción en bucle cerrado (*closed-loop stripping analysis, CLSA*) [34].

También se han utilizado, aunque en menor proporción, métodos no separativos tales como: introducción en espectrometría de masas a través de membrana (MIMS) [35] y el acoplamiento directo de un generador de espacio de cabeza con un espectrómetro de masas (HS-MS) [36, 37]. La metodología MIMS también se ha empleado acoplada a un cromatógrafo de gases, equipado con un inyector de temperatura programada (PTV), consiguiendo un método rápido y sensible para la determinación en línea de THMs en aguas cloradas [38].

Nuestro grupo de investigación ha aplicado de forma satisfactoria la configuración instrumental basada en el acoplamiento de un generador de espacio de cabeza con un cromatógrafo de gases- equipado con un inyector de temperatura programada (PTV)- y detección mediante espectrometría de

masas en la determinación de compuestos oxigenados y BTEX en aguas [39,40]. En este trabajo se propone el uso de esta nueva metodología para la determinación cuantitativa de THMs en aguas.

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es el de estudiar las posibilidades de un inyector de temperatura programada como sistema de introducción de muestras gaseosas, procedentes del generador de espacio de cabeza, en cromatografía de gases.

De este modo se pretenden solucionar los inconvenientes asociados a los inyectores convencionales *split/splitless*. Para este fin, la utilización de un dispositivo automático y comercialmente disponible evita el uso de los dispositivos de enfoque criogénico fabricados manualmente, y difíciles de manipular y reproducir, que se han venido utilizando en los últimos años.

Se selecciona el generador de espacio de cabeza estático como técnica de generación de volátiles con el objetivo de proponer un método rápido, que reduce al mínimo la etapa de pretratamiento de la muestra. Se logra así una reducción en el tiempo y precio del análisis y, además, una disminución considerable de los errores asociados a esta etapa.

Dentro de la tendencia de reducir al mínimo el tiempo de análisis se estudiarán las posibilidades de la cromatografía de gases rápida. Para ello se utilizará una columna de pequeño diámetro interno, altos flujos de gas portador y las rampas de temperaturas máximas permitidas por el equipo.

Se explorarán las posibilidades de la configuración instrumental HS-PTV-FGC-MS en el análisis a nivel de trazas, mediante la determinación de trihalometanos en muestras de agua.

El objetivo final del trabajo es poner a punto un método rápido, preciso y exacto para la determinación de trihalometanos en aguas.

Para ello se compararán los distintos modos de inyección permitidos por el PTV, seleccionando el más apropiado para el problema en cuestión. Se realizará un estudio de optimización de las distintas variables que influyen

en el proceso de medida y se aplicará el método optimizado a la determinación de THMs en diferentes muestras de agua.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos

Los trihalometanos (cloroformo, bromodiclorometano, dibromoclorometano y bromoformo) de Supelco (Bellefonte, PA, USA) fueron suministrados en un vial de 1 mL (*Trihalomethanes calibration mix*), que contenía los cuatro compuestos en una concentración de 200 mg/L en metanol. El metanol utilizado como disolvente fue suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania).

3.2. Disoluciones estándar y muestras

Se preparó una disolución de 200 mg/L por dilución de la mezcla de calibración en metanol. A partir de esta disolución madre se prepararon, en agua mineral, las distintas disoluciones empleadas para obtener las curvas de calibración y los límites de detección y cuantificación.

Se utilizó agua mineral, ya que en análisis previos realizados con agua destilada y agua ultrapura se detectaron concentraciones traza de estos compuestos. Otros autores han descrito la presencia de THMs, sobre todo cloroformo, en todas las matrices acuosas e incluso en el aire [26].

Los modelos obtenidos con las disoluciones preparadas en agua mineral se utilizaron para predecir las concentraciones de estos compuestos en diferentes muestras de agua.

3.3. Instrumentación HS-PTV-GC-MS

La configuración instrumental utilizada es la descrita en el apartado 1 de la sección III “Configuraciones instrumentales utilizadas”. Consta de cuatro partes fundamentales, que se han representado en el diagrama esquemático de la figura 1. Se han alterado los tamaños relativos de los diferentes módulos para resaltar las partes que se han considerado más significativas.

Figura 1: Diagrama esquemático de la configuración instrumental utilizada

El muestreo mediante generación de espacio de cabeza se llevó a cabo con el muestreador (modelo A 7694) de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania). El bucle de níquel de 3 mL se mantuvo a una temperatura de 95 °C y la línea de transferencia, que conecta el generador de espacio de cabeza con el inyector de temperatura programada se mantuvo a 100 °C. El gas portador era Helio N50 (99.995% de pureza; Air Liquide).

El *liner* utilizado en el inyector PTV (CIS-4; Gerstel, Baltimore, MD, USA) estaba empaquetado con Tenax-TA®.

El cromatógrafo de gases era un Agilent 6890 equipado con una columna capilar DB-VRX (20 m x 0.18 mm x 1 µm). La detección se realizó mediante espectrometría de masas, utilizando un detector de tipo cuadrupolo (HP

5973), que dispone de una fuente inerte de ionización por impacto electrónico a 70 eV. La temperatura de la fuente de ionización fue de 230 °C y se seleccionó una temperatura del cuadrupolo de 150 °C. Las medidas se realizaron tanto en modo de adquisición de datos *scan* como en modo SIM.

3.4. Procedimientos HS-PTV-GC-MS

3.4.1. Generador de espacio de cabeza

Alícuotas de 5 mL de las muestras de agua se depositaron en viales de 10 mL, que se cerraron con tapones que poseen *septum* de silicona. Cada muestra se analizó por triplicado. Una vez cerrados, los viales fueron sometidos al procedimiento de generación de espacio de cabeza a 90 °C, durante 30 min. Después de este tiempo, y una vez completados los procesos de presurización y llenado del bucle, la muestra se inyectó en el sistema durante 1 min.

3.4.2. Inyector de temperatura programada

Se utilizó el modo de inyección *solvent vent*. El enfriamiento del *liner* se consiguió con CO₂ líquido. Además se estudiaron otros modos de inyección permitidos por el PTV utilizado, con el fin de comparar los resultados obtenidos.

El espacio de cabeza se introdujo en el inyector a 5 °C. El flujo de purga se ajustó a 50.0 mL/min y la presión de venteo se fijó en 5.00 psi. Tras 1.70 min la válvula de purga o división se cerró y el *liner* se calentó rápidamente a 12 °C/s hasta alcanzar 250 °C, de manera que los analitos son transferidos, por desorción térmica, a la columna capilar (0.60 min). Una vez transcurrido este tiempo, la válvula de división se abrió de nuevo y la temperatura del *liner* se mantuvo a 250 °C durante 5.60 min.

3.4.3. Cromatógrafo de gases

La temperatura inicial del horno se fijó en 45 °C (durante 3 min), esta temperatura se incrementó hasta 175 °C a una velocidad de 70 °C/min, que se incrementó de nuevo hasta 240 °C a una velocidad de 45 °C/min y la columna se mantuvo a esta temperatura durante 1 min. Bajo estas condiciones los compuestos eluyeron en menos de 5 min y el tiempo cromatográfico total fue de 7.30 min.

3.4.4. Espectrómetro de masas

En el modo de adquisición de datos *scan* se registraron las relaciones m/z (masa/carga) entre 25 y 270 uma, y se seleccionó un valor umbral de abundancia de 0. La identificación de los diferentes compuestos se realizó por comparación de los espectros experimentales con los correspondientes a la base de datos NIST'98 (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, versión 1.6).

La información obtenida a partir de estos registros sirvió para establecer tres grupos SIM. El primero (3.00-4.50 min) contenía los tres iones más abundantes del cloroformo y el bromodiclorometano (83, 85 y 47); el segundo (4.50-4.83 min) estaba formado por los tres iones característicos del bromodiclorometano (127, 129 y 131), y el tercer grupo (4.83- 7.30 min) contenía las relaciones m/z 171, 173 y 175, características del bromoformo. La adquisición de señales para cada ion se realizó con un tiempo de permanencia de 30 ms.

3.5. Análisis de datos

La recogida de los datos cromatográficos se realizó con el software Enhanced ChemStation [41], G1701CA Ver. C 00.00 de Agilent Technologies.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Optimización de las condiciones experimentales del sistema HS-PTV-GC-MS

4.1.1. Optimización de la separación cromatográfica

Con el fin de conseguir la separación de los cuatro THMs mediante cromatografía de gases rápida, se utilizaron las rampas de temperaturas máximas permitidas por el horno del cromatógrafo y la columna capilar utilizados (véase apartado 3.4.3 de la parte experimental). De tal manera que la única variable a optimizar fue la temperatura inicial de la columna. Se estudiaron valores que oscilaban entre 35 °C y 55 °C. Los resultados mostraron que a medida que la temperatura inicial aumentaba, tenía lugar un ensanchamiento de los picos cromatográficos (Figura 2). Por otro lado, el tiempo necesario para recuperar las condiciones instrumentales iniciales aumentaba considerablemente a medida que la temperatura inicial de la columna disminuía (10 min para 35 °C y 5 min para 45 °C). Como consecuencia, se seleccionó una temperatura inicial de 45 °C, que permitía una separación adecuada de los analitos sin prolongar demasiado el tiempo de análisis.

Figura 2: Cromatogramas de una disolución de 10 ppb de THMs cuando se utilizan distintas temperaturas iniciales en el horno del cromatógrafo

4.1.2. Estudio de los modos de inyección

En el modo de inyección *split* en caliente, la relación de división era 1:10 y la temperatura del inyector se mantuvo a 250 °C durante todo el análisis. Esta misma temperatura se mantuvo en el modo de inyección *splitless* en caliente, con un tiempo de *splitless* de 2.25 min (Figura 3).

Figura 3: Condiciones de los modos de inyección en caliente

En los modos de inyección *split* y *splitless* en frío, la relación de *split* y el tiempo de *splitless* se mantuvieron, respectivamente, en los valores citados anteriormente, mientras que la temperatura inicial del inyector se fijó en 5 °C durante 1.70 min. Después de este tiempo el inyector se calentó a 12 °C/s hasta 250 °C (Figura 4).

La secuencia de etapas involucradas cuando se utiliza el modo de inyección *solvent vent* se ha descrito en la parte experimental (3.4.2) y una representación esquemática puede observarse en la figura 4.

Figura 4: Condiciones de los modos de inyección en frío

En todos los casos, una vez que ha tenido lugar la introducción de la muestra en la columna, se abre la válvula de división y el *liner* se limpia, mediante un flujo de helio, quedando preparado para la próxima inyección. Tras la inyección de la muestra comienza la separación cromatográfica

según el programa de temperaturas también esquematizado en las figuras 3 y 4.

Los cromatogramas obtenidos (modo de adquisición de datos *scan*) al analizar una muestra con los modos de inyección en frío mostraban un retraso en los tiempos de retención de los analitos, respecto a los obtenidos al analizar la misma muestra con los correspondientes modos de inyección en caliente. Al mismo tiempo, se observó un estrechamiento, incremento de altura y mejora de la forma de los picos, cuando se utilizaron los modos de inyección en frío (Figuras 5 y 6).

Figura 5: Comparación de las señales obtenidas mediante inyección split en caliente y en frío de una disolución de 10 ppb de THMs

Figura 6: Comparación de las señales obtenidas mediante inyección *splitless* en caliente y en frío de una disolución de 10 ppb de THMs

El retraso observado en los tiempos de retención es debido a que la transferencia de la muestra desde el PTV a la columna se retrasa, como consecuencia de la preconcentración de los analitos en el *liner* a baja temperatura. El mismo efecto de preconcentración, y la transferencia rápida de la muestra explican los otros efectos observados. Por tanto, con los modos de inyección en frío se consigue mejorar considerablemente la relación señal/ruido (*signal/noise*, *S/N*) y consecuentemente los límites de detección de la técnica. En la tabla 1 se muestran- para la relación m/z más abundante de cada compuesto- las áreas, anchuras de pico a media altura, y relaciones *S/N* de los picos obtenidos con los diferentes modos de inyección. Se ha tomado como referencia el modo de inyección más habitual en cromatografía de gases (*split* en caliente). Se pone de manifiesto que los efectos arriba descritos son más marcados para los compuestos más volátiles, que son los más afectados por el problema del ensanchamiento de

banda inicial, comúnmente asociado a los modos de inyección convencionales en caliente.

Tabla 1: Áreas, anchuras de pico a media altura y relación señal/ruido para los diferentes modos de inyección estudiados en este trabajo

	<i>Scan</i>					SIM
	<i>Split en caliente</i>	<i>Split en frío</i>	<i>Splitless en caliente</i>	<i>Splitless en frío</i>	<i>Solvent vent</i>	<i>Solvent vent</i>
Área						
CFM	1.00	0.79	2.98	3.22	5.55	7.77
BDCM	1.00	0.97	3.81	4.07	7.06	9.88
DBCM	1.00	1.05	4.01	4.40	7.16	11.5
BMF	1.00	1.17	4.55	4.64	8.09	14.6
Anchuras de pico a media altura						
CFM	1.00	0.21	1.05	0.34	0.32	0.38
BDCM	1.00	0.31	1.38	0.53	0.47	0.56
DBCM	1.00	0.45	0.94	0.55	0.50	0.60
BMF	1.00	0.69	0.94	0.77	0.77	0.92
S/N						
CFM	1.00	2.13	1.39	4.22	8.50	96.9
BDCM	1.00	2.20	1.76	3.41	8.34	111
DBCM	1.00	2.36	4.18	6.99	13.4	149
BMF	1.00	1.47	3.44	3.76	11.5	144

El modo de inyección *solvent vent* permite la eliminación del disolvente, que contiene los analitos, mientras que éstos permanecen retenidos en el *liner* del inyector. Generalmente, este modo de inyección se utiliza cuando el disolvente tiene un punto de ebullición inferior a los de los analitos. En este caso, cloroformo y bromodiclorometano tienen puntos de ebullición inferiores al del agua (61 °C y 90 °C respectivamente), mientras que los del dibromoclorometano y el bromoformo son ligeramente superiores (117 °C y 149 °C respectivamente). Este inconveniente se minimiza utilizando un *liner* empaquetado con el material de relleno adecuado. En este estudio se

seleccionó como material de relleno un polímero hidrofóbico- Tenax-TA® - que retiene los analitos de interés pero no el agua.

Con el fin de seleccionar las condiciones experimentales con las que la señal analítica obtenida para los compuestos de interés fuera máxima, se realizó un estudio de optimización de las variables involucradas en el modo de inyección *solvent vent*.

La temperatura inicial de *liner* se estudió para los valores de 5, 15, 25 y 35 °C. No se estudiaron valores inferiores a 5 °C, puesto que el tiempo necesario para enfriar el *liner* por debajo de esta temperatura era demasiado largo. Para todos los compuestos estudiados la señal analítica disminuía a medida que la temperatura inicial aumentaba, siendo este efecto más evidente para los compuestos más volátiles, cloroformo y bromodiclorometano (Figura 7). Con estos resultados, se seleccionó una temperatura inicial del inyector de 5 °C .

Figura 7: Comparación de las señales obtenidas con distintas temperaturas iniciales en el liner del PTV (disolución de THMs de 10 ppb)

Las variables que afectan a la eliminación del disolvente son: el tiempo durante el que se elimina el disolvente, denominado tiempo de purga, y el flujo al que tiene lugar esta purga del disolvente.

La primera variable se estudió para valores entre 1.55 y 2.0 min. Para todos los compuestos la señal analítica era prácticamente constante para tiempos de purga entre 1.65 y 2.00 min. Para tiempos inferiores se observó una ligera disminución de las señales analíticas, probablemente debida a que no se conseguía la eliminación completa del disolvente (Figura 8). Como consecuencia, se seleccionó un tiempo de 1.65 min como valor óptimo para esta variable.

Figura 8: Comparación de las señales obtenidas con distintos tiempos de purga en una disolución de THMs de 10 ppb

El flujo de purga no afectaba de manera significativa a la señal analítica, por lo que se seleccionó un flujo de 50 mL/min, que permitía la eliminación adecuada del disolvente (Figura 9).

Figura 9: Comparación de las señales obtenidas con distintos flujos de purga en una disolución de THMs de 10 ppb

Finalmente, se estudió el tiempo de inyección. La desorción térmica de los analitos tenía lugar mediante la rampa de temperaturas mostrada en la figura 4, según la cual, el *liner* pasaba de 5 °C a 250 °C en 0.3 min. Se estudiaron los tiempos de inyección de 0.1, 0.6, 1.0 y 1.5 min. La señal máxima se obtenía para el valor de 0.6 min. Este tiempo es suficiente para lograr la inyección completa de la muestra. Para tiempos inferiores, la inyección de la muestra era sólo parcial, mientras que para tiempos mayores se observó un ensanchamiento de los picos cromatográficos (Figura 10).

Figura 10: Comparación de las señales obtenidas con distintos tiempos de inyección en una disolución de THMs de 10 ppb

En la tabla 1 se muestran las áreas, anchuras de pico a media altura y relaciones S/N para los distintos modos de inyección permitidos por el PTV, utilizando el modo de inyección *split* en caliente como referencia. Comparando los tres modos de inyección en frío se observa que con el modo de inyección *split* las señales eran mucho menores, ya que sólo se inyecta una parte de la muestra (Figura 11). Sin embargo, comparando los dos modos de inyección en los que todos los volátiles del espacio de cabeza se inyectan en la columna, se observa que con el modo *solvent vent* se obtenía un incremento en el área y la altura de los picos, con el consiguiente incremento de la relación S/N.

Figura 11: Comparación de los tres modos de inyección en frío en una disolución de THMs de 10 ppb

Para concluir el estudio de los modos de inyección, la figura 12 muestra los cromatogramas obtenidos con el modo de inyección *split* en caliente - convencional en cromatografía de gases - y el modo de inyección *solvent vent*, optimizado en este trabajo. En cada caso se ha extraído la relación m/z más abundante para cada compuesto. Se observa un incremento significativo de la señal analítica cuando se utiliza el modo *solvent vent*, lo que permite proponer un método analítico altamente sensible para la determinación de THMs en aguas.

Figura 12: Comparación de *split en caliente* con *solvent vent* en una disolución de THMs de 10 ppb

4.1.3. Modos de adquisición de datos

Los resultados descritos hasta ahora se han obtenido con el modo de adquisición de datos *scan* para un intervalo de relaciones m/z entre 25 y 270 uma. Con la información obtenida a partir de estos cromatogramas se establecieron tres grupos SIM que contenían las tres relaciones m/z más abundantes para cada compuesto (véase parte experimental 3.4.4).

La figura 13 muestra las ventanas de los cromatogramas obtenidos cuando, en las condiciones óptimas para el modo de inyección *solvent vent*, se analiza la misma muestra con los modos de adquisición de datos *scan* y SIM. Para cada compuesto se ha extraído la relación m/z más abundante: m/z 83 para cloroformo y bromodichlorometano (Figuras 13a y 13b respectivamente); m/z 127 para dibromoclorometano, y m/z 173 para bromoformo. En el modo de adquisición de datos SIM se observó un ligero incremento de área de pico para todos los compuestos, que oscila entre 1.4

veces para el cloroformo y 1.8 para el bromoformo (Tabla 1). Sin embargo, más importante que este incremento en el área de los picos es la disminución del ruido registrado con el modo SIM para cada ion extraído, como se puede comprobar en las ventanas ampliadas, representadas en la parte superior derecha de cada cromatograma parcial mostrado en la figura 13. Esta disminución del ruido se traduce en un incremento de la relación S/N que oscila entre 11.1 y 13.3 veces (véase tabla 1).

Figura 13: Comparación de los modos de adquisición de datos scan y SIM en una disolución THMs de 10 ppb

La combinación del modo de inyección *solvent vent*, propuesto aquí, junto con el modo de adquisición de datos SIM, en las condiciones apropiadas, permite conseguir un incremento en la relación S/N de 100 a 150 veces con respecto al modo de inyección convencional en cromatografía de gases (*split* en caliente) con detección en modo *scan*.

Con las condiciones experimentales optimizadas (Tabla 2) era posible separar los cuatro THMs en menos de 5 min. En la figura 14 se muestra el cromatograma obtenido al analizar una muestra de agua con 2 ppb de cada uno de los THMs, con las condiciones experimentales optimizadas. Las anchuras de pico a media altura fueron de 1.68 s para el cloroformo, 1.08 s para el bromodiclorometano, 0.72 s para el dibromoclorometano y 0.66 s para el bromoformo. Según la clasificación basada en este parámetro, la separación obtenida corresponde a cromatografía de gases rápida para los dos primeros compuestos y muy rápida para los dos últimos [42].

Figura 14: Cromatograma de una disolución de 2 ppb de THMs

Tabla 2: Condiciones experimentales optimizadas

GENERADOR DE ESPACIO DE CABEZA		
Temperaturas	Horno	90 °C
	Bucle	95 °C
	Línea de Transferencia	100 °C
Tiempos	Generación espacio de cabeza	30 min
	Intervalo entre muestras	12.30 min
	Presurización del vial	0.30 min
	Llenado del bucle	0.15 min
	Equilibrado del bucle	0.02 min
	Inyección	1.00 min
INYECTOR DE TEMPERATURA PROGRAMADA		
Modo de inyección: Solvent vent	Flujo de purga	50.0 ml/min
	Tiempo de purga	1.65 min
	Tiempo de inyección	0.6 min
	Flujo de limpieza	20.0 mL/min
Inyección en frío	Tª inicial	5 °C (1.70 min)
	Rampa	12 °C/s hasta 250 °C (5.60 min)
CROMATÓGRAFO DE GASES		
Horno	Tª inicial	45 °C (3 min)
	Rampa 1	70 °C/min hasta 175 °C
	Rampa 2	45 °C/s hasta 240 °C (1 min)
	Tiempo cromatográfico total: 7.30 min	
ESPECTRÓMETRO DE MASAS		
Modo de adquisición de datos: SIM	Tiempo de permanencia: 30ms	
	Grupo 1: m/z (83, 85, 47), 3.00 a 4.50 min	
	Grupo 2: m/z (127, 129, 131), 4.50 a 4.83 min	
	Grupo 3: m/z (171, 173, 175), 4.83 a 7.30 min	

4.2. Calibración

Para cada uno de los analitos examinados se estudiaron trece niveles de concentración en el intervalo de 0.05 a 76 ppb, por lo que, para cada compuesto se cubren 3.5 órdenes de magnitud. Cada nivel se analizó por triplicado y se evaluó la linealidad del método. Este amplio intervalo de

concentraciones permite cuantificar los THMs en diferentes tipos de agua, en los que las concentraciones de estos compuestos pueden ser muy diversas.

Las variables utilizadas para la calibración fueron las áreas de los picos obtenidos al extraer, en cada caso, la relación m/z más abundante para cada uno de los compuestos de interés: m/z 83 para el cloroformo y el bromodiclorometano, m/z 127 para el bromodiclorometano y m/z 173 para el bromoformo (Figura 15).

Figura 15: Rectas de calibración en el intervalo 0.05-76 ppb

En la tabla 3 se resumen las características analíticas del método. Todas las calibraciones mostraron un comportamiento lineal, con valores de coeficiente de determinación (R^2) superiores a 0.99. La ordenada en el origen incluía el cero en todos los casos. Para estudiar la validez de los modelos se llevó a cabo un análisis de varianza, comprobando que ninguno de los modelos generados presentaba fallo de ajuste. La reproducibilidad, para un nivel de concentración de 1.0 ppb era satisfactoria, con valores de desviación estándar relativa (*relative standar deviation, RSD*) iguales o inferiores al 4.3%.

Tabla 3: Características analíticas del método

Compuesto	Pendiente	Ordenada en el origen	R^2	RSD (%)*	LD (ng/L)	LQ (ng/L)
CFM	$(6.26 \pm 0.06) \times 10^4$	$(1 \pm 2) \times 10^4$	0.9990	4.3	2.6	8.0
BDCM	$(3.91 \pm 0.06) \times 10^4$	$(0.5 \pm 1.6) \times 10^4$	0.9977	0.7	0.4	1.0
DBCM	$(2.01 \pm 0.06) \times 10^4$	$(-2 \pm 7) \times 10^4$	0.9983	0.8	0.5	1.0
BMF	$(1.51 \pm 0.06) \times 10^4$	$(-6 \pm 7) \times 10^4$	0.9974	1.3	0.6	2.0

* Calculado para una muestra de 1 µg/L de cada compuesto y n=3

Los límites de detección se estimaron a partir de la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3.3\sigma}{S}$$

donde σ es la desviación estándar (número de réplicas, n=10) de la señal de un pico correspondiente a una relación señal/ruido de aproximadamente 3; S es la pendiente de la curva de calibrado y 3.3 es el valor del parámetro t de Student (para n-1, 0.99).

Los límites de cuantificación se estimaron utilizando la ecuación:

$$LQ = \frac{10\sigma}{S}$$

donde σ y S significan lo mismo que en la ecuación previa. Los límites de cuantificación para los cuatro compuestos están especificados en la tabla 3.

En la tabla 4 se resumen las principales características analíticas de algunos de los métodos empleados para la determinación de THMs en aguas durante los últimos diez años. Una revisión más exhaustiva de los métodos analíticos empleados en este tipo de análisis es la correspondiente a la cita [11], cuya versión original se ha incluido al final de este capítulo (*published article IV₂*).

Taba 4: Comparación de las principales características analíticas de algunos métodos empleados para la determinación de THMs en aguas en los últimos diez años.

Configuración instrumental	Año	Linealidad		Reprod. RSD % (µg/L) ^a	LD (ng/L)	Ref.
		Margen conc. (µg/L)	R ²			
SDME-GC-ECD	2006	1-75	>0.991	<7 (15)	230-450	16
HS-SDME-GC-ECD	2004	1-100	>0.9982	<11.3 (10)	150-400	17
SLM-GC-ECD	2006	0.2-100	>0.9973	<6 (1)	10-200	18
DLLME-GC-ECD	2008	10-500	>0.9990	<8.6 (5)	5-40	19
HS-GC-MS	2001	0.5-10	ne	<39 (0.5)	100	12
HS-GC-MS	2002	0.5-10	ne	<39.1 (0.59)	50-200	13
HS-GC-ECD	2002	ne	ne	ne	60-500	20
HS-GC-MS	2006	20-300	>0.970	31.9 (40)	100	22
HS-PTV-GC-MS	2008	0.05-76	>0.9945	<4.3 (1)	0.4-2.6	c
HS-SPME-GC-ECD	2006	5-500	<0.9968	<2.6 (ne)	0.3-1.4	23
HS-SPME-GC-ECD	2003	0.05-80	>0.9976	<6.2 (5)	5-10	24
HS-SPME-GC-MS	2007	0.05-150	>0.990	<4 (9.6)	0.43-6	25
HS-SPME-GC-MS	2005	0.1-100	>0.9991	<4.5 (0.1)	10-20	26
P&T-GC-MS	2001	ne	ne	<64.9 (10)	50-250	12
P&T-GC-ECD	2001	ne	ne	<19.3 (2)	25-50	12
P&T-GC-MS	2002	0.1-40	ne	<13.2 (1)	10-50	13
P&T-GC-MS	2006	20-80	>0.849	<30.35 (20)	100	22
P&T-GC-MS	2005	0.001-1	ne	<10 (ne)	1	27
P&T-GC-MS	2001	0.2-25	>0.994	<10.5 (4)	20-120	28
P&T-GC-ECD	2000	1-50	>0.997	<12 (0.1)	20-70	29
CMS-GC-ECD	2006	0.9-35	>0.987	<8.6 (1.8)	100-400	31
SCMS-GC-ECD	2004	1.2-32.0	>0.993	<5.3 (ns)	300-900	32
CMS-FIA-FL	2005	10-100	>0.976	<8.8 (25)	1700-9400	33
MIMS-PTV-FGC-MS	2000	0.025-20	>0.993	<9.5 (b)	2-8	38
HS-MS	2007	4-50	ne	<4.5 (10)	100-120	39,40

ne: no especificado

^aConcentración a la que se ha calculado la RSD

^bMedia de 3 réplicas para cada nivel de concentración estudiado

^cMétodo propuesto en este trabajo

Con las técnicas de microextracción en fase líquida se obtienen buenos niveles de sensibilidad (5-450 ng/L).

Dentro de las técnicas de generación de espacio de cabeza, los mejores límites de detección se han obtenido con HS-SPME (0.3-20 ng/L). Con el modo dinámico (P&T) se consigue un gran aumento de sensibilidad cuando se utilizan trampas frías para focalizar los analitos y sistemas para eliminar el vapor de agua. Con la modalidad de generación de espacio de cabeza estático se obtienen límites de detección más bajos. Sin embargo, con la configuración instrumental propuesta en este trabajo (HS-PTV-GC) se consigue obtener límites de detección (0.4 a 2.6 ng/L), del mismo orden a los obtenidos con la técnica HS-SPME, pero manteniendo la instrumentación sencilla del HS estático.

Con los métodos basados en muestreo a través de membrana, se han obtenido buenos límites de detección que, de nuevo, mejoran significativamente cuando se incluye una trampa fría para focalizar los analitos antes de inyectarlos en el sistema.

Como conclusión se puede destacar que, los límites de detección obtenidos en este estudio se encuentran dentro de los más bajos en comparación con los obtenidos mediante otras metodologías descritas en literatura.

4.3. Determinación de trihalometanos en diferentes matrices acuosas

Para determinar la capacidad predictiva del modelo se analizaron distintas matrices de agua: agua ultrapura, mineral, de grifo y de sondeo. El amplio rango de concentraciones utilizado en los modelos de calibración permite seleccionar, a partir del calibrado completo, el intervalo más adecuado para la determinación de cada compuesto en cada muestra. De

este modo, se obtiene el valor de concentración con la menor incertidumbre posible.

Para confirmar la posible presencia de estos compuestos en las muestras analizadas, se comprobaron los espectros de masas de los picos que aparecían a los tiempos de retención que se habían determinado al analizar las disoluciones patrón. Inicialmente, las muestras se analizaron con el modo de adquisición de datos *scan* (Figura 16a). La identificación de los THMs se realizó por comparación de los espectros experimentales con los correspondientes a la base de datos NIST'98, admitiendo una diferencia en las abundancias relativas de los tres iones más intensos para cada compuesto inferiores al 20 %, que es lo habitual en este tipo de estudios. La cuantificación se realizó en modo SIM (Figura 16b), utilizando las mismas condiciones empleadas para obtener los calibrados.

Figura 16: Cromatograma de una muestra de agua de grifo (grifo 1) analizada en modo *scan* (a) y modo SIM (b)

La tabla 5 muestra las concentraciones encontradas para cada uno de los THMs en las diferentes muestras de agua analizadas. El intervalo de confianza se ha expresado para el valor de tres réplicas con un nivel de confianza del 95 %. Entre paréntesis se muestra el intervalo de concentraciones utilizado para la predicción de la concentración.

Tabla 5: Concentraciones encontradas en las muestras analizadas

Muestra	CFM (µg/L)	BDCM (µg/L)	DBCM (µg/L)	BFM (µg/L)
Agua uhq	0.82±0.03 (0-1)	<LC	<LD	<LD
Grifo 1	36.8±0.9 (0-76)	2.5±0.2 (0-6)	0.11±0.01 (0-0.5)	<LD
Grifo 2	37.0±0.9 (0-76)	2.4±0.2 (0-6)	0.10±0.01 (0-0.2)	<LD
Grifo 3	36.0±0.9 (0-76)	2.5±0.2 (0-6)	0.11±0.01 (0-0.2)	<LD
Grifo 4	23.8±0.7 (0-50)	1.8±0.2 (0-6)	0.08±0.01 (0-0.2)	<LD
Grifo 5	105±1 (0-76)	6.1±0.2 (0-10)	0.46±0.02 (0-1)	<LD
Sondeo 1	2.00±0.02 (0-6)	0.26±0.02 (0-0.5)	0.038±0.006 (0-0.1)	0.016±0.007 (0-0.05)
Sondeo 2	<LC	<LD	<LD	<LD
Agua mineral 1	0.015±0.007 (0-0.1)	<LC	<LC	<LC
Agua mineral 2	0.042±0.007 (0-0.1)	<LC	0.008±0.006 (0-0.05)	<LC

En el agua ultrapura, el agua mineral y las aguas de sondeo, se cuantificaron algunos de estos compuestos en concentraciones inferiores a 2 µg/L.

En las aguas de grifo, la concentración de cloroformo era de 20 a 40 µg/L, salvo para el agua “grifo 5” con una concentración de 105 µg/L (esta muestra se diluyó en una proporción 1:2 con agua mineral para el análisis, ya que la concentración estaba fuera del intervalo de calibración). El bromodiclorometano y el dibromoclorometano se cuantificaron en concentraciones menores. En ninguna de las muestras de agua de grifo se detectó bromoformo.

5. CONCLUSIONES

Se ha implementado un nuevo método para la determinación de THMs en agua, basado en el acoplamiento de generación de espacio de cabeza, inyección de muestra con el modo *solvent vent*, separación mediante cromatografía de gases rápida y detección mediante espectrometría de masas. Las principales ventajas del método son las siguientes:

La utilización de espacio de cabeza permite la introducción de las muestras en el montaje instrumental sin ningún tipo de tratamiento previo de las mismas. De esta forma se elimina la manipulación de las muestras, se simplifica el procedimiento y se minimizan los errores asociados a esta etapa del proceso analítico.

El acoplamiento de un generador de espacio de cabeza con un inyector de temperatura programada da resultados altamente satisfactorios. El modo de inyección *solvent vent* permite la inyección rápida de la muestra en modo *splitless*, dando lugar a límites de detección muy buenos sin el crítico problema de ensanchamiento de banda inicial.

La columna capilar utilizada permite obtener separaciones rápidas de los compuestos con anchuras de pico a media altura que van de 1.68 s (cloroformo) a 0.66 s (bromoformo). El tiempo cromatográfico total era de 7.3 min.

La utilización de espectrometría de masas permite la identificación inequívoca de los analitos y su cuantificación a niveles tan bajos como las ppt. La relación S/N era al menos diez veces superior cuando se utilizaba el modo de adquisición de datos SIM, respecto al modo *scan*.

El método propuesto es extremadamente sensible, con límites de detección que van de 0.4 a 6 ng/L.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] T. Ivahnenko, J. S. Zogorski, Sources and occurrence of chloroform and other trihalomethanes in drinking-water supply wells in the United States, 1986-2001, U.S Geological Survey Scientific Investigations Report, Virginia, 2006, p13.
- [2] M.J. Rodriguez, J-B. Sérodes, Water Res. 35 (2001)1572.
- [3] L. Zoccolillo, L. Amendola, G.A. Tarallo, Int. J. Environ. Anal. Chem. 63 (1996) 91.
- [4] J.J. Rook, J. Wtr. Trmt. Exam. 23 (1974) 234.
- [5] Z-Y. Zhao, J-D. Gu, X-J. Fan, H-B. Li, J. Hazardous Materials B 134 (2006) 60.
- [6] J.S. Zogorski, J.M. Carter, T. Ivahnenko, W.W. Lapham, M.J. Moran, B.L. Rowe, P.J. Squillace, P.L. Toccalino, Volatile organic compounds in the Nation's Ground water and drinking-water supply wells, U.S Geological Survey Circular 1292, Virginia, 2006, p101.
- [7] World Health Organization (WHO), Guidelines for drinking-water quality, third edition, Geneva, 2006, p366.
- [8] EPA Office of Water, Drinking water criteria document for brominated trihalomethanes, United States, Washington, 2005, p17.
- [9] Environmental Protection Agency (USEPA), National Primary Drinking Water Regulations: disinfectants and disinfection byproducts. United States, 1998.
- [10] Directiva 98/83/CE del consejo de 3 de noviembre de 1998 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano, Diario Oficial de las Comunidades Europeas.
- [11] J.L. Pérez Pavón, S. Herrero Martín, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, Anal. Chim. Acta 626 (2008) 6-23.
- [12] S.K. Golfinopoulus, T.D. Lekkas, A.D. Nikolau, Chemosphere 45 (2001) 275.

-
- [13] A.D. Nikolaou, T.D. Lekkas, S.K. Golfinopoulos, M.N. Kostopoulou, *Talanta* 56 (2002) 717.
- [14] A. Nikolaou, S. Golfinopoulos, L. Rizzo, G. Lofrano, T. Lekkas, V. Belgiorno, *Desalination* 176 (2005) 25.
- [15] USEPA Method 551, Determination of Chlorination Disinfection Products and Chlorinated Solvents in Drinking Water by Liquid-Liquid Extraction and Gas Chromatography with Electron-Capture Detection, USEPA, Cincinnati, OH, 1995.
- [16] A. Tor, M.E. Aydin, *Anal. Chim. Acta* 575 (2006) 138.
- [17] R.S. Zhao, W-j Lao, X-b Xu, *Talanta* 62 (2004) 751.
- [18] N. Vora-adisak, P. Varanusupakul, *J. Chromatogr. A* 1121 (2006) 236.
- [19] R.R. Kozani, Y. Assadi, F. Shemirani, M.R.M. Hosseini, M.R. Jamali, *Chromatographia* 66 (2007) 81.
- [20] H. Gallard, U. V. Gunten, *Water Res.* 36 (2002) 65.
- [21] J. Kuivinen, H. Johnsson, *Water. Res.* 5 (1999) 1201.
- [22] M. Culea, O. Cozar, D. Ristoiu, *J. Mass Spectrom.* 41 (2006) 1594.
- [23] C.V. Antoniou, E.E. Koukouraki, E. Diamadopoulos, *J. Chromatogr. A* 1132 (2006) 310.
- [24] D-H. Cho, S-H. Kong, S-G. Oh, *Water Res.* 37 (2003) 402.
- [25] P.M. San Juan, J.D. Carrillo, M.T. Tena, *J. Chromatogr. A* 1139 (2007) 27.
- [26] K. Luks-Betlej, D. Bodzek, *Pol. J. Environ. Stud.* 11 (2002) 255.
- [27] L. Zoccolillo, L. Amendola, C. Cafaro, S. Insogna, *J. Chromatogr. A* 1077 (2005) 181.
- [28] T.C. Chen, G.R. Her, *J. Chromatogr. A.* 927 (2001) 229.
- [29] A.S. Allonier, M. Khalanski, A. Bermond, V. Camel, *Talanta* 51 (2000) 467.
- [30] USEPA Method 524.2, Measurements of Purgeable Organic Compounds in water by Capillary Column Gas Chromatography-Mass Spectrometry, USEPA, Cincinnati, OH, 1995.
- [31] M.A. Brown, G.L. Emmert, *Anal. Chim. Acta* 555 (2006) 75.

-
- [32] G.L. Emmert, G. Cao, C. Duty, W. Wolcott, *Talanta* 63 (2004) 675.
- [33] G. Geme, M.A. Brown, P. Simone Jr, G. L. Emmert, *Water Res.* 39 (2005) 3827.
- [34] A.A. Kampioti, E. G. Stephanou, *J. Chromatogr. A* 857 (1999) 217.
- [35] R.A. Kelota, V.T. Virkki, M. Ojala, V. Komppa, T. Kotiaho, *Talanta* 44 (1997) 373.
- [36] A. Serrano, M. Gallego, *J. Chromatogr. A* 1154 (2007) 26.
- [37] J. Caro, A. Serrano, M. Gallego, *J. Chromatogr. A* 1138 (2007) 244.
- [38] C.C. Chang, G.R. Her, *J. Chromatogr. A* 893 (2000) 169.
- [39] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández Laespada, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A* 1141 (2007) 123.
- [40] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M. E. Fernández Laespada, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A* 1175 (2007) 106.
- [41] Enhanced ChemStation, G1701CA, Version C00.00, Agilent Technologies, CA, United States, 1999.
- [42] P. Korytár, H-G. Janssen, E. Matisová, U.A.Th. Brinkman, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 558.

PUBLISHED ARTICLE

Headspace–programmed temperature vaporizer–fast gas chromatography–mass spectrometry coupling for the determination of trihalomethanes in water

José Luis Pérez Pavón*, Sara Herrero Martín,
Carmelo García Pinto, Bernardo Moreno Cordero

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Ciencias Químicas,
Universidad de Salamanca, 37008 Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 February 2008
Received in revised form 7 April 2008
Accepted 17 April 2008
Available online 22 April 2008

Keywords:

Headspace analysis
Programmed temperature vaporizers
Water analysis
Trihalomethanes

ABSTRACT

A new method based on the use of a headspace autosampler in combination with a GC equipped with a programmable temperature vaporizer (PTV) and an MS detector has been developed for the screening and quantitative determination of trihalomethanes (THMs) in different aqueous matrices. The use of headspace generation to introduce the sample has the advantage that no prior sample treatment is required, thus minimizing the creation of analytical artifacts and the errors associated with this step of the analytical process. The PTV inlet used was packed with Tenax-TA. The injection mode was solvent vent, in which the analytes are retained in the hydrophobic insert packing by cold trapping, while the water vapour is eliminated through the split line. This allows rapid injection of the sample in splitless mode, very low detection limits being achieved without the critical problem of initial sample bandwidth. The capillary column used allowed rapid separations with half-height widths ranging from 1.68 s (chloroform) to 0.66 s (bromoform). The GC run time was 7.3 min. The use of mass spectrometry allows the identification and quantification of the analytes at the low ppt level. The S/N ratio was at least 10-fold higher when the SIM mode was used in data acquisition as compared to the scan mode. The proposed method is extremely sensitive, with detection limits ranging from 0.4 to 2.6 ppt.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Water chlorination has been successfully used to disinfect drinking water since 1908 (USA) and it continues to be the most widely used and cost-effective disinfection process [1]. Unfortunately, chlorination leads to the formation of undesirable disinfection by-products, such as trihalomethanes (THMs) and haloacetic acids (HAAs) [2,3].

THMs were first identified as disinfection by-products (DBPs) by Rook [4]. The compounds most frequently formed are chloroform (CHCl_3), bromodichloromethane (CHCl_2Br), dibromochloromethane (CHClBr_2) and bromoform (CHBr_3) [5,6]. Chloroform is the most common THM and indeed the main DBP in chlorinated drinking water. In the presence of bromides, brominated THMs are formed preferentially and chloroform concentrations decrease proportionally [7].

The presence of THMs in drinking water is a concern in public health owing to their adverse effects on health. The International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified chloroform and bromodichloromethane as possibly carcinogenic to humans (Group 2B), based on limited evidence of carcinogenicity in humans but sufficient evidence of this in experimental animals. Dibromochloromethane and bromoform belong to Group 3 (not classifiable as to their carcinogenicity in humans) based on inadequate carcinogenicity in humans and inadequate or limited in experimental animals [8].

The United States Environmental Protection Agency (EPA) has established a maximum level for total THMs in drinking water of $80 \mu\text{g/L}$ [9]. The European Union has ruled that as of January 2009 the maximum level of THMs should be $100 \mu\text{g/L}$ [10].

Trace analysis of THMs and other volatile compounds in water is usually performed by gas chromatography (GC) followed by electron capture detection (ECD) or mass spectrometric detection (MSD). Usually, a preconcentration step is required, in which the compounds are separated from the matrix to reach the desired levels of sensitivity. This step, as well as being the most

* Corresponding author. Tel.: +34 923 294483; fax: +34 923 294483.
E-mail address: jlp@usal.es (J.L. Pérez Pavón).

tedious and time-consuming, is the main source of error in the analytical method. Many techniques have been described in the literature for this purpose. The preconcentration technique most widely used for the determination of THMs in water is liquid–liquid extraction (LLE) [11–14]. This is also a time-consuming procedure and often needs large amounts of solvent. In the past few years methodologies involving variations of LLE have been developed with a view to solving the problems associated with this extraction method; examples are direct liquid–phase microextraction (LPME) [15], HS–LPME [16] and LPME with supported liquid membranes (SLM) [17].

Another widely used technique for the removal of volatile compounds from different matrices is headspace sampling, in its different modes. The static HS–GC methodology has frequently been used for the determination of THMs in water [11,18–20]. The main advantage of this configuration is that sample treatment is reduced to a minimum, thus avoiding the possible errors associated with this step. Sometimes, the coupling of this mode has the disadvantage of the initial bandwidth when large sample volumes are introduced in order to increase sensitivity.

With two-step HS techniques, which include an additional analyte preconcentration step, it is possible to achieve better levels of sensitivity. Thus, both HS–SPME–GC [21–24] and purge and trap (P&T) [12,25–29] have been used.

Other techniques applied to the determination of these compounds are capillary membrane sampling (CMS) [30–32] and closed-loop stripping analysis (CLSA) [33].

Although less frequently, non-separative methods have been used for the analysis of THMs in water samples, such as membrane introduction mass spectrometry (MIMS) [34], and direct coupling of an HS sampler with a mass spectrometer (HS–MS) [35,36]. The MIMS methodology has also been used coupled to a gas chromatograph with a programmed temperature vaporizer (PTV) and detection by means of mass spectrometry, achieving a rapid and sensitive method for the on-line determination of THMs in chlorinated water [37].

The use of a headspace autosampler in combination with a GC equipped with a PTV and a MS detector has been applied satisfactorily by our group for the determination of Class 1 residual solvents in pharmaceuticals and for the determination of oxygenated compounds and BTEX in water [38,39]. In the present work we propose the use of this new methodology for the screening and rapid quantitative determination of THMs in water. The PTV injector allows the analytes present in the gas phase of the headspace to be concentrated by means of a cryogenic effect, enabling large amounts of sample to be injected into the chromatographic column without the drawback of initial band broadening. In this way it is

possible to improve sensitivity, maintaining the simple headspace instrumentation.

2. Experimental

2.1. Chemicals

The trihalomethanes used here (chloroform, bromodichloromethane, dibromochloromethane and bromoform) were from Supelco (Bellefonte, PA, USA) in a 1-mL vial (*Trihalomethane calibration mix*) that contained all four at a concentration of 200 mg/L in methanol. The methanol used was from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Standard solutions and samples

A stock solution of 2.00 mg/L was prepared by diluting the THMs calibration mix in methanol. Solutions of the THMs were prepared by diluting the stock solution in mineral water and were employed to obtain the calibration curves and detection and quantification limits.

Mineral water was used since in previous assays with distilled water and ultrapure water trace concentrations of these compounds were detected. Other authors have reported the presence of THMs, above all chloroform, in all aqueous matrices and even in the air [26].

To perform the measurements, the samples were placed in 10-mL vials sealed with silicone septum caps. Each sample was analysed in triplicate.

The models obtained with mineral water were used to predict the concentrations of these compounds in different water samples.

2.3. HS–PTV–GC–MS instrumentation

The instrumentation used for this investigation consisted of four main parts. A schematic diagram of the apparatus used is shown in Fig. 1.

A 7694 headspace sampler from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany) equipped with a tray for 44 consecutive samples and an oven with positions for 6 sample vials was used. Oven temperature was kept at 90 °C for 30 min. The sampling system consisted of a stainless steel needle, a 316-SS six-port valve with a 3-mL nickel loop (heated to 95 °C), and two solenoid valves (for pressurization and venting). The headspace sampler was coupled to a PTV injector through an inert transfer line heated to 100 °C. The carrier gas was helium N50 (99.995% pure; Air Liquide). All experiments were carried out with a PTV inlet (CIS-4;

Fig. 1. Schematic diagram of the apparatus used.

Gerstel, Baltimore, MD, USA). A liner packed with Tenax-TA® was used.

An Agilent 6890 GC equipped with a DB-VRX capillary column (20 m × 0.18 mm × 1 µm) was used. A quadrupole mass spectrometer (HP 5973) equipped with an inert ion source operated in the electron impact mode using a 70 eV ionization voltage was used. The ion source temperature was 230 °C and the quadrupole temperature was set to 150 °C. The analyses were performed in the scan and SIM modes.

2.4. HS-PTV-GC-MS procedures

2.4.1. Headspace sampling

Aliquots of 5 mL of samples were placed in 10-mL vials and, after sealing, the vials were subjected to the headspace generation process for 30 min at 90 °C. After this time, and after the vial pressurization and loop filling and equilibration processes, the sample was injected over 1 min.

2.4.2. Programmed temperature vaporization

The solvent vent injection mode was used and cooling was accomplished with CO₂. To compare the results, other injection modes allowed by PTV inlet were also studied.

The headspace was introduced into the injector at 5 °C (Fig. 2). The vent flow was adjusted to 50.0 mL/min and the vent pressure to 5.00 psi. After 1.70 min, the split valve was closed and the liner was flash-heated at 12 °C/s to 250 °C. The analytes were transferred from the liner to the capillary column (0.60 min). The split valve was then opened and the liner temperature was held at 250 °C for 5.60 min.

Fig. 2. Sequence of events for solvent vent injection and GC separation process.

2.4.3. Gas chromatography

The column oven temperature program was set to an initial temperature of 45 °C for 3.00 min; this was increased at a rate of 70 °C/min to 175 °C, then increased at 45 °C/min to 240 °C, and held for 1.0 min. Under these conditions the compounds eluted in less than 5 min and the total chromatographic run time was 7.30 min.

2.4.4. Mass spectrometry

For the scan detection mode the m/z range was 25–270 amu, and the abundance threshold value was set to 0. The different compounds were identified by comparison of the experimental spectra with those of the NIST98 database (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, version 1.6).

The information obtained in scan mode allowed us to establish three SIM groups. The first one (3.00–4.50 min) contained the three most abundant ions of chloroform and bromodichloromethane (83, 85, and 47); the second (4.50–4.83 min) was formed by the characteristic ions of dibromochloromethane (127, 129, and 131), and the third (4.83–7.30 min) contained the m/z variables 171, 173, and 175, characteristic of bromoform. The ions were acquired with a dwell time of 30 ms.

2.5. Data analysis

Data collection was performed with Enhanced ChemStation, G1701CA Ver. C 00.00 software [40] from Agilent Technologies.

3. Results and discussion

3.1. HS-PTV-fast GC-MS data

3.1.1. Optimisation of chromatographic separation

In order to perform the separation of the four THMs by fast chromatography, the maximum temperature ramps permitted by the oven of the chromatograph and the capillary column were chosen (see Section 2). Under these conditions, the only variable to be optimised was the initial column temperature. Values ranging between 35 and 55 °C were studied. The results showed that as the initial temperature was increased, a slight broadening of the peaks occurred. Also, the time necessary to recover the initial chromatographic conditions increased considerably as the initial temperature of the column decreased (10 min for 35 °C and 5 min for 45 °C). Accordingly, an initial column temperature of 45 °C was selected, allowing adequate separation of the analytes without excessively prolonging the analysis time.

3.1.2. Study of injection modes

In the hot split injection mode, the split ratio was 1:10, and the temperature of the injector was kept at 250 °C. This same temperature was maintained for the hot splitless injection mode, with a splitless time of 2.25 min. In the cold split and splitless injection modes, both the split ratio and the splitless time were maintained, and the initial temperature of the injector was kept at 5 °C for 1.70 min, after which it was heated at 12 °C/s up to 250 °C.

The sequence of steps involved when solvent injection was used is shown in Fig. 2 and has been described in Section 2.

In all cases, after sample injection the split valve was opened again, the liner being cleaned by a stream of helium and hence ready for the next injection. Then, chromatographic separation was begun with the temperature program also shown in Fig. 2.

The chromatograms obtained in the SCAN data acquisition mode, with the cold injection modes, showed a delay in the analyte retention times with respect to the hot injection modes. Likewise, a narrowing, an increase in height, and an improvement in the peaks were observed.

Fig. 3. Extracted ion chromatograms for m/z 83, 127 and 173 when classical split-hot injection and solvent vent injection were used (10 ppb of each compound).

The delay in the retention times is because the transfer of the sample from the PTV inlet to the column is delayed owing to the preconcentration of the analytes in the liner at low temperature. The same preconcentration effect and the rapid sample transfer explain the other effects observed. Thus, with the cold injection modes the signal-to-noise ratio was considerably improved and hence the detection limits were also improved. Taking the usual injection mode in gas chromatography (split, in hot mode) as reference, Table 1 shows – for the most abundant m/z ratios of each of

the THMs – the area, half-height peak width, and signal-to-noise ratios for the cold split injection mode and the cold and hot split-less mode. It may be seen that the effects, commented above, are more marked for the most volatile compounds, which are those most affected by the initial band broadening problem associated with conventional hot injection modes.

The solvent vent injection mode allows the elimination of the solvent containing the analytes while these are retained in the liner. Generally, this injection system is used when the solvent has a

Fig. 4. Extracted ion chromatograms for m/z 83, 127 and 173 obtained when, under the optimum conditions for the solvent vent injection mode, scan and SIM acquisition mode were used (2 ppb of each compound).

Table 1

Areas, peak widths at half-height and signal/noise ratios for the different injection modes studied in this work

Compound	Scan mode				SIM mode	
	Hot split	Cold split	Hot splitless	Cold splitless	Solvent vent	Solvent vent
Area						
CHCl ₃	1.00	0.79	2.98	3.22	5.55	7.77
CHCl ₂ Br	1.00	0.97	3.81	4.07	7.06	9.88
CHClBr ₂	1.00	1.05	4.01	4.40	7.16	11.5
CHBr ₃	1.00	1.17	4.55	4.64	8.09	14.6
Widths at half-height						
CHCl ₃	1.00	0.21	1.05	0.34	0.32	0.38
CHCl ₂ Br	1.00	0.31	1.38	0.53	0.47	0.56
CHClBr ₂	1.00	0.45	0.94	0.55	0.50	0.60
CHBr ₃	1.00	0.69	0.94	0.77	0.77	0.92
S/N						
CHCl ₃	1.00	2.13	1.39	4.22	8.50	96.9
CHCl ₂ Br	1.00	2.20	1.76	3.41	8.34	111
CHClBr ₂	1.00	2.36	4.18	6.99	13.4	149
CHBr ₃	1.00	1.47	3.44	3.76	11.5	144

boiling point far below that of the analytes. In this case, chloroform and bromodichloromethane have lower boiling points (61 and 90 °C, respectively) while the boiling points of dibromochloromethane and bromoform are slightly higher than that of water (117 and 149 °C, respectively). This drawback can be minimized by choosing a suitable packing for the liner. In the present study we chose a hydrophobic polymer – Tenax-TA® – which retains the analytes of interest but not the water.

A study of the variables involved in the process was made to undertake experimental conditions in which the analytical signal would be maximum.

The initial temperature of the liner was studied for values of 5, 15, 25 and 35 °C. Values below 5 °C were not studied since the time necessary for cooling the liner was excessively long. For all the compounds studied, the analytical signal decreased as the temperature rose, this effect being more marked in the case of the more volatile analytes chloroform and bromodichloromethane. With these results, an initial temperature of 5 °C was chosen for the injector.

The variables affecting the elimination of solvent are the time during which the solvent is eliminated, called the purge time, and the flow rate at which such purging is performed. The first variable was studied for values between 1.55 and 2.0 min. For all the compounds the analytical signal was almost constant for purge times between 1.65 and 2.00 min. For lower values, the analytical signal decreased slightly because it was not possible to achieve complete elimination of the solvent. Accordingly, we chose a time of 1.65 min as the optimum value for this variable. The purge flow did not affect the analytical signal significantly such that a flow rate of 50 mL/min was selected; this allowed appropriate elimination of the solvent.

Finally, the injection time was studied. Thermal desorption of the analytes was accomplished using the temperature ramp shown in Fig. 1. In this, the liner passed from 5 to 250 °C in 0.34 min. We therefore studied injection times of 0.1, 0.6, 1.0 and 1.5 min. The maximum signal was obtained for a value of 0.6 min. This time is

Table 2

Optimised experimental conditions

Headspace sampler		
Temperatures	Oven	90 °C
	Injection loop	95 °C
Times	Transfer line	100 °C
	Headspace generation	30 min
	Interval between samples	10.0 min
	Injection	1.00 min
Programmable temperature vaporizer		
Injection mode: solvent vent	Purge flow	50.0 mL/min
	Purge time	1.65 min
	Injection time	0.6 min
	Cleaner flow	20.0 mL/min
Cold injection	Initial temperature	5 °C (1.70 min)
	Rate	12 °C/s–250 °C (5.60 min)
Gas chromatograph		
Carrier gas	Helium (1.5 mL/min)	
Oven	Initial temperature	45 °C (3 min)
	Ramp 1	70 °C/min to 175 °C
	Ramp 2	45 °C/min to 240 °C (1 min)
Mass spectrometer		
Data acquisition mode: SIM	Dwell time	30 ms
	Group 1	<i>m/z</i> (83, 85, 47)
	Group 2	3.00–4.50 min <i>m/z</i> (127, 129, 131)
	Group 3	4.50–4.83 min <i>m/z</i> (171, 173, 175)
		4.83–7.30 min

sufficient for complete injection of the sample before the liner is cleaned. For shorter times, sample injection was only partial, while for longer times a broadening of the chromatographic profiles of the analytes was observed.

Table 1 shows the areas, half-height peak widths and signal-to-noise ratios for the solvent vent injection mode as compared with the hot split injection mode. On comparing the three cold injection modes it may be observed that in the split mode the signals were much lower, because only part of the sample was injected. However, on comparing the two injection modes in which all the volatiles of the headspace were injected, with the injection mode optimised here (solvent vent), an improvement in the peak area was achieved, together with an increase in the signal-to-noise ratio.

Fig. 3 shows the chromatograms of the extracted ion for the most abundant *m/z* for each of the four trihalomethanes studied with two of the injection modes tested: the usual conventional mode in gas chromatography (hot split) and the solvent vent mode optimised in the present work. An important increase in the analytical signal was obtained with the solvent vent mode allowing a high-sensitivity analytical method to be proposed for the determination of these compounds in water.

3.1.3. Data acquisition modes

The above results corresponded to the analysis of the chromatograms of the extracted ion obtained, in all cases, in scan mode for an *m/z* range between 25 and 270 amu. With the information from these chromatograms, three groups of *m/z* ratios characteristic of the analytes were established in order to record the chromatograms in SIM mode (see Section 2).

Table 3

Analytical characteristics of the proposed method

Compound	Slope	Intercept	R ²	RSD (%) (n = 3)	DL (ng L ⁻¹)	QL (ng L ⁻¹)
CHCl ₃	(6.29 ± 0.06) × 10 ⁴	(1 ± 2) × 10 ⁴	0.9990	4.3	2.6	8.0
CHCl ₂ Br	(3.91 ± 0.06) × 10 ⁴	(0.5 ± 1.6) × 10 ⁴	0.9977	0.7	0.4	1.0
CHClBr ₂	(2.01 ± 0.03) × 10 ⁴	(-2 ± 7) × 10 ³	0.9983	0.8	0.5	1.0
CHBr ₃	(1.51 ± 0.02) × 10 ⁴	(-6 ± 7) × 10 ³	0.9974	1.3	0.6	2.0

Fig. 5. Chromatogram in scan mode (a) and in SIM mode (b) of one of the tap water samples analysed in this work.

Fig. 4 shows the windows of the chromatograms obtained when, under the optimum conditions for the solvent vent injection mode, the most abundant m/z were chosen for each of the compounds studied: m/z 83 for chloroform and bromodichloromethane (Fig. 3a and b, respectively); m/z 127 for dibromochloromethane, and m/z 173 for bromoform. In the SIM data acquisition mode, a slight increase in area was observed for all the compounds, ranging between 1.4 for chloroform and dibromochloromethane, and 1.8 for bromoform (Table 1). However, more important than this increase in area was the decrease in noise recorded for each extracted ion in SIM mode, as may be seen in the top right parts of each of the partial chromatograms shown in Fig. 4 (zoomed areas). This decrease in noise was reflected in an improvement of the signal-to-noise ratio of between 11.1 and 13.3 (see Table 1).

A combination of the solvent vent mode proposed here and the SIM data acquisition mode under suitable condi-

tions thus allows the signal-to-noise ratio to be improved by a factor ranging between 100 and 150 with respect to the conventional injection method in hot split mode and detection in scan mode.

With the experimental conditions optimised here (Table 2) it was possible to separate the four trihalomethanes in less than 5 min. The peak width values at half-height were 1.68 s for chloroform; 1.08 s for bromodichloromethane; 0.72 s for dibromochloromethane, and 0.66 for bromoform. These values correspond to a fast gas chromatography for the first two compounds and a very fast one for the latter two [41].

3.2. Calibration curves

Thirteen concentration levels ranging from 0.05 to 76 ppb were studied for each of the analytes examined. Each standard was analysed in triplicate and the linearity of the method was evaluated. This

Table 4
Concentrations found in the water samples analysed

Water sample	CHCl ₃ (μg/L)	CHBrCl ₂ (μg/L)	CHBr ₂ Cl (μg/L)	CHBr ₃ (μg/L)
UHQ	0.82 ± 0.03 (0–1) ^a	<QL	<DL	<DL
Tap 1	36.8 ± 0.9 (0–76)	2.5 ± 0.2 (0–6)	0.11 ± 0.01 (0–0.5)	<DL
Tap 2	37.0 ± 0.9 (0–76)	2.4 ± 0.2 (0–6)	0.10 ± 0.01 (0–0.2)	<DL
Tap 3	36.0 ± 0.9 (0–76)	2.5 ± 0.2 (0–6)	0.11 ± 0.01 (0–0.2)	<DL
Tap 4	23.8 ± 0.7 (0–50)	1.8 ± 0.2 (0–6)	0.08 ± 0.01 (0–0.2)	<DL
Tap 5	105 ± 1 (0–76)	6.1 ± 0.2 (0–10)	0.46 ± 0.02 (0–1)	<DL
Well 1	2.00 ± 0.02 (0–6)	0.26 ± 0.02 (0–0.5)	0.038 ± 0.006 (0–0.1)	0.016 ± 0.007 (0–0.05)
Well 2	<QL	<DL	<DL	<DL
Mineral 1	0.015 ± 0.007 (0–0.1)	<QL	<QL	<QL
Mineral 2	0.042 ± 0.007 (0–0.1)	<QL	0.008 ± 0.006 (0–0.05)	<QL

QL: quantification limit; DL: detection limit.

^a Range of concentrations of the overall calibration used for the prediction of each samples (μg/L).

broad concentration range allows the four THMs to be quantified in very different types of water in which their concentrations may be very different. Thus, for each compound 3.5 orders of magnitude were covered.

The variables used in the calibrations were the area under the curve in the extracted ion chromatogram for the quantitation ions: m/z 83 for chloroform and bromodichloromethane; m/z 127 for dibromochloromethane, and m/z 173 for bromoform. The analytical characteristics of the method are summarized in Table 3. All the calibrations showed good linear behavior, with values of the coefficient of determination (R^2) above 0.99. The intercept included zero in all cases. The validity of the models generated was checked using ANOVA and none of the models generated was found to be subject to lack of fit. The repeatability, for a concentration level of 1.0 ppb, was satisfactory, with an RSD equal to or less than 4.3%.

The detection limits (DLs) were estimated using the following equation:

$$DL = \frac{3.3\sigma}{S}$$

where σ is the standard deviation of peak response for 10 replicates corresponding to an S/N ratio of approximately 3; S is the slope of the calibration curve and 3.3 is Student's t factor ($n - 1$, 0.99). These detection limits (ranging between 0.4 and 2.6 ppt, Table 3) are within the lowest values obtained with other methodologies proposed in the literature [17,21–23,26,28,37].

The quantitation limits (QLs) were estimated using the following equation:

$$QL = \frac{10\sigma}{S}$$

where σ and S are the same as in the previous equation. The quantitation limits for the four compounds are summarized in Table 4.

3.3. Determination of trihalomethanes in different aqueous matrices

To check the predictive capacity of the models, different aqueous matrices were analysed: ultrapure, mineral, tap, and well water. The broad range of concentrations studied in the calibrations allows the portion of the calibration most suitable for the determination of each compound to be selected. In this way, the confidence interval associated with the prediction is as low as possible.

The possible presence of these compounds in the samples was checked from the chromatograms corresponding to them and from the mass spectra of the compounds for which retention times equal to those of the analytes were obtained. Initially, the chromatogram was recorded in scan mode (Fig. 5a), and the trihalomethanes present in the water samples were identified from the three most abundant m/z ratios for each of them by comparison with the spectra of the pure compounds, admitting a difference in abundances of 20% as maximum; the usual level for this type of study. Then, quantification was performed in SIM mode (Fig. 5b) under the same conditions as those used to obtain the calibrations.

Table 4 shows the concentrations found for each of the trihalomethanes in the samples analysed. The confidence interval is expressed by the value of three replicates, with a confidence level of 95%. The range of concentrations of the overall calibrations used for the prediction is shown in brackets.

In the ultrapure, mineral, and well water samples, some of the compounds were quantified at concentrations below 2 ppb.

In the tap water samples, the chloroform concentration was between 20 and 40 ppb, with the exception of tap sample 5, with a concentration of 105 ppb (the sample was diluted 1:1

with mineral water for analysis because the concentration was out of the calibration range). Bromodichloromethane and dibromochloromethane were quantified at lower concentrations. No bromoform was detected in any of the samples.

4. Conclusions

A new method for the determination of THMs in water has been implemented based on the coupling of headspace sampling, solvent vent injection and fast gas chromatographic separation with mass spectrometry detection. The main advantages obtained are as follows:

The use of headspace generation for introducing the sample has the advantage that no prior treatment of the sample is required, thus minimizing the creation of analytical artifacts and the errors associated with this step of the analytical process.

The solvent vent injection mode allows rapid sample injection in splitless mode, very low detection limits being attained without the critical problem of initial sample bandwidth.

The capillary column used allows rapid separations with half-height widths ranging from 1.68 s (chloroform) to 0.66 s (bromoform). The GC run time was 7.3 min.

The use of mass spectrometry allows the identification and quantification of the analytes at the low ppt level. The S/N ratio was at least 10-fold higher when the SIM mode was used in data acquisition as compared with the scan mode.

The proposed method is extremely sensitive, with detection limits from 0.4 to 2.6 ppt.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of the DGI (Projects CTQ2004-01379/BQU and CTQ2007-63157/BQU) and the Consejería de Educación y Cultura of the Junta de Castilla y León (Project SA057A05) for this research.

References

- [1] T. Ivahnenko, J.S. Zogorski, Sources and occurrence of chloroform and other trihalomethanes in drinking-water supply wells in the United States, 1986–2001, U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report, Virginia, 2006, p. 13.
- [2] M.J. Rodriguez, J.-B. Sérodes, Water Res. 35 (2001) 1572.
- [3] L. Zocolillo, L. Amendola, G.A. Tarallo, Int. J. Environ. Anal. Chem. 63 (1996) 91.
- [4] J.J. Rook, J. Water Treat. Exam. 23 (1974) 234.
- [5] Z.-Y. Zhao, J.-D. Gu, X.-J. Fan, H.-B. Li, J. Hazard. Mater. B 134 (2006) 60.
- [6] J.S. Zogorski, J.M. Carter, T. Ivahnenko, W.W. Lapham, M.J. Moran, B.L. Rowe, P.J. Squillace, P.L. Toccalino, Volatile organic compounds in the Nation's Ground water and drinking-water supply wells, U.S. Geological Survey Circular 1292, Virginia, 2006, p. 101.
- [7] World Health Organization (WHO), Guidelines for drinking-water quality, third edition, World Health Organization (WHO), Geneva, 2006, p. 366.
- [8] EPA Office of Water, Drinking Water Criteria Document for Brominated Trihalomethanes, EPA Office of Water, Washington, United States, 2005, p. 17.
- [9] Environmental Protection Agency (USEPA), National Primary Drinking Water Regulations: Disinfectants and Disinfection Byproducts, Environmental Protection Agency (USEPA), United States, 1998.
- [10] Directiva 98/83/CE del consejo de 3 de noviembre de 1998 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano, Diario Oficial de las Comunidades Europeas.
- [11] S.K. Gollinopoulos, T.D. Lekkas, A.D. Nikolau, Chemosphere 45 (2001) 275.
- [12] A.D. Nikolau, T.D. Lekkas, S.K. Gollinopoulos, M.N. Kostopoulou, Talanta 56 (2002) 717.
- [13] A. Nikolaou, S. Gollinopoulos, L. Rizzo, G. Lofrano, T. Lekkas, V. Belgiorno, Desalination 176 (2005) 25.
- [14] USEPA Method 551, Determination of Chlorination Disinfection Products and Chlorinated Solvents in Drinking Water by Liquid–Liquid Extraction and Gas Chromatography with Electron-Capture Detection, USEPA, Cincinnati, OH, 1995.
- [15] A. Tor, M.E. Aydin, Anal. Chim. Acta 575 (2006) 138.
- [16] R.S. Zhao, W.-J. Lao, X.-B. Xu, Talanta 62 (2004) 751.
- [17] N. Vora-adisak, P. Varanusupakul, J. Chromatogr. A 1121 (2006) 236.
- [18] H. Gallard, U.V. Gunten, Water Res. 36 (2002) 65.

- [19] J. Kuivinen, H. Johnsson, *Water Res.* 5 (1999) 1201.
- [20] M. Culea, O. Cozar, D. Ristoiu, *J. Mass Spectrom.* 41 (2006) 1594.
- [21] C.V. Antoniou, E.E. Koukouraki, E. Diamadopoulos, *J. Chromatogr. A* 1132 (2006) 310.
- [22] D.-H. Cho, S.-H. Kong, S.-G. Oh, *Water Res.* 37 (2003) 402.
- [23] P.M. San Juan, J.D. Carrillo, M.T. Tena, *J. Chromatogr. A* 1139 (2007) 27.
- [24] M.A. Stack, G. Fitzgerald, S. O'Connell, K.J. James, *Chemosphere* 41 (2000) 1821.
- [25] S.K. Gollinopoulos, T.D. Lekkas, A.D. Nikolau, *Chemosphere* 45 (2001) 275.
- [26] L. Zocollillo, L. Amendola, C. Cafaro, S. Insogna, *J. Chromatogr. A* 1077 (2005) 181.
- [27] T.C. Chen, G.R. Her, *J. Chromatogr. A* 927 (2001) 229.
- [28] A.S. Allonier, M. Khalanski, A. Bermond, V. Camel, *Talanta* 51 (2000) 467.
- [29] USEPA Method 524.2, Measurements of Purgeable Organic Compounds in water by Capillary Column Gas Chromatography–Mass Spectrometry, USEPA, Cincinnati, OH, 1995.
- [30] M.A. Brown, G.L. Emmert, *Anal. Chim. Acta* 555 (2006) 75.
- [31] G.L. Emmert, G. Cao, C. Duty, W. Wolcott, *Talanta* 63 (2004) 675.
- [32] G. Geme, M.A. Brown, P. Simone Jr., G.L. Emmert, *Water Res.* 39 (2005) 3827.
- [33] A.A. Kampioti, E.G. Stephanou, *J. Chromatogr. A* 857 (1999) 217.
- [34] R.A. Kelota, V.T. Virkki, M. Ojala, V. Komppa, T. Kotiaho, *Talanta* 44 (1997) 373.
- [35] A. Serrano, M. Gallego, *J. Chromatogr. A* 1154 (2007) 26.
- [36] J. Caro, A. Serrano, M. Gallego, *J. Chromatogr. A* 1138 (2007) 244.
- [37] C.C. Chang, G.R. Her, *J. Chromatogr. A* 893 (2000) 169.
- [38] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández Laespada, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A* 1141 (2007) 123.
- [39] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández Laespada, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A* 1175 (2007) 106.
- [40] Enhanced ChemStation, G1701CA, Version C00.00, Agilent Technologies, CA, United States, 1999.
- [41] P. Korytár, H.-G. Janssen, E. Matisová, U.A.Th. Brinkman, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 558.

PUBLISHED ARTICLE

available at www.sciencedirect.com journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Review

Determination of trihalomethanes in water samples: A review

José Luis Pérez Pavón*, Sara Herrero Martín, Carmelo García Pinto,
Bernardo Moreno Cordero

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Ciencias Químicas,
Universidad de Salamanca, 37008 Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 July 2008

Received in revised form

11 September 2008

Accepted 12 September 2008

Published on line 26 September 2008

Keywords:

Review

Trihalomethanes

Gas chromatography

Water analysis

ABSTRACT

This article reviews the most recent literature addressing the analytical methods applied for trihalomethanes (THMs) determination in water samples. This analysis is usually performed with gas chromatography (GC) combined with a preconcentration step. The detectors most widely used in this type of analyses are mass spectrometers (MS) and electron capture detectors (ECD).

Here, we review the analytical characteristics, the time required for analysis, and the simplicity of the optimised methods. The main difference between these methods lies in the sample pretreatment step; therefore, special emphasis is placed on this aspect. The techniques covered are direct aqueous injection (DAI), liquid–liquid extraction (LLE), headspace (HS), and membrane-based techniques.

We also review the main chromatographic columns employed and consider novel aspects of chromatographic analysis, such as the use of fast gas chromatography (FGC). Concerning the detection step, besides the common techniques, the use of uncommon detectors such as fluorescence detector, pulsed discharge photoionization detector (PDPID), dry electrolytic conductivity detector (DELCD), atomic emission detector (AED) and inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) for this type of analysis is described.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction.....	7
2. Sample preparation.....	8
2.1. Direct aqueous injection.....	8
2.2. Liquid–liquid extraction.....	8
2.3. Headspace techniques.....	12
2.3.1. Static headspace.....	13
2.3.2. Headspace-solid-phase microextraction.....	14

* Corresponding author. Tel.: +34 923 294483; fax: +34 923 294483.

E-mail address: jlpp@usal.es (J.L. Pérez Pavón).

0003-2670/\$ – see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.aca.2008.09.042

2.3.3. Dynamic headspace: purge and trap	17
2.4. Membrane-based sampling techniques	19
3. Chromatographic separation	20
4. Detectors	20
5. Conclusions	21
Acknowledgments	21
References	21

1. Introduction

Trihalomethanes (THMs) are a group of volatile organic compounds (VOCs) classified as disinfection by-products (DBPs). They were first identified by Rook [1] and are formed during the chlorination of water, when chlorine reacts with naturally occurring organic matter: mainly humic and fulvic acids. Their general formula is CHX_3 , where X may be any halogen or a combination of halogens. However, generally speaking this term is used to refer only to those compounds containing either chlorine or bromide, because these are the ones most commonly detected in chlorinated water (chloroform, bromodichloromethane, dibromochloromethane and bromoform). Brominated trihalomethanes are formed when hypochlorous acid oxidizes bromide ion present in water to form hypobromous acid, which subsequently reacts with organic materials to form these compounds. Iodinated THMs have been identified in chlorinated drinking water; however, they are not widely measured and are not regulated, even though iodinated compounds may be more toxic than brominated and chlorinated compounds [2].

The chlorination of water was started in New Jersey (USA) in 1908 and it continues to be the most widely used and cost-effective disinfection process [3]. The main purpose of chlorination is to prevent the spread of waterborne pathogens.

The rate and degree of THMs formation increase as a function of the chlorine and humic acid concentration, temperature, pH, and the bromide ion concentration. Chloroform is the most common THM and the main DBP in chlorinated drinking water. In the presence of bromides, brominated THMs are formed preferentially and chloroform concentrations decrease proportionally [4,5]. The pattern of concentrations in chlorinated water is: chloroform > bromodichloromethane > dibromochloromethane > bromoform.

Although the chlorination of drinking water provides many advantages, THMs remain a human health concern. The International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified chloroform and bromodichloromethane as possible carcinogens for humans (Group 2B) based on limited evidence of carcinogenicity in humans but sufficient evidence of carcinogenicity in experimental animals. Dibromochloromethane and bromoform belong to Group 3 (not classifiable as regards their carcinogenicity to humans), based on inadequate carcinogenicity in humans and inadequate or limited carcinogenicity in experimental animals [4,6,7].

In the case of THMs, approximately equal contributions to total exposure come from four sources: the ingestion of drinking water, inhalation of indoor air, inhalation and dermal exposure during showering or bathing, and the ingestion of foods [4,8].

With a view to protecting public health from the possible carcinogenic effects of such substances, the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) [9] and the European Union [10] have established a Maximum Contaminant Level (MCL) for the total concentration of the four THMs, also known as total trihalomethanes (TTHMs). In guidelines for drinking water quality, the World Health Organization (WHO) has also set values for each of the THMs in drinking water and proposes an equation to establish a TTHM standard [4]:

$$\frac{C_{\text{bromoform}}}{GV_{\text{bromoform}}} + \frac{C_{\text{dibromochloromethane}}}{GV_{\text{dibromochloromethane}}} + \frac{C_{\text{bromodichloromethane}}}{GV_{\text{bromodichloromethane}}} + \frac{C_{\text{chloroform}}}{GV_{\text{chloroform}}} \leq 1$$

C = concentration; GV = guideline value.

Table 1 summarises the maximum concentrations established in the legislation and WHO guidelines and the IARC category for each of the trihalomethanes.

Trihalomethanes have been detected in different aqueous matrices: tap water, swimming pool water, distilled water, ultrapure water and even in water that has not been subjected to chlorination processes, such as ground water, mineral water, snow, rain water, sea and river water.

However, the concentrations of these compounds in unchlorinated water tend to be much lower than those usually found in tap water. The presence of these levels of THMs may be due to several causes. In cases in which the chloroform > bromodichloromethane > dibromochloromethane > bromoform pattern is conserved, the THMs are likely to have originated from the infiltration of chlorinated water. The sources of chlorinated water to ground water may include the irrigation of lawns, gardens and parks; leaking drinking water distribution and sewer pipes, and industrial spills, among others [5]. In the case of mineral water may also be derived from disinfection with chlorine of the pipes used in production and bottling plants. In other cases, the concentration pattern is not upheld, such that the presence of these compounds can be attributed to natural sources. Chloroform was originally considered to be of anthropogenic origin, but it is now known that it is a ubiquitous compound and about 90% of its flux through the environment is of natural origin. The main natural sources described for chloroform in order of importance are offshore seawater through an undefined biological process, littoral and coastal sources from macroalgae, soil fungi, and volcanic and geological emissions [11,12].

Many methods for the determination of THMs and other VOCs in water have been reviewed in literatures [13–17]. The development and optimisation of sensitive, rapid and simple analytical methods is essential for monitoring THM

Table 1 – Drinking water standards and IARC category				
Compound	EPA maximum contaminant level for TTHMs (µg L ⁻¹)	Directive 98/83/CE parametric value for TTHMs (µg L ⁻¹)	WHO guideline value (µg L ⁻¹)	IARC category
Chloroform (CHCl ₃)	80	150 until December 31st 2008	300	Group 2B
Bromodichloromethane (CHCl ₂ Br)		100 after January 1st 2009	60	Group 2B
Dibromochloromethane (CHClBr ₂)			100	Group 3
Bromoform (CHBr ₃)			100	Group 3
EPA: Environmental Protection Agency; WHO: World Health Organization; IARC: International Agency for Research on Cancer; and TTHMs: total trihalomethanes.				

concentrations in drinking water and for a better understanding of their formation and removal in distribution systems. With such information it is possible to estimate human exposure to THMs and optimise current drinking water treatment practices with a view to reducing the pollution by DBPs in water, minimising health risks as much as possible.

The determination of THMs in water has mainly been carried out with gas chromatography (GC) followed by electron capture detection (ECD) or mass spectrometry detection (MSD). The concentrations of these compounds in natural and drinking waters is in the order of ngL⁻¹ to µgL⁻¹, such that as a general rule it is necessary to perform a preconcentration step of the analytes to achieve a level that can be measured by the analytical method chosen.

In the present work we report a review of the main analytical methods used in the determination of THMs in water and evaluate their analytical characteristics. The main difference between the different optimised methods is in the sample pretreatment step, such that special emphasis is placed on this aspect.

2. Sample preparation

Sample preparation is one of the most critical steps in environmental analysis. In this step, the compounds of interest are separated from the matrix and are preconcentrated to improve the selectivity, sensitivity, reliability, accuracy, and reproducibility of the analysis [18]. Sometimes, in the case of very dirty or highly complex samples this step also includes a cleaning step to facilitate the analysis and prevent the deterioration of the chromatographic system and detector used. Sample preparation is the most labour-intensive and time-consuming step and is also the main source of error of the analytical method.

In recent years new sample pretreatment techniques have been developed. They are faster and more selective and at the same time use lower amounts of solvents and reagents [19–21]. The current trend in analytical chemistry is to take “green chemistry” ideology into account and in this sense, “solvent minimised” or “solvent-free” sample preparation methods have been developed, such as microextraction, membrane extraction and headspace techniques.

In this part of the review we shall examine the main different sample preparation techniques employed for the extraction of THMs from aqueous matrices.

2.1. Direct aqueous injection

Direct aqueous injection (DAI) of water samples into a GC system is the most rapid and simplest “first step” in the analysis of an aqueous sample by means of gas chromatography. In this technique, no isolation or preconcentration of the compounds is performed, such that the loss of volatile analytes and the possibility of sample pollution during manipulation are minimised. Moreover, it avoids the problems associated with using solvents (which are toxic and expensive). The injection of water as solvent into a GC system is not usually desired, because it commonly degrades the columns coatings. Therefore, in this technique capillary columns are generally covered with a thick film of an apolar liquid phase that makes the water elute before the analytes. Generally, an on-column injector is employed, such that the sample is introduced into the chromatographic system with no prior vaporization. The disadvantage of this injection mode is the deterioration of the initial segment of the column, due to the presence of non-volatile organic compounds or inorganic salts in the aqueous samples analysed. To reduce this problem to a minimum, deactivated capillaries (pre-columns or guard columns) are placed at the start of the column, such protection being readily replaceable. Another important pitfall of DAI is that the sensitivity of the technique is limited to the volume of sample that can be loaded onto the column.

DAI-GC-ECD coupling was described by Grob and Habich [22], who applied the method for the determination of volatile halocarbons in water samples [23]. Since then, many papers have been published in which this method was used for the determination of this type of compounds in water [24–28] (see Table 2). DAI-GC has also been coupled with an MS detector [29,30]. In many of these applications, the cold on-column injection strategy was used [24,26,28,30], in which the aqueous samples are condensed in the pre-column, achieving a narrowing of the bandwidth and an increase in sensitivity. The limits of detection (LOD) obtained for THMs in water samples when DAI is used without pre-column cooling range from 3 to 5 µgL⁻¹ [27,29], and these values improve significantly when cold on-column injection is employed, limits of detection down to 0.01 µgL⁻¹ being achieved.

2.2. Liquid–liquid extraction

This is one of the most commonly used sample preparation techniques in water analyses. Table 3 summarises the main analytical characteristics of the methods based on LLE applied in the determination of trihalomethanes in water samples

over the past few years. In contrast with classical LLE techniques, which use large amounts of solvent in order to deplete the sample out of analytes, in LLE methods for THMs determination, the process is normally done with a much lower solvent volume (ca. 0.5–2 mL). The sample volume used varies between 5 and 100 mL in most cases.

Nikolaou et al. have recently performed several investigations [27,31–33] in which this preconcentration technique was used for the determination of THMs in water. In most of those studies [31–33] the authors used a modification of EPA method 551.1 [34], which includes liquid–liquid-extraction (LLE) with MTBE, after the addition of anhydrous sodium sulfate. The sodium sulfate was added to increase the ionic strength of the solution, enhancing the extraction of the compounds by the salting-out effect. They compared the LLE-GC-ECD, LLE-GC-MS, purge and trap (P&T)-GC-MS and headspace (HS)-GC-MS techniques [32]. Their studies revealed that the LLE-GC-ECD method was the most sensitive one for the determination of trihalomethanes. This method has been applied to the determination of trihalomethanes in water samples from Greece and Italy with a view to determining the formation potential of DBPs during chlorination [33] and to determine the presence of THMs in bottled water available on the Greek market [31].

A similar LLE method was proposed by Culea et al. [35], who studied the analytical characteristics of the LLE-GC-MS method.

Buszewski and Ligor used the LLE-GC-MS instrumental configuration. One mL of hexane was used to extract the compounds. The mixture was shaken for 30 s and finally a portion of 2 μ L of the hexane layer was injected into the GC [26].

González Gago et al. have recently developed a method in which this technique is used for the extraction of compounds. Four mL of *n*-pentane are added to 100 mL of water and the mixture is shaken mechanically for 10 min. Finally, 1 μ L of the organic extract is injected into a GC-ICP-MS system. With this configuration it is possible to achieve detection limits ranging between 3 and 6 ng L⁻¹ [36].

However, despite the advantages of being a simple and versatile sample preparation technique, it tends to be very time-consuming, although in the above cited optimised methods it was possible to reduce the extraction time considerably. Sample manipulation is high, such that a loss of the compounds of interest may occur due to their high volatility. Additionally, organic solvents – which are highly polluting – are required, although their use in laboratories is dwindling owing to the enactment of new, more stringent environmental directives.

Recently, modifications of the technique have appeared; these allow the problem of the use of large amounts of organic solvents to be circumvented. They have been termed solvent microextraction (SME) or liquid-phase microextraction (LPME) techniques.

One such technique involves the miniaturization of LLE into a microdrop, and is known as single-drop microextraction (SDME). The aqueous sample is placed in a vial, which is sealed hermetically and then perforated with a microsyringe at whose tip the microdrop of organic sample remains suspended. Once analyte distribution equilibrium has been attained between the organic solvent and the aqueous sample

Fig. 1 – Schematic diagram of the single-drop microextraction (SDME) technique.

solution, the drop of solvent with the concentrated analytes is transferred to the injection port of the gas chromatograph for analysis [37,38].

As with the solid-phase microextraction (SPME) technique, two modes are possible (Fig. 1): direct SDME, in which the microdrop is submerged in the aqueous solution to achieve analyte extraction, and the HS-SDME methodology, in which the drop of organic solvent remains suspended in the headspace over the aqueous solution.

Tor and Aydin applied direct SDME to the study of this type of pollution [39]. It is essential to select a proper organic solvent, which must have good affinity for the target compounds and low solubility in water. In that particular work, the authors selected *n*-hexane (2 μ L). The sample was subjected to agitation during extraction (600 rpm) and sodium chloride was added to improve the extraction efficiency.

The HS-SDME mode, which has been less studied, was applied by Zhao et al. [40]. 1-Octanol was used as solvent and a drop volume of 1 μ L was selected (an internal standard was used to correct possible variations in the volume injected in GC). Stirring (800 rpm) and the addition of NaCl also improved extraction of the analytes in this mode.

The SDME technique, in any of its modes, is simple, cheap, and rapid, requires very small amounts of solvent, and does not require specialised apparatus. Additionally, one of the main advantages is that it combines extraction, concentration and sample introduction in one step. Despite this, however, drop instability and the low sensitivity of the method cast doubt on its advantages.

As another possibility, LPME using a porous hollow fibre (HF) membrane was developed in order to improve solvent stability [41] (Fig. 2). This technique was applied by Voradisak and Varanusupakul as a preconcentration step in the determination of trihalomethanes in water samples [42]. THMs were extracted from the water samples through an organic extracting solvent (1-octanol, 25 μ L) impregnated in the pores and filled inside the channel of the polypropylene hollow fibre membrane. After extraction, the solvent with the analytes was introduced directly into the GC. The method was optimised under simple conditions such as extraction at

Fig. 2 – Schematic diagram of LPME using a hollow fibre (HF) membrane.

room temperature, no agitation, and no salt addition in order to minimise sample preparation steps.

A new solvent microextraction technique has been developed by Rezaee et al. [43] and is called dispersive-liquid-liquid microextraction (DLLME) (Fig. 3). Kozani et al. have used this methodology successfully for the preconcentration of THMs in drinking water [44]. In this method a cloudy solution is formed when an appropriate mixture of an extraction solvent and a disperser solvent are rapidly injected into an aqueous sample containing the analytes of interest. The cloudy solution consists of numerous drops of the solvent mixture (extraction and disperser), which are distributed throughout the aqueous solution. Transfer of the compounds from the aqueous phase to the organic one is very fast owing to the large contact surface afforded by the drops. After extraction, the sample is subjected to centrifugation to separate the two phases and finally a volume of the settled phase containing the concentrated analytes is analysed by GC-ECD. Some

advantages of this preconcentration technique are that the extraction time is very short; the method does not require special approaches and hence is very simple, easy to use, and relatively inexpensive. The main drawbacks of this technique are the intense manipulation of the sample and the fact that the preconcentration and analysis steps are performed separately and are difficult to integrate as an on-line system.

2.3. Headspace techniques

Headspace techniques have been widely used in the determination of THMs and other volatiles in water samples. In the static headspace mode, an aliquot of the gas phase from the vial, in equilibrium with the sample, is introduced into the carrier gas stream, which carries it to the column. From this mode, also known as one-step HS, different modifications have been developed, based on the inclusion of adsorption traps, whose aim is to separate the volatile analytes of interest from the rest of the compounds of the gas phase. Within these, the most widely used is HS-SPME (solid-phase microextraction), in which a fused-silica fibre covered with a polymeric coating material is used. The fibre is introduced into the headspace of the vial containing the mixture. After equilibrium has been reached, the fibre with the adsorbed volatiles is introduced into the vaporization chamber of the injector of the gas chromatograph and the analytes are transferred to the chromatographic column by thermal desorption. Other modes of static HS using a miniaturized extraction technique have also been applied for the determination of THMs in water. Zhao et al. optimised the HS-SDME technique (described in Section 2.2) [40]. The HS-HF-LPME configuration was studied Vora-adisak and Varanusupakul [42]. In that work, the authors observed that direct immersion of the membrane in the aqueous sample afforded higher extraction.

In dynamic headspace (purge and trap), gas extraction is carried out by continuously removing the gas phase. Thus, the total amount of the volatile analytes is removed from the sample.

The main advantage of headspace techniques is that they allow the volatiles of the samples to be analysed without interference by the non-volatile matrix. In these systems, sample

Fig. 3 – Schematic diagram of a dispersive-liquid-liquid microextraction (DLLME) procedure.

Table 4 – Determination of THMs in water samples using a static HS method

Instrumental configuration	Injection mode	Extraction time (min) + GC run time (min)	R.S.D. % ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^a	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Water samples	Ref.
HS-GC-MS	Split (1:25)	45 + 23 ^b	<39.1 (0.5)	0.1	–	[27]
HS-GC-MS	Split (1:25)	40 + 35.30 ^b	<39.1 (0.5)	0.05–0.2	–	[32]
HS-GC-MS	ns	45 + 4.67	<31.4 (40)	0.1	–	[35]
HS-GC-ECD	ns	15 + ns	ns	0.06–0.5	–	[45]
HS-GC-ECD	Splitless	34 + 20 ^b	<19.6 (0.1)	0.03–0.06	Tap waters	[46]
HS-PTV-FGC-MS	Solvent vent: injector starting temperature 5 °C. Cooling was accomplished with liquid CO ₂	30 + 7.30 ^c	<4.3 (1)	0.0004–0.0026	Tap, uhq, well and mineral waters	[53]
HS-GC-MS	ns	10 + 16 ^{b,c}	<4.5 (10)	0.5–0.7	River, swimming pool and tap waters	[54,55]
HS-MS	Split 1:20	10 + 2.5 ^c	<4.2 (10)	1–1.2	Mineral, lake, river, swimming poll, tap and well waters	[54,55]

ns: not specified.

^a Concentration at which the R.S.D. was calculated.

^b Apart from THMs, other VOCs were determined. In Ref. [27] the authors determined 34 compounds; 15 compounds were determined in Ref. [32]; 9 in Ref. [46] and 8 in Ref. [54].

^c The headspace generation device used (HP7694) allows the simultaneous heating of 6 vials in the oven, thereby significantly reducing total analysis time. For example, in Ref. [53] the time of analysis per sample – after the 30 min necessary for the extraction from the first vial – was 12:30 min. In Refs. [54] and [55] which used the HS-MS technique, sample throughput was 3 min.

manipulation is minimum, such that errors are reduced. Additionally, these techniques do not require the use of organic solvents and they can be coupled on-line with the chromatographic systems, allowing the complete analysis of a sample to be performed in a closed system. They are therefore reliable automatic preparation techniques, with which high extraction recoveries and high repeatabilities have been achieved.

2.3.1. Static headspace

The static headspace technique is the simplest and fastest headspace alternative and permits a high degree of automation. The main drawback associated with this headspace mode is its low sensitivity, since the concentration of analytes in the headspace may sometimes be below the limit of detection of the technique. If an attempt is made to increase sensitivity by increasing the volume of sample introduced into the column, band-broadening effects and a loss of resolution occur. Therefore, the resulting sensitivity depends, apart from on detector sensitivity, on the capacity of the column for a gas sample.

This technique has been applied for the determination of THMs in water samples [27,32,35,45,46], limits of detection ranging from 0.03 to 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ being achieved. Table 4 summarises the main applications based on this sample preparation technique.

The sensitivity levels obtained with this preconcentration technique tend to be lower than those obtained with two-step headspace techniques, which include a prior analyte preconcentration step. Nevertheless, some strategies of cryogenic trapping have been developed to solve the problem of sensitivity. These strategies have mainly been used with the dynamic headspace technique, although they may also be applied for

static HS-GC and they are discussed in detail in the book [47] and review [48] published by Kolb. When cryo-trapping is combined with direct static HS, both band-sharpening and enrichment are obtained, and sensitivity levels of the same order and even higher than those achieved with HS-SPME and P&T techniques are obtained.

The main drawback of the cryogenic entrapment devices used until now is that they tend to be homemade and require considerable training for use. This highlights the need to have automatic devices able to introduce large headspace volumes into the gas chromatograph without the pitfalls associated with conventional injection techniques. A possible alternative is the use of the commercial devices known as programmed temperature vaporizers (PTV). This possibility has been reported by Kolb in the above publications [47,48]. In 1999, Engewald et al. published a review [49] addressing some articles in which this instrumental configuration was used. However, since then little has appeared in the literature about the use of this type of coupling, with the exception of some application notes by instrumentation companies [50].

Recently, this coupling has been proposed by Pérez Pavón et al. for the determination of VOCs in different matrices [51,52]. In particular, a method based on a headspace autosampler coupled with a GC equipped with a PTV (Fig. 4) has been satisfactorily applied for the determination of THMs in water samples [53]. The PTV inlet used was packed with Tenax-TA®. The injection mode was solvent-vent, in which the analytes were retained in the hydrophobic insert packing by cold trapping, while the water vapour was eliminated through the split line. The advantages of this injection mode, together with the use of fast gas chromatography (GC run time: 7:30 min) and MS detection in SIM mode afford an automatic, rapid,

Table 5 – Determination of THMs in water samples using an SPME method

Instrumental configuration	Fibre	Extraction time (min) + desorption time (min) + GC run time (min)	R.S.D. % ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^a	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Water samples	Ref.
HS-SPME-GC-ECD	85 μm CAR/PDMS	30 + 4 + 30	<6.2 (5)	0.005–0.01	Drinking waters	[60]
HS-SPME-GC-ECD	85 μm CAR/PDMS	30 + 10 + 42 ^b	<2.6 (ns)	0.0003–0.0014	Drinking waters	[61]
HS-SPME-GC-MS	PDMS/DVB	20 + 5 + 14	<3.75 (9.6)	0.00043–0.006	Drinking waters	[62]
DI-SPME-GC-MS	50/30 μm DVB/CAR/PDMS	15 + 2 + 14.9 ^b	<3.9 (25)	0.02–0.7	Drinking waters	[63]
HS-SPME-MS	75 μm CAR/PDMS	15 + ns + 22 ^b	<13.06 (1)	0.13–0.17	Drinking, surface and industrial effluent waters	[64]
HS-SPME-MS	100 μm PDMS	30 + 1 + 32.5 ^b	<4.5 (0.1)	0.01–0.02	River and tap waters	[65]
HS-SPME-ECD	100 μm PDMS	38 + 2 + 25	<12 (0.5)	0.0015–0.020	Drinking waters	[66]
HS-SPME-GC-MS	100 μm PDMS	20 + 2 + 17	<4.6 (10)	1–2.8	Drinking and swimming pool waters	[67]

ns: not specified.

^a Concentration at which the R.S.D. was calculated.

^b As well as THMs, other VOCs were determined. In Ref. [61], 14 compounds were determined; 23 in Ref. [64]; 22 VOCs in Ref. [55], and 8 in Ref. [63].

reliable, and highly sensitive method for the determination of THMs in water samples. The sensitivity of the method is 100–150 fold higher than that of methods in which the static headspace method is used with a conventional injection technique (Table 4).

Static headspace directly coupled with a mass spectrometer detector has also been used for the screening [54] and determination [55] of TTHMs in waters. This coupling is considered to be a kind of “electronic nose”, and has been used for the rapid detection of VOCs in different matrices [56]. It consists of the introduction of the headspace sample without prior chromatographic separation into the ionization chamber of the mass spectrometer. The resulting spectrum is a “fingerprint” of the sample being analysed. Accordingly, suitable treatment of this signal by chemometric techniques is essential to extract the information contained in the profile.

Caro et al. proposed a method for the rapid screening of THMs in different water matrices [54]. With this method, it is possible to discriminate between contaminated and uncon-

taminated water samples according to a cut-off level ($4 \mu\text{g L}^{-1}$). The method was applied to the analyses of 30 water samples and only five (river, tap and swimming pool waters) were found to be contaminated. Positive samples were confirmed by analysing them with a conventional HS-GC–MS method. This confirmation method requires 0.5 h per sample, pointing to the saving in time that can be gained, in this case, in the analysis of samples by use of this screening method.

Application of the HS-MS instrumental configuration for the determination of total trihalomethane concentrations (TTHMs) has also been described recently [55]. Soft-independent modelling of class analogy (SIMCA) and partial least squares (PLS) were used to interpret the data obtained. The HS-MS method is very fast, reliable and involves minimal sample handling and is therefore very useful for routine analyses and in situations in which the results must be provided as fast as possible with a view to future decisions. However, it is not useful when the compounds are present in water samples at trace levels, owing to their high detection limits. Moreover, this method only affords information about the total concentration of trihalomethanes and often it is more interesting to know the individual concentrations of each of them.

2.3.2. Headspace-solid-phase microextraction.

SPME, developed by Belardi and Pawliszyn [57], has been widely used for analysing environmental samples. The HS-SPME mode has undergone progressive developments since its introduction in 1990 [58] and is now a firmly established technique.

The HS-SPME technique has been successfully applied for the separation of trihalomethanes from water matrices. With this preconcentration technique – simple, reliable and very sensitive – analytical methods have been developed. Different approaches are compared in Table 5.

The sensitivity of the method is strongly dependent upon the type of fibre selected. Many studies have been carried out in which the most suitable type of polymeric coating

Fig. 4 – Schematic diagram of a headspace (HS)-programmed temperature vaporizer (PTV) coupling.

Table 6 - Determination of THMs in water samples using a P&T method

Instrumental configuration	Trap	Elimination of water vapour	Purge time (min) + desorption time (min) + GC run time (min)	R.S.D. % ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^a	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Water samples	Ref.
P&T-GC-DECD	ns	-	ns + ns + 28 ^b	<4 (15)	0.6–0.9	Drinking, swimming pool and distillate waters	[26]
P&T-GC-MS	Trap of Tenax, silica gel and charcoal (30.5 cm) Vocarb 3000 trap (30.5 cm)	-	11 + 4 + 23 ^b	<64.9 (10)	0.05–0.25	-	[27]
P&T-GC-ECD	Trap of Tenax, silica gel and charcoal (30.5 cm) Vocarb 3000 trap (30.5 cm)	-	11 + 4 + 51 ^b	<19.3 (2)	0.025–0.05	-	[27]
P&T-GC-MS	Vocarb 3000 trap (30 cm)	-	11 + 3 + 35.3 ^b	<13.2 (1)	0.01–0.05	-	[32]
P&T-GC-MS	Charcoal trap	-	20 + 3 + 4.67	<30.35 (20)	1	-	[35]
P&T-GC-MS	Vocarb 3000 trap (10 cm) Carbotrap B, 6 cm Carboxen 1000 and 1 cm Carboxen 1001	-	11 + 1 + 14.9 ^b	<4.7 (25)	0.04–0.2	Drinking waters	[63]
P&T-GC-ECD	Tube (30.5 cm $\times$ 0.312 cm e.d) packed with Tenax-GC®, silica gel and activated carbon	-	11 + 4 + 23.25	<6.36 (2)	0.02–0.07	Chlorinated sea water samples	[72]
P&T-GC-ECD	Macrotrap: glass tube (80 mm $\times$ 4 mm i.d.) Microtrap: glass tube (50 mm $\times$ 2 mm i.d.) Both packed with Tenax-GC® and Carbosieve III S	Nafion drier	30 + 6 + 22	<4.1 (50)	0.001	Tap waters	[73]
P&T-GC-AED	Column (30.5 cm $\times$ 0.312 cm o.d.) packed with Tenax-GC®, silica gel and activated carbon	Moisture control module	9 + 4 + 12.6 ^b	<8.5 (1)	0.05–0.18	Tap waters and beverages	[74]
P&T-GC-ECD	Cold trap: stainless steel tubing (20 cm $\times$ 1 mm i.d.) filled with Porapak N. Cooled by a circulating water mixture at +5 °C	Cooling the upper part of the purge chamber Tube with anhydrous magnesium perchlorate	4 + ns + 21 ^b	<4 (ns)	0.00007–0.007	Sea water	[75]

for the target compounds was studied. Many authors agree that the fibre with the best extraction efficiency is carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) [59–65]. However, this type of fibre has not always been used. Nakamura and Daishima selected the 100 μm PDMS fibre owing to the wide range of linearity that it provides [65]. This type of fibre has also been used by Luks-Betlej et al. [66] and Stack et al. [67]. San Juan et al. evaluated different fibres: CAR/PDMS, divinylbenzene/carboxen/polydimethyl-siloxane (DVB/CAR/PDMS) and polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) [62]. The PDMS-DVB fibre was chosen because it was better than the others in terms of detection limits and repeatability, and because it provided a broader linear range. Lara Gonzalo et al. [63] used DVB/CAR/PDMS fibre, which, despite having slightly lower extraction efficiency than the CAR/PDMS fibre, provided chromatograms with narrower peaks.

Apart from the choice of fibre, other important variables to be optimised are headspace volume, the addition of salt, the stirring of the sample, the extraction and desorption times, and the extraction and desorption temperatures. The addition of salt [60–62,66,67] and stirring [60,61,63,67] during the extraction procedure seems to improve the transfer of the compounds from water to the headspace, and hence have been widely used.

As well as other parameters, Lara Gonzalo et al. studied SPME modality [63]. The signals obtained were higher when the direct immersion mode was used (DI-SPME). These results differ from those reported elsewhere, which propose the HS-SPME mode for THMs determination in water. The authors of the article attribute this to the sample agitation system used, which was quite different from the usual ones.

2.3.3. Dynamic headspace: purge and trap

Purge and trap-gas chromatography (P&T-GC), as first described by Swinnerton and Linnenbom in 1962 [68] and developed by Bellar and Liechtenberg [69], has become a valuable and widely accepted method for the analysis of VOCs in water and is one of the methodologies figuring in the EPA legislation for the determination of THMs in water [70,71]. Table 6 summarises the main works published in recent years in which this preconcentration technique was used.

The purged volatiles are diluted in the extractant gas and must be focused in a trap before being introduced into the column. This focalisation can be performed in a cold trap, although generally cartridges packed with an adsorbent material are used, from where the volatiles are transferred to the chromatographic column by thermal desorption [26,27,32,35,63,72]. With this second mode of trapping, limits of detection ranging between 20 and 1000 ng L^{-1} have been obtained (see Table 6, which also specifies instrumental configuration, trap, water removal system, analysis time and relative standard deviation).

One drawback associated with this methodology is the excessive water vapour that is purged with the volatiles by the stream of inert gas. This gives rise to peak distortion, especially in the early part of the chromatogram.

To avoid this problem, Zygmunt developed a laboratory-built P&T device combining a solvent elimination system, consisting of a Nafion desiccator (whose walls are perme-

able to water vapour but not to organic compounds) and a double-trap system with different sorbents. With this system the authors achieved a limit of detection of 1 ng L^{-1} [73]. For the same purposes, a moisture control module was used by Campillo et al. [74]. Another strategy used in order to minimise band broadening was to draw the desorption flow through the trap in the opposite direction to the purge flow onto the column [74]. In this work an atomic emission detector (AED) coupled to the GC was used; this has been rarely used for VOC determination (see Section 4).

Moreover, when cryogenic traps are used the water problem is even more prominent, since the trap may be blocked by ice plugging. Therefore, these traps are usually combined with a “drying step” in which the water vapour is removed prior to cryogenic trapping. The main trapping devices and desiccators used with the dynamic headspace technique have been reviewed by Kolb [48].

Different methods have been developed for the determination of THMs and other VOCs in water samples that include a cold trapping step. Ekdahl and Abrahamsson developed a laboratory-built miniaturised cold trap that consisted of stainless steel tubing filled with an adsorbent material (Porapak N) [75]. The trap was maintained at around 0 °C by means of a circulating water/glycol mixture. The amount of water vapour in the gas was minimised by cooling the upper part of the purge chamber to approximately 0 °C. In addition, a tube with anhydrous magnesium perchlorate was used to dry the gas. Also, the carrier gas was made to circulate through the trap in the opposite direction to the purge flow with a view to preventing band broadening.

A continuous flow P&T-GC-MS system for the on-line monitoring of THMs in water was developed by Chen and Her [76]. This system had a cryo-focusing trap, which consisted of a fused-silica capillary column cooled to trap the analytes. Sample injection was accomplished at a controlled temperature of 0 °C to ensure that the analytes would pass to the column, while the water vapour remained condensed in the trap. The purge and chromatographic times used in this mode are very short, thereby reducing the total analysis time to less than 5 min. The speed of analysis, and the fact that the method is on-line, increase laboratory output and provide the feedback necessary for monitoring THMs in waters at trace levels.

Zocolillo et al. developed a P&T system, in which the sample introduction system was modified in order to avoid any air intake into the system [77]. In the configuration employed, a moisture trap, in which the water vapour was condensed, and a cold trap, cooled by a stream of liquid nitrogen, were combined. With this preconcentration step coupled with GC-ECD it is possible to obtain limits of detection in the ng L^{-1} range and the method has been shown to be especially useful for the discrimination of different water samples whose concentration levels range from 1 ng L^{-1} to 1 $\mu\text{g L}^{-1}$.

The use of cryogenic traps affords an increase in sensitivity and also improves chromatography resolution by band concentration. However, the cryofocusing devices described are lab made and require more or less skill and experience of the operator. As in the direct static headspace mode, the use of programmed temperature vaporizers would solve many of the drawbacks. However, few papers addressing this kind

Instrumental configuration	Membrane	Preconcentration step	Elimination of water vapour	GC run time (min)	R.S.D. % ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^a	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Water samples	Ref.
SCMS-GC-ECD	A silicone capillary membrane wound around a 5 in. length metal body	–	By heating the transfer lines	8.5	<5.3 (ns)	0.3–0.9	–	[84]
SCMS-GC-PDFID	A silicone capillary membrane wound around a 5 in. length metal body	–	Nafion tubing	5	<7 (6.7)	0.16–1.3	–	[85]
SCMS-GCOV-PDFID	A silicone capillary membrane wound around a 5 in. length metal body	–	By heating the transfer lines	13	<16 (3.0)	1.1–1.6	Drinking water	[85]
CMS-FIA	A 94 cm length of silicone rubber membrane tubing placed inside a Tefzel® tubing	–	–	20–30 ^b	2.1 (ns)	1.1	–	[86]
CMS-GC-ECD	A 120 cm length of silicone rubber membrane tubing placed inside a Tefzel® tubing	–	Nafion tubing	7	<8.6 (1.8)	0.3–0.5	–	[87]
GEC-GC-DELCD	A 5 cm length of silicone capillary membrane tubing placed inside a cell	Tenax-GR® trap	Tenax-GR® trap	11	<2.8 (1.7)	0.1–0.8	Drinking water	[88]
MIMS-FGC-MS	A 8 cm silicon hollow fibre membrane	Cryofocusing unit (first part of a DB-5MS column) cooled to –165 °C by a flow of liquid nitrogen.	Programmed temperature vaporization injection	0.6	<9.5 (average of three analyses)	100–1000 (calibration level)	Drinking water	[93]

ns: not specified.

^a Concentration at which the R.S.D. was calculated.

^b The times shown in the table are the total analysis time.

^b The times shown in the table are the total analysis time.

of coupling have been published [78], and to the best of our knowledge it has not been applied for the determination of trihalomethanes in waters. Moreover, P&T is a rather time-consuming technique, with extraction times ranging from 4 to 36 min in the analysis of THMs in water and – further – complex instrumentation is required.

Another dynamic headspace technique is closed-loop stripping analysis (CLSA). This technique, developed by Grob [79–82], has been studied by Kampioti and Stephanou, who tested its analytical capabilities for the determination of halogenated DBPs, including THMs, in water [83]. They used a commercially available apparatus. The bottle with the water sample was dipped in a thermostatted water bath (35 °C) and the headspace above the sample was purged through a flow of inert gas which was continually recirculated through the closed-loop circuit by means of a pump. The moist gas stream leaving the sample was warmed above the water bath temperature in order to minimise the possible condensation of water, and was passed through an activated carbon filter, where the stripped analytes were retained. The sample was purged for 2 h, after which the filter was removed from the loop and analyte extraction was accomplished using 30 μ L of carbon disulfide. Finally, a portion of 1 μ L of the extract was introduced into the GC-ECD system.

Despite the high sensitivity and reliability of the technique, the extraction time required is very high and, additionally, exhaustive conditioning of the activated carbon fibre is required due to the possible carry-over effect, which leads to low sample throughput and low analysis cycle rates. Moreover, in the process of extraction of very volatile compounds some of them may be lost.

2.4. Membrane-based sampling techniques

Several membrane extraction techniques have been used for the enrichment of VOCs out of water [18–20]. One technique recently applied to the determination of THMs in water samples is HF-LPME [39], previously described in Section 2.2. The rest of the membrane-based techniques used for such purposes consist of lab-made devices. The main advantage of these systems with respect to the HF-LPME method is that they permit the THM concentration to be monitored on-line. Additionally, in these systems no solvents are used because introduction of the analytes into the system is done directly through the membrane by means of a process called pervaporation. Table 7 shows the main works in which this sample preparation technique was used in the analysis of THMs in water samples.

Emmert et al. have devoted a great deal of effort to developing simple and portable devices based on membrane sampling for the on-line monitoring of THM concentrations in water samples. They first proposed a supported capillary membrane sampling (SCMS) probe connected to GC-ECD [84]. The SCMS probe consists of a silicone membrane wound around a metal body. The portion of the device with the wrapped membrane is immersed in the water sample or connected directly to the distribution system for measurements of THM concentrations in real time. The THMs permeate from the outer to the inner wall of the membrane and are transported to the gas chromatograph via a stream of N_2 . Some modifications of this

instrumental configuration have also been explored. The same authors used SCMS-GC coupled to a pulsed discharge photoionization detector (PDPID) [85] (see Section 4). In an effort to reduce the size and complexity of the SCMS-GC system, this group proposed SCMS-gas chromatography on a valve (GCOV) configuration. In this miniaturized version, the components of the SCMS-GC are placed onto a sample injection valve [85].

Emmert et al. have also developed a membrane-sampling system known as capillary membrane sampling (CMS). This lab-built device consists of a length (see Table 7) of silicone rubber tubing membrane inserted into Tefzel® tubing. The water to be analysed flows continuously through the space between the Tefzel® tubing and the membrane, such that the THMs cross the membrane from the outer wall to the inside of the silicone tube. Two different couplings have been proposed for the determination of THMs in waters. One is CMS-FIA (flow injection analysis) [86], in which the carrier stream circulating through the inside of the silicone tube consists of reagent water, which is mixed with a nicotinamide solution to form a fluorescent product (see Section 4). With this configuration, the on-line monitoring of total THM concentrations was optimised. The other possibility studied consisted of CMS-GC-ECD coupling [87]. The device used was very similar to the previous one, but in this case a flow of N_2 is used to transport the analytes to the GC. With this coupling it was possible to determine individual THM concentrations in real-time.

The last membrane sample device constructed by this group was the gas extraction cell (GEC) [88]. This system is very similar to the CMS except for the length of the silicone capillary membrane tubing, which was reduced to 5 cm. After sampling, the carrier gas with the THMs flows through a Tenax-GR® trap, where the analytes are preconcentrated, while the water is very sparingly retained. Separation and detection of THMs were accomplished by GC with a dry electrolytic conductivity detector (DELCD) (see Section 4).

Another membrane-based sampling technique, which has been widely used for monitoring VOCs directly from aqueous solutions, is membrane introduction mass spectrometry (MIMS) [89–92]. In this technique, the organic compounds are introduced directly into the ionization source of the mass analyser through a membrane. The exclusion of possible ionic compounds, solids in suspension, high-molecular weight compounds, etc., caused by the membrane eliminates the need for a sample preparation step.

Recently, a very sensitive method (LOD: 2–8 ngL^{-1}) consisting of a modification of the traditional MIMS technique was used by Chang and Her for the on-line monitoring of THMs in waters samples [93]. In that work, MIMS was coupled with fast gas chromatography (FGC). The membrane introduction system used was a laboratory-built purge-type one. It consists of a stainless tube with a silicon hollow fibre membrane tube mounted inside. The water sample flows inside the membrane tube, while the carrier gas flows over the outside of the membrane, transporting the compounds that pervaporate through it. To solve the problem of the water passing through the membrane, a strategy based on programmed temperature vaporization injection was developed. A cryofocusing unit was used in which the first part of the chromatographic column acted as a trap. After the injection step, water is desorbed into the column by heating the trap to 200 °C. With

this configuration a very sensitive and fast method (the cycle time is less than 3 min) was optimised.

The main advantage of membrane-based sampling devices, besides being solvent-free, is the possibility of direct sampling from drinking water distribution systems, providing on-line monitoring data in a very simple and automatic manner. The main drawbacks are the fact that the devices used are lab-made and the possibility of exceeding the capacity of the membrane when analysing water samples with high THMs concentrations [84,86,87].

On comparing the limits of detection obtained with the different optimised methods (Table 7), it may be seen that the best results are obtained when ECD and MS are used as detecting systems. Also, an increase is seen in sensitivity when preconcentration traps and water vapour elimination systems are included. The best results as regards sensitivity and speed of analysis have been obtained with the MIMS-FGC-MS instrumental configuration [93]. However, the use of a MS detector limits the portability of the instruments and increases the cost and complexity of the configuration.

3. Chromatographic separation

Different chromatographic columns have been used for the determination of THMs in water samples. They are fused-silica capillary columns coated with a liquid phase. They generally have a dimethylpolysiloxane stationary phase (non-polar) that can be combined with different phenyl or cyanopropylphenyl groups, achieving different degrees of polarity.

The GC run time necessary to separate the four THMs by conventional gas chromatography ranges between approximately 15 and 35 min (in the applications in which only these THMs are determined). In some applications fast gas chromatography (FGC) has been used. With this technique it is possible to reduce analysis times by a considerable extent, implying an increase in sample throughput.

This is reflected in time-saving and cost reduction per sample and an increase in laboratory productivity. Another advantage of FGC is that it allows a higher number of replicates of each sample being performed in the same time as that needed for the analysis of a sample with conventional gas chromatography. This affords a larger body of analytical findings and hence better precision in the results [94,95]. To accomplish these rapid separations, short narrow-bore columns are used, programming rapid temperature ramps in the oven.

A clear example of this strategy is that of Chang and Her [93], who used a very short DB-5MS capillary column ($5\text{ m} \times 0.25\text{ mm i.d.}$, $0.25\text{ }\mu\text{m}$ film thickness). The column temperature was kept at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ during the analysis and the authors were able to separate the compounds and elute the water in less than 2 min, reducing the overall analysis cycle to 3 min per sample. The same column was used by Chen and Her, who optimised a method with a cycle time of 5 min [76].

Brown et al. also used a short column to achieve rapid separation of THMs (VB-5: $15\text{ m} \times 0.53\text{ mm} \times 1.00\text{ }\mu\text{m}$). With this column, using a fast temperature ramp, the GC run time was 7 min. [87]. An HP-5MS ($30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$) column was

used by Zocolillo et al. After 1.50 min at $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, the temperature was raised to $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ at $40\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ and this final temperature was maintained for 1.25 min, giving a total run time of 5.50 min [77].

Another work in which fast separation of the compounds was obtained is that of Culea et al. [35]. Those authors used an RTX-5MS ($30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$) column and by programming a temperature ramp of $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ they managed to separate the four compounds in less than 5 min.

A similar compound separation time was reported by Emmert and his group with the miniaturised device called “gas chromatography on a valve” (GCOV) [85]. In this configuration, a MXT-1 ($20\text{ m} \times 0.53\text{ mm} \times 5.00\text{ }\mu\text{m}$) column was used.

Pérez Pavón et al. used a DB-VRX ($20\text{ m} \times 0.18\text{ mm} \times 1\text{ }\mu\text{m}$) [53] column. By programming the maximum heating ramps permitted by the apparatus employed, they successfully separated the compounds in 5 min. This type of column, with narrow internal diameters, has the drawback that they require low volume injection, which negatively affects the sensitivity of the analytical method. In that work, the problem was solved by using a PTV, with which it was possible to introduce large sample volumes into the chromatographic column thanks to the removal of the solvent at low temperature. The PTV-FGC combination has great potential since it allows rapid separations to be achieved with better results as regards resolution and sensitivity than those obtained with conventional GC [96–98].

4. Detectors

The detectors most widely used in the analysis of VOCs in water samples are mass spectrometers (MS) and electron capture detectors (ECD).

The MS is a potent detector that allows rapid qualitative identification of analytes by comparison of their mass spectra with those in a library of spectra of known compounds. In the analysis of THMs in water samples, this possibility is interesting, above all when complex chromatograms of highly polluted samples are obtained. Some papers have been published in which a direct coupling of a direct-static headspace with a mass spectrometer was used [54,55]. With this configuration, the spectrum recorded is characteristic of the sample being analysed, such that it is considered the “digital fingerprint” of the sample (see Section 2.3.1).

The ECD is highly specific for halogenated compounds and is therefore indicated for the determination of THMs in water samples. Generally, with these detectors good limits of detection are achieved for the analysis of THMs in water samples. However, detectors with other advantages, such as portability, simplicity and the ability to provide real- or near-real-time measurements, have also been proposed. Within this group, the detectors proposed by Emmert et al could be cited [85,86,88].

Those authors used an FIA analyser with a fluorescence detector [86]. The THMs react with a nicotinamide solution, forming a fluorescent product which is then detected.

Emmert et al. have also proposed the use of a pulsed discharge photoionization detector (PDPID) [85]. The compounds eluted from the GC column are ionized by photons from the

PDPID discharge. The resulting electrons are focused using two bias electrodes toward a collector electrode.

Another possibility is a dry electrolytic conductivity detector (DELCD) [88,26]. This detector operates by reacting THMs with oxygen in the make-up gas at 1000 °C to form and detect chlorine dioxide and bromine dioxide.

Although lower levels of sensitivity are obtained with these detectors, the above advantages mean that they offer interesting possibilities in certain specific situations, such as when it becomes necessary to know the *in situ* concentrations of the compounds very rapidly.

To date, detection systems that use atomic emission have not found wide application in the analysis of VOCs. Recently, however, several applications of these techniques have been developed for the determination of THMs in water samples. Campillo et al. proposed the coupling of P&T-GC with an atomic emission detector (AED) [74]. The solutes eluted from the GC column are atomized in a microwave-induced plasma (MIP). The excited atoms and ions generated in the plasma produce a characteristic emission as they return to the ground state. The polychromatic light is dispersed in a spectrometer and the emission intensity of the characteristic wavelengths is measured by a photodiode array. The limits of detection obtained with this instrumental configuration range from 0.05 to 0.18 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Table 6).

Another atomic emission technique was used by González Gago et al. Those authors propose a method based on GC-inductively coupled plasma (ICP-MS) coupling, using LLE as a technique for preconcentrating the compounds [36]. This plasma is more robust in comparison with MIP, such that with this method very low limits of detection can be obtained (0.003–0.006 $\mu\text{g L}^{-1}$; Table 3). In that work, the authors show that the ICP-MS response for chlorine and bromine is independent of the chemical structure of the different trihalomethanes, such that the compound-independent calibration strategy (CIC) was used with an internal standard. The main disadvantages of this method, apart from those associated with the sample preparation technique (LLE, Section 2.2) are the high cost; sensitivity drifts, and the matrix effect.

5. Conclusions

The most widely used methods for THMs determination in waters are based on GC with an electron capture detector (ECD) or a mass spectrometry detector (MSD). THMs concentrations in natural and drinking waters are in the order of ng L^{-1} to $\mu\text{g L}^{-1}$, such that it is usually necessary to subject the compounds to a preconcentration step in order to attain the desired levels of sensitivity. Because of this, the applicability of DAI is limited to the sample volume that can be introduced in the column. Traditionally, LLE has been the technique most used. In recent years, solvent microextraction techniques such as SDME, HF-LPME and DLLME have been used to determine THMs in water samples. With these techniques, it is possible to circumvent the drawback of the need to use large amounts of organic solvents implied by the traditional method, and good levels of sensitivity are obtained (0.005–0.4 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Other sample pretreatment techniques involving minimum sample preparation have been used; they do not use

organic solvents and are coupled on-line to the chromatographic system. Such techniques include the different modes of headspace generation. The best levels of detection are obtained with HS-SPME (0.3–1.4 ng L^{-1}). In the P&T mode, an important increase in sensitivity is attained when cold traps and the elimination of water vapour are implemented. With static HS methods, poorer limits of detection have been obtained. However, the inclusion of a programmed temperature vaporizer, in which the analytes are preconcentrated while the water vapour is eliminated, affords limits of detection (0.4–2.6 ng L^{-1}) of the same order as those obtained with HS-SPME, maintaining the simple static HS instrumentation.

Nowadays HS and P&T methodologies are among the preferred choices owing to their easy automation. However, other techniques such as LLE may offer easy performance with a much lower investment.

Within the same trend of on-line analysis, membrane techniques have been used. The devices employed are laboratory-made and allow the monitoring of THMs concentrations in real or near-real time. Again, the LODs improve considerably when a cold trap is used before the sample is introduced into the chromatograph.

Regarding chromatographic separation, of special interest is fast gas chromatography, with which it is possible to achieve the separation of the four THMs addressed here in an interval of 0.6–5 min. Fast sampling preparation schemes need to be developed to attain a real throughput gain.

In the detection stage, apart from the usual ECD and MS, other detectors such as PDPID and DELCD have been used; despite showing lower levels of sensitivity, they have advantages such as simplicity and portability. Also important is the use of atomic emission-based detectors, whose application to the analysis of VOCs is still not very well developed.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of the DGI (Project CTQ2007-63157/BQU) and the Consejería de Educación y Cultura of the Junta de Castilla y León (Project SA112A08) for this research.

REFERENCES

- [1] J.J. Rook, *J. Water Treat. Exam.* 23 (1974) 234.
- [2] S.D. Richardson, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 666.
- [3] T. Ivahnenko, J.S. Zogorski, Sources and occurrence of chloroform and other trihalomethanes in drinking-water supply wells in the United States, 1986–2001, U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report, Virginia, 2006, p. 13.
- [4] World Health Organization (WHO), Guidelines for Drinking-Water Quality, third ed., World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2006, p. 366.
- [5] J.S. Zogorski, J.M. Carter, T. Ivahnenko, W.W. Lapham, M.J. Moran, B.L. Rowe, P.J. Squillace, P.L. Toccalino, U.S. Department of Interior, Circular 1292, U.S. Geological Survey, Reston, Virginia, 2006.
- [6] U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), Integrated Risk Information System, <http://www.epa.gov/iris/>.
- [7] E.P.A. Office of Water, Drinking Water Criteria Document for Brominated Trihalomethanes, EPA Office of Water, Washington, United States, 2005, p. 17.

- [8] W. Wang, B. Ye, L. Yang, Y. Li, Y. Wang, *Environ. Int.* 33 (2007) 219.
- [9] U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), National Primary Drinking Water Regulations: Disinfectants and Disinfection Byproducts, U.S. Environmental Protection Agency, United States, 1998.
- [10] Directive 98/83/CE. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, Bruselas, 1998.
- [11] A. McCulloch, *Chemosphere* 50 (2003) 1291.
- [12] E.J. Hoekstra, J.H. Duyzer, E.W.B. Leer, U.A.Th. Brinkman, *Atmos. Environ.* 35 (2001) 61.
- [13] M. Biziuk, A. Przyjazny, *J. Chromatogr. A* 733 (1996) 417.
- [14] J. Dewulf, H.V. Langenhove, G. Wittmann, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 637.
- [15] J. Dewulf, T. Huybrechts, H.V. Langenhove, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 300.
- [16] G.L. Emmert, G. Cao, G. Geme, N. Joshi, N. Rahman, *Methods for Real Time Measurement of THMs and HAAs in Distribution Systems*, International Water Association (IWA), London, 2005.
- [17] P. Kuran, L. Sojak, *J. Chromatogr. A* 733 (1996) 119.
- [18] T. Hyötyläinen, M.L. Riekkola, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 1962.
- [19] K. Demeestere, J. Dewulf, B.D. Witte, H.V. Langenhove, *J. Chromatogr. A* 1153 (2007) 130.
- [20] T. Hyötyläinen, M.L. Riekkola, *Anal. Chim. Acta* 614 (2008) 27.
- [21] Somenath, Mitra (Eds.), *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry* (Chemical Analysis, vol. 162), John Wiley & Sons, New Jersey, United States, 2003.
- [22] K. Grob, A. Habich, *J. High Resolut. Chrom.* 6 (1983) 11.
- [23] K. Grob, *J. Chromatogr.* 299 (1984) 1.
- [24] M. Biziuk, J. Namiesnik, J. Czerwinski, D. Gorlo, B. Makuch, W. Janicki, Z. Polkowska, *J. Chromatogr. A* 733 (1996) 171.
- [25] L. Wolska, C. Olszewska, M. Truska, B. Zygmunt, J. Namiesnik, *Chemosphere* 37 (1998) 2645.
- [26] B. Buszewski, T. Ligor, *Water Air Soil Pollut.* 129 (2000) 155.
- [27] S.K. Goufopoulos, T.D. Lekkas, A.D. Nikolau, *Chemosphere* 45 (2001) 275.
- [28] Z. Polkowska, *Chemosphere* 57 (2004) 1265.
- [29] S.M. Pyle, D.F. Gurka, *Talanta* 41 (1994) 1845.
- [30] C. Aeppli, M. Berg, T.B. Hofstetter, R. Kipfer, R.P. Schwarzenbach, *J. Chromatogr. A* 1181 (2008) 116.
- [31] S.V. Leivadara, A.D. Nikolau, T.D. Lekkas, *Food Chem.* 108 (2008) 277.
- [32] A.D. Nikolau, T.D. Lekkas, S.K. Goufopoulos, M.N. Kostopoulou, *Talanta* 56 (2002) 717.
- [33] A.D. Nikolau, S.K. Goufopoulos, L. Rizzo, G. Lofrano, T.D. Lekkas, *V. Belgiorio, Desalination* 176 (2005) 25.
- [34] USEPA Method 551, Determination of Chlorination Disinfection Products and Chlorinated Solvents in Drinking Water by Liquid-Liquid Extraction and Gas Chromatography with Electron-Capture Detection, USEPA, Cincinnati, OH, 1995.
- [35] M. Culea, O. Cozar, D. Ristoiu, *J. Mass. Spectrom.* 41 (2006) 1594.
- [36] A. González Gago, J.M. Marchante Gayón, J.I. García Alonso, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 22 (2007) 1138.
- [37] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2236.
- [38] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, *Anal. Chem.* 69 (1997) 235.
- [39] A. Tor, M.E. Aydin, *Anal. Chim. Acta* 575 (2006) 138.
- [40] R.S. Zhao, W.-J. Lao, X.-b. Xu, *Talanta* 62 (2004) 751.
- [41] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2650.
- [42] N. Vora-adisak, P. Varanusupakul, *J. Chromatogr. A* 1121 (2006) 236.
- [43] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R.M. Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1.
- [44] R.R. Kozani, Y. Assadi, F. Shemirani, M.R.M. Hosseini, M.R. Jamali, *Chromatographia* 66 (2007) 81.
- [45] H. Gallard, U.V. Gunten, *Water Res.* 36 (2002) 65.
- [46] J. Kuivinen, H. Johnsson, *Water Res.* 33 (1999) 1201.
- [47] B. Kolb, L.S. Ettre, *Static Headspace-Gas Chromatography: Theory and Practice*, 2nd ed., John Wiley & Sons, New Jersey, United States, 2006, p. 343.
- [48] B. Kolb, *J. Chromatogr. A* 842 (1999) 163.
- [49] W. Engewald, J. Teske, J. Efer, *J. Chromatogr. A* 842 (1999) 143.
- [50] A.C. Heiden, B. Kolahgar, E. Pafnknock, appnote 7/2001: Benefits of using programmed temperature vaporizers (PTVs) instead of hot split/splitless inlet for measurements of volatiles by liquid, headspace, and solid phase microextraction (SPME) techniques, Gerstel, Mülheim/Ruhr, Germany, 2001, p. 7.
- [51] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández-Laesgada, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A* 1141 (2007) 123.
- [52] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández-Laesgada, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A* 1175 (2007) 106.
- [53] J.L. Pérez Pavón, S. Herrero Martín, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A* 1194 (2008) 103.
- [54] J. Caro, A. Serrano, M. Gallego, *J. Chromatogr. A* 1138 (2007) 244.
- [55] A. Serrano, M. Gallego, *J. Chromatogr. A* 1154 (2007) 26.
- [56] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, C. García Pinto, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, A. Gorrero Peña, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 257.
- [57] R.P. Belardi, J.B. Pawliszyn, *Water Pollut. Res. J. Can.* 24 (1989) 179.
- [58] C.L. Arthur, J.B. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145.
- [59] J. O'Reilly, Q. Wang, L. Setkova, J.P. Hutchinson, Y. Chen, H.L. Lord, C.M. Linton, J. Pawliszyn, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 2010.
- [60] D.-H. Cho, S.-H. Kong, S.-G. Oh, *Water Res.* 37 (2003) 402.
- [61] C.V. Antoniou, E.E. Koukouraki, E. Diamadopoulos, *J. Chromatogr. A* 1132 (2006) 310.
- [62] P.M. San Juan, J.D. Carrillo, M.T. Tena, *J. Chromatogr. A* 1139 (2007) 27.
- [63] A. Lara-Gonzalo, J.E. Sánchez-Uría, E. Segovia-García, A. Sanz-Medel, *Talanta* 74 (2008) 1455.
- [64] A.D. Guimaraes, J.J. Carvalho, C. Goncalves, M.F. Alpendurada, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 88 (2008) 151.
- [65] S. Nakamura, S. Daishima, *Anal. Chim. Acta* 548 (2005) 79.
- [66] K. Luks-Betlej, D. Bodzek, *Pol. J. Environ. Stud.* 11 (2002) 255.
- [67] M.A. Stack, G. Fitzgerald, S. O'Connell, K.J. James, *Chemosphere* 41 (2000) 1821.
- [68] J. Swinnerton, V. Linnenboom, C.H. Cheek, *Anal. Chem.* 34 (1992) 483.
- [69] T. Bellar, J. Lichtenberg, *J. Am. Water Works Assoc.* 66 (1974) 739.
- [70] USEPA Method 524.2, Measurements of Purgeable Organic Compounds in Water by Capillary Column Gas Chromatography–Mass Spectrometry, USEPA, Cincinnati, OH, 1995.
- [71] USEPA Method 502.2, Volatile Organic Compounds in Water by Purge and Trap–Capillary Column–Gas Chromatography with Photoionization and Electrolytic Conductivity Detectors in Series, USEPA, Cincinnati, OH, 1995.
- [72] A.S. Allonier, M. Khalanski, A. Bermond, V. Camel, *Talanta* 51 (2000) 467.
- [73] B. Zygmunt, *J. Chromatogr. A* 725 (1996) 157.
- [74] N. Campillo, P. Viñas, I. López-García, N. Aguinaga, M. Hernández-Córdoba, *J. Chromatogr. A* 1035 (2004) 1.
- [75] A. Ekdahl, K. Abrahamsson, *Anal. Chim. Acta* 357 (1997) 197.
- [76] T.C. Chen, G.R. Her, *J. Chromatogr. A* 927 (2001) 229.
- [77] L. Zocollilo, L. Amendola, C. Cafaro, S. Insogna, *J. Chromatogr. A* 1077 (2005) 181.

- [78] J. Tabera, G. Reglero, M. Herraiz, Th. Knobloch, K. Levsen, *Chromatographia* 37 (1993) 361.
- [79] K. Grob, *J. Chromatogr.* 84 (1973) 255.
- [80] K. Grob, G. Grob, *J. Chromatogr.* 90 (1974) 303.
- [81] K. Grob, K. Grob Jr., G. Grob, *J. Chromatogr.* 106 (1975) 299.
- [82] K. Grob, F. Zürcher, *J. Chromatogr.* 117 (1976) 285.
- [83] A.A. Kampioti, E.G. Stephanou, *J. Chromatogr. A* 857 (1999) 217.
- [84] G.L. Emmert, G. Cao, C. Duty, W. Wolcott, *Talanta* 63 (2004) 675.
- [85] G.L. Emmert, M.A. Brown, Z. Liao, G. Cao, C. Duty, *Anal. Chim. Acta* 560 (2006) 197.
- [86] G. Geme, M.A. Brown, P. Simone Jr., G.L. Emmert, *Water Res.* 39 (2005) 3827.
- [87] M.A. Brown, G.L. Emmert, *Anal. Chim. Acta* 555 (2006) 75.
- [88] M.A. Brown, S. Miller, G.L. Emmert, *Anal. Chim. Acta* 592 (2007) 154.
- [89] T. Kotiaho, F.R. Lauritsen, T.K. Choudhury, R.G. Cooks, G.T. Taso, *Anal. Chem.* 63 (1991) 875A.
- [90] S. Bauer, D. Solyom, *Anal. Chem.* 66 (1994) 4422.
- [91] V.T. Virkki, R.A. Kelota, M. Ojala, T. Kotiaho, V. Komppa, A. Grove, S. Facchetti, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1421.
- [92] R.A. Kelota, V.T. Virkki, M. Ojala, V. Komppa, T. Kotiaho, *Talanta* 44 (1997) 373.
- [93] C.C. Chang, G.R. Her, *J. Chromatogr. A* 893 (2000) 169.
- [94] P. Korytár, E. Matisová, U.A.Th. Brinkman, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 558.
- [95] K. Mastovská, S.J. Lehotay, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 153.
- [96] E. Korenková, E. Matisová, J. Slobodník, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 1193.
- [97] M. Kirchner, E. Matisová, S. Hrouzková, J. de Zeeuw, *J. Chromatogr. A* 1090 (2005) 126.
- [98] M. Hafa, M. Takino, T. Yamagami, S. Daishima, K. Yamaguchi, *J. Chromatogr. A* 874 (2000) 81.

V

**MÉTODO BASADO EN EL USO DE UN
INYECTOR DE TEMPERATURA
PROGRAMADA PARA LA
DETERMINACIÓN DE THMs Y BTEX
EN SUELOS**

1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos orgánicos volátiles (*Volatile Organic Compounds*, VOCs) están ampliamente distribuidos en las diferentes matrices ambientales. Entre los medios receptores de este tipo de compuestos, el suelo es una de las matrices más sensibles y vulnerables. Además, la contaminación del suelo puede transferirse fácilmente a la atmósfera y las aguas subterráneas [1]. De muchos de estos compuestos y sus productos de degradación se sabe o se sospecha que son tóxicos y cancerígenos, por lo que suponen un alto riesgo para la salud humana y los ecosistemas.

Estos factores ponen de manifiesto la necesidad de instrumentos normativos que garanticen la protección de los suelos, establezcan sus usos potenciales y fijen los niveles de concentración para cada uno de los VOCs, por encima de los cuales se considera que un suelo está contaminado. Por tanto, es esencial el desarrollo de métodos analíticos capaces de determinar concentraciones traza de VOCs en los suelos de forma rápida, sencilla y fiable.

En general, este tipo de análisis se ha llevado a cabo mediante la extracción de los VOCs del suelo y cuantificación por cromatografía de gases (GC) con detectores de espectrometría de masas (MS), ionización de llama (FID) y, en el caso de compuestos halogenados, detectores de captura electrónica (ECD) [2]. La etapa más crítica del método completo es la que implica la extracción de los compuestos. Esto se debe a la diversidad y complejidad de las muestras y a la baja concentración y alta volatilidad de los compuestos. A lo largo de los años se ha propuesto una amplia variedad de procesos de extracción [3-5].

Las técnicas clásicas de extracción con disolventes como la extracción Soxhlet [6-8] y la extracción sólido-líquido [6,9] normalmente requieren mucho tiempo, incluyen un número elevado de etapas y, a menudo, requieren un manejo manual de los extractos. En los últimos años se han

desarrollado nuevas tecnologías que utilizan menos disolventes y son más rápidas que los procedimientos clásicos. Algunos ejemplos son: extracción con fluidos supercríticos (SFE) [10] y extracción con líquidos presurizados (PLE) [7], que han sido especialmente aplicadas a la determinación de compuestos semi-volátiles en suelos [11-15], al igual que otras técnicas como la extracción asistida con microondas (MAE) [16,17] o la extracción mediante ultrasonidos. La ventaja de estas técnicas es que son poco dependientes de la matriz, ya que consiguen una extracción prácticamente completa de los analitos. Sin embargo, presentan un gran inconveniente, ya que normalmente necesitan una etapa adicional de limpieza de los extractos obtenidos y, por tanto, se realizan en discontinuo [12].

Recientemente, una técnica llamada extracción con barra agitadora (SBSE) se ha combinado con algunos de los métodos de extracción con disolventes citados anteriormente, para la determinación de compuestos semi-volátiles en suelos [18-21]. Los compuestos se adsorben y preconcentran en la barra agitadora y se analizan mediante desorción térmica acoplada a cromatografía de gases. La técnica permite eliminar tediosas etapas de limpieza y preconcentración, tiene mayor capacidad de análisis de muestras en el mismo tiempo y consigue mejorar los límites de detección alcanzados.

En el análisis de VOCs en suelos se han utilizado mayoritariamente técnicas basadas en la generación de espacio de cabeza. Espacio de cabeza estático (SHS) [22] y purga y trampa (P&T) [23] son, junto con la destilación a vacío [24], las técnicas propuestas por la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (USEPA) para este tipo de análisis [25]. Se han publicado numerosos artículos utilizando SHS [26-30], P&T [31-33] y HS-microextracción en fase sólida (SPME) [6,26,8,34]. Estas técnicas presentan las ventajas de que no utilizan disolventes, la manipulación de la muestra es mínima y son fáciles de automatizar en procesos en línea. La principal desventaja es que, generalmente, están más influenciadas por la

matriz que las anteriormente descritas. Se han propuesto diversas estrategias para mejorar la eficacia de la extracción, entre las que es muy común la adición de agua o de un disolvente orgánico. Algunos trabajos describen el uso de una etapa de extracción con metanol previa al análisis mediante P&T [35,36]. Otros autores proponen el uso de un dispositivo de SPME enfriado internamente [37] o técnicas de generación de espacio de cabeza en múltiples etapas-SPME [38]. También se han empleado métodos no separativos como SHS-MS [28,30] y purga y membrana (*purge and membrane*, PAM)-MS [39].

Dentro de los VOCs considerados en diferentes protocolos y normativas [1,2] como contaminantes habituales del suelo se encuentran los trihalometanos (THMs: cloroformo, bromodiclorometano, dibromoclorometano y bromoformo) y los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado el benceno [40] como carcinógeno para los humanos (Grupo 1). Etilbenceno [41], cloroformo [42] y bromodiclorometano han sido considerados como posibles carcinógenos para humanos (Grupo 2B) mientras que tolueno, xilenos, dibromoclorometano y bromoformo [43] pertenecen al Grupo 3, que engloba aquellos compuestos no clasificables como carcinógenos en humanos.

La presencia de los trihalometanos en el suelo puede atribuirse a numerosas causas antropogénicas, debido a su uso como refrigerantes en frigoríficos, como propulsores y como disolventes de limpieza en la industria [36]. También pueden proceder del riego con aguas cloradas o de fugas en el sistema de distribución de agua potable, ya que se generan como subproductos en el proceso de cloración de las aguas [44]. Por otro lado, existen numerosos estudios, especialmente para el cloroformo, que confirman la formación de estos compuestos en el suelo por procesos naturales [45-52]. McCulloch ha realizado una estimación de las fuentes de

cloroformo en el ambiente, concluyendo que el 90% de las emisiones de cloroformo proceden de fuentes naturales, dentro de las cuales los procesos que tienen lugar en el suelo constituyen el 37% [51].

Los BTEX se encuentran en el petróleo y sus derivados, tales como gasolina o gasoil. Las principales fuentes de contaminación de suelos y aguas subterráneas se deben a derrames durante el transporte, fugas de tuberías o tanques de almacenamiento y a las emisiones de vehículos de motor [26].

Nuestro grupo de investigación tiene experiencia en el uso de la técnica de generación de espacio de cabeza estático para la extracción de compuestos orgánicos de muestras de suelos [28,53]. Recientemente, una metodología basada en el uso de un generador de espacio de cabeza seguido de cromatografía de gases rápida y detección mediante espectrometría de masas, utilizando un inyector de temperatura programada (PTV), ha sido aplicada de manera satisfactoria a la determinación de VOCs en diferentes matrices líquidas [54-56].

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es el de confirmar las posibilidades de la metodología basada en el acoplamiento de un generador de espacio de cabeza con un cromatógrafo de gases, equipado con un inyector de temperatura programada, y un espectrómetro de masas para la determinación de compuestos orgánicos en muestras de suelos.

Para ello, se desarrollará un método en el que esta estrategia metodológica se aplica, por primera vez, a muestras de suelos y se han seleccionado los THMs y los BTEX como compuestos objeto de estudio.

Basándonos en las conclusiones obtenidas en el estudio detallado de los modos de inyección que permite el PTV, que se realizó en el capítulo anterior, el modo de inyección seleccionado es *solvent vent*. El *liner* del PTV está empaquetado con Tenax-TA® y el horno del cromatógrafo de gases se ha modificado, instalando un sistema modular de calentamiento acelerado de columna (MACH™) con el que se logran velocidades de calentamiento y enfriamiento de la columna muy altas.

En el desarrollo de trabajo se estudiarán las variables que afectan al proceso de extracción y la posible existencia de efecto de matriz. En las condiciones experimentales óptimas se determinarán las características analíticas del método y se realizará una validación del mismo mediante la determinación de estos compuestos en materiales de referencia certificados (*certified reference materials*, CRMs).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos

El metanol fue suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania). Los trihalometanos (cloroformo, bromodiclorometano, dibromoclorometano y bromoformo) fueron suministrados por Supelco (Bellefonte, PA, USA). Tolueno, etilbenceno y m-xileno eran de Acros Organics (Geel, Bélgica) y el benceno fue suministrado por Sigma Aldrich (Sleinheim, Alemania).

3.2. Disoluciones estándar y muestras

3.2.1. Muestras acuosas

Las condiciones analíticas del método se optimizaron preparando disoluciones estándar de THMs y BTEX en agua. Para preparar las disoluciones patrón se utilizó un agua mineral (con el menor contenido de alguno de estos compuestos), ya que en ensayos previos con agua destilada y agua ultrapura se detectaron concentraciones a nivel de traza de alguno de los compuestos estudiados. Para realizar las medidas, las muestras se introducen en viales de 10 mL sellados con cierres que poseen *septum* de silicona. Los viales se colocaron en la bandeja del muestreador de espacio de cabeza y se analizaron en las condiciones especificadas en el apartado 3.4.

3.2.2. Muestras de suelos

3.2.2.1. Suelos dopados

Para estudiar las características analíticas del método, determinar la influencia de la adición de agua y NaCl en la eficacia de la extracción de los compuestos y para explorar la presencia de efecto de matriz se utilizaron matrices de suelos. Se seleccionaron ejemplos extremos de los diferentes tipos de suelos presentes en la naturaleza: un suelo con un alto contenido orgánico, recogido de un jardín público (Salamanca, España), un suelo

arcilloso (Vertisol procedente de Méjico) y arena comercial suministrada por Scharlau (Barcelona, España).

Para obtener matrices blanco -limpias de VOCs- a partir de los suelos naturales, las muestras recogidas (suelo de jardín y Vertisol) se secaron al aire sobre una placa calefactora a 90 °C, durante 48 horas, removiendo frecuentemente. Con este procedimiento se conseguía eliminar del suelo la humedad y prácticamente cualquier traza de compuesto orgánico presente en él. Posteriormente, 20 g de suelo se colocaron en un frasco de 100 mL y se añadieron 2 mL de una disolución de BTEX y THMs en metanol. El frasco se sella herméticamente y se agita vigorosamente durante 15 minutos para conseguir la perfecta homogenización de los compuestos en la matriz. Las muestras se almacenaron en el frigorífico (4 °C) durante 15 días para lograr que se produjera la interacción entre los compuestos y la matriz. Un tiempo de contacto similar ha sido utilizado por otros autores [9,16,17,29]. Los suelos en contacto con los contaminantes durante un largo período de tiempo se asemejan más a una muestra real que los que se analizan directamente después de dopar. Estos últimos, pueden considerarse como una aproximación a los suelos recién contaminados [8,33,34] y las recuperaciones obtenidas coinciden, prácticamente, con las obtenidas al analizar una disolución patrón de los compuestos [29].

3.2.2.2. Materiales de referencia certificados

Para validar el método optimizado se analizaron tres materiales de referencia (CRMs) con contenidos certificados de los compuestos de interés. Estos materiales certificados fueron: un suelo arenoso limoso (RTC-CRM633), un suelo arcilloso (RTC-CRM635) y un suelo arcilloso limoso (RTC-CRM631). Todos ellos fueron suministrados por LGC Promochem (Barcelona, España).

3.3. Instrumentación HS-PTV-GC-MS

La configuración instrumental utilizada es la descrita en el apartado 1 de la sección III “*Configuraciones instrumentales utilizadas*”. Consta de cuatro partes fundamentales, que se han representado en el diagrama esquemático de la figura 1.

El muestreo mediante generación de espacio de cabeza se llevó a cabo con el modelo A 7694 de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania). El bucle de níquel de 3 mL se mantuvo a una temperatura de 95 °C y la línea de transferencia, que conecta el generador de espacio de cabeza con el inyector de temperatura programada, estaba calentada a 100 °C. El gas portador era Helio N50 (99.995% de pureza; Air Liquide). El *liner* utilizado en el inyector PTV (CIS-4; Gerstel, Baltimore, MD, USA) estaba empaquetado con Tenax-TA®.

El equipo de cromatografía de gases utilizado fue un Agilent 6890 equipado con un sistema modular de calentamiento de columna (MACH™). La columna cromatográfica utilizada fue una DB-VRX (20 m x 0.18 mm x 1 µm) de Agilent J&W, montada sobre una carcasa protectora. Este módulo permite calentar y enfriar muy rápidamente la columna, acortando significativamente el tiempo total de análisis [57].

La detección se realizó mediante espectrometría de masas, utilizando un detector de tipo cuadrupolo (HP 5973) que dispone de una fuente inerte de ionización por impacto electrónico a 70 eV. La temperatura de la fuente de ionización fue de 230 °C y se seleccionó una temperatura del cuadrupolo de 150 °C. Las medidas se realizaron tanto en modo *scan* como en modo SIM.

Figura 1: Representación esquemática del equipo utilizado

3.4. Procedimiento HS-PTV-GC-MS

3.4.1. Muestreo de espacio de cabeza

Para el análisis, las muestras de agua (alícuotas de 5 mL) o las muestras de suelo (1 g de muestra pesado de forma precisa y 5 mL de agua) se depositaron en viales de vidrio de 10 mL. Estos viales se sellaron con tapones con *septum* de silicona y se sometieron al proceso de generación de espacio de cabeza durante 30 minutos a una temperatura de 90 °C. Transcurrido este tiempo y, después de la correspondiente presurización del vial, llenado y equilibrado del bucle, la muestra se inyectó en el sistema durante un minuto.

3.4.2. Inyección a temperatura programada

El modo de inyección utilizado en todos los casos fue *solvent vent*. La etapa de enfriamiento se llevó a cabo con CO₂ líquido. En la figura 2 se muestran esquemáticamente las condiciones experimentales. La temperatura inicial del inyector fue de 15 °C. Se seleccionaron un flujo y una

presión de venteo de 50.0 mL/min y 5.00 psi, respectivamente. Después de un tiempo de purga de 1.70 min, se cierra la válvula de división y el *liner* se calienta de forma rápida a 12 °C /s hasta 300 °C. De esta forma, los analitos se transfieren desde el *liner* a la columna capilar (tiempo de inyección: 0.55 min). Posteriormente, la válvula de división se abre para limpiar las posibles impurezas manteniendo la temperatura del *liner* a 300 °C.

Figura 2: Representación esquemática de las condiciones experimentales

3.4.3. Cromatografía de gases

El programa de temperaturas utilizado en el horno del cromatógrafo está esquematizado en la figura 2. Inicialmente se programa una temperatura de 50 °C que se mantiene durante 3 minutos. El sistema modular de calentamiento de columna permitió incrementar la temperatura a una velocidad de 100 °C/min hasta 240 °C, temperatura que se mantiene durante 1.0 min. Esta rampa de temperaturas no es posible con el horno convencional del cromatógrafo de gases. En estas condiciones los compuestos eluyen en menos de 5 min y el tiempo total de desarrollo cromatográfico es de 6.10 min.

3.4.4. Espectrometría de masas

Los análisis realizados para la optimización de las condiciones analíticas se llevaron a cabo registrando los cromatogramas de los compuestos en modo *scan*. Para la predicción de la concentración de los compuestos estudiados en muestras reales, se registraron los cromatogramas correspondientes en el modo de seguimiento de iones seleccionados (SIM).

En el modo *scan* se registraron las relaciones m/z entre 25 y 270 uma, y se seleccionó un valor umbral de abundancia de 0. La identificación de los diferentes compuestos se realizó por comparación de los espectros experimentales con los correspondientes a la base de datos NIST'98 (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, versión 1.6). En la figura 3 se muestran los espectros de masas de cada uno de los compuestos objeto de estudio.

Figura 3: Espectros de masas de los THMs (NIST'98)

Figura 3 cont.: Espectros de masas de los BTEX (NIST' 98)

La información obtenida a partir de los registros en modo *scan* sirvió para establecer tres grupos SIM con seis iones cada uno. El primer grupo, entre 2.50-4.00 minutos, contiene los tres iones más abundantes para el cloroformo y bromodiclorometano (83, 85, 47) y los tres del benceno (78, 77, 51); el segundo (4.00-4.30 min) estaba formado por los tres iones característicos del tolueno (91, 92, 65) y los tres del dibromoclorometano (127, 129, 131). Finalmente, el tercer grupo (4.30-6.10 min) contenía las relaciones m/z características del etilbenceno y los xilenos (91, 106, 77) y las correspondientes al bromoformo (171, 173, 175). La adquisición de señales para cada ion se realizó con un tiempo de permanencia de 10 ms.

La tabla 1 muestra las condiciones experimentales de cada uno de los módulos que componen la configuración instrumental.

Tabla 1: Condiciones experimentales optimizadas

GENERADOR DE ESPACIO DE CABEZA		
Temperaturas	Horno	90 °C
	Bucle	95 °C
	Línea de Transferencia	100 °C
Tiempos	Generación espacio de cabeza	30 min
	Intervalo entre muestras	9 min
	Presurización del vial	0.30 min
	Llenado del bucle	0.15 min
	Equilibrado del bucle	0.02 min
	Inyección	1.00 min
INYECTOR DE TEMPERATURA PROGRAMADA		
Modo de inyección: Solvent vent	Flujo de purga	50.0 ml/min
	Tiempo de purga	1.70 min
	Tiempo de inyección	0.55 min
	Flujo de limpieza	20.0 mL/min
Inyección en frío	Tª inicial	15 °C (1.70 min)
	Rampa	12 °C/s hasta 300 °C (5.60 min)
CROMATÓGRAFO DE GASES		
Horno	Tª inicial	50 °C (3 min)
	Rampa 1	100 °C/min hasta 240 °C (1 min)
	Tiempo cromatográfico total: 6.10 min	
ESPECTRÓMETRO DE MASAS		
Modo de adquisición de datos: SIM	Tiempo de permanencia: 30ms	
	Grupo 1: m/z (83, 85, 47,78,77,51)	
	2.50 a 4.00 min	
	Grupo 2: m/z (91,92,65,127, 129, 131)	
	4.00 a 4.30 min	
	Grupo 3: m/z (91,106,77,171, 173, 175)	
4.30 a 6.10 min		

3.5. Análisis de datos

La recogida de los datos cromatográficos se realizó con el software Enhanced ChemStation, G1701CA Ver. C 00.00 de Agilent Technologies.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Optimización de las condiciones experimentales con disoluciones acuosas

Para optimizar las condiciones experimentales del método, se utilizó una disolución acuosa de los ocho compuestos con una concentración de 100 µg/L para cada uno de ellos.

4.1.1. Parámetros del acoplamiento HS-PTV

Los parámetros correspondientes al generador de espacio de cabeza (ver apartado 3.4.1.) se seleccionaron a partir de las conclusiones obtenidas en trabajos anteriores realizados por nuestro grupo de investigación, en los que se analizan muestras de suelos [28,53].

De los modos de inyección permitidos por el PTV, se seleccionó el modo de inyección *solvent vent*, que combina la inyección en frío con la vaporización controlada del disolvente. Con este modo de inyección se consiguen mejores niveles de sensibilidad, con respecto a los obtenidos con los modos de inyección convencionales [54-56], debido al estrechamiento y aumento del área de los picos, que da lugar a un incremento en la relación señal/ruido.

Las condiciones se eligieron de forma que los compuestos de interés se retuvieran en el *liner* por atrapamiento frío, mientras el disolvente se eliminaba a través de la válvula de división. Para garantizar la retención de los analitos en el *liner* durante la eliminación del disolvente, se ha utilizado un *liner* empaquetado con Tenax-TA®, un polímero poroso adecuado para retener compuestos orgánicos pero no retener el agua. El uso de este polímero permite utilizar satisfactoriamente este sistema de inyección incluso con analitos cuyo punto de ebullición es inferior al del agua. Este es el caso de tres de los compuestos objeto de estudio: cloroformo (61 °C), benceno (80 °C) y bromodiclorometano (90°C) (Tabla 2).

Las variables involucradas en el proceso son: la temperatura de venteo, el flujo y el tiempo de purga, el tiempo de inyección y la temperatura final del inyector.

La temperatura inicial del *liner* se estudió para los valores de 5, 10, 15, 20 y 25 °C. Para la mayoría de los compuestos se obtienen resultados similares en el margen de temperaturas estudiadas, excepto para el cloroformo y el benceno, los dos compuestos más volátiles. Para éstos, los mejores resultados se obtienen con 5 °C, sin embargo, se decidió seleccionar un valor de 15 °C, de compromiso entre la señal analítica obtenida y el tiempo necesario para enfriar y equilibrar el *liner* a dicha temperatura. A esta temperatura la pérdida de los analitos más volátiles es inferior al 10 %.

Las variables que afectan a la eliminación del disolvente (flujo y tiempo de purga) ya han sido optimizadas para un grupo similar de compuestos en un trabajo previo [56], por lo que sólo se estudiaron otras variables relacionadas con el sistema de inyección; como la temperatura final del inyector y el tiempo durante el que se realiza la inyección de la muestra. La temperatura final del inyector se estudió para dos valores: 250 °C y 300 °C (que es la temperatura máxima de trabajo recomendada para el Tenax-TA®). Las señales analíticas se mantenían constantes para todos los compuestos, excepto para el tolueno, etilbenceno y xileno, cuyas áreas de pico aumentaban del orden de 67 %, 21 % y 24 % respectivamente, al utilizar 300 °C, por lo que se decidió utilizar esta temperatura. El tiempo de inyección se estudió para valores comprendidos entre 0.40 y 0.60 min. Tiempos inferiores a 0.55 min no permiten la desorción completa de los compuestos menos volátiles, mientras que tiempos más altos no suponen una mejora de la señal, por lo que se seleccionó este valor como óptimo.

4.1.2. Parámetros de cromatografía de gases rápida

Las condiciones experimentales del proceso cromatográfico se optimizaron con el criterio de conseguir una adecuada separación de los

compuestos en el menor tiempo posible. La temperatura inicial de la columna cromatográfica se estudió para valores comprendidos entre 40 y 60 °C. A medida que aumenta esta temperatura disminuyen los tiempos de retención de los compuestos, si bien se produce también un solapamiento de los picos cromatográficos. A la vista de los resultados se seleccionó una temperatura inicial de 50 °C que se mantuvo durante los tres minutos iniciales del cromatograma para conseguir una adecuada resolución de los compuestos estudiados.

Para conseguir la separación de los compuestos por cromatografía de gases rápida, se eligió una rampa de temperatura de 100 °C/min hasta 240 °C. Esta rampa de calentamiento permite la separación rápida de los compuestos sin comprometer la resolución cromatográfica. La temperatura final seleccionada, 240 °C (que se mantiene durante 1.0 min para evitar posibles problemas de efecto memoria), es suficiente para garantizar la elución de los compuestos de interés y adecuada a las especificaciones técnicas de la columna cromatográfica. El flujo de gas portador (helio) se estableció en 1.5 mL/min.

4.1.3. Condiciones del espectrómetro de masas

Los resultados que se han descrito hasta ahora se obtuvieron a partir de los cromatogramas de ion extraído, correspondientes a los cromatogramas registrados en modo *scan* en un margen de relaciones m/z entre 25 y 270 una. Para registrar los cromatogramas en modo SIM se establecieron los tres grupos de relaciones m/z especificados en la sección 3.4.4, de forma que para cada compuesto se registraron sus tres relaciones m/z más abundantes. El tiempo de permanencia en el registro de cada ion se estudió para los valores de 10, 30 y 100 ms, seleccionando un valor de 10 ms por ser el que daba lugar a picos mejor definidos.

En la figura 4 se muestra el cromatograma obtenido en modo SIM, cuando se analiza una disolución acuosa con una concentración de 100 µg/L

de cada uno de los compuestos. Para cada compuesto se ha extraído la relación m/z más abundante. El tiempo necesario para que eluyan los ocho compuestos es de 4.55 min.

Figura 4: Cromatograma de una muestra de agua ($100 \mu\text{g/L}$ de cada compuesto) analizada con el método optimizado

En la tabla 2 se muestran los tiempos de retención, las anchuras de pico a media altura, los puntos de ebullición y las relaciones m/z características de los analitos estudiados. En cromatografía de gases rápida, los valores habituales para las anchuras de pico a media altura ($W_{1/2}$) son de entre 0.2 y 3 s y los tiempos de desarrollo del cromatograma varían entre 1 y 10 minutos [58], por lo que la separación obtenida con el método optimizado corresponde a una cromatografía rápida para todos los compuestos estudiados.

Tabla 2: *Puntos de ebullición, tiempos de retención, anchuras de pico a media altura y relaciones m/z para los ocho compuestos estudiados.*

Compuesto	P. de ebullición (°C)	t _R (min)	Anchura de pico a media altura* (s)	m/z	
				Ion cuantitativo	Iones cualitativos
CFM	61	3.47	1.43	83	85, 47
BDCM	90	3.87	1.17	83	85, 47
DBCM	117	4.23	0.76	127	129, 131
BMF	149	4.52	0.53	173	171, 175
Benceno	80	3.73	1.31	78	77, 51
Tolueno	111	4.16	0.89	91	92, 65
Etilbenceno	136	4.46	0.58	91	106, 77
m-xileno	139	4.49	0.56	91	106, 77

* Medida para el pico correspondiente al ion de cuantificación

4.1.4. Tiempo de análisis

La metodología requiere 6.10 min para completar la rampa de temperaturas. Además, se necesitan unos 3 minutos más para enfriar la columna desde la temperatura final (240 °C) hasta las condiciones iniciales (50 °C). Este rápido enfriamiento se consigue gracias al uso del sistema MACH™, con el que se consigue una reducción considerable del tiempo total en comparación con un horno convencional de cromatografía de gases. El tiempo de funcionamiento del PTV se programó de forma que estuviese preparado a la temperatura inicial seleccionada en el momento de la siguiente inyección.

El horno de posiciones múltiples del HS permite equilibrar 6 viales simultáneamente, por lo que una vez transcurridos los primeros 30 min, necesarios para la generación de espacio de cabeza del primer vial, es posible analizar una muestra cada 9 min, es decir prácticamente 7 muestras por hora.

4.2. Análisis de muestras de suelos

4.2.1. Adición de agua y cloruro sódico

La adición de modificadores a las muestras de suelos para mejorar la eficacia de extracción ha sido utilizada ampliamente con las diferentes modalidades de generación de espacio de cabeza. El agua [26, 33-35, 38, 39] y la adición de disoluciones acuosas saturadas de sal (efecto *salting-out*) [26, 29, 31, 36, 39] han sido las opciones más empleadas. La USEPA en el método 5021, en el que se utiliza espacio de cabeza estático, propone ambas posibilidades [22] mientras que en el método 5035, con la técnica de purga y trampa, propone la adición de agua [23].

En este trabajo, se estudió el efecto de la adición de agua ultrapura, así como de disoluciones saturadas de NaCl sobre las muestras de suelo. La disolución de NaCl se preparó según especifica la USEPA. Sobre 500 mL de agua ultrapura, se añadió ácido fosfórico concentrado hasta alcanzar pH=2. Posteriormente se añadieron 180 g de NaCl y se agitó la mezcla, hasta lograr que la mayor parte de sal se disolviera.

Se utilizaron dos matrices diferentes de suelo - un suelo de jardín y un vertisol - dopados con una concentración de 40 µg/kg para los ocho compuestos. Sobre 1g de suelo dopado se añadieron volúmenes crecientes (1mL, 3 mL, 5 mL y 6 mL) de agua y disolución de NaCl respectivamente. Cada uno de los niveles se analizó por triplicado. La humedad es un factor que puede afectar considerablemente al proceso de extracción de VOCs y es muy variable en las muestras de suelos reales, por ello se seleccionó el mínimo volumen añadido (1 mL) de manera que la muestra de suelo estuviera completamente impregnada con el agua. De este modo, con la adición del modificador se consigue, además de favorecer la extracción de los analitos, homogeneizar la humedad de las muestras por exceso. Para cada uno de los modificadores, y en los dos tipos de suelos analizados, se observó que las señales analíticas de los compuestos de interés no eran

significativamente distintas para los cuatro volúmenes estudiados. Debido a esto, se decidió seleccionar un volumen de 5 mL y así conservar la proporción (g de muestra/mL de modificador) recomendada por el método USEPA 5021.

Se compararon las señales analíticas obtenidas al añadir 5 mL de agua y 5 mL de la disolución saturada de NaCl sobre los dos tipos de suelos estudiados. En ambos casos se observó que las señales obtenidas para los BTEX eran significativamente mayores cuando se utilizaba agua. Las figuras 5 y 6 muestran los resultados obtenidos. Se han representado las respuestas relativas (normalizadas a la señal más alta para cada compuesto).

Figura 5: Efecto de la adición de agua y de una disolución de NaCl sobre la señal analítica en una muestra de suelo de jardín dopada con 40 ppb de cada compuesto

Figura 6: Efecto de la adición de agua y de una disolución de NaCl sobre la señal analítica en una muestra de Vertisol dopada con 40 ppb de cada compuesto

Estos resultados, obtenidos con los suelos dopados en el laboratorio, se comprobaron analizando un material de referencia certificado (CRM-633). La figura 7 muestra las respuestas relativas (normalizadas a la señal más alta para cada compuesto) obtenidas al analizar 1 g del material certificado sin adición de agente modificador, con 5 mL de agua y con 5 mL de NaCl.

Figura 7: Efecto de la adición de agua y de una disolución de NaCl sobre la señal analítica en un material de referencia certificado (CRM-633) dopado con 50 ppb de cada compuesto

Los resultados corroboran las conclusiones obtenidas al analizar los suelos dopados en el laboratorio. En este caso se observa que las señales analíticas aumentan significativamente al añadir un modificador sobre el suelo con respecto a las obtenidas al analizar el material de referencia sin modificador. Por otro lado, con la adición de agua se consiguen rendimientos de extracción más altos que con la disolución de NaCl para los BTEX, mientras que para los trihalometanos se obtienen rendimientos de extracción del mismo orden con ambos modificadores. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores con este mismo grupo de compuestos [26,38].

El mecanismo responsable del efecto del agua en la liberación de los analitos de matrices sólidas no se conoce de forma precisa. Una de las teorías hace referencia a que los sitios activos del suelo adsorben los compuestos más polares más fuertemente que los menos polares, por lo que el agua desplaza a los analitos de sus puntos de adsorción. Otra de las interpretaciones se basa en una competencia entre la matriz y el agua por

los analitos. Los analitos pasarían del suelo al agua por un proceso de solvatación, y después migrarían al espacio de cabeza. La adición de sal podría ser menos favorable que el agua, para algunos compuestos, debido a que la alta concentración de iones en disolución puede dar lugar a una menor solvatación de las moléculas de analito y por tanto menor tasa de desorción de los compuestos del suelo.

4.2.2. Efecto de matriz

Las muestras de suelo son matrices muy complejas y diversas, en las que es difícil lograr una extracción completa de los compuestos. Debido a esto, es muy frecuente la presencia del efecto de matriz con muchas de las técnicas analíticas empleadas para la determinación de VOCs en estas matrices.

En este trabajo se ha realizado un estudio, utilizando tres tipos de suelos diferentes para explorar la existencia o no de un posible efecto de matriz. En la naturaleza existe una gran variedad de suelos diferentes, sin embargo, su capacidad de adsorción está fuertemente determinada por su contenido en tres materiales: arena, arcilla y materia orgánica. Los tres suelos analizados en el trabajo: arena comercial, un Vertisol (suelo con un alto contenido en arcilla) y un suelo de jardín (caracterizado por su alta proporción de materia orgánica) son ejemplos representativos de los posibles tipos de suelos.

Las tres muestras de suelos diferentes se doparon a cuatro niveles de concentración (0, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/kg}$) para los ocho compuestos estudiados. El procedimiento de contaminación de los suelos es el descrito en el apartado 3.2.1.1. Cada nivel se analizó por triplicado y se compararon las pendientes de las rectas de calibración obtenidas (Tablas 3 y 4).

Tabla 3: Pendientes de las rectas de calibración de los THMs

	CFM	BDCM	DBCM	BMF
Arena	$(53 \pm 1)10^2$	$(90 \pm 3)10^2$	$(50 \pm 1)10^2$	$(297 \pm 8)10$
Suelo de jardín	$(45 \pm 1)10^2$	$(43.6 \pm 0.5)10^2$	$(45.4 \pm 0.5)10^2$	$(274 \pm 5)10$
Vertisol	$(37 \pm 1)10^2$	$(39 \pm 2)10^2$	$(42.6 \pm 0.5)10^2$	$(254 \pm 5)10$

Tabla 4: Pendientes de las rectas de calibración de los BTEX

	Benceno	Tolueno	Etilbenceno	Xileno
Arena	$(205 \pm 7)10^2$	$(43 \pm 1)10^3$	$(64 \pm 2)10^3$	$(50 \pm 1)10^3$
Suelo de jardín	$(188 \pm 7)10^2$	$(36.5 \pm 0.1)10^3$	$(43.4 \pm 0.9)10^3$	$(33.2 \pm 0.7)10^3$
Vertisol	$(163 \pm 6)10^2$	$(29 \pm 1)10^3$	$(33.9 \pm 0.5)10^3$	$(24.9 \pm 0.4)10^3$

Se observa que, para la mayoría de los compuestos, existen diferencias significativas en las pendientes para las tres matrices, por lo que se puede concluir que con el método optimizado existe efecto de matriz en la determinación de THMs y BTEX en diferentes tipos de suelos. Puede observarse que la influencia de la matriz es diferente para los distintos compuestos analizados, lo que hace difícil la utilización de un estándar interno (IS) único. En este sentido, la USEPA reconoce que el uso de un estándar interno puede proporcionar alguna indicación de la magnitud del efecto de matriz, sin embargo este efecto puede ser difícil e incluso imposible de solucionar [22,33]. Una vía para poder cuantificar los compuestos mediante el método de patrón interno, sería utilizar estándares isotópicos de cada uno de los compuestos. Otra posibilidad consiste en utilizar el protocolo de adiciones estándar sobre la propia matriz, que es la alternativa que se propone en este trabajo.

Los resultados obtenidos en este estudio, debido a las diferentes características de los suelos estudiados, podrían considerarse extrapolables al análisis de VOCs en la mayoría de los tipos de suelos presentes en la naturaleza.

4.2.3. Características analíticas del método

Una vez optimizadas las condiciones experimentales de cada uno de los módulos que componen la configuración instrumental, y seleccionado el procedimiento preparación de muestra, se procedió a estudiar las características analíticas del método.

Este estudio se realizó utilizando muestras de arena comercial dopada, ya que es el suelo que presenta el efecto de matriz menos acusado de los estudiados (ver apartado 4.2.2 de esta sección). Esta misma estrategia ha sido utilizada en algunos de los estudios consultados, como en el método 5021 de la USEPA y en el trabajo publicado por A. Serrano y colaboradores [29]. Las características analíticas del método en muestras de arena dopada se muestran en la tabla 5.

Tabla 5: Características analíticas del método en muestras de arena dopada

Compuestos	Pendiente	Ordenada en el origen	R ²	RSD (%)*	LD (ng/kg)	LQ (ng/kg)
CFM	(53±1)10 ²	(-1±2)10 ⁴	0.9954	13	45.6	135
BDCM	(90±3)10 ²	(1±3)10 ⁴	0.9786	9	29.7	90
DBCM	(50±1)10 ²	(-5±2)10 ⁴	0.9955	10	4.7	14
BMF	(297±8)10	(-3±1)10 ⁴	0.9945	10	4.4	13
Benceno	(205±7)10 ²	(-0.7±1)10 ⁵	0.9895	13	44.9	136
Tolueno	(43±1)10 ³	(-2±2)10 ⁵	0.9937	11	120.8	366
Etilbenceno	(64±2)10 ³	(-2±3)10 ⁵	0.9964	9	8.8	27
m-xileno	(50±1)10 ³	(-3±2)10 ⁵	0.9960	10	38.4	116

*Calculada para una muestra de arena con 50µg/kg de cada compuesto y n=3

La estimación de los límites de detección (LD) se realizó utilizando la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3.3\sigma}{S}$$

donde σ es la desviación estándar (número de réplicas, $n=10$) de un pico correspondiente a una relación señal/ruido de aproximadamente 3; S es la pendiente de la curva de calibrado y 3.3 es el valor del parámetro t de Student (para $n-1$, 0.99).

La metodología propuesta permite obtener límites de detección (5-121 ng/kg) similares e incluso inferiores a los obtenidos cuando se utilizan otras metodologías descritas en bibliografía. La USEPA ha estimado los límites de detección obtenidos para los analitos de interés con el método 5021, que utiliza la configuración instrumental HS-GC-MS, obteniendo valores de 210 a 470 ng/kg [22]. Otros autores han calculado los límites de detección alcanzados con diferentes métodos propuestos para la determinación de BTEX (entre otros compuestos) en matrices de suelos. A. Serrano y colaboradores estimaron límites de detección entre 1200 y 2000 ng/kg, utilizando la metodología HS-GC-MS [29]. Con la configuración HSSPME-GC-MS se han alcanzado límites de detección de 50-230 ng/kg [26] y 70-180 ng/kg [34]. M. Rosell y colaboradores han propuesto la metodología P&T-GC-MS, obteniendo límites de detección de 330-1630 ng/kg [33].

Análogamente, los límites de cuantificación (LQ) se calcularon con la siguiente ecuación:

$$LQ = \frac{10\sigma}{S}$$

donde σ es la desviación estándar (número de réplicas, $n=10$) de señal de un pico correspondiente a una relación señal/ruido de aproximadamente 3 y S es la pendiente de la curva de calibrado. Los resultados para los límites de cuantificación se resumen en la tabla 5.

Además, en la tabla 5 se muestra la reproducibilidad del método optimizado, obtenida al analizar tres muestras de arena dopada con una concentración de 50 $\mu\text{g/kg}$. En todos los casos los valores obtenidos fueron inferiores o iguales al 13 %.

4.2.4. Determinación de los compuestos objeto de estudio en tres matrices diferentes de suelos con contenidos certificados

A partir de los resultados obtenidos en la sección 4.2.2, se puede concluir que el método de calibración externa está altamente influenciado por el tipo de suelo, que afecta a los rendimientos de extracción, pudiendo dar lugar a una cuantificación sesgada. Por ello, en este trabajo, se propone un protocolo basado en el método de adición estándar para la determinación de los compuestos objeto de estudio en muestras de suelos.

Se estudiaron tres tipos de materiales de referencia certificados que presentan características diferentes: un suelo arenoso limoso (RTC-CRM633), un suelo arcilloso (RTC-CRM635) y un suelo arcilloso limoso (RTC-CRM631). Al igual que en el apartado anterior, se seleccionaron diferentes matrices para probar la validez del método y su aplicabilidad a los diferentes tipos de suelo presentes en la naturaleza. En cada uno de los suelos se realizó un estudio con cinco niveles de calibración, analizando tres réplicas de cada nivel. Las concentraciones añadidas para cada compuesto estaban uniformemente distribuidas desde 0 $\mu\text{g/kg}$ hasta el nivel más alto de concentración, que se calculó, en cada caso, de manera que coincidiera aproximadamente con el doble del valor certificado (ver tabla 6), consiguiendo así la mínima incertidumbre asociada a la predicción.

Cada muestra se preparó pesando de forma precisa 1 g de suelo en un vial de 10 mL; inmediatamente se añadieron 5 mL de agua ultrapura y 20 μL de una disolución de los compuestos en metanol en la concentración adecuada para cada caso. El agua ultrapura que se añadía al suelo, contenía concentraciones traza de varios de los compuestos de interés, por lo que a todos los niveles del calibrado se le restaron los valores de área de pico obtenidos al analizar 5 mL de dicho agua. Las variables utilizadas para la calibración fueron las áreas de pico de los cromatogramas de ion extraído correspondientes a los iones de cuantificación (ver tabla 2).

A modo de ejemplo, en la figura 8a se muestra el cromatograma correspondiente a la muestra de suelo CRM633 registrado en modo *scan*. Los compuestos de interés presentes en la muestra se identificaron a partir de las tres relaciones m/z más abundantes para cada compuesto, admitiendo una diferencia en abundancias respecto a los espectros puros inferior al 20 %. Posteriormente, la cuantificación se realizó a partir del cromatograma en modo SIM (Figura 8b).

Figura 8: Cromatograma en modo scan (8a) y en modo SIM (8b) del material de referencia certificado (CRM633)

En la tabla 6 se muestran las rectas de calibración obtenidas para cada compuesto, el coeficiente de determinación (R^2), las concentraciones predichas por los calibrados, el valor certificado y el intervalo de predicción especificado para cada compuesto. Todos los calibrados mostraron un buen comportamiento lineal. El valor predicho está, en todos los casos, dentro del intervalo de predicción (PI) especificado en el material certificado.

Tabla 6: Determinación de los compuestos objeto de estudio en tres materiales de referencia certificados

CRM 635						
Compuesto	Intervalo de adición estándar (µg/kg)	Pendiente	Ordenada en el origen	R ²	Valor predicho (µg/kg)	Valor de referencia (µg/kg) *
Cloroformo	0-190	(52±5) 10 ²	(61±5) 10 ⁴	0.9801	120±20	98.7
BDCM	0-190	(51±3) 10 ²	(58±4) 10 ⁴	0.9884	110±10	90.6
DBCM	0-260	(29±3) 10 ²	(38±5) 10 ⁴	0.9714	130±30	131
Bromoformo	0-150	(26±2) 10 ²	(17±2) 10 ⁴	0.9889	70±10	74.5
Benceno	0-86	(15±1) 10 ³	(72±8) 10 ⁴	0.988	46±8	42.9
Tolueno	0-260	(40±3) 10 ³	(57±5) 10 ⁵	0.988	140±20	129
Etilbenceno	0-260	(50±6) 10 ³	(79±8) 10 ⁵	0.9719	160±30	133
m + p xileno	0-412	(33±5) 10 ³	(95±9) 10 ⁵	0.9511	280±60	206
CRM 631						
Cloroformo	0-125	(33±1) 10 ²	(23±8) 10 ⁴	0.9869	71±4	60.4
BDCM	0-150	(46±3) 10 ²	(44±3) 10 ⁴	0.9881	96±11	74.9
DBCM	0-150	(24±3) 10 ²	(22±2) 10 ⁴	0.9694	93±20	84.2
Bromoformo	0-125	(10±1) 10 ²	(95±8) 10 ³	0.9568	93±17	64.1
Benceno	0-150	(204±9) 10 ²	(16±7) 10 ⁴	0.9948	80±6	72.0
Tolueno	0-150	(40±2) 10 ³	(31±1) 10 ⁵	0.9918	78±6	77.5
Etilbenceno	0-248	(56±3) 10 ³	(67±3) 10 ⁵	0.9939	120±10	124
m + p xileno	0-188	(46±2) 10 ³	(42±2) 10 ⁵	0.9922	91±8	94.5
CRM 633						
Cloroformo	0-250	(48±4) 10 ²	(72±6) 10 ⁴	0.9900	150±23	125
BDCM	0-250	(70±5) 10 ²	(99±8) 10 ⁴	0.9852	141±19	104
DBCM	0-250	(40±3) 10 ²	(40±5) 10 ⁴	0.9839	97±18	95.0
Bromoformo	0-250	(19±2) 10 ³	(22±2) 10 ⁵	0.9842	117±20	96.4
Benceno	0-65	(37±2) 10 ³	(114±7) 10 ⁴	0.9936	31±3	24.5
Tolueno	0-90	(55±3) 10 ³	(28±2) 10 ⁵	0.9909	52±6	40.6
Etilbenceno	0-450	(35±3) 10 ³	(116±9) 10 ⁵	0.9856	332±51	228

* Valores de referencia e intervalos de predicción proporcionados en los certificados de análisis de los suelos certificados

5. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método simple y muy sensible para la determinación de compuestos orgánicos volátiles en suelos. La configuración instrumental está basada en el acoplamiento de un generador de espacio de cabeza, inyección en modo *solvent vent* y cromatografía de gases rápida con detección mediante espectrometría de masas.

Se ha demostrado que, para los BTEX, la adición de agua sobre los suelos consigue mayores rendimientos de extracción que la adición de disoluciones saturadas en NaCl.

La introducción de la muestra mediante un generador de espacio de cabeza presenta la ventaja de que no se requiere un tratamiento previo de la misma, reduciendo así los errores experimentales asociados a esta etapa del proceso analítico. La cromatografía de gases rápida permite una separación de los ocho compuestos en menos de 4.60 min y el MACH™ puede calentarse y enfriarse de forma muy rápida, consiguiendo un tiempo total de análisis muy corto (9 min). El atrapamiento criogénico de los compuestos en el PTV (en el modo de inyección *solvent vent*), junto con la detección mediante espectrometría de masas en modo SIM, dan lugar a un método altamente sensible con límites de detección del orden de ng/kg en muestras de arena.

El método se ha aplicado en tres suelos de referencia con contenidos certificados para los compuestos estudiados, obteniendo resultados satisfactorios. Los suelos seleccionados poseen diferentes porcentajes de arena, arcilla y materia orgánica, por lo que los resultados obtenidos se pueden considerar extrapolables a la mayor parte de los suelos presentes en la naturaleza. En todos los casos la concentración predicha estaba dentro del intervalo de predicción especificado en el material certificado. Por tanto, puede concluirse que el método optimizado es rápido, fiable, preciso y altamente sensible.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Supplemental guidance for developing soil screening levels for superfund sites, Office of emergency and Remedial Response, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, USA, 2001, p. 177.
<http://www.epa.gov/superfund/health/conmedia/soil/pdfs>
- [2] USEPA Method 8260B, Volatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS), Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 8000 series, USEPA, Washington, USA, 1996.
<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8260b.pdf>
- [3] J.R. Dean, G. Xiong, Trends Anal. Chem. 19 (2000) 553.
- [4] F.J. Santos, M.T. Galceran, Trends Anal. Chem. 21 (2002) 672.
- [5] N. Jakubowska, B. Zygmunt, Z. Polkowska, B. Zabiegala, J. Namiésnik, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 422.
- [6] M. Eriksson, J. Fäldt, G. Dalhammar, A.-K. Borg-Karlson, Chemosphere 44 (2001) 1641.
- [7] Accelerated Solvent Extraction (ASE) of Hydrocarbon Contaminants (BTEX, Diesel, and TPH) in Soils, Application Note 324, DIONEX.
http://www.dionex.com/en-us/webdocs/4331_AN324.pdf
- [8] R-A. Doong, P-L. Liao, J. Chromatogr. A 918 (2001) 177.
- [9] K.M. Meney, C.M. Davidson, D. Littlejohn, Analyst 123 (1998) 195.
- [10] M.D. Burford, S.B. Hawthornr, D.J. Miller, J. Chromatogr. A 685 (1994) 95.
- [11] USEPA Method 8270B, Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS), Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 8000 series, USEPA, Washington, USA, 1996.
<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8270d.pdf>
- [12] L. Ramos, J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman, J. Chromatogr. A 891 (2000) 275.

-
- [13] E. Björklund, S. Bowadt, T. Nilsson, L. Mathiasson, J. Chromatogr. A 836 (1999) 285.
- [14] K. Li, M. Landriault, M. Fingas, M. Llompart, J. Hazard. Mater. 102 (2003) 93.
- [15] L. Wennrich, P. Popp, M. Möder, Anal. Chem. 72 (2000) 546.
- [16] G. Xiong, B. Tang, X. He, M. Zhao, Z. Zhang, Z. Zhang, Talanta 48 (1999) 333.
- [17] G. Xiong, X. He, Z. Zhang, Anal. Chim. Acta 413 (2000) 49.
- [18] R. Rodil, P. Popp, J. Chromatogr. A 1124 (2006) 82.
- [19] F. David, P. Sandra, J. Chromatogr. A 1-2 (2007) 54.
- [20] M. Martínez-Parreño, J. Llorca-Pórcel, I. Valor, J. Sep. Sci. 31 (2008) 3620.
- [21] R.J. De La Torre-Roche, W-Y Lee, S.I. Campos-Díaz, J. Hazar. Mater. 163 (2009) 946.
- [22] USEPA Method 5021, Volatile Organic Compounds in soils and other solid matrices using equilibrium headspace analysis, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 5000 series, USEPA, Washington, USA, 1996.
<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/5021.pdf>
- [23] USEPA Method 5035, Closed System Purge and Trap Extraction for Volatile Organics in Soil and Waste Samples, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 5000 series, USEPA, Washington, USA, 1996.
<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/5035.pdf>
- [24] USEPA Method 5032, Volatile Organic Compounds by Vacuum Distillation, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 5000 series, USEPA, Washington, USA, 1996.
<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/5032.pdf>

- [25] USEPA Method 5000, Sample Preparation for Volatile Organic Compounds, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 5000 series, USEPA, Washington, USA, 1996.
<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/5000.pdf>
- [26] M. Llompart, K. Li, M. Fingas, *Talanta* 48 (1999) 451.
- [27] J.S. Alvarado, C. Rose, *Talanta* 62 (2004) 17.
- [28] J.L. Pérez Pavón, A. Guerrero Peña, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A* 1047 (2004) 101.
- [29] A. Serrano, M. Gallego, *J. Chromatogr. A* 1118 (2006) 261.
- [30] F.A. Esteve-Turrillas, S. Armenta, S. Garrigues, A. Pastor, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 587 (2007) 89.
- [31] O. Zuloaga, N. Etxebarria, J. Zubiaur, L.A. Fernández, J.M. Madariaga, *Analyst* 125 (2000) 477.
- [32] K.F. Haselmann, F. Laturnus, B. Svensmark, C. Gron, *Chemosphere* 41 (2000) 1769.
- [33] M. Rosell, S. Lacorte, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1132 (2006) 28.
- [34] R.S. Dungan, *Anal. Lett.* 38 (2005) 2393.
- [35] O. Zuloaga, N. Etxebarria, L.A. Fernández, J.M. Madariaga, *Anal. Chim. Acta* 416 (2000) 43.
- [36] N. Campillo, P. Viñas, I. López-García, N. Aguinaga, M. Hernández-Córdoba, *Talanta* 64 (2004) 584.
- [37] Z. Zhang, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 67 (1995) 34.
- [38] O. Ezquerro, G. Ortiz, B. Pons, M.T. Tena, *J. Chromatogr. A* 1035 (2004) 17.
- [39] M. Ojala, I. Mattila, T. Särme, R.A. Ketola, T. Kotiaho, *Analyst* 124 (1999) 1421.
- [40] Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risk to humans, Summaries & Evaluations, vol. 29, International Agency for Research on Cancer, 1982. <http://monographs.iarc.fr/>

- [41] Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risk to humans, Summaries & Evaluations, vol.77, International Agency for Research on Cancer, 2000.
- [42] Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risk to humans, Summaries & Evaluations, vol.73, International Agency for Research on Cancer, 1999.
- [43] Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risk to humans, Summaries & Evaluations, vol.71, International Agency for Research on Cancer, 1999.
- [44] J.S. Zogorski, J.M. Carter, T. Ivahnenko, W.W. Lapham, M.J. Moran, B.L. Rowe, P.J. Squillace, P.L. Toccalino, U.S. Department of Interior, Circular 1292, U.S. Geological Survey, Reston, Virginia, 2006.
<http://pubs.usgs.gov/circ/circ1292/pdf/circular1292.pdf>
- [45] H. Frank, W. Frank, D. Thiel, *Atmos. Environ.* 23 (1989) 1333.
- [46] E.J. Hoekstra, E.W.B. de Leer, U.A.Th. Brinkman, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 3724.
- [47] E.J. Hoekstra, F.J.M. Verhagen, J.A. Field, E.W.B. De Leer, U.A.Th. Brinkman, *Phytochemistry* 49 (1998) 91.
- [48] E.J. Hoekstra, J.H. Duyzer, E.W.B. De Leer, U.A.Th. Brinkman, *Atmos. Environ.* 35 (2001) 61.
- [49] K.F. Haselmann, R.A. Kelota, F. Laturus, F.R. Lauritsen, C. Gron, *Atmos. Environ.* 34 (2000) 187.
- [50] F. Laturus, K.F. Haselmann, T. Borch, C. Gron, *Biogeochemistry* 60 (2002) 121.
- [51] A. McCulloch, *Chemosphere* 50 (2003) 1291.
- [52] J. Wang, P. Quin, S. Sun, *Eviron. Pollut.* 148 (2007) 10.
- [53] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, C. García Pinto, M.E. Fernández-Laespada, B. Moreno Cordero, A. Guerrero Peña, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2034.

- [54] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández-Laespada, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1141 (2007) 123.
- [55] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández-Laespada, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1175 (2007) 106.
- [56] J.L. Pérez Pavón, S. Herrero Martín, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1194 (2008) 103.
- [57] A. Hoffmann, B. Tienpont, F. David, P. Sandra, Application Note 6/2006, Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Germany.
<http://www.gerstel.com/pdf/p-gc-an-2006-06.pdf>
- [58] E. Matisová, M. Dömötörová, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 199.

PUBLISHED ARTICLE

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Programmed temperature vaporizer based method for the sensitive determination of trihalomethanes and benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in soils

José Luis Pérez Pavón*, Sara Herrero Martín, Carmelo García Pinto, Bernardo Moreno Cordero

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Salamanca, 37008 Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 February 2009

Received in revised form 16 June 2009

Accepted 18 June 2009

Available online 23 June 2009

Keywords:

Headspace analysis

Programmed temperature vaporizers

Soil matrices

Trihalomethanes

BTEX

ABSTRACT

A methodology based on the coupling of a headspace autosampler with a GC and a MS detector operating in SIM mode has been developed for the determination of volatile organic compounds (THMs and BTEX) in soils. The GC device used is equipped with a programmable temperature vaporizer (PTV) packed with Tenax- TA° to introduce the samples (the injection mode used was solvent vent), and a modular accelerated column heater (MACH $^{\text{TM}}$) to control column temperature. The proposed measurement procedure reduces the sample pretreatment step to a minimum. Combined use of solvent vent injection mode and mass spectrometry detection allows a highly sensitive method to be proposed, with limits of detection of the order of ng/kg for all the target compounds. Furthermore, the capillary column used allows rapid separations of compounds in less than 4.60 min, affording a very short total analysis cycle time of 9 min.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Volatile organic compounds (VOCs) are widespread in the different environmental matrices. The soil is one of the more sensitive and vulnerable receptors for this type of compounds. Additionally, pollution agents in the soil can be readily transferred to the atmosphere and underground waters [1]. Many such compounds and their degradation products are either known or suspected of being toxic and carcinogenic, such that they pose a severe risk to human health and ecosystems.

These factors underscore the need for normative instruments that will ensure the protection of soils, establish their use, and fix the concentration levels for each of the VOCs above which a soil should be considered polluted. Accordingly, the development of analytical methods able to determine trace concentrations of VOCs in soils in a rapid, simple and reliable way is paramount.

This type of analysis has usually been performed by extraction of VOCs from soil and quantification by gas chromatography (GC), followed by mass spectrometry (MS), flame ionization detection (FID) and, in the case of halogenated compounds, electron capture detection (ECD) [2]. The most critical step in the method is compound extraction. This is due to the diversity and complexity of the samples and to the low concentrations and high volatility of

the compounds. A broad variety of extraction procedures has been proposed [3–5].

Classical solvent extraction techniques such as Soxhlet extraction [6–8] and liquid–solid extraction [6,9] are usually time-consuming, multi-step procedures, require large volumes of organic solvents, and often require a lot of extract manipulation. Over the past few years, new technologies that use less solvent and are faster than classical procedures have been applied to the determination of VOCs in soils. Some examples are: supercritical fluid extraction (SFE) [10] and pressurised liquid extraction (PLE) [7], which have usually been applied in the determination of semi-volatile compounds in soils [11–15], or microwave-assisted extraction (MAE) [16,17] or ultrasonic solvent extraction. The advantage of these techniques is that they are not very matrix-dependent since they achieve almost complete extraction of the analytes. However, an important drawback is that they usually need additional cleaning and enrichment steps of the extracts obtained and are therefore carried out off-line [12]. Recently, a technique called Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) has been combined with these solvent extraction methods in the determination of semi-volatile compounds in soils [18–21]. The compounds are adsorbed and preconcentrated in the Stir Bar and then are analyzed by thermal desorption (TD)–GC. The technique has proved to avoid tedious clean-up and preconcentration steps, have higher throughput capacity and improve detection limits.

Headspace techniques have also been widely applied. Static headspace (HS) [22] and purge and trap (P&T) [23] are, together

* Corresponding author. Fax: +34 923 294483.
E-mail address: jlpp@usal.es (J.L.P. Pavón).

with vacuum distillation [24], the techniques proposed by the United States Environmental Protection Agency (USEPA) for this type of analysis [25]. Many articles have been published reporting the use of HS [6,26–30], P&T [31–33] and HS-solid-phase microextraction (SPME) [8,26,34]. These techniques have the advantages of being solvent-free; sample manipulation is minimum, and they are easy to automate in on-line procedures. The main drawback is that they are generally more matrix-dependent than those described above. Different strategies have been proposed to improve the efficiency of extraction, among which the addition of water or of an organic solvent is common. Some reports describe the use of a methanol extraction step prior to analysis by P&T [35,36]. Other authors propose the use of an internally cooled SPME device [37] or the multiple headspace-SPME technique [38].

Non-separative methods such as HS-MS [28,30] and purge and membrane (PAM)-MS [39] have also been proposed.

Within the VOCs considered in different protocols and legislative norms [1,2], trihalomethanes (THMs: chloroform, bromodichloromethane, bromodichloromethane and bromoform) and BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes) are common soil pollutants. The International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified benzene [40] as being carcinogenic to humans (Group 1); ethylbenzene [41], chloroform [42] and bromodichloromethane have been considered possibly carcinogenic to humans (Group 2B), and toluene, xylenes, dibromochloromethane and bromoform [43] belong to Group 3, which encompasses compounds that are not classifiable as regards their carcinogenicity in humans.

The presence of trihalomethanes in the soil can be attributed to many human activities, to their use as coolants in refrigerators, and as propellants and cleaning solvents in industry [36]. They may also derive from irrigation with chlorinated water or leaking drinking water distribution and sewer pipes, since they are generated as subproducts in the water chlorination process [44]. Additionally, there are many studies, especially in the case of chloroform, that have confirmed the formation of these compounds in the soil due to natural processes [45–52]. McCulloch performed an estimation of the sources of chloroform present in the environment and concluded that 90% of chloroform emissions derived from natural sources, among which the processes that occur in the soil account for 37% [51].

BTEX are found in petroleum and its derivatives such as gasoline or fuel-oil. Spills during transport, leaking storage tanks or pipelines, and motor vehicle emissions are the main sources of contamination to soils and groundwater by these compounds [26].

Our research group has experience in the use of headspace sampling for the extraction of organic compounds from soils [28,53]. Recently, a methodology based in the use of a headspace autosampler followed by fast gas chromatography and mass spectrometry, using a programmable temperature vaporizer (PTV), has previously been applied satisfactorily to the determination of VOCs in different liquid matrices [54–56]. In the present work, we propose for the first time the use of such a methodological strategy for the determination of THMs and BTEX in soils. With this configuration it is possible to retain the advantages of the simple headspace instrumentation, achieving high sensitivity thanks to the preconcentration of the analytes in the PTV and rapid separation of the compounds via fast gas chromatography.

2. Experimental

2.1. Chemicals

The solvents used were purchased from the following sources: methanol was from Merck (Darmstadt, Germany); trihalomethanes

(chloroform, bromodichloromethane, dibromochloromethane and bromoform) were from Supelco (Bellefonte, PA, USA); toluene, ethylbenzene and m-xylene from Acros Organics (Geel, Belgium), and benzene from Sigma Aldrich (Sleinheim, Germany).

2.2. Standard solutions and samples

2.2.1. Water samples

The analytical conditions of the method were optimized by preparing standard solutions of the four THMs and BTEX in water. A mineral water (with the lowest content of some of these compounds) was used to prepare the standards, since in previous assays with distilled water and ultrapure water, trace concentrations of some of the compounds studied were detected. To perform the measurements, the samples were placed in 10 mL vials sealed with silicone septum caps. The vials were placed in the tray of the headspace autosampler and were analyzed under the conditions described in Section 2.3.

2.2.2. Soil samples

2.2.2.1. Spiked soils. Soil matrices were used to determine the analytical characteristics of the method, study the effect of the addition of water and NaCl on the efficiency of compound extraction, and explore the possible existence of a matrix effect. Extreme examples of soil types were used: a soil with a high organic content, from a public garden, a clay soil (a Vertisol from Mexico) and commercial sand purchased from Scharlau (Barcelona, Spain).

In order to obtain VOC-free blank matrices of natural soils, the soil samples collected (garden soil and Vertisol) were air-dried on a heating plate at 90 °C for 48 h, with frequent turning. This procedure removed any organic traces or humidity from the soil. These blank soils were checked to be free of the target VOCs before spiking. Then, a portion of 20 g of soil was placed in a 100 mL vial and 2 mL of a BTEX and THMs solution in methanol was added (at a suitable concentration for each case). The vial was hermetically sealed and shaken vigorously for 15 min to achieve perfect homogenization of the compounds in the matrix. The samples were stored in a refrigerator (4 °C) for 15 days to allow the interaction between the compounds and the matrix to take place. Similar aging times have been reported in literature [16,17,29,9]. Soils spiked and aged for long periods of time resemble real samples more than those analyzed directly after spiking. These latter can be considered to approximate freshly contaminated soils [33,34,8] and the recoveries obtained are mainly an indication of instrumental determination recoveries [29].

2.2.2.2. CRM soils. To validate the optimized method, three certified reference materials (CRMs) were analyzed. The CRM soils employed were: a loamy sandy soil (RTC-CRM633), a clay soil (RTC-CRM635) and a silty clay soil (RTC-CRM631). All of them were purchased from LGC Promochem (Barcelona, Spain).

2.3. HS-PTV-GC-MS instrumentation

The instrumental configuration used consists of four main parts. A schematic diagram of the apparatus is shown in Fig. 1. HS sampling was performed with a model 7694 headspace sampler from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). This sampler is equipped with a tray for 44 consecutive samples and an oven with positions for 6 sample vials. The sampling system consisted of a stainless steel needle, a 316-SS six-port valve with a 3 mL nickel loop (heated to 95 °C), and two solenoid valves (for pressurization and venting). The headspace sampler was coupled to a PTV injector through an inert transfer line heated to 100 °C. The carrier gas was helium N50 (99.995% pure; Air Liquide). A PTV inlet (CIS-4; Gerstel, Baltimore, MD, USA) with a liner packed with Tenax-TA® was used.

Fig. 1. Schematic diagram of the apparatus used.

An Agilent 6890 GC equipped with a Modular Accelerated Column Heater (MACH™) was used. This module is mounted outside the conventional GC oven. The capillary column, a DB-VRX (20 m × 0.18 mm × 1 μm) from Agilent J&W, is mounted in a protective case. It is coiled with an insulated heating wire and a temperature sensor wire along its entire length. Temperatures between ambient and 400 °C can be programmed at a maximum temperature ramp of 1800 °C/min. Fast cooling is performed by a set of ventilators mounted underneath each column module [57]. This module can be heated and cooled very rapidly, making total analysis cycle times very short.

A quadrupole mass spectrometer (HP 5973) equipped with an inert ion source operating in electron-impact mode using a 70 eV ionization voltage was used. The ion source temperature was 230 °C and the quadrupole temperature was set to 150 °C. Analyses were performed in the scan and SIM modes.

2.4. HS-PTV-GC-MS procedure

2.4.1. Headspace sampling

Water samples (aliquots of 5 mL) or soil samples (1 g portions of soil accurately weighed and 5 mL of water) were placed in 10 mL glass vials. The vials were sealed with silicone septum caps and subjected to the headspace generation process for 30 min at 90 °C. After this time, and after vial pressurization, loop filling and equilibration processes, the sample was injected over 1 min.

2.4.2. Programmed temperature vaporizer

The injection mode used in all the cases was solvent vent. Cooling was carried out by means of CO₂. The injector initial temperature was 15 °C. Vent flow was adjusted to 50.0 mL/min and vent pressure to 5.00 psi. After 1.70 min (purge time), the split valve was closed and the liner was flash-heated at 12 °C/s to 300 °C. The analytes were transferred from the liner to the capillary column (injection time: 0.55 min). The split valve was then opened and the liner temperature was held at 300 °C for 3 min to clean possible impurities.

2.4.3. Gas chromatography

The column oven temperature program involved an initial temperature of 50 °C for 3.00 min. The Modular Accelerated Column Heater allowed an increase in temperature at a rate of 100 °C/min to 240 °C, which was held for 1.2 min. This temperature ramp is not possible when the conventional oven of the chromatograph is used. The helium flow was 1.5 mL/min. Under these conditions, the compounds eluted in less than 5 min and the total chromatographic run time was 6.10 min.

Table 1
Optimized experimental conditions.

Headspace sampler		
Temperatures	Oven	90 °C
	Injection loop	95 °C
	Transfer line	100 °C
Times	Headspace generation	30 min
	Interval between samples	9 min
	Injection	1.00 min
Programmable temperature vaporizer		
Injection mode: solvent vent	Purge flow	50.0 mL/min
	Vent pressure	5.00 psi
	Purge time	1.70 min
	Injection time	0.55 min
	Cleaner flow	20.0 mL/min
	Initial temperature	15 °C (1.70 min)
	Rate	12 °C/s to 300 °C (3 min)
Gas chromatograph		
Carrier gas	Helium (1.5 mL/min)	
	Initial temperature	50 °C (3 min)
Oven	Ramp	100 °C/min to 240 °C (1 min)
	GC run time	6.10 min
Mass spectrometer		
Data acquisition mode: SIM	Dwell time	10 ms
	Group 1	<i>m/z</i> (83, 85, 47, 78, 77, 51)
	Group 2	2.50–4.00 min <i>m/z</i> (91, 92, 65, 127, 129, 131)
Group 3	4.00–4.30 min	<i>m/z</i> (91, 106, 77, 171, 173, 175)
	4.30–6.10 min	

2.4.4. Mass spectrometry

The analyses carried out to optimize the analytical conditions were performed in scan mode, and the analyses for the prediction of the concentration of the target compounds in real samples were performed in the SIM mode.

For the scan detection mode, the *m/z* range was 25–270 amu and the abundance threshold value was set to 0. The different compounds were identified by comparison of the experimental spectra with those of the NIST'98 database (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, version 1.6).

The information obtained in scan mode allowed us to establish three SIM groups with six ions each. The first one (2.50–4.00 min) contained the three most abundant ions of chloroform and bromodichloromethane (83, 85, 47) and the three of benzene (78, 77, 51); the second (4.00–4.30 min) was formed by the characteristic ions of toluene (91, 92, 65) and dibromochloromethane (127, 129, and 131), and the third group (4.30–6.10 min) contained the *m/z* variables characteristic of ethylbenzene and xylene (91, 106, 77) and those characteristic of bromoform (171, 173, 175). The ions were acquired with a dwell time of 10 ms.

Table 1 shows the optimized experimental conditions for each of the modules comprising the instrumental configuration.

2.5. Data analysis

Data collection was performed with Enhanced ChemStation, G1701CA Ver. C 00.00 software from Agilent Technologies.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of the experimental conditions in water matrices

3.1.1. HS-PTV-fast GC-MS data

To optimize the experimental conditions of the method, an aqueous solution of the eight compounds at a concentration of 100 μg/L was used in all cases.

Table 2Formula, boiling points, retention times, widths at half height and *m/z* ratios selected for the 8 compounds studied.

Compounds	Formula	Boiling point (°C)	<i>t_R</i> (min)	<i>w_b</i> ^a (s)	<i>m/z</i>	
					Quantitation ion	Qualifier ions
Chloroform (CFM)	CHCl ₃	61	3.47	1.43	83	85, 47
Bromodichloromethane (BDCM)	CHCl ₂ Br	90	3.87	1.17	83	85, 47
Dibromochloromethane (DBCM)	CHClBr ₂	117	4.23	0.76	127	129, 131
Bromoform (BMF)	CHBr ₃	149	4.52	0.53	173	171, 175
Benzene	C ₆ H ₆	80	3.73	1.31	78	77, 51
Toluene	C ₇ H ₈	111	4.16	0.89	91	92, 65
Ethylbenzene	C ₈ H ₁₀	136	4.46	0.58	91	106, 77
m-Xylene	C ₈ H ₁₀	139	4.49	0.56	91	106, 77

^a In an aqueous solution with 100 µg/L of each of the compounds.

3.1.2. HS-PTV parameters

The parameters corresponding to the headspace system (see Section 2.4.1) were selected from conclusions obtained in previous work carried out by our group, in which soils were also used as the matrix [28,53].

Among the injection modes permitted by the PTV, the solvent vent mode was chosen; this combines cold injection with controlled vaporization of the solvent. It allows an important increase in sensitivity with respect to conventional injection modes [54–56] owing to a narrowing of the peaks and an improvement in peak area, together with an increase in the signal-to-noise ratio.

The conditions were chosen such that the components were retained in the liner by cold trapping, while the solvent was eliminated through the split line. In order to guarantee analyte retention in the liner during solvent elimination, a liner packed with Tenax-TA® was used. This is a porous polymer designed to trap organics without retaining water. Use of this polymer allows this injection system to be used satisfactorily even with analytes whose boiling point is lower than that of water. This is the case of three of the compounds studied here: chloroform (61 °C), benzene (80 °C) and bromodichloromethane (90 °C) (see Table 2).

The variables involved in the process are the venting temperature, the flow and purge time, the injection time, and the final temperature of the injector.

The initial temperature of the liner, or venting temperature, was studied for the values of 5, 10, 15, 20 and 25 °C. For most of the compounds, similar results were obtained in the temperature range studied, except for chloroform and benzene, the two most volatile compounds. For these, the best results were obtained at 5 °C. However, it was decided to choose a value of 15 °C; i.e., a compromise between the analytical signal obtained and the time required to cool and equilibrate the liner at that temperature. At this temperature, the loss of the more volatile analytes was lower than 10%.

The variables affecting the elimination of solvent (flow and purge time) had been optimized for a similar group of compounds in a previous work [56], so only other variables such as the final detector temperature and injection time were studied. The final temperature of the injector was studied at two levels: 250 and 300 °C (which is the maximum working temperature recommended for Tenax-TA®). The analytical signals remained constant for all the compounds, except for toluene, ethylbenzene and xylene, whose peak areas increased in the order of 67%, 21% and 24% respectively when a temperature of 300 °C was used. Accordingly, it was decided to use this temperature. Injection times were studied for values ranging between 0.40 and 0.60 min. Times shorter than 0.55 min did not permit complete desorption of the less volatile compounds while longer times did not afford an improvement in the signal, such that this value was chosen as optimum.

The optimized sequence of steps involved when solvent injection was used has been described in Section 2.4.2.

3.1.2.1. Fast GC parameters. The experimental conditions for the GC column were selected to achieve baseline separation in the lowest possible time. The initial temperature of the chromatographic column was studied for values ranging between 40 and 60 °C. As temperature increased the retention times of the compounds decreased, although an overlapping of the chromatographic peaks also occurred. In view of the results, an initial temperature of 50 °C was chosen and this was maintained along the first 3 min of the chromatographic analysis in order to achieve suitable resolution of the compounds studied.

To accomplish compound separation by fast chromatography, a temperature ramp from 50 to 240 °C (at 100 °C/min) was chosen. This heating ramp allowed compound separation without compromising the chromatographic resolution. The final temperature selected – 240 °C (which was maintained for 1 min to prevent possible problems due to the memory effect) – was sufficient to guarantee the elution of the compounds of interest and appropriate for the technical specifications of the chromatographic column. The flow of helium through the column was set at 1.5 mL/min.

3.1.2.2. MS conditions. The previous results were obtained from the extracted ions corresponding to the chromatograms recorded in scan mode for an *m/z* range between 25 and 270 amu. To record the chromatograms in SIM mode, the three groups of *m/z* ratios specified in Section 2.4.4 were established, each of which had the three most abundant *m/z* ratios of each of the compounds. The dwell time was studied for values of 10, 30 and 100 ms, finally choosing a value of 10 ms because it afforded the best defined peaks.

Fig. 2 shows the chromatogram obtained on analyzing a water sample with a concentration of 100 µg/L of each of the compounds. For each compound, the most abundant *m/z* ratio was extracted.

Fig. 2. Chromatogram of a water sample (100 µg/L of each compound) analyzed with the optimized method.

The time necessary for the eight compounds to elute was 4.55 min. The retention times, widths at half-height (w_h), boiling points, and the characteristic and most abundant m/z ratios of the analytes studied are shown in Table 2. In fast GC the usual value for peak widths at half height is 0.2–3 s and the typical run times range from 1 to 10 min [58], such that the separation achieved with the optimized method corresponded to fast chromatography for all the compounds.

3.1.3. Time of analysis

The methodology required 6.10 min to complete the temperature ramp. Additionally, about 3 min were necessary to cool the column from the final temperature (240 °C) to initial conditions (50 °C). This rapid cooling was achieved by means of the MACH™ system, with which it was possible to attain a considerable reduction in the cycle time as compared with a conventional GC oven. The run time of the PTV was programmed so that it would be prepared at the initial temperature selected at the time of the next injection.

The multiposition oven of the HS allows vials to be equilibrated simultaneously and hence after the first 30 min, required for the generation of headspace of the first vial, it was possible to analyze a sample every 9 min: i.e., nearly 7 samples/h.

3.2. Analysis of soil samples

3.2.1. Addition of water and NaCl

The addition of modifiers to the soil sample to improve the extraction efficiency has been widely used with different modes of headspace generation. The addition of water and salt saturated aqueous solutions (salting-out effect) are the most widely used methods. USEPA method 5021, in which static headspace is used, proposes both possibilities [22], while method 5035, with the purge and trap technique, proposes the addition of water [23].

In this work the effect of adding ultrapure water as well as a saturated NaCl solution to the soil sample was studied. The NaCl solution was prepared as specified by the USEPA. Concentrated phosphoric acid was added to 500 mL of ultrapure water until a pH of 2 was reached. Then, 180 g of NaCl were added and the mixture was stirred until most of the salt was dissolved.

Two different soil matrices were employed – a garden soil and a Vertisol – spiked with 40 µg/kg for the eight compounds. Increasing volumes (1, 3, 5 and 6 mL) of water and NaCl solution were added to 1 g of spiked soil. Each of the levels was analyzed in triplicate. Moisture is a factor that may affect the process of VOC extraction to a considerable extent and it is highly variable in real soil samples. Accordingly, the minimum volume studied was 1 mL such that the soil would be completely saturated with the solution. Thus, with the addition of modifier, apart from promoting the release of volatiles it was possible to homogenize the moisture of the samples.

For both modifiers, and in both types of soil analyzed, it was observed that the analytical signals of the compounds of interest were not significantly different for the four volumes studied. In light of this, it was decided to select a volume of 5 mL and hence conserve the proportion (g of sample/mL of modifier) recommended by the USEPA method 5021.

Fig. 3. Effect on the analytical signal after the addition of water and NaCl solution to the soil CRM-633.

The analytical signals obtained upon adding 5 mL of water and 5 mL of NaCl solution to the two types of soils were compared. In both cases the analytical signals obtained for BTEX were seen to be higher when water was used. These observations, obtained with the soils spiked at the laboratory, were checked against a certified reference material (CRM633). Fig. 3 shows the relative responses (normalized to the highest signal for each compound) obtained upon analyzing 1 g of the certified CRM-633 material with no addition of the modifying agent, with 5 mL of water, and with 5 mL of NaCl solution. The results corroborated those obtained with the soils spiked at the laboratory. The analytical signals increased significantly when a modifier was added to the soils in comparison with those obtained on analyzing the reference material without modifier. Also, in the case of BTEX the addition of water afforded higher extraction yields than the NaCl solution, whereas the yields were similar for the trihalomethanes. These findings are similar to those reported by other authors using the same group of compounds.

The mechanism responsible for the effect of water on the release of VOCs from solid matrices is not very well understood. One theory is that active sites in the soil adsorb polar compounds more strongly than less polar ones, such that the water displaces the analytes from their adsorption sites. Another proposed mechanism is the competition between the matrix and the solvent for the analytes. The analytes would be desorbed from the soil into the solvent by solvation, after which they would migrate to the headspace. The addition of salt could be less favourable than water for some compounds because the high concentration of ions in solution may give rise to a lesser solvation of the analyte molecules and hence a slower desorption rate of the compounds from the soil to the water.

3.2.2. Matrix effect

Soil samples are highly complex and diverse matrices in which it is difficult to achieve an exhaustive extraction of the compounds. Because of this, the existence of a matrix effect is common in many of the analytical techniques used for the determination of VOCs in these matrices.

Here we performed a study using three types of soil in order to check the existence of a matrix effect. In nature, there are many different types of soil, but their adsorption capacity is strongly governed by their contents in three materials: sand, clay and organic

Table 3
Slopes of the calibration curves for each compound in each type of soil.

	Chloroform	Bromodichloromethane	Dibromochloromethane	Bromoform	Benzene	Toluene	Ethylbenzene	m-Xylene
Sand	$(53 \pm 1)10^2$	$(90 \pm 3)10^2$	$(50 \pm 1)10^2$	$(297 \pm 8)10$	$(205 \pm 7)10^2$	$(43 \pm 1)10^3$	$(64 \pm 2)10^3$	$(50 \pm 1)10^3$
Garden soil	$(45 \pm 1)10^2$	$(43.6 \pm 0.5)10^2$	$(45.4 \pm 0.5)10^2$	$(274 \pm 5)10$	$(188 \pm 7)10^2$	$(36.5 \pm 0.1)10^3$	$(43.4 \pm 0.9)10^3$	$(33.2 \pm 0.7)10^3$
Vertisol	$(37 \pm 1)10^2$	$(39 \pm 2)10^2$	$(42.6 \pm 0.5)10^2$	$(254 \pm 5)10$	$(163 \pm 6)10^2$	$(29 \pm 1)10^3$	$(33.9 \pm 0.5)10^3$	$(24.9 \pm 0.4)10^3$

Table 4
Analytical characteristics of the method in fortified sand samples.

Compounds	Slope	Intercept	R ²	RSD (%) ^a	DL (ng/kg)	QL (ng/kg)
Chloroform (CFM)	(53 ± 1)10 ²	(−1 ± 2)10 ⁴	0.9954	13	46	135
Bromodichloromethane (BDCM)	(90 ± 3)10 ²	(1 ± 3)10 ⁴	0.9786	9	30	90
Dibromochloromethane (DBCM)	(50 ± 1)10 ²	(−5 ± 2)10 ⁴	0.9955	10	5	14
Bromoform (BMF)	(297 ± 8)10	(−3 ± 1)10 ⁴	0.9945	10	5	13
Benzene	(205 ± 7)10 ²	(−0.7 ± 1)10 ⁵	0.9895	13	45	136
Toluene	(43 ± 1)10 ²	(−2 ± 2)10 ⁵	0.9937	11	121	366
Ethylbenzene	(64 ± 2)10 ³	(−2 ± 3)10 ⁵	0.9964	9	9	27
m-Xylene	(50 ± 1)10 ³	(−3 ± 2)10 ⁵	0.9960	10	39	116

^a Calculated for a sand sample with 50 µg/kg of each compound and n = 3.

matter. The three soils analyzed here – a commercial sand, a Vertisol (soil with a high clay content) and a garden soil (characterized by its high proportion of organic matter) – are extreme examples of the soil types.

The three types of soil chosen were spiked at different concentration levels (0, 50, 100 and 200 µg/kg) for the eight compounds studied. The procedure used to spike the soil was that reported in Section 2.2.2.1. Each level was analyzed in triplicate and the slopes of the regression curves obtained were compared. Table 3 shows that for most of the compounds there were significant differences in the slopes for all three matrices, such that it may be concluded that in the optimized method a matrix effect occurs in the determination of THMs and BETX in different types of soil. It may be seen that the influence of the matrix is different for the different compounds analyzed, which hinders the use of a single internal standard (IS). In this sense, the USEPA recommends that the use of an internal standard can provide some indication of the degree of the matrix effect. However, this effect can be difficult if not impossible to overcome. It would therefore be necessary to use isotopic standards of each of the compounds.

Additionally, owing to the different characteristics of the soils studied the results of this study could be extrapolated to the analysis of VOCs in most types of soil present in nature.

Table 5
Determination of the target compounds in the three certified reference materials.

Compound	Standard addition interval (µg/kg)	Slope	Intercept	R ²	Predicted value (µg/kg)	Reference value (µg/kg) ^a	Prediction interval (µg/kg) ^a
CRM 635							
Chloroform	0–190	(52 ± 5)10 ²	(61 ± 5)10 ⁴	0.9801	120 ± 20	98.7	46.0–151
BDCM	0–190	(51 ± 3)10 ²	(58 ± 4)10 ⁴	0.9884	110 ± 10	90.6	45.9–135
DBCM	0–260	(29 ± 3)10 ²	(38 ± 5)10 ⁴	0.9714	130 ± 30	131	63.8–198
Bromoform	0–150	(26 ± 2)10 ²	(17 ± 2)10 ⁴	0.9889	70 ± 10	74.5	27.5–122
Benzene	0–86	(15 ± 1)10 ³	(72 ± 8)10 ⁴	0.988	46 ± 8	42.9	24.2–61.7
Toluene	0–260	(40 ± 3)10 ³	(57 ± 5)10 ⁵	0.988	140 ± 20	129	66.9–192
Ethylbenzene	0–260	(50 ± 6)10 ³	(79 ± 8)10 ⁵	0.9719	160 ± 30	133	76.0–190
m + p Xylene	0–412	(33 ± 5)10 ³	(95 ± 9)10 ⁵	0.9511	280 ± 60	206	126–286
CRM 631							
Chloroform	0–125	(33 ± 1)10 ²	(23 ± 8)10 ⁴	0.9869	71 ± 4	60.4	14.0–136
BDCM	0–150	(46 ± 3)10 ²	(44 ± 3)10 ⁴	0.9881	96 ± 11	74.9	45.9–135
DBCM	0–150	(24 ± 3)10 ²	(22 ± 2)10 ⁴	0.9694	93 ± 20	84.2	2.37–166
Bromoform	0–125	(10 ± 1)10 ²	(95 ± 8)10 ³	0.9568	93 ± 17	64.1	0–131
Benzene	0–150	(204 ± 9)10 ²	(16 ± 7)10 ⁴	0.9948	80 ± 6	72.0	35.6–108
Toluene	0–150	(40 ± 2)10 ³	(31 ± 1)10 ⁵	0.9918	78 ± 6	77.5	37.1–118
Ethylbenzene	0–248	(56 ± 3)10 ³	(67 ± 3)10 ⁵	0.9939	120 ± 10	124	59.3–188
m + p Xylene	0–188	(46 ± 2)10 ³	(42 ± 2)10 ⁵	0.9922	91 ± 8	94.5	38.4–151
CRM 633							
Chloroform	0–250	(48 ± 4)10 ²	(72 ± 6)10 ⁴	0.9900	150 ± 23	125	65.2–184
BDCM	0–250	(70 ± 5)10 ²	(99 ± 8)10 ⁴	0.9852	141 ± 19	104	46.2–162
DBCM	0–250	(40 ± 3)10 ²	(40 ± 5)10 ⁴	0.9839	97 ± 18	95.0	43.2–147
Benzene	0–250	(19 ± 2)10 ³	(22 ± 2)10 ⁵	0.9842	117 ± 20	96.4	47.2–146
Toluene	0–65	(37 ± 2)10 ³	(114 ± 7)10 ⁴	0.9936	31 ± 3	24.5	10.8–38.2
Ethylbenzene	0–90	(55 ± 3)10 ³	(28 ± 2)10 ⁵	0.9909	52 ± 6	40.6	20.3–60.8
m + p Xylene	0–450	(35 ± 3)10 ³	(116 ± 9)10 ⁵	0.9856	332 ± 51	228	109–347

^a Reference values and prediction intervals provided in the Certificates of Analysis of the CRM soils.

detection limits for the 5021 method that uses the instrumental configuration HS-GC-MS, obtaining values of 210–470 ng/kg for the analytes of interest [22]. Other authors have reported the detection limits provided by different methods proposed for the determination of BTEX (among other compounds) in soil matrices. A. Serrano et al. estimated detection limits between 1200 and 2000 ng/kg, by using the HS-GC-MS methodology [29]. HSPME-GC-MS has afforded detection limits of 50–230 ng/kg [26] and 70–180 ng/kg [34]. Rosell et al. have proposed the P&T-GC-MS methodology, obtaining detection limit values of 330–1630 ng/kg [33].

The quantitation limits (QLs) were estimated using the following equation:

$$QL = \frac{10\sigma}{S}$$

where σ is the standard deviation of peak response for ten replicates ($n = 10$) corresponding to an S/N ratio of approximately 3, and S is the slope of the calibration curve. The results for the quantitation limits are summarized in Table 4.

Additionally, Table 4 shows the repeatability of the optimized method, obtained by analyzing three samples of sand spiked with a concentration of 50 $\mu\text{g/kg}$. In all cases, the intra-day values obtained were less than or equal to 13%.

3.2.4. Determination of the target compounds in three different CRM soils

From the results obtained in Section 3.2.2 it may be concluded that the external calibration method is strongly influenced by the type of soil matrix, which affects extraction yields and can cause biased quantification. In light of this, here we propose a standard additions protocol for the accurate determination of VOCs in soil samples.

Three different certified reference materials – a loamy sandy soil (RTC-CRM633), a clay soil (RTC-CRM635) and a silty clay soil (RTC-CRM631) – were used. As in the study of the matrix effect,

very different matrices were chosen to check the validity of the method and its applicability in different types of natural soil present in nature. In each of the soils, a five-level calibration study was performed, analyzing 3 replicates from each level. The concentrations of each compound added were uniformly distributed from 0 $\mu\text{g/kg}$ to the highest concentration level, which in each case was calculated such that it would approximately coincide with twice the certified value (see Table 5), thus achieving the minimum uncertainty associated with the prediction.

1 g of soil was accurately weighed in a 10 mL vial, immediately adding 5 mL of ultrapure water and 20 μL of methanol containing the compounds of interest at the appropriate concentration in each case. Then, the vials were sealed with silicone caps and subjected to the measuring procedure. The variables used in the calibration curves were the area under the peak in the extracted ion chromatogram for the quantitation ions (see Table 2).

As an example, Fig. 4a shows the chromatogram corresponding to the CRM-633 soil recorded in scan mode. The compounds of interest present in the sample were identified from the three most abundant m/z ratios for each of them by comparison with the spectra of the pure compounds, accepting a difference in abundances of 20% as maximum. Then, quantification was performed in SIM mode (Fig. 4b) under the same conditions as those used to obtain the calibrations.

Table 5 shows the calibration curves obtained for each compound, the coefficient of determination (R^2), the concentrations predicted by the calibrations and the certified value and the prediction interval specified for each compound. In all cases, the predicted value was within the prediction interval specified in the certified material.

4. Conclusions

A simple and very sensitive method has been implemented for the determination of volatile organic compounds in soils. The instrumental configuration is based on the coupling of headspace sampling, solvent vent injection, and fast-gas chromatography separation with mass spectrometry detection.

It is demonstrated that for BTEX the addition of water to the soils affords higher extraction yields than NaCl. Owing to the presence of the matrix effect a standard additions protocol is proposed for the determination of the target compounds in soil samples.

The use of headspace generation for introducing the sample has the advantage that no prior treatment of the sample is required, thus reducing the experimental errors associated with this step of the analytical process. Fast gas chromatography allows the separation of the eight compounds in less than 4.60 min and the MACHTM can be heated and cooled very rapidly, making the total analysis cycle time very short (9 min). The cryo-trapping of the compounds in the PTV (solvent vent injection mode) together with mass spectrometry detection in SIM mode give rise to a highly sensitive method with limits of detection in the order of ng/kg in sand samples.

The optimized method was successfully applied in three different certified reference materials. The soils chosen had different percentages of sand, clay and organic matter, such that the results obtained can be extrapolated to most natural soils. In all cases, the predicted concentrations by the calibrations are within the prediction interval specified in the certified material. In view of the results obtained the method proposed here is fast, reliable, accurate and highly sensitive.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of the DGI (CTQ2007-63157/BQU) and the Consejería de Educación y Cul-

Fig. 4. Chromatogram in scan mode (a) and SIM mode (b) of the CRM-633 soil.

tura de la Junta de Castilla y León (Project SA112A08) for this research.

References

- [1] Supplemental Guidance for Developing Soil Screening Levels for Superfund Sites, Office of Emergency and Remedial Response, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, USA, 2001, p. 177, <http://www.epa.gov/superfund/health/commedia/soil/pdfs/attachc.pdf>.
- [2] USEPA Method 8260B, Volatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS), Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 8000 series, USEPA, Washington, USA, 1996, <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8260b.pdf>.
- [3] J.R. Dean, G. Xiong, Trends Anal. Chem. 19 (2000) 553.
- [4] F.J. Santos, M.T. Galcerán, Trends Anal. Chem. 21 (2002) 672.
- [5] N. Jakubowska, B. Zygmunt, Z. Polkowska, B. Zabiegała, J. Marniesnik, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 422.
- [6] M. Ericsson, J. Faldt, G. Dalhammar, A.-K. Borg-Karlson, Chemosphere 44 (2001) 1641.
- [7] Accelerated Solvent Extraction (ASE) of Hydrocarbon Contaminants (BTEX, Diesel, and TPH) in Soils, Application Note 324, DIONEX, http://www.dionex.com/en-us/webdocs/4331_AN324.pdf.
- [8] R.-A. Doong, P.-L. Liao, J. Chromatogr. A 918 (2001) 177.
- [9] K.M. Meney, C.M. Davidson, D. Littlejohn, Analyst 123 (1998) 195.
- [10] M.D. Burford, S.B. Hawthorn, D.J. Miller, J. Chromatogr. A 685 (1994) 95.
- [11] USEPA Method 8270D, Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS), Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 8000 series, USEPA, Washington, USA, 1996, <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8270d.pdf>.
- [12] L. Ramos, J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman, J. Chromatogr. A 891 (2000) 275.
- [13] E. Björklund, S. Bowadt, T. Nilsson, L. Mathiasson, J. Chromatogr. A 836 (1999) 285.
- [14] K. Li, M. Landriault, M. Fingas, M. Llompart, J. Hazard. Mater. 102 (2003) 93.
- [15] L. Wennrich, P. Popp, M. Möder, Anal. Chem. 72 (2000) 546.
- [16] G. Xiong, B. Tang, X. He, M. Zhao, Z. Zhang, Z. Zhang, Talanta 48 (1999) 333.
- [17] R. Roll, P. Popp, J. Chromatogr. A 1124 (2006) 82.
- [18] F. David, P. Sandra, J. Chromatogr. A 1152 (2007) 54.
- [19] M. Martínez-Parreño, J. Llorca-Pórcel, I. Valor, J. Sep. Sci. 31 (2008) 3620.
- [20] R.J. De la Torre-Roche, W.-Y. Lee, S.I. Campos-Díaz, J. Hazard. Mater. 163 (2009) 946.
- [22] USEPA Method 5021, Volatile Organic Compounds in Soils and Other Matrices using Equilibrium Headspace Analysis, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 5000 series, USEPA, Washington, USA, 1996, <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/5021.pdf>.
- [23] USEPA Method 5035, Closed System Purge and Trap and Extraction for Volatile Organics in Soils and Waste Samples, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 5000 series, USEPA, Washington, USA, 1996, <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/5035.pdf>.
- [24] USEPA Method 5032, Volatile Organic Compounds by Vacuum Distillation, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 5000 series, USEPA, Washington, USA, 1996, <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/5032.pdf>.
- [25] USEPA Method 5000, Sample Preparation for Volatile Organic Compounds, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 5000 series, USEPA, Washington, USA, 1996, <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/5000.pdf>.
- [26] M. Llompart, K. Li, M. Fingas, Talanta 48 (1999) 451.
- [27] J.S. Alvarado, C. Rose, Talanta 62 (2004) 17.
- [28] J.L. Pérez Pavón, A. Guerrero Peña, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1047 (2004) 101.
- [29] A. Serrano, M. Gallego, J. Chromatogr. A 1118 (2006) 261.
- [30] F.A. Esteve-Turrillas, S. Armenta, A. Pastor, M. de la Guardia, Anal. Chim. Acta 587 (2007) 89.
- [31] O. Zuloaga, N. Etchebarria, J. Zubiaur, L.A. Fernández, J.M. Madariaga, Analyst 125 (2000) 477.
- [32] K.F. Haselmann, F. Laturnus, B. Svensmark, C. Gron, Chemosphere 41 (2000) 1769.
- [33] M. Rosell, S. Lacorte, D. Barceló, J. Chromatogr. A 1132 (2006) 28.
- [34] R.S. Dungan, Anal. Lett. 38 (2005) 2393.
- [35] O. Zuloaga, N. Etchebarria, L.A. Fernández, J.M. Madariaga, Anal. Chim. Acta 416 (2000) 43.
- [36] N. Campillo, P. Viñas, I. López-García, N. Aguina, M. Hernández-Córdoba, Talanta 64 (2004) 584.
- [37] Z. Zhang, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 67 (1995) 34.
- [38] O. Ezquerro, G. Ortiz, B. Pons, M.T. Tena, J. Chromatogr. A 1035 (2004) 17.
- [39] M. Ojala, I. Mattila, T. Särme, R.A. Kelota, T. Kotiaho, Analyst 124 (1999) 1421.
- [40] Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to humans, Summaries & Evaluations, vol. 29, International Agency for Research on Cancer, 1982, <http://monographs.iarc.fr/>.
- [41] Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to humans, Summaries & Evaluations, vol. 77, International Agency for Research on Cancer, 2000.
- [42] Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Summaries & Evaluations, vol. 73, International Agency for Research on Cancer, 1999.
- [43] Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to humans, Summaries & Evaluations, vol. 71, International Agency for Research on Cancer, 1999.
- [44] J.S. Zogorski, J.M. Carter, T. Ivahnenko, W.W. Lapham, M.J. Moran, B.L. Rowe, P.J. Squillace, P.L. Toccalino, U.S. Department of Interior, Circular 1292, U.S. Geological Survey, Reston, Virginia, 2006, <http://pubs.usgs.gov/circ/circ1292/pdf/circular1292.pdf>.
- [45] H. Frank, W. Frank, D. Thiel, Atmos. Environ. 23 (1989) 1333.
- [46] E.J. Hoekstra, E.W.B. de Leer, U.A.Th. Brinkman, Environ. Sci. Technol. 32 (1998) 3724.
- [47] E.J. Hoekstra, F.J.M. Verhagen, J.A. Field, E.W.B. De Leer, U.A.Th. Brinkman, Phytochemistry 49 (1998) 91.
- [48] E.J. Hoekstra, J.H. Duyzer, E.W.B. De Leer, U.A.Th. Brinkman, Atmos. Environ. 35 (2001) 61.
- [49] K.F. Haselmann, R.A. Kelota, F. Laturnus, F.R. Lauritsen, C. Gron, Atmos. Environ. 34 (2000) 187.
- [50] F. Laturnus, K.F. Haselmann, T. Borch, C. Gron, Biogeochemistry 60 (2002) 121.
- [51] A. McCulloch, Chemosphere 50 (2003) 1291.
- [52] J. Wang, P. Quin, S. Sun, Environ. Pollut. 148 (2007) 10.
- [53] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, C. García Pinto, M.E. Fernández-Laespada, B. Moreno Cordero, A. Guerrero Peña, Anal. Chem. 75 (2003) 2034.
- [54] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández-Laespada, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1141 (2007) 123.
- [55] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández-Laespada, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1175 (2007) 106.
- [56] J.L. Pérez Pavón, S. Herrero Martín, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1194 (2008) 103.
- [57] A. Hoffmann, B. Tienpont, F. David, P. Sandra, Application Note 6/2006, Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Germany, <http://www.gerstel.com/pdf/p-gc-an-2006-06.pdf>.
- [58] E. Matisova, M. Dömötöróvá, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 199.

VI

**PROPUESTA DE UNA VERSIÓN
SIMPLIFICADA DE LA METODOLOGÍA
QuEChERS PARA LA DETERMINACIÓN DE
COMPUESTOS CLORADOS EN SUELOS**

1. INTRODUCCIÓN

La determinación de compuestos orgánicos volátiles y semi-volátiles en matrices ambientales, como el aire, el agua, el suelo, o los sedimentos, habitualmente requiere de una etapa de pretratamiento de la muestra, previa al procedimiento de determinación final, el cual generalmente se ha llevado a cabo mediante cromatografía de gases. La etapa de pretratamiento implica la separación de los compuestos de interés de la matriz en la que se encuentran y su transferencia a otro medio. En este proceso, idealmente, se consigue la eliminación simultánea de sustancias interferentes y el enriquecimiento selectivo de los analitos de interés hasta una concentración superior al límite de detección del procedimiento de medida [1].

La selección del método de pretratamiento empleado depende fuertemente de la complejidad de la matriz. El agua, generalmente, representa una matriz menos complicada que el aire, o las muestras de sedimentos y suelos. Otro factor a tener en cuenta es el método de determinación al que se va a someter la muestra. Cuanto más selectivo y específico es el método de detección empleado, menos etapas serán necesarias en el procedimiento de tratamiento de la muestra [2]. Las estrategias analíticas más modernas tienden, en la medida de lo posible, hacia la automatización e integración del procedimiento de pretratamiento de la muestra en el propio sistema cromatográfico [3].

El desarrollo de técnicas de pretratamiento de la muestra que no utilizan disolventes orgánicos, o que minimizan el uso de los mismos, constituye el pilar de la química analítica “verde” [4], que ha experimentado un rápido desarrollo durante los últimos años. Las principales ventajas de este tipo de técnicas se deben a aspectos toxicológicos, medio ambientales y económicos. Se han desarrollado un gran número de técnicas que cumplen estas características [5,6], tales como: microextracción en una gota (SDME), microextracción en fase sólida (SPME) o extracción por adsorción en barra

agitadora (SBSE), generación de espacio de cabeza estático (SHS), Purga y Trampa (P&T) y análisis por extracción en bucle cerrado (CLSA). También se han desarrollado dispositivos basados en el uso de membranas: extracción con disolvente soportado en membrana (MASE), o introducción de muestra en espectrometría de masas a través de membrana (MIMS) [7].

El procedimiento QuEChERS (*quik, easy, cheap, effective, rugged and safe*) fue introducido en el año 2003 por Anastassiades y sus colaboradores como un nuevo método para extraer un amplio grupo de pesticidas de matrices alimentarias con un alto contenido en agua [8]. El procedimiento inicial está basado en una extracción líquido-líquido con acetonitrilo, seguida de un procedimiento de limpieza denominado extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE), en el que se utilizó amina primaria-secundaria (PSA) como material adsorbente.

El método QuEChERS se ha aplicado fundamentalmente a la extracción de pesticidas polares, con polaridad media, y no polares, en diversas matrices alimentarias [9-16]. Ha recibido una gran aceptación a nivel mundial debido a su simplicidad, bajo coste, fácil desarrollo, alta capacidad de procesamiento de muestras y a la obtención de resultados altamente eficaces en pocas etapas. Recientemente, el método QuEChERS para la extracción de múltiples residuos de pesticidas en matrices de frutas y verduras ha recibido la distinción de método oficial de la AOAC Internacional [17].

Aunque el método ha sido principalmente empleado para la determinación de pesticidas, se ha utilizado también para la determinación de otros compuestos como: compuestos farmacéuticos [18], antibióticos β -lactámicos [19,20] o fármacos para animales [20-24]. El uso de QuEChERS con matrices de suelos ha sido muy limitado hasta la fecha [25]. En la publicación citada, la etapa de limpieza de los extractos se llevó a cabo

mediante d-SPE. Conforme a estas experiencias, el desarrollo de nuevas aplicaciones y modificaciones del método es de gran interés.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es el de estudiar las posibilidades de la aplicación del método QuEChERS para la extracción de VOCs de muestras de suelos. Para este fin, se desarrollará una nueva versión simplificada del método QuEChERS para la extracción de compuestos clorados en muestras de suelos.

Para solucionar la principal desventaja comúnmente asociada al método QuEChERS, de baja preconcentración de los compuestos en los extractos, se propone el análisis de los extractos mediante cromatografía de gases, utilizando un micro-detector de captura electrónica (μ -ECD), que proporciona mayor selectividad y sensibilidad que los detectores convencionales.

La principal ventaja de la versión de QuEChERS propuesta en este trabajo se debe a la eliminación de la etapa de limpieza (d-SPE) de los extractos después de la extracción. Esta etapa ha demostrado ser altamente eficaz en la reducción del contenido de compuestos lipídicos co-extraídos de la matriz y es más rápida, más barata y más sencilla que el procedimiento de extracción en fase sólida (SPE) convencional. Sin embargo, debido a la naturaleza no grasa de los suelos y al alto grado de selectividad y sensibilidad del sistema GC- μ ECD, se decidió analizar directamente los extractos obtenidos tras la etapa de centrifugación sin someterlos a procedimientos de limpieza. Como consecuencia, la nueva versión de QuEChERS incluye menos etapas de pretratamiento de la muestra, lo que hace que el procedimiento sea más rápido, más económico y minimiza la probabilidad de cometer errores experimentales.

Con el fin de demostrar la validez del método propuesto, se seleccionaron tres compuestos clorados (cloroformo, 1,2-diclorobenceno y hexaclorobenceno) con diferentes características en cuanto a su volatilidad y polaridad. Estos compuestos son importantes contaminantes orgánicos,

debido a su uso común y su alta toxicidad. La IARC ha clasificado el cloroformo [26] y el hexaclorobenceno [27] como posibles carcinógenos en humanos (Grupo 2B), basándose en pruebas insuficientes de su carcinogenicidad en humanos, pero evidencias suficientes de su carcinogenicidad en animales de laboratorio. El 1,2-diclorobenceno ha sido clasificado en el Grupo 3 (no clasificable como carcinógeno en humanos) [26].

Se han evaluado dos disolventes (acetonitrilo y acetato de etilo), en cuanto a su adecuación para el análisis cromatográfico y a su eficacia en la extracción de compuestos de matrices de suelos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos

El cloroformo (pureza: 99.9 %) fue suministrado por Supelco (Bellefonte, PA, USA) y el 1,2-diclorobenceno (pureza: 99 %) y el hexaclorobenceno (pureza: 99 %) por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El acetonitrilo (MeCN) fue suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania) y el acetato de etilo (EtOAc) fue suministrado por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El sulfato de magnesio deshidratado y el cloruro sódico fueron de Scharlau (Barcelona, España). El agua ultrapura se obtuvo mediante un sistema de purificación de agua Elgastat.

3.2. Disoluciones estándar y muestras

3.2.1. Disoluciones estándar

Se prepararon disoluciones estándar de cada uno de los compuestos (500 mg/L) en EtOAc y en MeCN, y las disoluciones se almacenaron refrigeradas a 4 °C. A partir de éstas se realizaron diferentes diluciones, que se utilizaron en los estudios de selección del modo de inyección, así como para dopar los suelos a los niveles de concentración requeridos.

3.2.2. Muestras de suelos

Se utilizaron tres tipos de suelos diferentes para evaluar el método QuEChERS propuesto. Dos suelos naturales: un suelo de jardín, con un alto contenido de materia orgánica (Salamanca, España) y un Vertisol, que se caracteriza por su alto contenido en arcilla (Tabasco, México). Y un material de referencia (RTC-CRM631), que es un suelo arcillo-limoso con concentraciones certificadas de los compuestos de interés.

Aunque existe una gran diversidad de tipos de suelos en la naturaleza, su capacidad de adsorción está fuertemente relacionada con su contenido en arena, arcilla y materia orgánica, por lo que los tres suelos considerados

en este estudio pueden considerarse ejemplos representativos de los posibles tipos de suelos y los resultados obtenidos podrían extrapolarse a la mayoría de los suelos presentes en la naturaleza.

Con el fin de evitar la presencia de los compuestos de interés en los suelos recolectados (suelo de jardín y Vertisol), estas matrices se secaron al aire sobre una placa calefactora a 90 °C, durante 48 horas, removiendo frecuentemente. Con este procedimiento se conseguía eliminar del suelo la humedad y prácticamente cualquier traza de compuesto orgánico volátil presente en él. Los suelos desecados se analizaron antes de doparlos para comprobar que estaban libres de los VOCs estudiados. En todos los blancos se detectó cloroformo, que es un compuesto ubicuo en todas las matrices ambientales [28, 29].

El procedimiento utilizado para dopar los suelos es el siguiente: 20 g de suelo se depositan en un vial de 100 mL y sobre él se añaden 2 mL de una disolución de los analitos objeto de estudio en EtOAc (a las concentraciones adecuadas). El vial se sella herméticamente y se agita vigorosamente durante 15 minutos para conseguir la perfecta homogenización de los compuestos en la matriz. Finalmente, las muestras se almacenan en el frigorífico (4 °C) durante 15 días para lograr que tenga lugar la interacción entre los compuestos y la matriz.

3.3. Instrumentación GC- μ ECD

La configuración instrumental utilizada es la descrita en el apartado 2 de la sección III “*Configuraciones instrumentales utilizadas*”.

El cromatógrafo de gases era un Agilent 7890A, equipado con un micro-detector de captura electrónica (μ ECD). De acuerdo con las especificaciones del detector, la zona de detección es diez veces menor a la de un ECD convencional, lo que se traduce en mayor sensibilidad y disminuye la probabilidad de contaminación de la celda. Se utilizó una columna capilar DB-VRX (20 m x 0.18 mm x 1 μ m) para cromatografía de gases rápida de

Agilent Technologies (J&W Scientific Columns, USA). El gas portador era Helio N50 (99.995% de pureza; Air Liquid).

Todos los experimentos se realizaron con un inyector PTV Agilent 6890. El PTV estaba equipado con un *liner* de 71 mm x 2 mm, empaquetado con Tenax-TA®, un polímero hidrofóbico diseñado para retener compuestos orgánicos (volumen interno del *liner* de 180 µL). Las muestras se introdujeron en el inyector PTV a través de un sistema de inyección de muestras líquidas (Agilent 7683).

3.4. Procedimiento Analítico

La etapa de pretratamiento de la muestra mediante el método QuEChERS simplificado consta de una serie de pasos que se describen a continuación. Se pesan 2.5 g de suelo en un tubo de centrifuga de 15 mL con tapón roscado. El tapón mantiene el tubo cerrado durante la mayor parte del procedimiento de pretratamiento de la muestra, con lo que se evitan, en la medida de lo posible, las pérdidas de compuestos volátiles durante esta etapa. A continuación, se añaden sobre el suelo 1.5 mL de agua ultrapura, con el fin de hacer los poros de la muestra más accesibles al disolvente de extracción y al mismo tiempo homogeneizar el contenido de agua en las diferentes muestras de suelo. Esta mezcla se agita con un Vortex durante 1 min. En la siguiente etapa se añaden 2.5 mL de acetato de etilo (disolvente de extracción) y la mezcla se agita de nuevo durante 1 min con un Vortex. A continuación, se añade 1 g de MgSO₄ deshidratado y se agita el tubo durante 1 min. La agitación debe realizarse inmediatamente después de la adición de MgSO₄ para evitar la formación de conglomerados durante el proceso de hidratación de la sal. Finalmente, el tubo se centrifuga a 5000 rpm durante 5 min. En la figura 1 se muestra una comparación entre el procedimiento QuEChERS original y la versión simplificada propuesta en este trabajo.

Figura 1: Comparación del procedimiento propuesto respecto al método QuEChERS original, adaptado a muestras sin humedad.

El análisis de los extractos se realizó mediante GC- μ ECD. Se utilizaron dos modos de inyección: *splitless* para el compuesto más volátil (cloroformo) y *solvent vent* para los dos compuestos semi-volátiles (1,2-diclorobenceno y hexaclorobenceno).

En el modo de inyección *splitless* se inyectaron 0.2 μL de muestra y el inyector se mantuvo a una temperatura de 250 $^{\circ}\text{C}$ a lo largo de todo el tiempo de análisis. El tiempo de *splitless* era de 1 min. En el modo de inyección *solvent vent*, la temperatura inicial del inyector se fijó en 30 $^{\circ}\text{C}$. El volumen de inyección era de 5 μL , el flujo de venteo de 20 mL/min y la presión de venteo era de 5.00 psi. Después de 0.5 min, la válvula de purga

se cierra y el *liner* se calienta de forma rápida a 12 °C/s hasta 300 °C. De esta forma se produce la transferencia de los analitos desde el *liner* a la columna cromatográfica (tiempo de inyección 1.5 min). A continuación, la válvula de purga se abre de nuevo para garantizar la correcta limpieza del *liner*, evitando la posibilidad de efecto de memoria. En ambos modos de inyección el flujo de purga del *septum* se fijó en 4.0 mL/min.

La temperatura inicial de la columna cromatográfica era de 60 °C durante 2 min, ésta se incrementó con una velocidad de 65 °C/s hasta 175 °C, y entonces se incrementó de nuevo a 45 °C/min hasta 240 °C y se mantuvo durante 3.05 min. Las rampas de temperatura utilizadas son las máximas permitidas por la configuración instrumental utilizada. El gas portador era He y el flujo era de 1.4 mL/min. El tiempo total del análisis cromatográfico era 8.26 min.

Los parámetros del μ ECD eran los siguientes: una temperatura de detección de 300 °C y un flujo de gas auxiliar (N_2) de 20 mL/min.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Optimización de las variables involucradas en el proceso de extracción

Para llevar a cabo estos estudios se seleccionó un grupo de compuestos clorados con propiedades diferentes en lo que respecta a su volatilidad, polaridad y grado de interacción con las matrices de suelos. El grupo de compuestos seleccionado incluye: un compuesto volátil, el cloroformo (CFM) y dos compuestos semi-volátiles, 1,2-diclorobenceno (12DCB) y hexaclorobenceno (HCB). La volatilidad (expresada como punto de ebullición), la polaridad (expresada como el valor de los respectivos log K_{ow}) y el grado de interacción con el suelo (expresado como el valor de la constante de partición de carbono orgánico, K_{oc}) para los compuestos de interés se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Características de los compuestos objeto de estudio

Compuestos	Punto de ebullición (°C)	Log K_{ow}	K_{oc} (L/kg)
CFM	62	1.97	40
12DCB	180-183	3.38	617
HCB	323-326	6.2	54954

4.1.1. Selección del disolvente de extracción

La técnica de pretratamiento de muestra QuEChERS puede considerarse una adaptación de la técnica convencional de extracción líquido-líquido asistida por sales (*salting-out assisted liquid-liquid extraction*, SALLE) a la nueva tendencia en química analítica de minimización del tratamiento de la muestra, así como del volumen de disolventes utilizados.

Los tres disolventes más comúnmente utilizados en el análisis mediante SALLE han sido MeCN, acetona y EtOAc, debido a que con ellos se ha

conseguido una buena separación de fases (acuosa/orgánica). El método se ha aplicado especialmente en la extracción de pesticidas en diferentes matrices alimentarias y con los tres disolventes citados se han conseguido altas recuperaciones. Sin embargo, se pueden citar una serie de ventajas y desventajas del uso de cada uno de éstos disolventes [8,13,30]:

La acetona es completamente miscible con el agua, por lo que para lograr una adecuada separación de fases es necesaria la adición de un disolvente no polar, que da lugar a la dilución del extracto orgánico y probablemente a menores recuperaciones de los analitos más polares. Además, el bajo punto de ebullición de este disolvente (56 °C frente a 77 °C y 82 °C del EtOAc y MeCN, respectivamente) constituye una desventaja durante el proceso de extracción, ya que pueden producirse variaciones en el volumen del extracto, y la exposición del analista al disolvente es mayor.

El EtOAc tiene una baja solubilidad en el agua, por lo que basta con la adición de un agente desecante para lograr una adecuada separación de fases. La principal desventaja del uso de acetato de etilo en la extracción de pesticidas de matrices vegetales es que los extractos obtenidos contienen altas cantidades de compuestos no polares co-extraídos de la matriz, como grasas y materiales lipofílicos. Lehotay y colaboradores han realizado varios estudios en los que concluyen que la co-extracción de compuestos lipídicos de las matrices alimentarias decrece en el orden EtOAc>acetona>MeCN [8,31].

El MeCN, al igual que la acetona, es altamente miscible con el agua, sin embargo, se puede conseguir una buena separación de fases con la adición de una determinada cantidad de sales. Las principales desventajas del uso de este disolvente son su precio, que es superior al de los otros dos disolventes, y su mayor toxicidad.

Respecto a la adecuación de los disolventes para el análisis mediante cromatografía de gases, Mastovská y Lehotay [30] evaluaron y compararon

las posibilidades de MeCN, acetona y EtOAc. Los tres disolventes pueden utilizarse directamente como medio de inyección en GC. Por tanto, no es necesario el intercambio de disolvente antes del análisis cromatográfico, lo cual es muy adecuado cuando lo que se pretende es minimizar la etapa de pretratamiento de la muestra. La selección del disolvente más adecuado para el análisis cromatográfico depende de muy diversos factores entre los que se encuentran el modo de inyección y el tipo de analitos a determinar.

En este trabajo, el método de extracción QuEChERS se aplicará a la extracción de VOCs en muestras de suelos. Los suelos, a diferencia de las frutas y verduras, no contienen altas cantidades de materiales lipídicos. Los diferentes tipos de suelos presentes en la naturaleza se caracterizan por su fracción mineral (porcentajes variables de arena, limo y arcilla) y su fracción orgánica (10-15 %), principalmente compuesta por sustancias húmicas. Por tanto, la principal desventaja del EtOAc (co-extracción de compuestos polares como los lípidos) podría no ser significativa en este caso, y cualquiera de los tres disolventes orgánicos considerados podría ser adecuado para la extracción y la determinación cromatográfica de compuestos clorados procedentes de matrices de suelos. En este trabajo no se estudió la acetona debido a sus desventajas en la separación de fases y a su elevada volatilidad. Por lo tanto, los disolventes evaluados respecto a su comportamiento cromatográfico y a su poder de extracción fueron el MeCN y el EtOAc.

4.1.1.1. Estudio de los dos disolventes en relación a su adecuación para el análisis cromatográfico

Debido a las diferencias en las propiedades de los analitos objeto de estudio (ver tabla 1) y con el fin de obtener señales analíticas óptimas para cada uno de los compuestos, se decidió estudiar de forma separada el compuesto orgánico volátil de los dos compuestos semi-volátiles, ya que

éstos podrían verse influenciados de manera muy distinta por las condiciones utilizadas en la inyección.

En primer lugar se prepararon dos disoluciones de 500 µg/L de CFM, una en MeCN y otra en EtOAc, que se inyectaron en el sistema de análisis con tres de los modos de inyección permitidos por el PTV: *split* en caliente, *splitless* en caliente y *solvent vent*. La figura 2 muestra los cromatogramas obtenidos en esta experiencia.

Figura 2: Diferentes modos de inyección para el cloroformo en acetato de etilo y acetonitrilo.

Con el modo de inyección *split* en caliente, se observó que el pico del CFM era más estrecho y mejor definido cuando se inyectaba la disolución en EtOAc, que el obtenido con la disolución en MeCN. Sin embargo, la principal desventaja del modo de inyección *split* es que gran parte de la muestra se elimina por la válvula de desecho, por lo que ésta no es la técnica de inyección más apropiada para el análisis de compuestos a nivel de trazas, en los que se requiere la máxima sensibilidad.

Cuando se inyectaron las disoluciones de CFM con el modo de inyección *splitless* en caliente se consiguió un incremento significativo del área de pico, respecto a las obtenidas con el modo de inyección *split*. Si comparamos los picos obtenidos al inyectar las dos disoluciones con el modo *splitless* en caliente se observa, nuevamente, un claro ensanchamiento de la forma de pico para la disolución de CFM en MeCN. Este efecto puede ser atribuido a varios factores. Por un lado, el alto volumen de expansión del MeCN (506 μL) genera un volumen de vapor y un tiempo de residencia del analito superior al del EtOAc (272 μL) (temperatura de inyección: 250 °C, presión en cabeza de columna: 9 psi, y volumen de inyección: 1 μL) [30]. Este alto volumen de expansión puede dar lugar a problemas de desbordamiento y contaminación del *liner* y, por tanto, a una pérdida parcial de los analitos de interés y falta de reproducibilidad. Por otro lado, el CFM, debido a su bajo punto de ebullición, está fuertemente influenciado por la presencia del disolvente en la columna, lo que provoca el ensanchamiento y la distorsión de los picos cromatográficos. Este efecto es más acusado y desfavorable cuando se utiliza MeCN como disolvente que cuando se utiliza EtOAc.

Cuando las dos disoluciones de CFM, en EtOAc y MeCN, se inyectaron en el sistema utilizando el modo de inyección *solvent vent* (volumen de inyección: 0.2 μL , temperatura inicial: 5 °C, tiempo de purga: 1 min, flujo de purga: 50 mL/min, tiempo de inyección 1.5 min) se observó el mismo efecto observado con los otros dos modos de inyección, de aumento de la anchura y peor definición de la forma de pico con la disolución en MeCN.

Comparando este modo de inyección con el modo *splitless* en caliente, se observa que cuando se inyecta el mismo volumen de muestra con el modo *solvent vent* se producen pérdidas de CFM. Además, con este modo de inyección se obtiene menor reproducibilidad de señales entre inyecciones.

Estos resultados pueden explicarse fácilmente por la alta volatilidad del CFM, con un punto de ebullición (61 °C) inferior a los de los disolventes (77 y 82 °C para el EtOAc y el MeCN, respectivamente). El uso de un *liner* empacutado con Tenax-TA® no resuelve el problema, debido a la retención de los disolventes estudiados en este polímero a bajas temperaturas. No obstante, ninguno de los *liners* disponibles comercialmente, rellenos con materiales adsorbentes (lana de vidrio, Carbotrap C, Carbotrap B) mostraban propiedades adecuadas para la combinación de disolventes y analitos estudiados en este trabajo.

En el caso de los compuestos semi-volátiles el uso del PTV ofrece una alternativa muy interesante para incrementar la sensibilidad del método, utilizando el modo de inyección *solvent vent*. Los puntos de ebullición de los disolventes son suficientemente bajos y, por tanto, adecuados para atrapar a los analitos en el *liner* a temperaturas relativamente altas, lo que evita la necesidad de un enfriamiento excesivo del *liner*. Por otro lado, y aún más importante, esta diferencia entre los puntos de ebullición de los disolventes y los analitos permite eliminar la mayor parte del disolvente sin que se produzcan pérdidas significativas de los analitos, lo cual posibilita la inyección de grandes volúmenes de muestra, con el consecuente incremento de sensibilidad.

La figura 3 muestra los cromatogramas obtenidos cuando se inyectan, con el modo *solvent vent*, diferentes volúmenes de las disoluciones de los dos compuestos semi-volátiles (12DCB, con una concentración de 250 µg/L y HCB en una concentración de 50 µg/L) en los dos disolventes estudiados.

Figura 3: Cromatogramas obtenidos al inyectar diferentes volúmenes de las disoluciones de los compuestos semi-volátiles en los dos disolventes, con el modo de inyección solvent vent.

Se observa que para la disolución de los compuestos en MeCN se produce una fuerte distorsión de la forma de los picos cuando se utilizan volúmenes de inyección altos. Este comportamiento del MeCN ya se había observado en el estudio realizado para el CFM. En este caso, para analitos semi-volátiles, la eliminación del disolvente a una temperatura relativamente alta (30 °C) permite la inyección de hasta 1 µL en modo *solvent vent* sin que se produzca una distorsión de los picos cromatográficos. Por otro lado, debido a los altos puntos de ebullición de estos compuestos, su elución se produce cuando la temperatura de la columna cromatográfica es alta y, por tanto, cuando el disolvente ha eluído completamente, reduciendo así la distorsión generada por éste. Sin embargo, para

volúmenes de inyección más altos, la cantidad de MeCN que se elimina durante el proceso de venteo no es suficiente y se introduce en la columna cromatográfica un volumen de disolvente demasiado alto que provoca los problemas de ensanchamiento y distorsión de la forma de pico característicos de los efectos del disolvente en cromatografía de gases.

En lo que respecta al EtOAc, a medida que aumenta el volumen de muestra inyectado se produce un incremento de la señal cromatográfica, por lo que se consigue un aumento de la sensibilidad. En este caso, el menor volumen de expansión del EtOAc reduce el efecto del disolvente en la columna cromatográfica permitiendo volúmenes de inyección de, al menos, hasta 5 μL sin que se produzca distorsión de los picos cromatográficos. La diferencia en las señales obtenidas cuando se inyectan 3 y 5 μL nos permite predecir que la inyección de volúmenes superiores no mejoraría significativamente los resultados.

Por tanto, desde un punto de vista cromatográfico, el EtOAc presenta ventajas de mejor resolución para los compuestos estudiados y permite la inyección de mayores volúmenes de muestra, utilizando el modo de inyección *splitless* en caliente para el cloroformo (0.2 μL con las condiciones experimentales optimizadas) y el modo *solvent vent* para los compuestos semi-volátiles (5 μL en las condiciones experimentales optimizadas), lo cual da lugar a una mayor sensibilidad del método cromatográfico.

Sin embargo, en el caso de utilizar el acetonitrilo como disolvente, las condiciones óptimas de inyección implicarían: inyección en el modo *split* en caliente para el cloroformo (1.0 μL , relación de *split* 1:4) y el modo *splitless* en caliente para los compuestos semi-volátiles (1.0 μL).

4.1.1.2. Estudio de los dos disolventes en relación a su eficacia en la extracción de compuestos de matrices de suelos

Una vez que los disolventes han sido comparados en relación a su comportamiento cromatográfico, se realizó un estudio para determinar los diferentes parámetros relacionados con la eficacia de extracción del método en muestras de suelo.

El método de extracción utilizado para esta experiencia sigue las principales etapas y proporciones del método QuEChERS original (excepto la etapa de limpieza de los extractos): 2.5 g de suelo dopado se homogeneizaron con 1.5 mL de agua, utilizando un Vortex, entonces se añadieron 2.5 mL de disolvente y la muestra se agitó de nuevo. A continuación, se añadió una combinación de $\text{MgSO}_4:\text{NaCl}$ (1g:0.25g), agitando la mezcla con Vortex y por último, la muestra se sometió a un proceso de centrifugación. Tras la centrifugación el extracto orgánico se inyectó directamente en el sistema cromatográfico.

Los extractos orgánicos se inyectaron utilizando el modo de inyección adecuado para cada grupo de los compuestos con cada uno de los disolventes considerados. Las recuperaciones de los compuestos se calcularon por comparación de las señales obtenidas al inyectar los extractos procedentes de los suelos, con las señales que se obtuvieron al inyectar disoluciones de los analitos en cada uno de los disolventes con las mismas concentraciones que en los suelos dopados. Cada muestra se analizó por triplicado y se consideró el valor medio de las tres inyecciones.

Los resultados obtenidos en estos experimentos se muestran en la figura4.

Figura 4: Recuperaciones medias para los compuestos seleccionados en suelo de jardín y Vertisol, utilizando como disolventes de extracción acetonitrilo y acetato de etilo.

Son diversos los efectos que pueden contribuir a estos resultados. La hidratación del MgSO_4 es un proceso exotérmico, por lo que la mezcla se calienta durante el proceso de extracción/partición (temperaturas entre 40-45 °C). Los bajos coeficientes de partición octanol-agua (K_{ow}) para algunos de estos compuestos implican una mayor partición en el agua y por tanto baja concentración en el extracto orgánico analizado (Tabla 1). Además, los valores de la constante de partición de carbono orgánico (K_{oc}) son muy diferentes para los compuestos considerados, lo que puede afectar a las recuperaciones finales.

La alta volatilidad del cloroformo y su bajo valor de K_{ow} podrían explicar las bajas recuperaciones (entre 66 y 70 %) obtenidas para este compuesto. Para los compuestos semi-volátiles, las recuperaciones conseguidas son superiores. Las recuperaciones obtenidas oscilaban entre 83 y 92 % y están directamente relacionadas con la polaridad y con el punto de ebullición de los compuestos. El gran poder de retención del suelo para el

hexaclorobenceno parece no ser un parámetro importante, ya que para este compuesto se consiguen las más altas recuperaciones. Otros autores observaron un comportamiento similar al utilizar el procedimiento de extracción QuEChERS con compuestos que presentaban una fuerte retención en el suelo [25].

En lo que respecta a las dos matrices de suelo consideradas, se observa que el poder de extracción de la técnica es muy similar para ambas matrices, ya que no existían diferencias significativas en las recuperaciones obtenidas para los dos tipos de suelos. Este comportamiento refuerza la idea de que el poder de retención de los suelos no es un factor determinante en el proceso de extracción, ya que el contenido de materia orgánica de los dos suelos contaminados es muy diferente y sin embargo las recuperaciones obtenidas son muy similares.

Por tanto, en lo que se refiere a la extracción de los compuestos en muestras de suelos, los dos disolventes presentaban un comportamiento similar. Sin embargo, ya que el EtOAc mostraba un mejor comportamiento cromatográfico, se seleccionó éste como disolvente de extracción.

4.1.2. Adición de agua sobre las muestras

En la aplicación del método a matrices secas es muy común añadir un volumen de agua sobre las muestras, antes de someterlas al procedimiento de extracción, con el fin de hidratarlas y de hacer los poros más accesibles al disolvente de extracción [32-34]. El efecto de la humedad de las muestras se estudió mediante la adición de diferentes volúmenes de agua sobre las muestras de suelo y evaluando su influencia en las recuperaciones de los compuestos de interés. Se estudió la adición de 1.5 mL y 2.5 mL de agua ultrapura sobre alícuotas de 2.5 g de suelo de jardín dopado, y las mezclas se agitaron con el Vortex durante 1 min. A continuación se aplicó el procedimiento de extracción, utilizando las cantidades y proporciones recomendadas en el método QuEChERS original. Las recuperaciones

obtenidas fueron de 65 y 67 % para el cloroformo, 81 y 79 % para el 1,2-diclorobenceno y 91 y 93 % para el hexaclorobenceno. Estos resultados se compararon utilizando un test t de dos colas del que se concluyó que no existían diferencias significativas en las recuperaciones de los compuestos para los dos volúmenes de agua estudiados. Por tanto, se decidió añadir un volumen de 1.5 mL, que era suficiente para saturar completamente la muestras y adecuado para proporcionar una correcta homogeneización durante la etapa de agitación con el Vortex.

4.1.3. Selección de la relación g de muestra:mL de disolvente

El tamaño de la muestra es otra de las variables comúnmente estudiadas. Idealmente los métodos analíticos tratan de reducir el volumen de muestra, empleando la mínima cantidad capaz de proporcionar resultados estadísticamente fiables. Los métodos que requieren cantidades de muestra elevadas utilizan grandes volúmenes de disolvente, lo que conlleva un mayor gasto, mayores requerimientos de seguridad, necesidad de más espacio de almacenamiento, más trabajo y más tiempo.

En este estudio se seleccionaron dos posibles tamaños de muestra: 2.5 y 5.0 g. El volumen de agua y las proporciones de sales añadidas se escalaron de forma adecuada. Las muestras se sometieron al procedimiento de extracción en las mismas condiciones que se han descrito previamente y en ambos casos se empleó un volumen de disolvente de extracción de 2.5 mL. De esta manera, las relaciones muestra:disolvente consideradas fueron 1:1 y 2:1. El uso de mayores tamaños de muestra o mayores volúmenes de disolvente no era posible, ya que el tamaño del tubo de centrífuga utilizado (15 mL) evitaba la correcta homogeneización de la muestra y la adecuada extracción de los compuestos durante las etapas de agitación.

Los resultados obtenidos muestran que las señales correspondientes a los compuestos de interés cuando se utilizó la relación muestra:disolvente 2:1 eran de 1.87 a 1.98 veces superiores a las obtenidas con la relación 1:1. Por

tanto, en los casos en los que se requieren límites de detección muy bajos y la cantidad de muestra no es un factor limitante, es posible estudiar diferentes relaciones muestra:disolvente para obtener una preconcentración de los compuestos.

4.1.4. Adición de diferentes combinaciones de sales

En la publicación inicial de QuEChERS, tras la separación de fases con MeCN, se añadían sales (MgSO_4 y NaCl en proporción 4:1) para inducir la separación de fases. El MgSO_4 se añadió en una cantidad que excedía su saturación en el volumen de agua utilizado. De esta manera, se consigue reducir significativamente la fase acuosa y promover la partición de los analitos en la fase orgánica. La adición de NaCl ayuda a reducir el porcentaje de agua presente en la fase orgánica, lo que hace que esta fase sea menos polar. Esto afecta de forma negativa a la recuperación de los analitos más polares pero disminuye la co-extracción de otros compuestos polares de la matriz, que pueden interferir en la determinación.

En este trabajo hemos estudiado el efecto de la adición de sales en la versión simplificada de QuEChERS propuesta. El primer experimento que se realizó se llevó a cabo sin añadir sales. Sin embargo, el extracto orgánico obtenido no era totalmente transparente, debido a la solubilidad del agua en EtOAc (7.24 % a 20 °C) [35]. Por tanto, en el estudio final se ensayó la adición de diferentes cantidades de MgSO_4 con y sin NaCl. Para llevar a cabo los experimentos se utilizaron: un material de referencia con contenido certificado de cloroformo (RTC-CRM 631) y un suelo de jardín contaminado con 1,2-diclorobenceno y hexaclorobenceno. La tabla 2 muestra los resultados obtenidos en las diferentes experiencias. Se ha considerado el valor medio de tres determinaciones. Los valores entre paréntesis muestran la desviación estándar relativa para las tres réplicas. Se ha asignado un valor de 1.00 (en negrita en la tabla) a los valores de área de pico obtenidos cuando se utiliza la combinación de sales recomendada en el procedimiento QuEChERS original (1g de MgSO_4 y 0.25 g de NaCl para 2.5 g de muestra).

Los valores obtenidos para el resto de combinaciones de sales estudiadas han sido normalizados respecto a este valor.

Tabla 2: Influencia de las diferentes combinaciones de sales en las recuperaciones de los compuestos de interés (2.5 g de suelo)

Sales		Área de pico normalizada (RSD,%)		
MgSO ₄ (g)	NaCl (g)	CFM	12DCB	HCB
1 *	0	1.00 (0.5)	0.95 (0.57)	0.94 (0.38)
	0.25 *	1.00 (0.5)	1.00 (0.41)	1.00 (1.08)
	0.5	1.04 (4.9)	0.99 (0.63)	0.99 (0.25)
2	0	0.93 (1.4)	0.97 (0.57)	0.97 (1.02)
	0.25	0.99 (1.1)	0.97 (1.00)	0.98 (1.21)
	0.5	1.08 (1.0)	0.97 (0.41)	1.0 (0.83)

*Proporción de sales utilizada en el procedimiento QuEChERS original

Como puede observarse, no existen diferencias significativas en las áreas de pico obtenidas con las diferentes combinaciones de sales estudiadas. Además, no hay diferencias en los resultados obtenidos para el material de referencia certificado y el suelo de jardín dopado en el laboratorio. Por otro lado, la adición de NaCl no tiene un efecto significativo en la separación de fases ni en la extracción de los compuestos cuando se aplica el procedimiento a muestras de suelo (los cromatogramas obtenidos son limpios y no se observan otros compuestos interferentes, a diferencia de los resultados que se han descrito para la extracción de pesticidas en muestras de alimentos). De acuerdo con estos resultados, y con el fin de simplificar el procedimiento de extracción lo máximo posible, se decidió añadir solamente 1.0 g of MgSO₄ en el procedimiento final.

4.2. Recuperaciones y reproducibilidad obtenidas con el método de extracción optimizado

Con el procedimiento final optimizado, se realizaron estudios de recuperación y reproducibilidad para los analitos objeto de estudio, a dos

niveles de concentración y en dos matrices diferentes de suelo (suelo de jardín y Vertisol). Las concentraciones consideradas en este estudio están dentro del margen lineal del método (20 y 600 µg/kg para CFM, 50 y 2400 µg/kg para 12DCB, y 10 y 400 µg/kg para HCB) y son superiores a los límites de detección estimados para cada compuesto (2.2 µg/kg, 1.3 µg/kg y 0.15 µg/kg, respectivamente). Estas concentraciones se seleccionaron teniendo en cuenta la sensibilidad de cada compuesto en el detector. La tabla 3 muestra los resultados obtenidos, los cuales corresponden a la media de tres inyecciones en el sistema cromatográfico con las condiciones de análisis óptimas para cada compuesto. Los valores entre paréntesis indican la RSD de estas tres medidas. Las recuperaciones se calcularon mediante el análisis de disoluciones de los compuestos en EtOAc, con las mismas concentraciones que contenían los suelos dopados.

Tabla 3: Porcentajes de recuperación y RSD para los compuestos de interés en suelo de jardín y Vertisol

Compuesto	Concentración (µg/kg)	Suelo de jardín		Vertisol	
		Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)
CFM	50	62	2.0	62	1.2
	200	68	1.8	64	0.5
12DCB	625	82	1.0	83	3.4
	1562	78	1.0	79	1.5
HCB	15	93	1.9	86	1.6
	125	92	0.1	90	0.3

Las recuperaciones obtenidas para cada compuesto eran similares en las dos matrices estudiadas, a los dos niveles de concentración considerados, y oscilaban de 62 % a 93 %, con una RSD en la etapa de inyección inferior al 3.5 %. De nuevo, las recuperaciones más bajas se obtuvieron para el

compuesto más volátil (CFM), mientras que las más altas se alcanzaron para el compuesto menos volátil (HCB).

Con el fin de calcular la reproducibilidad del procedimiento completo (extracción + análisis), 10 alícuotas de una muestra de suelo dopado se sometieron al procedimiento de extracción y los extractos obtenidos se analizaron con el método optimizado. La reproducibilidad, a los niveles de concentración especificados en la tabla 4, era muy buena en todos los casos, con valores de RSD entre 3.3 y 7.6 %. Los valores de RSD más elevados correspondían al compuesto más volátil, lo que pone de manifiesto la dificultad en la extracción y determinación de este tipo de analitos.

Tabla 4: Reproducibilidad del procedimiento global propuesto ($n=10$)

Compuesto	Concentración ($\mu\text{g/kg}$)	RSD (%)
CFM	50	7.6
12DCB	19.5	3.5
HCB	0.46	3.3

5. CONCLUSIONES

Se ha evaluado una versión modificada y simplificada del método QuEChERS para la determinación de compuestos clorados en matrices de suelos.

Tanto el MeCN como el EtOAc se pueden utilizar para la extracción de los analitos, sin embargo se seleccionó el EtOAc porque mostraba ventajas en el análisis cromatográfico. Se han evaluado diferentes modos de inyección, seleccionando el más adecuado en función de las características de los analitos.

El método propuesto no requiere limpieza de los extractos y se consigue una separación de fases adecuada, añadiendo únicamente MgSO_4 a la mezcla muestra:disolvente.

Es necesario realizar nuevas investigaciones con el fin de realizar una validación más exhaustiva del método y probar su posible aplicación a diferentes compuestos orgánicos en matrices de suelos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] N. Jakubowska, B. Zygmunt, Z. Polkowska, B. Zabiegała, J. Namiésnik, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 422.
- [2] B. Gilbert-López, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, *Talanta* 79 (2009) 109.
- [3] T. Hyötyläinen, *J. Chromatogr. A* 1186 (2008) 39.
- [4] W. Wardencki, J. Curylo, J. Namiésnik, *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 275.
- [5] K. Demeestere, J. Dewulf, B. De Witte, H. Van Langenhove, *J. Chromatogr. A* 1153 (2007) 130.
- [6] T. Hyötyläinen, M.-L. Riekkola, *Anal. Chim. Acta* 614 (2008) 27.
- [7] T. Barri, J.A. Jönsson, *J. Chromatogr. A* 1186 (2008) 16.
- [8] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412.
- [9] K. Banerjee, D.P. Oulkar, S. Dasgupta, S.B. Patil, S.H. Patil, R. Savant, P.G. Adsule, *J. Chromatogr. A* 1173 (2007) 98.
- [10] J.F. García-Reyes, M.D. Hernando, C. Ferrer, A. Molina-Díaz, A.R. Fernández-Alba, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7308.
- [11] P. Payá, M. Anastassiades, D. Mack, I. Sigalova, B. Tasdelen, J. Oliva, A. Barba, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 1697.
- [12] D.A. Lambropoulou, T.A. Albanis, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 1663.
- [13] A. Hercegová, M. Dömötörövá, E. Matisová, *J. Chromatogr. A* 1153 (2007) 54.
- [14] C. Lesueur, P. Knittl, M. Gartner, A. Mentler, M. Fuerhacker, *Food Control* 19 (2008) 906.
- [15] T. Cajka, J. Hajslova, O. Lacina, K. Mastovská, S.J. Lehotay, *J. Chromatogr. A* 1186 (2008) 281.
- [16] T.D. Nguyen, J.E. Yu, D.M. Lee, G.H. Lee, *Food Chemistry* 110 (2008) 207.

-
- [17] S.J. Lehotay, J. AOAC Int. 90 (2007) 90.
- [18] F. Plössl, M. Giera, F. Bracher, J. Chromatogr. A 1135 (2006) 19.
- [19] C.K. Fagerquist, A.R. Lightfield, S.J. Lehotay, Anal. Chem. 77 (2005) 1473.
- [20] K. Mastovská, A.R. Lightfield, J. Chromatogr. A 1202 (2008) 118.
- [21] A. Posyniak, J. Zmudzki, K. Mitrowska, J. Chromatogr. A 1087 (2005) 259.
- [22] M.M. Aguilera-Luiz, J. L. Martínez Vidal, R. Romero-González, A. Garrido Frenich, J. Chromatogr. A 1205 (2008) 10.
- [23] G. Stubbings, T. Bigwood, Anal. Chim. Acta 637 (2009) 68.
- [24] B. Kinsella, S.J. Lehotay, K. Mastovska, A.R. Lightfield, A. Furey, M. Danaher, Anal. Chim. Acta 637 (2009) 196.
- [25] C. Lesueur, M. Gartner, A. Mentler, M. Fuerhacker, Talanta 75 (2008) 284.
- [26] Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Summaries & Evaluations, vol. 73, International Agency for Research on Cancer, 1999.
- [27] Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Summaries & Evaluations, vol. 79, International Agency for Research on Cancer, 2001.
- [28] A. McCulloch, Chemosphere 50 (2003) 1291.
- [29] L. Zoccolillo, L. Amendola, C. Cafaro, S. Insogna, J. Chromatogr. A 1077 (2005) 181.
- [30] K. Mastovská, S.J. Lehotay, J. Chromatogr. A 1040 (2004) 259.
- [31] S.J. Lehotay, A.R. Lightfield, J.A. Harman-Fetcho, D.A. Donoghue, J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 4589.
- [32] C. Díez, W.A. Traag, P. Zommer, P. Marinero, J. Atienza, J. Chromatogr. A 1131 (2006) 11.
- [33] T.D. Nguyen, E.M. Han, M.S. Seo, S.R. Kim, M.Y. Yun, D.M. Lee, G.H. Lee, Anal. Chim. Acta 619 (2008) 67

- [34] U. Koesukwiwat, K. Sanguankaew, N. Leepipatpiboon, *Anal. Chim. Acta* 626 (2008) 10.
- [35] E.W. Washburn (Ed.), *International Critical Tables of Numerical Data, Physics, Chemistry and Technology*, first electronic ed., Knovel, Norwich, New York, 2003.

PUBLISHED ARTICLE

Simplified QuEChERS approach for the extraction of chlorinated compounds from soil samples

Carmelo García Pinto, María Esther Fernández Laespada, Sara Herrero Martín, Ana María Casas Ferreira, José Luis Pérez Pavón*, Bernardo Moreno Cordero

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Salamanca, 37008 Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 September 2009

Received in revised form 3 December 2009

Accepted 10 December 2009

Available online 16 December 2009

Keywords:

Simplified QuEChERS approach

Chlorinated compounds

Soil samples

ABSTRACT

A simplified version of the QuEChERS method for the extraction of chlorinated pollutant compounds from soil samples is proposed. The procedure involves simple liquid extraction of the soil sample with ethyl acetate, followed by the addition of anhydrous MgSO_4 . Gas chromatography/electron capture detection (ECD) is then used to analyse the extracts without any other sample pretreatment. This new QuEChERS version includes, therefore, fewer treatment stages of the sample, which makes the final procedure simpler, faster, and cheaper and minimizes the creation of errors associated with this step. Three chlorinated compounds (chloroform, 1,2-dichlorobenzene, and hexachlorobenzene) of different volatility and polarity have been selected as target compounds and two different solvents (acetonitrile and ethyl acetate) have been evaluated in order to prove the suitability of the proposed approach for the extraction of these compounds from different soil samples. The suitability of the acetonitrile and ethyl acetate for PTV-GC analysis has also been evaluated. Recoveries between 62 and 93% and reproducibilities between 3.5 and 7.6% have been achieved.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Determination of organic volatile/semivolatile compounds in environmental samples, such as air, water, soil or sediments usually requires special pretreatment prior to the final determination, most often performed by gas chromatography. This pretreatment involves the isolation from the matrix of the compounds of interest and their transfer to other medium, ideally with the simultaneous removal of interfering substances and selective enrichment in the receiving medium to a concentration higher than the detection limit of the proposed procedure [1].

The choice of sample treatment applied depends heavily on the complexity of the matrix. Water, in general, represents a less complicated matrix than air, sediment or soil samples. This choice is also related to the detection method. The more sensitive and specific detection method is used, the less stages of sample treatment will be required [2]. Modern analytical strategies tend towards automatization and integration of sample pretreatment in the chromatographic systems as far as possible [3].

Development of solventless (or at least with low solvent consumption) sample preparation techniques constitutes a pillar of green analytical chemistry [4] and has taken a rapid development

during last years. The great interest in this approach is due to toxicological, environmental and economical aspects. A number of techniques with those characteristics have been developed [5,6] such as single drop microextraction (SDME), liquid phase microextraction (LPME), solid phase microextraction (SPME) and stir-bar sorptive extraction (SBSE). Among techniques based in gas extraction, static headspace (SHS), purge and trap (P&T) and closed loop stripping analysis (CLSA) could be mentioned. Membrane extraction approaches such as membrane assisted solvent extraction (MASE), membrane extraction with sorbent interface (MESI) or membrane inlet mass spectrometry (MIMS) have also been applied to environmental samples [7].

QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) procedure was introduced by Anastassiades in 2003 as a new approach to extract a wide range of pesticides from different food matrices with high water content [8]. This basic procedure is based on a liquid partitioning with acetonitrile followed by a dispersive SPE clean-up with primary secondary amine (PSA). Modifications to the original method to ensure efficient extraction of pH dependent compounds (by using different buffers solutions) [9–12] or addition of water to dry samples in order to obtain the necessary moisture [13–15] have been introduced.

To remove matrix components in the clean-up step, modifications of the original dispersive SPE step by using graphitized carbon black (GCB) and C_{18} sorbent [10], SPE in cartridge [16] or Florisil cartridges [17,18] have been used. The QuEChERS method

* Corresponding author. Fax: +34 923 294483.
E-mail address: jlpp@usal.es (J.L.P. Pavón).

is particularly popular for determination of polar, middle polar and non-polar pesticide residues in various food matrices [19–26] because of its simplicity, inexpensiveness, amenability to high throughput, and relatively high efficiency results with a minimal number of steps. Recently, the QuEChERS method for multiple residue pesticides in fruits and vegetables has received the distinction of Official method of AOAC International [27].

Although QuEChERS has mainly been used for the determination of pesticides, some other compounds, such as pharmaceuticals [28], β -lactam antibiotics [29,30] or veterinary drugs [30–34] have been determined using QuEChERS. To the best of our knowledge the use of QuEChERS in soils is very limited [35] but with very good results. In the above-mentioned report, the clean-up step of the extracts was carried out by dispersive SPE. According to these experiences, the development of new applications and modifications of the method is of great interest.

In this paper, a new and simplified version of the QuEChERS method is proposed for the extraction of chlorinated pollutant compounds from soil samples. To solve the main disadvantage associated to the QuEChERS methodology (low preconcentration of the compounds in the extracts), analysis by gas chromatography with a micro-electron capture detector (μ ECD), which improves the selectivity and sensitivity with respect to conventional detectors, is proposed.

The main advantage of the proposed version is related to the elimination of the dispersive SPE step after the extraction. This step has demonstrated to be highly effective to reduce lipid matrix co-extracts from the extracts, and it is faster, cheaper and easier than traditional SPE clean-up procedures. However, due to the non-fatty characteristics of the soil matrices and the high degree of selectivity and sensitivity of the GC– μ ECD system, it was decided to analyse the extracts, obtained after the centrifugation step, without conducting further clean-up. In consequence, the new QuEChERS version includes fewer treatment stages of the sample, which makes the final procedure simpler, faster, and cheaper and minimizes the errors associated with this step.

In order to prove the suitability of the proposed approach, chlorinated compounds of different characteristics related to their volatility and polarity have been chosen. These analytes are very important organic pollutants, because of their common use and high toxicity. The International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified the three target compounds as possibly carcinogenic to humans (Group 2B), based on limited evidence of carcinogenicity in humans but sufficient evidence of this in experimental animals. Two solvents (acetonitrile and ethyl acetate) have been evaluated in terms of their suitability for chromatographic analysis and of their extraction efficiency from different soil matrices.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Chloroform (99.9% purity) was supplied by Supelco (Bellefonte, PA, USA) and 1,2-dichlorobenzene (99% purity), and hexachlorobenzene (99% purity) were from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Acetonitrile (MeCN) was from Merck (Darmstadt, Germany) and ethyl acetate (EtOAc) from Sigma–Aldrich. Magnesium sulfate anhydrous and sodium chloride were from Scharlau (Barcelona, Spain). Ultrapure quality water obtained with an Elgastat UHQ water purification system was used.

2.2. Standard solutions

Stock solutions (500 mg/L in ethyl acetate or acetonitrile) of each compound were prepared and stored in a refrigerator at 4 °C. From

these, different solutions were prepared by dilution in each of the solvents. They were used in the studies of the different modes of injection, as well as in the spiking of soils at the required concentration levels.

2.3. Soil samples

Three different types of soils were used to evaluate the proposed QuEChERS methodology. Two collected soils: a garden soil, with high organic content (Salamanca, Spain), and a Vertisol, which has a high percentage of clay (Tabasco, Mexico), as well as a certified reference material RTC-CRM631 (silty clay soil) with certified content for chloroform purchased from LGC Promochem (Barcelona, Spain). The absorption capacity of soils is strongly governed by their contents in sand, clay and organic matter. Therefore, the soils studied are extreme examples of soil types, and the results obtained could be extrapolated to most natural soils.

In order to avoid the presence of any of the compounds studied in the soils, collected samples (garden soil and Vertisol) were air-dried on a heating plate at 90 °C for 48 h, with frequent turning. This procedure removed any organic traces or humidity from the soil. These soil blanks were checked to be free of the target analytes before spiking.

The spiking procedure was as follows: 20 g of soil was placed in a 100 mL amber flask and 2 mL of the target analytes solution (at suitable concentrations) in ethyl acetate was added. The flask was hermetically sealed and shaken vigorously for 15 min to achieve perfect homogenization of the compounds in the matrix. To allow the interaction between the compounds and the matrix the samples were stored in a refrigerator at 4 °C for 15 days.

2.4. Apparatus

Gas chromatographic analysis was performed with an Agilent 7890A chromatograph equipped with a ^{63}Ni micro-electron-capture detector (μ ECD). According to the specifications, the detection zone volume of this detector is 10 times smaller than any other ECD, which translates into greater sensitivity and decreases the chance of cell contamination. A DB-VRX capillary column (20 m $\times$ 0.18 mm $\times$ 1 μm) for fast gas chromatography from Agilent J&W was used. The carrier gas was helium N50 (99.995% pure; Air Liquide).

All experiments were carried out with an Agilent 6890 PTV inlet. The PTV was equipped with a 71 mm $\times$ 2 mm liner (internal volume of 180 μL) packed with Tenax-TA, a hydrophobic polymer designed to trap organics. The sample was introduced through an automatic liquid sample injection system (Agilent 7683).

2.5. Analytical procedure

For sample pretreatment with the simplified QuEChERS approach, 2.5 g of soil sample was weighed in a 15 mL glass centrifuge tube with screw cap, which keeps the tube closed for most of the process of sample preparation, thus avoiding as much as possible losses of volatile compounds during this stage. 1.5 mL of ultrapure water was added on the soil sample in order to make pores in the sample more accessible to the extraction solvent and to homogenize water content in different soil samples and the mixture was shaken for 1 min with a Vortex device. Then, 2.5 mL of ethyl acetate (extraction solvent) was added and the mixture was shaken again during 1 min. Following this, 1 g of magnesium sulfate was added, shaking it for 1 min as quick as possible to prevent formation of MgSO_4 conglomerates. The tube was centrifuged at 5000 rpm during 5 min. A comparison between the original QuEChERS approach and the modifications proposed in this paper is summarized in Fig. 1.

Fig. 1. Comparison of the proposed method with the original QuEChERS adapted to dry samples.

The analysis of the extracts was performed by a GC provided with a μ ECD. Two injection modes were used: splitless injection for the volatile compound (chloroform) and solvent vent injection for semivolatiles compounds (1,2-dichlorobenzene and hexachlorobenzene).

In the splitless injection, 0.2 μ L of sample was injected and the injector temperature was kept at 250 °C throughout the analysis time. The splitless time was 1 min. In the solvent vent mode, the injector starting temperature was 30 °C. The injection volume was 5.0 μ L. The vent flow was adjusted to 20 mL/min and the vent pressure to 5.00 psi. After 0.5 min, the split valve was closed and the liner was flash-heated at 12 °C/s to 300 °C. The analytes were transferred from the liner to the capillary column (1.5 min injection time). The split valve was then opened and the liner temperature was held at 300 °C for 5.00 min to allow the cleaning of the liner thus avoiding the possibility of memory effects. In both cases, the septum purge flow was 4.0 mL/min.

The column oven temperature involved an initial temperature of 60 °C for 2 min, this was increased at 65 °C/min to 175 °C, and then further increased at 45 °C/min to 240 °C and held for 3.05 min. The latter two temperature ramps are the maximum ones permitted by

the instrumental configuration employed. The carrier gas was He and the flow was 1.4 mL/min. The total chromatographic run time was 8.26 min.

The μ ECD parameters were a detection temperature of 300 °C and a make up flow gas (N_2) of 20 mL/min.

3. Results and discussion

3.1. Selection of solvent for PTV-GC analysis

The solvents most commonly used for multiresidue analysis of pesticides have been MeCN, acetone and EtOAc; each of them gives acceptably high recoveries for a wide range of pesticides in different food matrices [8].

Regarding the suitability of the organic solvents for gas chromatography, Mastovská and Lehochay [11] evaluated and compared the possibilities of MeCN, acetone, and EtOAc. The three solvents can directly serve as a medium for GC injection and therefore solvent exchange is not required before the chromatographic analysis.

Table 1
Characteristics of the compounds under study.

Compounds	Boiling point (°C)	Log K_{ow}	K_{oc} (L/kg)
CFM	62	1.97	40
1,2-DCB	180–183	3.38	617
HCB	323–326	6.2	54954

Soil samples, in contrast with fruits and vegetables, do not have high contents of lipid materials. Different soil types are characterised by their mineral fraction (variable percentages of sand, silt and clay) and organic matter fraction (10–15%) mainly composed by humic substances. Therefore, the main disadvantage of EtOAc (co-extraction of non-polar compounds such as lipids or waxes) may not be significant here, and any of the three organic solvents could be suitable for the extraction and chromatographic determination of chlorinated compounds from soil matrices. In this work, acetone was not investigated as extraction solvent, due to its disadvantages in phase separation and to its high volatility. Therefore, MeCN and EtOAc were evaluated in relation with their chromatographic behaviour.

In order to evaluate the possibilities of the new proposed approach a set of organic chlorinated compounds with very different properties related to volatility, polarity and their interaction with soil was selected. The set of target compounds includes: a volatile compound, chloroform (CFM) and two semivolatile compounds, 1,2-dichlorobenzene (1,2-DCB) and hexachlorobenzene (HCB). The volatility (expressed as their boiling point), the polarity (expressed as the value of their $\log K_{ow}$), and the interaction with soil (expressed as the value of their organic carbon partition constant K_{oc}) for these compounds are shown in Table 1.

According to the differences in the properties of the target analytes, and in order to achieve optimal analytical signals for every compound, it was decided to study separately the volatile organic compound from the semivolatile ones, because they could be influenced in a very different way by solvent and conditions used for injection.

Firstly, 500 µg/L solutions of chloroform were prepared in MeCN and EtOAc and injected in the gas chromatograph with three different injection modes allowed by the programmable temperature vaporizer used: hot split, hot splitless and solvent vent. Fig. 2 shows the chromatograms obtained. When hot split injection mode was used it was observed that chromatographic resolution obtained with EtOAc was better than with MeCN; the peak of CFM was narrower and therefore better signal to noise ratio was obtained. However, the main disadvantage of split injection is that most of the sample is wasted through the split line, and therefore it is not the most appropriate technique for trace analysis, that requires maximum sensitivity.

When the solution of CFM in EtOAc was injected in hot splitless mode, a significant improvement in peak area and height was achieved on comparing with split injection. Nevertheless, when the same injection mode was used for the MeCN solution a clear distortion of peak shape was obtained. This poor resolution can be explained by the high expansion volume of MeCN (506 µL) which generates a larger vapour volume and analyte residence time in the injection port than ethyl acetate (272 µL). With this injection mode, most of the solvent is probably focused to the column inlet in the splitless injections, causing problems with the peak shapes. Other authors also suggest that in the splitless injection mode solvents with less volume expansion are preferred [11].

When the two solutions of CFM in EtOAc and MeCN were injected using the solvent vent mode (injection volume 0.2 µL, initial temperature 5 °C, purge time 1 min, purge flow 50 mL/min, injection time: 1.5 min) the same effect of worse chromatographic resolution and wider peak with MeCN, observed for the other two

Fig. 2. Different injection modes for chloroform in acetonitrile and ethyl acetate.

injection modes studied, was obtained. On comparing this mode with the hot splitless mode it was noticed that losses of the compounds occurred when the same amount of sample was injected in solvent vent mode. Moreover, worse peak reproducibility between injections was obtained. These results could easily be explained by the volatility of the compound (boiling point of 61 °C) which is lower than the boiling points of the solvents (77 and 82 °C for EtOAc and MeCN, respectively). The use of a liner packed with Tenax-TA® did not solve this problem, due to the retention of the solvents investigated at low temperatures. Nevertheless none of the commercially available packing materials (glass wool, carbotrap C, carbotrap B) showed better properties for the combination of solvents and analyte studied here.

In the case of semivolatile compounds, the use of a programmed temperature vaporizer (PTV) inlet offers an interesting alternative for increasing sensitivity with the solvent vent injection mode. The boiling point of the solvents are sufficiently low and, therefore, adequate to trap the analytes in the liner at acceptable high venting temperatures (to avoid a need for excessive cooling), but more importantly, to be able to eliminate the majority of the solvent by venting without losing the analytes. Additionally, this allows the injection of large sample volumes, with a consequent increase in sensitivity.

Fig. 3 shows the chromatograms obtained for the two chosen semivolatile compounds (1,2-dichlorobenzene at 250 µg/L and hexachlorobenzene at 50 µg/L) when increasingly larger acetonitrile and ethyl acetate solution volumes are injected. It is clear that, for acetonitrile, a strong distortion of the chromatographic

Fig. 3. GC/ECD chromatograms obtained by injecting (solvent vent injection mode) different volumes of semivolatile compound solutions in acetonitrile and ethyl acetate.

peaks occurs at large injection volumes, making impossible to work with injection volumes greater than 1.0 μL . This behaviour, as seen with the volatile compound, can be explained by the large volume expansion of acetonitrile. With solvent vent injection, the effect is observed at volumes larger than 1.0 μL , instead of 0.2 μL because, in the first place, this injection mode allows the removal of most of the solvent during the venting step, and, in the second place, the semivolatile compounds elute when the chromatographic column temperature is high, and therefore when the solvent has been completely eluted, thus avoiding the distortion caused by it.

Regarding ethyl acetate, on increasing the injection volume the chromatographic signal accordingly increases, thus providing better sensitivity. In this case, the boiling point of the solvent, slightly lower than that of acetonitrile, makes it possible a more effective solvent elimination during the venting process, thus allowing the injection of volumes up to 5 μL , without distortion of the chromatographic peaks. The difference in signals between 3 and 5 μL , allows to predict that injection of larger sample volumes would not improve the results significantly.

Therefore, from a chromatographic point of view, ethyl acetate presented advantages in terms of chromatographic resolution for the compounds studied and allowed larger injection volumes using hot splitless injection mode for chloroform (0.2 μL in the optimized experimental conditions) and solvent vent injection mode for semivolatile compounds (5 μL in the optimized experimental conditions), which gives rise to improved sensitivity of the chromatographic methodology.

Nevertheless, in case that acetonitrile would be used as solvent, the optimal injection conditions would imply hot split for chloroform (1.0 μL , split ratio 1:4), and hot splitless for the semivolatile compounds (1.0 μL).

3.2. Simplified QuEChERS approach applied to soil samples

Once the solvents had been compared in terms of their chromatographic resolution and analyte response, a study to determine the different parameters involved in the extraction efficiency in soil samples was done.

The extraction method used for this experience, followed the main steps and proportions of the original QuEChERS method (except for the extract clean-up): 2.5 g of spiked sample were homogenized with 1.5 mL of water using vortex mixing and then 2.5 mL of solvent were added and the sample was shaken with a vortex device again and, after that, a combination of anhydrous $\text{MgSO}_4:\text{NaCl}$ (1 g:0.25 g) was added. After centrifugation, the organic extract was directly injected into the GC system.

The organic extracts were injected using the injection mode that provided the optimal chromatographic resolution and sensitivity with reproducible results was selected. The recoveries were calculated by comparing the signals provided by the extracts with the signals obtained on injecting solutions of the analytes prepared in each of the solvents with the same concentrations as those used in spiking the soils. Each solution was analysed in triplicate and the average value of the three injections was used.

The results obtained in these experiments are represented in Fig. 4. Several effects can contribute to these results. The hydration of MgSO_4 is an exothermic process, causing the sample extract to get hot during the extraction/partitioning step (temperatures between 40 and 45 $^{\circ}\text{C}$). The low octanol–water partition coefficients (K_{ow}) for some of these compounds involve a possible high partition in the water phase and as a consequence low concentration in the analysed organic phase. Besides, the value of the organic

Fig. 4. Average recoveries of selected compounds from garden soil (G) and Vertisol (V).

carbon partition constant (K_{oc}) are very different for different compounds and could affect to the final recovery.

The high volatility of chloroform and its low value of K_{ow} could explain the low recoveries (between 66 and 70%) of this compound. For the semivolatile compounds the extraction recoveries are higher and should be mainly related to their polarity and interaction with soil. In this case, recoveries are between 83 and 92% and appear directly related to the polarity of the analytes. The strong binding to soil of hexachlorobenzene does not seem to be an important parameter as it presents the highest recovery. A similar behaviour with QuEChERS approach has been observed by other authors for compounds that present strong binding to soils [35].

Regarding the two different matrices, it can be observed that the extraction power of the technique in different complex soil samples is very similar. The recoveries found in the two soils showed no significant differences. This behaviour reinforces the idea that the binding of compounds to the soil is not a determining parameter in the extraction process given that the organic matter content in both soils is very different, but the recoveries obtained are similar.

Therefore, regarding the extraction from soil samples, the two studied solvents behave in a similar way. The better chromatographic behaviour observed for ethyl acetate led us to choose this solvent as the optimum.

In the application of the method to dry matrices, it is very common to add a volume of water to the samples, prior to the extraction step, to hydrate them and make the pores in the sample more accessible to the extraction solvent [13–15]. The effect of the moisture of the sample was studied by adding different volumes of water to the soil sample on the recoveries of the target compounds. Volumes of 1.5 and 2.5 mL of ultrapure water were added to the 2.5 g aliquots of the spiked garden soil sample, and the mixtures were vortex mixed for 1 min. Following this, the extraction procedure, using the amounts and proportions recommended in the original QuEChERS, was applied to the homogenized samples. The recoveries obtained were 65 and 67% for chloroform, 81 and 79% for 1,2-dichlorobenzene, and 91 and 93% for hexachlorobenzene, respectively. Comparison of these values by using a paired *t*-test showed that there were not significant differences in the recoveries of the compounds for the volumes of water studied. Therefore, we decided to choose a volume of 1.5 mL, which was enough to completely saturate the sample and appropriate to provide a proper homogenization of the sample during the vortex-mixing step.

Sample size is another of the commonly studied variables. Ideally, analytical methods try to reduce sample size to a minimum amount that provides statistically reliable results. Methods in which excessive sample size are used require larger solvent volumes, thus leading to more waste, greater safety concerns, greater storage, more labour and time, and more expensive than necessary.

In this study two different sample sizes were selected: 2.5 and 5.0 g of soil. Water volume and salt proportions were scaled accordingly. The samples were extracted under the same conditions as previously with 2.5 mL of extracting solvent. Thus the sample:solvent ratios studied were 1:1 and 2:1. Larger sample sizes or larger solvent volumes were not possible because the glass centrifuge tube volume (15 mL) prevented proper homogenization of the sample and adequate extraction of the analytes during shaking process.

The results obtained show that signals obtained for a 2:1 sample:solvent ratio were 1.87–1.98 times higher compared to the signals for a 1:1 ratio. These results show that, if lower detection limits are needed and sample availability is not the limiting factor, different sample:solvent ratios could be designed to obtain concentration of the analytes ensuring at all times the right conditions for the extraction.

In the initial QuEChERS publication, after the initial single-phase extraction with MeCN, salts (MgSO₄ and NaCl) were added

Table 2
Influence of different combinations of salts on the recoveries of the target compounds (2.5 g soil sample).

Salts		Normalized peak area (RSD, %) ^a		
MgSO ₄ (g)	NaCl (g)	CFM	1,2-DCB	HCB
1 ^b	0	1.00 (0.5)	0.95 (0.57)	0.94 (0.38)
	0.25^b	1.00 (0.5)	1.00 (0.41)	1.00 (1.08)
	0.5	1.04 (4.9)	0.99 (0.63)	0.99 (0.25)
2	0	0.93 (1.4)	0.97 (0.57)	0.97 (1.02)
	0.25	0.99 (1.1)	0.97 (1.00)	0.98 (1.21)
	0.5	1.08 (1.0)	0.97 (0.41)	1.0 (0.83)

^a *n* = 3.
^b Combination of salts used in QuEChERS original.

to induce phase separation. The salting-out effect resulting from addition of NaCl usually leads to increased recoveries of polar compound and allows to control the percentage of water in the organic phase. MgSO₄ was added at amounts well exceeding its saturation in water because of its ability to bind large amounts of water and thus significantly reduce the water phase and promote partitioning of the analytes into the organic phase.

In this work we have studied the effect of the addition of salts in the modified QuEChERS proposed. The first experiment was carried out without adding any salt. In this case, the upper layer is not transparent owing to the solubility of water in ethyl acetate. Therefore, different combinations of MgSO₄ with and without NaCl were studied in the extraction of RTC-CRM631 reference soil (with certified content for chloroform) and fortified garden soil samples (for 1,2-dichlorobenzene and hexachlorobenzene). Table 2 gives the results of the different experiments designed to determine this effect. Data are the average value of three determinations. Values in parentheses show the relative standard deviation for three replicates.

The peak areas obtained when the combination of salts recommended in the original QuEChERS method (1 g of MgSO₄ and 0.25 g of NaCl for 2.5 g of sample) is used have been assigned a value of 1.00 (in bold in Table 2), the values for the other assayed combinations being normalized to this value. It can be seen that there are no significant differences between the different combinations of salts studied. Moreover, there are no differences between the compound studied in the certified material (unspiked in the laboratory) and the analytes in the garden soil (polluted in the lab). The addition of NaCl does not have any significant effect in the soil matrices (the chromatograms are clean and no peaks from other compounds are observed, in contrast with the results reported for pesticides in food samples). Accordingly to these results and in order to simplify the new approach as much as possible only 1.0 g of MgSO₄ was used in the final procedure.

3.3. Analyte recoveries and reproducibility

We conducted recovery and reproducibility studies with the final method for the target analytes at different concentrations in two different matrices (garden soil and Vertisol). These concentrations are within the range of linearity of the method (20–600 µg/kg for CFM, 50–2400 µg/kg for 1,2-DCB, and 10–400 µg/kg for HCB) and well above the detection limits (2.2, 1.3, and 0.15 µg/kg, respectively). The calculated bias was below 5% for the three compounds studied. Table 3 shows the results obtained for the two fortified soil samples at different levels according to their sensitivity on the detector. The results correspond to the average of three injections on the chromatographic system in the optimal injection mode for each compound. Values in brackets indicate the RSD of these three measures. Recoveries were calculated by analyzing solutions of the compounds in EtOAc at the same concentration levels than those used to spike the soil samples; the values found were similar in the

Table 3

Percentage of recoveries and RSDs for the target compounds in garden soil and Vertisol.

Compound	Concentration level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Garden soil		Vertisol	
		Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
CFM	50	62	2.0	62	1.2
	200	68	1.8	64	0.5
1,2-DCB	625	82	1.0	83	3.4
	1562	78	1.0	79	1.5
HCB	15	93	1.9	86	1.6
	125	92	0.1	90	0.3

Table 4

Reproducibility of the global procedure proposed ($n = 10$).

Compound	Concentration level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD (%)
CFM	50	7.6
1,2-DCB	19.5	3.5
HCB	0.46	3.3

two different matrices at the two fortified levels and satisfying the 62–93% recovery range with a relative standard deviation lower than 3.5% in the injection step. Again, the lowest recoveries corresponded to the most volatile compound (CFM). On the contrary the highest were obtained for the less volatile one (HCB).

In order to calculate the reproducibility of the overall approach 10 aliquots of a soil sample were submitted to the extraction procedure and the extracts were injected using the optimized method. The reproducibility, at concentrations specified in Table 4, was very good in all cases, with standard deviation values between 3.3 and 7.6%. Even so, the highest values correspond to the volatile compound, reflecting the difficulty in the extraction and determination of this kind of analytes.

4. Conclusions

A modified and simplified QuEChERS approach has been evaluated for the determination of chlorinated compounds in soil matrices.

Both MeCN and EtOAc can be used for analyte extraction, although EtOAc is preferred because it shows chromatographic advantages. Different injection techniques have been evaluated with good results in all cases.

The proposed method does not require a clean-up step and single liquid–liquid partitioning is achieved with the addition of just MgSO_4 to the sample:solvent mixture.

Future work must be developed to address more extensive validation of this method in order to extend it to different organic compounds in soil matrices.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of the DGI (CTQ2007-63157/BQU) and the Consejería de Educación y Cultura of the Junta de Castilla y León (Projects SA112A08 and Q3718001E) for this research. S.H.M. and A.M.C.F. are also grateful to Spanish MEC for award doctoral fellowships.

References

- [1] N. Jakubowska, B. Zygmunt, Z. Polkowska, B. Zabiegała, J. Namieśnik, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 422.
- [2] B. Gilbert-López, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, Talanta 79 (2009) 109.
- [3] T. Hyötyläinen, J. Chromatogr. A 1186 (2008) 39.
- [4] W. Wardencki, J. Curylo, J. Namieśnik, J. Biochem. Biophys. Methods 70 (2007) 275.
- [5] K. Demeestere, J. Dewulf, B. De Witte, H. Van Langenhove, J. Chromatogr. A 1153 (2007) 130.
- [6] T. Hyötyläinen, M.-L. Riekkola, Anal. Chim. Acta 614 (2008) 27.
- [7] T. Barri, J.A. Jönsson, J. Chromatogr. A 1186 (2008) 16.
- [8] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, J. AOAC Int. 86 (2003) 412.
- [9] S.J. Lehotay, A. De Kok, M. Hiemstra, P. Van Bodegraven, J. AOAC Int. 88 (2005) 595.
- [10] S.J. Lehotay, K. Matovska, S.J. Yun, J. AOAC Int. 88 (2005) 630.
- [11] K. Mastovská, S.J. Lehotay, J. Chromatogr. A 1040 (2004) 259.
- [12] S.J. Lehotay, K. Mastovská, A.R. Lightfield, J. AOAC Int. 88 (2005) 615.
- [13] C. Díez, W.A. Traag, P. Zommer, P. Marinero, J. Atienza, J. Chromatogr. A 1131 (2006) 11.
- [14] T.D. Nguyen, E.M. Han, M.S. Seo, S.R. Kim, M.Y. Yun, D.M. Lee, G.H. Lee, Anal. Chim. Acta 619 (2008) 67.
- [15] U. Koesukwivat, K. Sangunkaew, N. Leepipatpiboon, Anal. Chim. Acta 626 (2008) 10.
- [16] F.J. Schenck, A.N. Brown, L.V. Podhoriak, A. Parker, M. Reliford, J.W. Wong, J. AOAC Int. 91 (2008) 422.
- [17] M.A. Aramendía, V. Borau, F. Lafont, A. Marinas, J.M. Marinas, J.M. Moreno, F.J. Urbano, Food Chem. 105 (2007) 855.
- [18] A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, E. Pastor-Montoro, R. Romero-González, Anal. Bioanal. Chem. 390 (2008) 947.
- [19] K. Banerjee, D.P. Oulkar, S. Dasgupta, S.B. Patil, S.H. Patil, R. Savant, P.G. Adsule, J. Chromatogr. A 1173 (2007) 98.
- [20] J.F. García-Reyes, M.D. Hernando, C. Ferrer, A. Molina-Díaz, A.R. Fernandez-Alba, Anal. Chem. 79 (2007) 7308.
- [21] P. Payá, M. Anastassiades, D. Mack, I. Sigalova, B. Tasdelen, J. Oliva, A. Barba, Anal. Bioanal. Chem. 389 (2007) 1697.
- [22] D.A. Lambropoulou, T.A. Albanis, Anal. Bioanal. Chem. 389 (2007) 1663.
- [23] A. Herczegova, M. Domotorova, E. Matisova, J. Chromatogr. A 1153 (2007) 54.
- [24] C. Lesueur, P. Knittel, M. Gartner, A. Mentler, M. Fuerhacker, Food Control 19 (2008) 906.
- [25] T. Cajka, J. Hajslova, O. Lacina, K. Mastovska, S.J. Lehotay, J. Chromatogr. A 1186 (2008) 281.
- [26] T.D. Nguyen, J.E. Yu, D.M. Lee, G.H. Lee, Food Chem. 110 (2008) 207.
- [27] S.J. Lehotay, J. AOAC Int. 90 (2007) 90.
- [28] F. Plössl, M. Giera, F. Bracher, J. Chromatogr. A 1135 (2006) 19.
- [29] C.K. Fagerquist, A.R. Lightfield, S.J. Lehotay, Anal. Chem. 77 (2005) 1473.
- [30] K. Mastovska, A.R. Lightfield, J. Chromatogr. A 1202 (2008) 118.
- [31] A. Posyniak, J. Zmudzki, K. Mitrowska, J. Chromatogr. A 1087 (2005) 259.
- [32] M.M. Aguilera-Luiz, J.L. Martínez Vidal, R. Romero-González, A. Garrido Frenich, J. Chromatogr. A 1205 (2008) 10.
- [33] G. Stubbings, T. Bigwood, Anal. Chim. Acta 637 (2009) 68.
- [34] B. Kinsella, S.J. Lehotay, K. Mastovska, A.R. Lightfield, A. Furey, M. Danaher, Anal. Chim. Acta 637 (2009) 196.
- [35] C. Lesueur, M. Gartner, A. Mentler, M. Fuerhacker, Talanta 75 (2008) 284.

VII

DETERMINACIÓN DE TRIHALOMETANOS
EN SUELOS MEDIANTE QuEChERS
SIMPLIFICADO-CROMATOGRFÍA DE
GASES RÁPIDA-DETECCIÓN DE CAPTURA
ELECTRÓNICA

1. INTRODUCCIÓN

La extracción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) de muestras de suelo es un proceso crítico debido a la diversidad y complejidad de las matrices y a las bajas concentraciones y alta volatilidad de los compuestos. Este procedimiento se ha llevado a cabo principalmente mediante técnicas de generación de espacio de cabeza [1].

La Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (USEPA) propone: generación de espacio de cabeza estático (SHS) [2], purga y trampa (P&T) [3] y destilación a vacío [4] como técnicas de extracción para la determinación, mediante cromatografía de gases, de VOCs en suelos y otras matrices sólidas [5,6].

Muchos artículos basados en cromatografía de gases utilizan como técnicas de extracción: HS [7-11], P&T [12-14] y HS-microextracción en fase sólida (SPME) [7,15,16]. Las técnicas de generación de espacio de cabeza tienen las ventajas de que no utilizan disolventes, la manipulación de la muestra es mínima y son fáciles de automatizar en procedimientos en línea. El principal inconveniente es que son técnicas bastante dependientes de la matriz cuando se trabaja con muestras tan complejas como los suelos, en los que tienen lugar fuertes interacciones entre los analitos y otros componentes de la matriz. Debido a este hecho, en algunas ocasiones, no se consigue la eficacia de extracción deseada.

En los últimos años, se han propuesto algunas estrategias para mejorar la eficacia de la extracción. Algunos artículos describen el uso de una etapa de extracción con metanol, previa al análisis mediante P&T [17,18]. Otros autores proponen el uso de un dispositivo de SPME enfriado internamente [19], o la técnica de generación de espacio de cabeza múltiple-SPME [20].

Cuando se utiliza la modalidad de generación de espacio de cabeza más sencilla (SHS), el inconveniente de baja preconcentración de los compuestos en la fase gaseosa se suma a los mencionados anteriormente. Nuestro grupo

de investigación ha propuesto una alternativa para resolver esta desventaja que consiste en el acoplamiento de SHS con un inyector de temperatura programada (PTV) para preconcentrar los compuestos antes de inyectarlos en el sistema cromatográfico [21].

También se han propuesto métodos no separativos para este tipo de análisis, como HS-MS [9,11,22] y purga y membrana (PAM)-MS [23].

En el año 2003, Anastassiades y colaboradores [24] introdujeron un nuevo método para extraer una amplia variedad de residuos de pesticidas en matrices de frutas y verduras. El método se denominó QuEChERS y ha recibido gran aceptación a nivel mundial.

El método original está basado en extracción líquido-líquido asistida por sales, utilizando un disolvente miscible o parcialmente miscible con el agua. Tras la extracción, los extractos se sometían a un procedimiento de limpieza que se denominó extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE), en el que como adsorbente se ha utilizado principalmente amina primaria secundaria (PSA). Recientemente este método ha recibido la distinción de Método Oficial de la AOAC Internacional [25].

El uso de QuEChERS con matrices de suelos ha sido muy limitado hasta la fecha [26,27]. En ambos artículos se aplicó el método a la determinación de pesticidas en este tipo de matrices, y se utilizó una etapa de limpieza (d-SPE) tras la extracción.

Recientemente, se ha propuesto una nueva simplificación del método QuEChERS para la extracción de compuestos clorados, volátiles y semi-volátiles, de muestras de suelos [28]. La nueva versión incluye algunas simplificaciones respecto al método original. La principal ventaja del método simplificado es la eliminación de la etapa de limpieza (d-SPE) tras la extracción, lo que hace que el procedimiento final sea más sencillo, rápido, económico y se minimiza la probabilidad de cometer errores experimentales.

2. OBJETIVOS

En este trabajo se propone el uso del método de extracción QuEChERS simplificado para la determinación de trihalometanos en muestras de suelos, mediante cromatografía de gases con detección de captura electrónica. Debido a la alta selectividad y sensibilidad del detector de captura electrónica para los compuestos halogenados, se pretende poner a punto una metodología con buenos límites de detección, a pesar de los bajos factores de preconcentración obtenidos con QuEChERS.

Se optimizarán las variables relacionadas con la determinación cromatográfica de los compuestos, se estudiará la posible existencia de efecto de matriz (habitual en este tipo de muestras) y se determinarán las características analíticas del método en muestras de suelo de jardín dopadas. Para validar la metodología propuesta se utilizarán dos materiales de referencia certificados (CRMs).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos

El acetato de etilo (EtOAc), de grado HPLC (CHROMASOLV® Plus), fue suministrado por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El cloroformo (pureza: 99.9 %), bromodichlorometano (pureza: 99.9%), dibromodichlorometano (pureza: 99.9 %) y bromoformo (pureza: 96.9 %) fueron suministrados por Supelco (Bellefonte, PA, USA). Las principales características de los analitos objeto de estudio se muestran en la tabla 1. El sulfato de magnesio deshidratado (extra puro) y el cloruro sódico (grado reactivo) fueron suministrados por Scharlau (Barcelona, España). El agua ultrapura se obtuvo mediante un sistema de purificación de agua Elgastat.

Tabla 1: Puntos de ebullición, tiempos de retención (t_R), anchura de pico a media altura (w_h), coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow}) y constante de partición de carbón orgánico (K_{oc})

Compuestos	Punto de ebullición (°C)	t_R (min)	w_h (s)	Log K_{ow}	K_{oc} (L/kg)
Cloroformo (CFM)	61	2.44	0.41	1.97	40
Bromodichlorometano (BDCM)	90	2.76	0.83	2.0	87
Dibromodichlorometano (DBCM)	117	3.25	0.81	2.16	107
Bromoformo (BFM)	149	3.72	0.82	2.35	126

3.2. Disoluciones estándar y muestras

3.2.1. Disoluciones estándar

Se preparó una disolución de trihalometanos en acetato de etilo (5.00 mg/L), que se almacenó en el frigorífico a 4 °C. A partir de esta disolución se prepararon diferentes diluciones, que se utilizaron para optimizar las condiciones experimentales del método y para dopar las muestras de suelo y agua.

3.2.2. Muestras

3.2.2.1. Suelos dopados

Las matrices de suelo dopado se utilizaron para la optimización de la etapa de pretratamiento de la muestra, para comprobar la posible existencia de efecto de matriz y para determinar las características analíticas del método. Se utilizaron dos tipos de suelos diferentes: un suelo con un alto contenido orgánico, recogido de un jardín público (Salamanca, España) y un Vertisol, que tiene un alto porcentaje de arcilla (Tabasco, México).

Los suelos recolectados se desecaron al aire sobre una placa calefactora a 90 °C, durante 48 horas, removiendo frecuentemente. Con este procedimiento se conseguía eliminar del suelo la humedad y prácticamente cualquier concentración de los analitos de interés. Los suelos desecados se analizaron antes de doparlos para comprobar que estaban libres de los VOCs estudiados. En los cromatogramas obtenidos se observa la presencia de un pico correspondiente al cloroformo en una concentración a nivel traza. Sin embargo, este mismo pico se obtiene cuando se analiza EtOAc puro. En diferentes artículos publicados se ha descrito la ubicuidad de este compuesto en el ambiente y la presencia de niveles traza en los blancos analizados [29-31]. Como consecuencia, en todas las muestras analizadas, se restó al área de pico del cloroformo la correspondiente a la señal del blanco.

El procedimiento utilizado para dopar los suelos es el siguiente: 20 g de suelo se depositan en un vial de 100 mL y sobre él se añaden 2 mL de una disolución de los analitos en EtOAc (en concentraciones adecuadas). El vial se sella herméticamente y se agita vigorosamente durante 15 minutos para conseguir la perfecta homogenización de los compuestos en la matriz. Finalmente, las muestras se almacenan en el frigorífico (4 °C) durante 15 días para lograr que tenga lugar la interacción entre los compuestos y la matriz.

3.2.2.2. Materiales de referencia certificados (CRMs)

Con el fin de validar el método optimizado se analizaron dos suelos comerciales con contenidos certificados de los compuestos a estudiar. Los CRMs utilizados fueron: un suelo arcillo-limoso (RTC-CRM631) y un suelo arcilloso (RTC-CRM635), ambos suministrados por LGC Promochem (Barcelona, España).

3.2.2.3. Muestras de agua

Las muestras de agua dopada se utilizaron en el estudio del efecto de matriz. Se prepararon disoluciones de los compuestos en agua ultrapura y las muestras se sometieron a los mismos procesos de extracción y análisis cromatográfico a los que se someten las muestras de suelo. El agua ultrapura utilizada para preparar las disoluciones no contenía concentraciones detectables de ninguno de los THMs, excepto para el cloroformo, que estaba presente en todos los blancos analizados, como se ha mencionado anteriormente.

3.3. Instrumentación

La configuración instrumental utilizada es la descrita en el apartado 2 de la sección III “*Configuraciones instrumentales utilizadas*”.

El análisis mediante cromatografía de gases se realizó con un Agilent 7890A. La columna capilar utilizada era una DB-VRX para cromatografía de gases rápida (20 m x 0.18 mm x 1 µm) de Agilent Technologies (J&W Scientific Columns, USA). El gas portador era Helio N50 (99.995% de pureza; Air Liquid). El detector utilizado era un ⁶³Ni micro-detector de captura electrónica (µ-ECD). El gas auxiliar utilizado fue nitrógeno (99.999%; Air Liquide).

El cromatógrafo de gases estaba equipado con un inyector de temperatura programada de Agilent (6890). Se utilizó un *liner* vacío con un

volumen interno de 150 μL . Para introducir las muestras en el PTV se utilizó un sistema de inyección automático (Agilent 7883).

3.4. Procedimientos analíticos

3.4.1. Pretratamiento de la muestra (QuEChERS)

Se pesaron 5 g de muestra en un tubo de centrifuga de 15 mL con tapón roscado. El tapón mantiene el tubo cerrado durante la mayor parte del proceso de preparación de la muestra, lo cual minimiza las pérdidas de los compuestos más volátiles durante esta etapa. A continuación se añadieron 3 mL de agua ultrapura sobre el suelo, con lo que se consigue homogeneizar la humedad de las diferentes muestras de suelo y facilitar la extracción de los compuestos (el agua, que es más polar que los compuestos de interés, desplaza a éstos de sus lugares de adsorción en el suelo). La mezcla se agitó durante 1 min con un Vortex. En el siguiente paso se añadieron 2.5 mL de acetato de etilo (disolvente de extracción) y la muestra se agitó vigorosamente durante 1 min, utilizando un Vortex. A continuación se añadieron 2 g de sulfato de magnesio deshidratado y la mezcla se agitó inmediatamente durante 1 min (esta acción debe llevarse a cabo de forma inmediata para evitar la formación de aglomerados que tiene lugar cuando el MgSO_4 se hidrata con el agua). Por último, el tubo se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min y el extracto orgánico obtenido se transfirió a un vial y se sometió al procedimiento de medida mediante cromatografía de gases. En la figura 1 se ha representado un diagrama esquemático del proceso completo.

Figura 1: Representación esquemática del procedimiento QuEChERS simplificado

3.4.2. Análisis mediante GC- μ ECD

Para la inyección el sistema cromatográfico se seleccionó el modo *splitless* en caliente. Se inyectó un volumen de muestra de 0.2 μ L en el *liner* a 250 °C. La temperatura del *liner* se mantuvo a 250 °C durante todo el análisis. El tiempo de *splitless* se fijó en 1 min y el flujo de purga del *septum* era de 4.0 mL/min.

La temperatura inicial de la columna era de 60 °C (1.5 min); ésta se incrementó a 65 °C/min hasta 175 °C y entonces se incrementó de nuevo a 45 °C/min hasta 250 °C, temperatura que se mantuvo durante 1.00 min. Las rampas de temperaturas utilizadas eran las máximas permitidas por el equipo. El flujo de helio era de 1.5 mL/min. Bajo estas condiciones los compuestos eluían en menos de 4 min y el tiempo cromatográfico total era de 5.94 min.

Los parámetros del μ ECD fueron: temperatura de detección 300 °C y flujo de gas auxiliar (N₂) 20 mL/min.

La adquisición de los datos se realizó con software de Agilent Technologies (Chemstation G2075BA Ver.B.03.01).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Variables involucradas en el proceso de extracción

En el capítulo VI de esta memoria se ha realizado un estudio detallado de las diferentes etapas implicadas en el método QuEChERS para la extracción de compuestos halogenados volátiles y semi-volátiles de muestras de suelos. En el citado capítulo también se realizó un estudio para seleccionar el modo de inyección más adecuado para cada grupo de compuestos.

En el estudio de selección del disolvente de extracción se probaron acetonitrilo y acetato de etilo. Aunque se obtenían recuperaciones similares de los compuestos con ambos disolventes, el acetato de etilo tenía un mejor comportamiento cromatográfico y permitía inyectar mayores volúmenes de muestra, lo que da lugar a mayor sensibilidad del método. Respecto al modo de inyección, para los compuestos volátiles (como los analitos de interés de este trabajo), el modo *splitless* en caliente es el que proporcionó mejores resultados.

La adición de agua sobre muestras secas es un procedimiento muy común en QuEChERS; se seleccionó un volumen de 1.5 mL sobre 2.5 g de suelo. Este volumen era suficiente para impregnar completamente la muestra de suelo y adecuado para proporcionar una adecuada homogeneización de la mezcla durante la etapa de agitación con el Vortex.

Otro parámetro que podría afectar a la extracción de THMs en muestras de suelos y al proceso de separación de fases es la combinación de sales añadida. En el presente trabajo se ha ensayado la adición de diferentes combinaciones de MgSO_4 con y sin NaCl en la extracción de los compuestos de interés en 2.5 g del material de referencia CRM631. También se probó la posibilidad de aplicar el procedimiento de extracción sin añadir sales, sin embargo no se conseguía una adecuada separación de fases.

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos en las diferentes experiencias. Se ha considerado el valor medio de tres determinaciones. Los valores entre paréntesis muestran la desviación estándar relativa para las tres réplicas. Se ha asignado un valor de 1.00 (en negrita en la tabla) a los valores de área de pico obtenidos cuando se utiliza la combinación de sales recomendada en el procedimiento QuEChERS original (1g de MgSO_4 y 0.25 g de NaCl para 2.5 g de muestra). Los valores obtenidos para el resto de combinaciones de sales estudiadas han sido normalizados respecto a este valor. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la adición de NaCl no afecta a las recuperaciones de THMs de las muestras de suelo.

Tabla 2: Influencia de las diferentes combinaciones de sales en las recuperaciones de los compuestos de interés de 2.5 g del material CRM631

Sales		Área de pico normalizada (RSD %)			
MgSO_4 (g)	NaCl (g)	CFM	BDCM	DBCM	BMF
1*	0	1.00 (0.5)	0.95 (0.4)	0.95 (1.3)	0.98 (1.1)
	0.25*	1.00 (0.5)	1.00 (1.8)	1.00 (3.2)	1.00 (5.6)
	0.5	1.04 (4.9)	1.03 (2.6)	1.03 (4.3)	0.99 (4.3)
2	0	0.93 (1.4)	0.95 (3.1)	0.94 (4.4)	0.91 (4.3)
	0.25	0.99 (1.1)	1.01 (0.7)	1.02 (0.7)	0.98 (1.1)
	0.5	1.08 (1.0)	1.02 (0.1)	1.03 (0.8)	0.98 (1.1)

*Proporción de sales utilizada en el procedimiento QuEChERS original

Además, no se observaron diferencias en la cantidad de componentes co-extraídos de la matriz (grado de limpieza de los extractos) cuando se variaba la cantidad de NaCl añadida, como se puede observar en los cromatogramas de la figura 2.

Figura 2: Cromatogramas de los extractos procedentes de la extracción de 2.5 g del material CRM631, utilizando 1 g de MgSO_4 con diferentes cantidades de NaCl.

En la metodología QuEChERS original la adición de NaCl evita la co-extracción de los componentes polares de las matrices de alimentos y reduce la presencia de agua en la fase orgánica (MeCN). Sin embargo, las muestras de suelos no contienen tantos componentes polares como las matrices alimentarias. Estas diferencias entre las matrices de suelos y las de alimentos justificarían la no influencia del NaCl. Además, el detector utilizado en este trabajo (μECD) es altamente selectivo para los compuestos halogenados, lo que evita la detección de posibles interferentes, dando lugar a cromatogramas muy limpios. Por otro lado, el EtOAc es parcialmente miscible con agua, por tanto, tras la extracción, la cantidad de agua que permanece en el extracto orgánico es muy pequeña (sólo un 7.94 % del agua es soluble en EtOAc a 20 °C [32]), y este agua es muy fácil de eliminar mediante la adición de un agente desecante. En este trabajo, con el objetivo de simplificar la etapa de pretratamiento de la muestra lo máximo posible, se decidió no añadir NaCl en el procedimiento final.

Otra variable importante que afecta fuertemente a la sensibilidad del método es la relación muestra:disolvente. En este trabajo se han estudiado las relaciones muestra:disolvente de 1:1 y 2:1. Los tamaños de muestra considerados fueron 2.5 g y 5 g. Ambos tamaños de muestra se sometieron al procedimiento de extracción con 2.5 mL de disolvente (las cantidades de agua y sal añadidas sobre 5 g de muestra se escalaron proporcionalmente). Para esta experiencia se utilizaron dos matrices de suelo (suelo de jardín y Vertisol) dopadas a dos niveles de concentración (50 $\mu\text{g/kg}$ y 200 $\mu\text{g/kg}$) y cada una de las muestras se sometió al procedimiento de extracción utilizando las dos relaciones muestra:disolvente citadas anteriormente. Se hicieron tres inyecciones de cada extracto y se compararon los valores medios. La figura 3 muestra los resultados obtenidos.

Figura 3: Comparación de las áreas de pico obtenidas para los compuestos de interés cuando se utilizan las relaciones muestra:disolvente 1:1 y 2:1 para muestras de suelos dopadas a 50 µg/kg (a) y 200 µg/kg (b).

Cuando se utilizó la relación 2:1, el área de los picos aumentaba de 1.79 a 1.96 veces, respecto a las señales obtenidas con la relación 1:1. No se observaron diferencias significativas en los incrementos de señal obtenidos para cada compuesto, ni con las dos concentraciones ni con las dos matrices de suelos con las que se realizó la experiencia.

La cuantificación de concentraciones traza de trihalometanos en muestras de suelos requiere la máxima sensibilidad. El uso de 5 g de muestra aumenta la sensibilidad del método sin complicar o prolongar el procedimiento y, por tanto, se decidió seleccionar una relación g de muestra:mL de disolvente de 2:1 (ver apartado 3.4.1).

De esta manera, el método QuEChERS simplificado es sencillo y rápido; un solo analista puede realizar al menos 6 extracciones en una hora, sin necesidad de instrumentación costosa y utilizando pocos materiales y menos de 20 mL de EtOAc.

4.2. Variables del análisis cromatográfico

4.2.1. Parámetros cromatográficos

Con el fin de conseguir la separación rápida de los cuatro THMs se utilizaron las rampas de temperaturas máximas permitidas por el horno del cromatógrafo (ver apartado 3.4.2.). Para llevar a cabo estos experimentos se utilizó una disolución de 500 µg/L para cada uno de los compuestos.

La temperatura final seleccionada fue 250 °C, que se mantuvo durante 1 min para prevenir los posibles problemas debidos al efecto de memoria. Esta temperatura era suficiente para garantizar la elución de los compuestos y adecuada a las especificaciones técnicas de la columna cromatográfica utilizada.

La temperatura inicial de la columna cromatográfica se estudió para valores entre 45 y 60 °C. A medida que la temperatura inicial aumentaba, los tiempos de retención de los compuestos disminuían sin producirse variaciones en la forma o el área de los picos. Además, el tiempo necesario para recuperar las condiciones cromatográficas iniciales tras un análisis aumentaba considerablemente a medida que disminuye la temperatura inicial. A la vista de estos resultados se decidió seleccionar una temperatura inicial de 60 °C, que era adecuada para conseguir una buena resolución

cromatográfica de los compuestos, con tiempos de retención más cortos y el tiempo necesario para recuperar las condiciones para la siguiente inyección era de tan solo 4 min. Esta temperatura inicial se mantuvo durante 1.5 min, porque para tiempos menores se observaron problemas de reproducibilidad en el tiempo de retención y el área de pico del cloroformo, debido a la co-elución de este compuesto con el frente del disolvente.

Con las condiciones cromatográficas optimizadas el tiempo cromatográfico total era de 5.94 min, por lo que, considerando el tiempo necesario para recuperar las condiciones iniciales de análisis, era posible analizar un extracto cada 10 min, es decir, se pueden realizar aproximadamente 6 análisis por hora.

4.2.2. Parámetros del μ ECD

La temperatura del detector, 300 °C, se seleccionó teniendo en cuenta la temperatura final alcanzada en el horno del cromatógrafo y las recomendaciones del fabricante.

El flujo de gas auxiliar se estudió para los valores de 10, 20, 30 y 40 mL/min. El valor de este flujo está inversamente relacionado con la sensibilidad del método. A medida que aumenta el flujo de gas auxiliar, la muestra que eluye de la columna pasa por el detector más diluida y por tanto la altura de los picos es menor. Cuando se utilizó un flujo de 10 mL/min se observaba que los picos tenían cola. Para un flujo de 20 mL/min la forma de los picos era adecuada, con valores de simetría que oscilan de 0.89 a 1.02. Los valores de flujo de 30 y 40 mL/min no proporcionaban una mejora en la simetría de los picos, pero sin embargo tenía lugar una disminución progresiva de la sensibilidad. A la vista de los resultados se seleccionó un flujo de gas auxiliar de 20 mL/min.

4.2.3. Condiciones experimentales optimizadas

En la figura 4 se muestran los cromatogramas de un blanco de EtOAc y de una disolución de 500 µg/L de THMs en EtOAc, analizadas con las condiciones optimizadas. Los compuestos de interés eluyen en menos de 3.8 min y las anchuras de pico a media altura (w_h) están entre 0.41 y 0.82 s (Tabla 1). Por tanto, ambos parámetros se ajustan a las especificaciones consideradas para la cromatografía de gases rápida (tiempo de análisis de 1 a 10 min y w_h de 0.3 a 3 s) [33].

Figura 4: Cromatograma de una disolución de 500 µg/L de THMs en EtOAc en las condiciones experimentales óptimas.

4.3. Estudio del efecto de matriz

La presencia de efecto de matriz en la determinación de VOCs en suelos es muy común en muchas de las técnicas analíticas empleadas para este tipo de análisis. Esto es debido a la alta complejidad y heterogeneidad de las muestras y a las fuertes interacciones que experimentan algunos compuestos con los constituyentes de suelo.

En este trabajo se ha realizado un estudio para evaluar la posible existencia de efecto de matriz cuando el método QuEChERS simplificado se aplica a la extracción de THMs de muestras de suelos. Se utilizaron dos tipos de suelo diferentes (suelo de jardín y Vertisol) dopados a diferentes niveles de concentración para cada compuesto (50, 100, 150 y 200 $\mu\text{g/kg}$). Además, se dopó una muestra de agua a los mismos niveles de concentración y se sometió al mismo procedimiento de extracción aplicado a las muestras de suelo. En caso de que no existiera efecto de matriz se seleccionarían muestras de agua para realizar la calibración externa. Los extractos orgánicos obtenidos de las muestras de suelos y agua se analizaron (tres inyecciones de cada nivel) con el método optimizado y se compararon las pendientes de las rectas de calibración obtenidas para cada matriz.

Los resultados muestran que existe efecto de matriz (Figura 5). Para muchos de los compuestos había diferencias significativas entre las pendientes obtenidas en las tres matrices consideradas. Los valores de las pendientes obtenidas en suelo de jardín y Vertisol, respecto a las pendientes en agua son inferiores en un 1 y un 16 % para el CFM respectivamente, mientras que estas disminuciones son del 6 y 14 % para el BDCM, del 13 y 20 % para el DBCM y del 19 y 27 % para el BMF. Estas diferencias podrían explicarse por las diferentes interacciones que experimentan los compuestos con los distintos componentes de los dos tipos de suelos, que tienen una estructura porosa muy compleja y contienen diferentes proporciones de minerales y componentes orgánicos. Por otro lado, la influencia de la matriz es diferente para cada uno de los compuestos estudiados. Las diferencias entre las pendientes obtenidas, para cada compuesto, en las diferentes matrices aumentaban a medida que aumenta su constante de partición orgánica (K_{oc}), que proporciona información sobre el grado de adsorción de los compuestos en el suelo.

Con el fin de solucionar el efecto de matriz se ha propuesto un protocolo de adiciones estándar, que ha demostrado funcionar adecuadamente con matrices de suelo [21].

Figura 5: Pendientes obtenidas para cada compuesto en las tres matrices consideradas

4.4. Recuperaciones en diferentes matrices

Con el fin de determinar la eficacia de extracción de la versión simplificada de QuEChERS para los compuestos seleccionados en muestras de suelos, se compararon las pendientes de las rectas de calibración en suelo de jardín, Vertisol y agua con la recta obtenida al inyectar en el sistema cromatográfico disoluciones de los compuestos en EtOAc a los mismos niveles de concentración (50, 100, 150 y 200 µg/L). Para realizar estos experimentos se utilizó una relación g de muestra:mL de disolvente de 1:1, con el fin de evitar cualquier factor de preconcentración en el proceso de extracción. Al comparar las pendientes se tiene en consideración la recuperación media obtenida en cada matriz a lo largo del intervalo de concentraciones considerado (50-200 µg/L). Los valores obtenidos estaban comprendidos entre 65-94 % (Tabla 3).

Tabla 3: Recuperaciones de los compuestos de interés en las tres matrices consideradas

Matriz	Recuperaciones (%)			
	CFM	BDCM	DBCM	BFM
Agua	69	78	86	94
Suelo de jardín	70	73	74	76
Vertisol	65	67	69	68

Las mayores recuperaciones, para todos los compuestos, se obtuvieron de la muestra de agua. Sin embargo, el poder de extracción de la técnica en muestras de suelo complejas no es tan diferente, como cabría esperar, a la eficacia de extracción en las muestras de agua.

Respecto a los diferentes compuestos, los porcentajes de recuperación crecen en el orden CFM<BDCM<DBCM<BFM. En la tabla 1 se puede observar que todos los compuestos tienen coeficientes octanol-agua (K_{ow}) similares, por lo que este parámetro no debería influir en las diferentes recuperaciones obtenidas para los compuestos. La constante de partición

orgánica (K_{oc}) es relativamente baja para los THMs (de 40 a 126 L/kg) y por tanto, cabría esperar altas recuperaciones. Sin embargo, el factor crítico para estos compuestos es su alta volatilidad, que hace que las pérdidas de los mismos durante el proceso de pretratamiento de la muestra sean altamente probables. Este factor explica el orden de los porcentajes de recuperación obtenidos. Además, los buenos resultados de recuperación alcanzados demuestran las posibilidades de esta técnica de extracción con muestras de suelos, incluso cuando se trabaja con compuestos muy volátiles.

En lo que respecta a las diferentes matrices de suelo, se obtuvieron mayores recuperaciones en suelo de jardín que en Vertisol. La interpretación de estos resultados se ha realizado de manera detallada en el apartado 4.3.

4.5. Características analíticas del método en suelo de jardín dopado

En el apartado 4.3. se demostró la presencia de efecto de matriz. Como consecuencia se seleccionó una muestra de suelo de jardín como matriz para estudiar las características analíticas del método (Tabla 4).

Las muestras de suelo de jardín se doparon a diferentes niveles de concentración (50, 100, 250, 350 y 500 $\mu\text{g/kg}$). Para cada nivel de concentración, se sometieron al procedimiento de extracción tres alícuotas de 5 g de suelo, y cada uno de los extractos obtenidos se analizó por triplicado.

Tabla 4: Características analíticas del método en suelo de jardín dopado

Comp.	Pendiente	R ²	Repetitividad (%)		Reproducibilidad (%)	LD (ng/kg)	LQ (ng/kg)
			instrumental	método			
CFM	27.2±0.5	0.9966	3.7	6.7	8.3	659	1998
BDCM	238±4	0.9973	2.8	4.4	4.2	6	17
DBCM	206±3	0.9977	2.3	3.3	3.3	14	44
BMF	74±1	0.9975	2.0	2.5	2.8	159	483

Todos los calibrados mostraban un comportamiento lineal con valores de coeficiente de determinación (R²) superiores a 0.9966. La validez de los modelos generados se comprobó utilizando ANOVA y ninguno de ellos presentaba fallo de ajuste.

La repetitividad del método cromatográfico se calculó inyectando diez veces el extracto procedente de una muestra de suelo de jardín dopado con una concentración de 100 µg/kg. La repetitividad y reproducibilidad del procedimiento completo se calcularon inyectando diez extractos procedentes de someter al procedimiento de extracción y análisis cromatográfico a diez alícuotas de suelo de jardín dopado a la misma concentración. Los extractos se inyectaron en un mismo día, en el caso de la repetitividad, y a lo largo de un periodo de dos semanas en el caso de la reproducibilidad. Los valores obtenidos (expresados como RSD) se muestran en la tabla 4 y pueden considerarse altamente satisfactorios.

Los límites de detección y cuantificación se estimaron utilizando las siguientes ecuaciones:

$$LD = \frac{3.3\sigma}{S} \qquad LQ = \frac{10\sigma}{S}$$

donde σ es la desviación estándar (número de réplicas, n=10) de señal de un pico correspondiente a una relación señal/ruido de aproximadamente 3;

S es la pendiente de la recta de calibrado y 3.3 es el valor del parámetro t de Student (para n-1, 0.99).

Con la metodología propuesta se alcanzaron límites de detección de 6 a 659 ng/kg. Estos límites son del mismo orden a los que publica la USEPA para el método 5021 (HS-GC-MS), que se calculan en muestras de arena y los valores obtenidos para los THMs van de 210 a 300 ng/kg [2].

4.6. Determinación de THMs en dos materiales de referencia certificados

Con el fin de validar el método optimizado, se analizaron dos materiales de referencia (un suelo arcillo-limoso RTC-CRM631 y un suelo arcilloso RTC-CRM635) con contenido certificado de los THMs.

Debido a la existencia de efecto de matriz se propuso un método de adiciones estándar sobre las muestras de suelo contaminado para determinar de forma precisa la concentración de THMs en las muestras.

En cada suelo se consideraron seis niveles de adición estándar, analizando tres réplicas de cada nivel. Para preparar cada uno de los niveles de adición estándar se pesaron 5.0 g del material de referencia en un tubo de centrifuga de vidrio y sobre él se añadieron 50 µL de una disolución de los compuestos en EtOAc con la concentración adecuada para cada nivel. Una vez dopada la muestra, se sometió a las etapas de extracción siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.4.1.

Tabla 5: *Determinación de los compuestos objeto de estudio en dos materiales de referencia certificados*

CRM 631			
Compuesto	Valor predicho (µg/kg)	Valor de referencia (µg/kg) *	Intervalo de predicción (µg/kg) *
Cloroformo	64±5	60.4	14.0-136
BDCM	97±7	74.9	45.9-135
DBCM	146±6	84.2	2.37-166
Bromoformo	122±7	64.1	0-131
CRM 635			
Cloroformo	76±5	98.7	46.0-151
BDCM	72±8	90.6	45.9-135
DBCM	130±10	131	63.8-198
Bromoformo	81±7	74.5	27.5-122

* Valores proporcionados en el material de referencia certificado

La tabla 5 muestra las concentraciones predichas, los valores certificados y el intervalo de predicción para cada compuesto. En todos los casos el intervalo de confianza de la predicción era inferior al 8 %. Las concentraciones predichas estaban, en la mayoría de los casos, muy próximas a los valores de referencia y en todos los casos estos valores estaban dentro del intervalo de predicción especificado en el material de referencia. Estos resultados ponen de manifiesto la validez de la metodología propuesta para la determinación de estos compuestos en matrices de suelos.

5. CONCLUSIONES

Se ha implementado un método basado en extracción QuEChERS seguida de cromatografía de gases rápida y detección mediante captura electrónica para la determinación de THMs en suelos.

El método QuEChERS simplificado cumple con los requerimientos de la química “verde” y proporciona resultados altamente satisfactorios con un procedimiento rápido, sencillo y económico, que utiliza instrumental comúnmente disponible en los laboratorios de análisis.

Se han optimizado las condiciones experimentales cromatográficas. Con el método final optimizado los compuestos de interés eluyen en menos de 3.8 min, y tienen anchuras de pico a media altura (w_h) de 0.41 a 0.82 s (cromatografía de gases rápida). El tiempo necesario para recuperar las condiciones iniciales es de 4 min, por lo que es posible analizar 1 extracto cada 10 min.

Se ha demostrado la existencia de efecto de matriz, por comparación de las pendientes de las rectas de calibración en diferentes matrices.

Las recuperaciones obtenidas para los compuestos de interés en diferentes tipos de matrices se encontraban en el intervalo de 65 a 94 %.

Se han determinado las características analíticas del método en muestras de suelo de jardín dopado. Los límites de detección obtenidos (6-659 ng/kg) son del mismo orden a los descritos en literatura con otras metodologías de análisis. La repetitividad (2.5-6.7 %) y la reproducibilidad del procedimiento completo (2.8-8.3 %) pueden considerarse excelentes.

Para validar el método optimizado se analizaron dos materiales de referencia certificados: un suelo arcillo-limoso (RTC-CRM631) y un suelo arcilloso (RTC-CRM635). Se utilizó el protocolo de adiciones estándar como estrategia de calibración y los resultados obtenidos fueron altamente satisfactorios.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] N. Jakubowska, B. Zygmunt, Z. Polkowska, B. Zabiegala, J. Namiésnik, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 422.
- [2] USEPA Method 5021, Volatile Organic Compounds in soils and other solid matrices using equilibrium headspace analysis, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 5000 series, USEPA, Washington, USA, 1996.
<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/5021.pdf>
- [3] USEPA Method 5035, Closed System Purge and Trap Extraction for Volatile Organics in Soil and Waste Samples, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 5000 series, USEPA, Washington, USA, 1996.
<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/5035.pdf>
- [4] USEPA Method 5032, Volatile Organic Compounds by Vacuum Distillation, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 5000 series, USEPA, Washington, USA, 1996.
<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/5032.pdf>
- [5] USEPA Method 5000, Sample Preparation for Volatile Organic Compounds, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 5000 series, USEPA, Washington, USA, 1996.
- [6] USEPA Method 8260B, Volatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS), Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 8000 series, USEPA, Washington, USA, 1996.
<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8260b.pdf>
- [7] M. Llompart, K. Li, M. Fingas, Talanta 48 (1999) 451.
- [8] J.S. Alvarado, C. Rose, Talanta 62 (2004) 17.

- [9] J.L. Pérez-Pavón, A. Guerrero-Peña, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1047 (2004) 101.
- [10] A. Serrano, M. Gallego, J. Chromatogr. A 1118 (2006) 261.
- [11] F.A. Esteve-Turrillas, S. Armenta, S. Garrigues, A. Pastor, M. de la Guardia, Anal. Chim. Acta 587 (2007) 89.
- [12] O. Zuloaga, N. Etxebarria, J. Zubiaur, L.A. Fernández, J.M. Madariaga, Analyst 125 (2000) 477.
- [13] K.F. Haselmann, F. Laturnus, B. Svensmark, C. Gron, Chemosphere 41 (2000) 1769.
- [14] M. Rosell, S. Lacorte, D. Barceló, J. Chromatogr. A 1132 (2006) 28
- [15] M. Eriksson, J. Fäldt, G. Dalhammar, A.-K. Borg-Karlson, Chemosphere 44 (2001) 1641.
- [16] R.S. Dungan, Anal. Lett. 38 (2005) 2393.
- [17] O. Zuloaga, N. Etxebarria, L.A. Fernández, J.M. Madariaga, Anal. Chim. Acta 416 (2000) 43.
- [18] N. Campillo, P. Viñas, I. López-García, N. Aguinaga, M. Hernández-Córdoba, Talanta 64 (2004) 584.
- [19] Z. Zhang, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 67 (1995) 34.
- [20] O. Ezquerro, G. Ortiz, B. Pons, M.T. Tena, J. Chromatogr. A 1035 (2004) 17.
- [21] J.L. Pérez Pavón, S. Herrero Martín, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 6063.
- [22] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, C. García Pinto, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, A. Guerrero Peña, Anal. Chem. 75 (2003) 2034
- [23] M. Ojala, I. Mattila, T. Särme, R.A. Ketola, T. Kotiaho, Analyst 124 (1999) 1421.
- [24] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, J. AOAC Int. 86 (2003) 412.
- [25] S.J. Lehotay, J. AOAC Int. 90 (2007) 485.

-
- [26] C. Lesueur, M. Gartner, A. Mentler, M. Fuerhacker, *Talanta* 75 (2008) 284.
- [27] L. Chen, X-S. Li, Z-Q. Wang, C-P. Pan, R-C. Jin, *Ecotox. Environ. Safe.* 73 (2010) 73.
- [28] C. García Pinto, M.E. Fernández Laespada, S. Herrero Martín, A.M. Casas Ferreira, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, *Talanta* 81 (2010) 385.
- [29] J.L. Pérez Pavón, S. Herrero Martín, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A* 1194 (2008) 103.
- [30] L. Zoccolillo, L. Amendola, C. Cafaro, S. Insogna, *J. Chromatogr. A* 1077 (2005) 181.
- [31] A. McCulloch, *Chemosphere* 50 (2003) 1291.
- [32] E.W. Washburn (Ed.), *International Critical Tables of Numerical Data, Physics, Chemistry and Technology*, first electronic ed., Knovel, Norwich, New York, 2003.
- [33] E. Matisová, M. Dömötörövá, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 199.

ARTICLE SUBMITTED
FOR PUBLICATION

**DETERMINATION OF TRIHALOMETHANES IN SOIL MATRICES
BY SIMPLIFIED QUICK, EASY, CHEAP, EFFECTIVE, RUGGED
AND SAFE EXTRACTION AND FAST GAS CHROMATOGRAPHY
WITH ELECTRON CAPTURE DETECTION**

Sara Herrero Martín, Carmelo García Pinto, José Luis Pérez Pavón*, and
Bernardo Moreno Cordero

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Facultad de
Ciencias Químicas, Universidad de Salamanca. Plaza de los Caídos s/n,
37008 Salamanca, SPAIN

* Corresponding author: Tel.: +34-923-294483; Fax: +34-923-294483;
(e-mail) jlpp@usal.es

Abstract

A method based on QuEChERS extraction is proposed for the determination of trihalomethanes (chloroform, bromodichloromethane, dibromochloromethane and bromoform) in soil samples. The new version of QuEChERS adapted to soil samples consists of liquid extraction with ethyl acetate, the addition of water to moisten the samples, salting-out partitioning of the water with anhydrous MgSO_4 , and direct injection of the organic extract, obtained after the centrifugation step, into the gas chromatograph. This simplified extraction procedure maintains the advantages of the original method and avoids some steps, making the final procedure simpler, faster, and cheaper, with the consequent reduction in errors associated with sample manipulation.

The experimental conditions of the analytical method, based on fast gas chromatography (FGC) and micro-electron capture detection (μECD), were optimised. The column and oven program used allowed fast separation of the compounds in less than 4 min and the total analysis cycle time was as short as 10 min. The existence of a matrix effect was checked and the analytical conditions of the method were studied in a fortified garden soil sample. The highly sensitive and selective detector used afforded to detection limits in the order of ng/kg for the target compounds. To validate the proposed method two certified reference materials (CRMs) were analysed.

Keywords: QuEChERS approach; Trihalomethanes; Electron capture detection; Soil samples

1. Introduction

The extraction of volatile organic compounds (VOCs) from soil samples is a critical step owing to the diversity and complexity of such samples and to the low concentrations and high volatility of the compounds present in them. Extraction has mainly been performed by means of headspace techniques [1]. The United States Environmental Protection Agency (USEPA) proposes static headspace (S-HS) [2], purge and trap (P&T) [3], and vacuum distillation [4] as sample preparation techniques for GC determination of VOCs from soils and other solid matrices [5,6]. Many publications based on GC methods have reported the use of HS [7-11], P&T [12-14] and HS-solid-phase microextraction (HS-SPME) [7,15,16] as extraction techniques. Headspace techniques have the advantages of being solvent-free; sample manipulation is minimum, and they are easy to automate in on-line procedures. The main drawback is that they are somewhat matrix-dependent when matrices as complex as soils are addressed, in which strong interactions between the analytes and other sample components occur. Because of this, the desired efficiency of extraction is sometimes impossible to achieve. In recent years, some strategies aimed at improving extraction efficiency have been proposed. Some reports have described the use of a methanol extraction step prior to analysis by P&T [17,18]. Other authors have proposed the use of an internally cooled SPME device [19] or the multiple headspace-SPME technique [20]. When the simplest headspace mode (static headspace) is used, the drawback of low compound preconcentration in the gas phase is added to those mentioned above. To counter this disadvantage, our research group proposes an alternative, consisting of the coupling of S-HS with a programmable temperature vaporizer (PTV) to preconcentrate the compounds before they are injected into the GC system [21]. Non-

separative methods such as HS-MS [9,11,22] and purge and membrane (PAM)-MS [23] have also been proposed.

In 2003, Anastassiades et al [24] introduced a new approach for the extraction of a broad range of pesticide residues from fruits and vegetables. The method was given an acronymic name, QuEChERS which stands for its main advantages (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe). The original method was based on salting-out assisted liquid-liquid extraction with water miscible or partially miscible solvents like acetonitrile, acetone or ethyl acetate, among others. After the extraction process, a cleanup of the organic extract using dispersive solid-phase extraction (d-SPE) with primary secondary amine (PSA) was introduced. Recently, the QuEChERS method for multiple pesticides in fruits and vegetables has received the distinction of the Official Method of AOAC International [25].

Although QuEChERS was initially a particular “method” for pesticide residue analysis it is now starting to find use in the extraction of other types of compounds and non-food matrices [26-32]. However, to the best of our knowledge the use of QuEChERS with soil matrices has so far been very limited [33,34]. In both papers the method was applied to the analysis of pesticides in soil samples, and a cleaning d-SPE step was used after the QuEChERS extraction.

Recently, a simplified QuEChERS method for the extraction of volatile and semi-volatile chlorinated compounds from soil samples has been proposed [35]. The new version of QuEChERS eliminate the d-SPE cleanup step after the extraction, which makes the final procedure simpler, faster and cheaper, and also minimizes the creation of errors associated with this step.

In the present work we propose for the first time the use of the simplified QuEChERS extraction method for the determination of trihalomethanes in soil samples by fast GC with electron capture detection.

Trihalomethanes (chloroform, bromodichloromethane, dibromochloromethane and bromoform) are considered to be priority pollutants by the main agencies, and they are common soil contaminants. Additionally, they are of particular interest because they are known, or suspected, to be carcinogenic, such that they pose a severe risk to human health and ecosystems. The high selectivity and sensitivity of the detector used for halogenated compounds would achieve detection limits at least of the same order of that obtained with the Official Method USEPA 5021 (from 210 to 300 ng/kg for the target analytes) [2], in spite of the low preconcentration factors obtained with the QuEChERS extraction technique.

The variables related to the extraction process from soil samples were selected according to a previous paper [35] and the chromatographic determination of compounds was optimized. The existence of a matrix effect was checked and the analytical characteristics of the method were determined in a fortified garden soil sample. Two certified reference materials (CRMs) were applied to validate the proposed methodology.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Ethyl acetate was HPLC grade (CHROMASOLV® Plus) and was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Analytical standards of chloroform (99.9 % purity), bromodichloromethane (99.9 % purity), dibromochloromethane (96.9 % purity) and bromoform (99.9 % purity) were from Supelco (Bellefonte, Pa, USA). The main characteristics of the target compounds are shown in table 1. Anhydrous magnesium sulfate (extra pure) and sodium chloride (reagent grade) were from Scharlau (Barcelona, Spain). Ultrapure water used was obtained with an Elgastat UHQ water purification system.

2.2. Standard solutions and samples.

2.2.1. Standard solutions

A stock solution of trihalomethanes (5.00 mg/L) in ethyl acetate (EtOAc) was prepared and stored in a refrigerator at 4°C. Dilutions of this stock solution in EtOAc were used to optimize the experimental conditions, and to spike the soil and water samples.

2.2.2. Soil samples

2.2.2.1. Spiked soils

Soil matrices were used for the optimization of the sample pretreatment step, to check the existence of a matrix effect and to determine the analytical characteristics of the method. Two different soil types were used: a soil with a high organic content, from a public garden (Salamanca, Spain) and a Vertisol, which has a high percentage of clay (Tabasco, Mexico).

The soil samples collected were air-dried on a heating plate at 90 °C for 48h with frequent turning in order to remove any traces of the compounds of interest and humidity. The blank matrices obtained were ascertained to be free of the target VOCs before spiking. In the chromatograms obtained it is possible to note the presence of chloroform at a trace level concentration. However, the same peak was obtained when pure EtOAc was analyzed. This signal of chloroform was subtracted to all the analyzed samples. Many authors have reported the ubiquity of this compound in the environment and the presence of trace levels in the targets analyzed [36-38].

The procedure used to spike the samples was as follows: 20 g of soil was placed in a 100 mL flask and 2 mL of a THMs solution in ethyl acetate was added (at a suitable concentration for each case). The vial was sealed hermetically and shaken vigorously for 15 minutes to achieve perfect homogenization of the compounds in the matrix. The samples were stored in a refrigerator (4 °C) for 15 days to allow the interaction between the

compounds and the matrix to take place, with a view to obtaining samples that would resemble natural soils as much as possible.

2.2.2.2. CRM soils

To validate the optimised method, two commercial soils with a certified content of the target compounds were analysed. The certified reference materials (CRMs) employed were: a silty clay soil (RTC-CRM631) and a clay soil (RTC-CRM635), both of them purchased from LGC Promochem (Barcelona, Spain).

2.2.3. Water samples

Spiked water samples were used in the study of the matrix effect. Solutions of the target compounds were prepared in ultrapure water and the samples were subjected to the same procedures of extraction and chromatographic analysis applied to the soil samples. The ultrapure water used to prepare the solutions did not contain detectable concentrations of any of the trihalomethanes, except for chloroform, which was present in all the blanks analyzed, as mentioned above.

2.3. Apparatus

Gas chromatographic analysis was performed with an Agilent 7890A. The capillary column used was a DB-VRX for fast gas chromatography (20 m x 0.18 mm x 1 μ m) from Agilent J&W. The carrier gas (1.5 mL/min) was helium N50 (99.995 % pure; Air Liquide). The detector used was a ^{63}Ni micro-electron-capture detector (μ -ECD). The makeup gas used was nitrogen (99.999 %; Air Liquide).

The gas chromatograph was equipped with an Agilent 6890 Programmable Temperature Vaporizer (PTV) inlet. The liner used was an empty, deactivated multi baffle, with an internal volume of 150 μ L. To introduce the samples into the PTV, an automatic liquid sample injection system (Agilent 7683) was used.

2.4. Analytical procedures

2.4.1. Sample pretreatment (QuEChERS)

5 g of soil sample was weighed in a 15 mL glass centrifuge tube with a screw cap, which kept the tube closed during the greater part of the sample preparation process, thus avoiding losses of more volatile compounds during this stage as much as possible. 3 mL of ultrapure water was added to the soil sample, such that water, which is more polar than the target analytes, displaces them from their adsorption sites in soil. This mixture was shaken for 1 min with a vortex device. Then, 2.5 mL of ethyl acetate was added (extraction solvent) and the mixture was shaken vigorously for 1 min, using a vortex mixer at maximum speed. Following this, 2 g of anhydrous magnesium sulfate (prepared in advanced in a closed vial) was added, and the tube was immediately vortex-mixed for 1 min (this was performed immediately to prevent the formation of agglomerates that occurred when the anhydrous MgSO_4 was hydrated with water). Then, the tube was centrifuged at 5000 rpm for 5 min. Finally, the organic layer was transferred into an autosampler vial for GC analysis and subjected to subsequent measurement. A schematic diagram of the procedure is shown in figure 1.

2.4.2. GC- μ ECD analysis

The injection mode used was hot splitless. A volume of 0.2 μL of the organic extract was injected into the liner at 250 $^{\circ}\text{C}$. The liner temperature was kept at 250 $^{\circ}\text{C}$ throughout the analysis time. The splitless time was fixed at 1 min and the septum purge flow was 4.0 mL/min.

The temperature of the column was programmed from 60 $^{\circ}\text{C}$ (1.5 min); this was increased at 65 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 175 $^{\circ}\text{C}$, and then further increased at 45 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 250 $^{\circ}\text{C}$ and held for 1.00 min. The temperature ramps used are the maximum one permitted by the oven. The helium flow was 1.5 mL/min.

Under these conditions the compounds eluted in less than 4 min and the total chromatographic run time was 5.94 min.

The μ ECD parameters were: detection temperature 300 °C and make up flow gas (N₂) 20 mL/min.

Data acquisition was performed with Chemstation G2075BA Ver. B.03.01 software from Agilent Technologies.

3. Results and discussion

3.1. Variables involved in the pretreatment step for the extraction of trihalomethanes from soil samples.

In a previous publication [35] a detailed study of the different steps involved in the QuEChERS method for the extraction of volatile and semi-volatile halogenated compounds from soil samples and the most appropriate mode of injection of the extracts was done. Although similar recoveries were obtained with acetonitrile (MeCN) and ethyl acetate (EtOAc) solvents, the latter showed better chromatographic behaviour and allowed higher injection volumes, which gives rise to higher sensitivity of the chromatographic methodology. Hot splitless injection mode provided the best results for volatile compounds such as those studied in this work.

Addition of water to dry samples is very common, so a volume of 1.5 mL was added to 2.5 g of soil. This volume was enough to completely saturate the sample and appropriate to provide a proper homogenisation of the sample during the vortex-mixing step. Addition of salts may affect the extraction of the THMs from soils and the phase separation process. Different combinations of MgSO₄ with and without NaCl were studied in the extraction of 2.5 g of the CRM631 certified material.

Table 2 shows the results of experiments performed. Application of the extraction procedure without the addition of salts was also checked, but the phase separation obtained was inadequate. The presence of NaCl does not

affect the recoveries of THMs from soil sample. Moreover, there were no differences in the amount of matrix co-extracted components (degree of cleanup of the extract) when the amount of NaCl added was varied, as can be seen in the chromatograms shown in figure 2. Moreover, the detector used in this work (μ ECD) is highly selective for halogenated compounds, preventing the presence of many possible interfering matrix constituents and hence affording very clean chromatograms. Water is partially miscible with EtOAc, and therefore after extraction a small amount of water remains in the organic extract (only 7.94 % of water is soluble in EtOAc at 20 °C [39], which can easily be removed with the addition of 1 g of MgSO_4 . In order to simplify the sample pretreatment as much as possible, no addition of NaCl was performed in the final procedure.

The sensitivity of the method depends on the sample:solvent ratio. We performed a study in which sample:solvent ratios of 1:1 and 2:1 were investigated. The sample sizes studied were 2.5 g and 5 g; both sizes were extracted with 2.5 mL of solvent (the amount of water and salt used for the sample size of 5 g were scaled proportionally). For this experiment, two different soil matrices (a garden soil and a Vertisol) spiked at two concentration levels (50 $\mu\text{g/kg}$ and 200 $\mu\text{g/kg}$) were subjected to the extraction procedure using the two sample:solvent ratios described above and the extracts were injected in triplicate. Figure 3 shows the results obtained. When the ratio used was 2:1, the peak area was improved by a factor ranging from 1.79 to 1.96. No significant differences were observed in the increases in signal either with the two concentrations or with the two soil matrices with which the experiment was performed.

The use of 5 g of sample did not complicate or prolong the extraction procedure, and therefore it was decided to use a 2:1 sample:solvent ratio for maximum sensitivity; the amounts of water and salts used were scaled proportionally (see section 2.4.1). Thus, the simplified QuEChERS method was very simple and fast, a single analyst can prepare a batch of at least 6

extracts in an hour, using few materials and consuming less than 20 mL of EtOAc.

3.2. Experimental chromatographic variables

3.2.1. Chromatographic parameters

In order to perform the separation of the four THMs by fast chromatography a solution of 500 µg/L of the target compounds in EtOAc was injected. The maximum temperature ramps permitted by the oven of the chromatograph used were chosen (see section 2.4.2). The final temperature selected (250 °C) -which was maintained for 1min to prevent possible problems due to the memory effect- was sufficient to guarantee the elution of the compounds and was appropriate for the technical specifications of the chromatographic column. The initial temperature of the column was studied for values ranging between 45 and 60 °C. As the initial temperature was increased the retention times of the compounds decreased, and no differences in peak areas and shapes were observed. An initial temperature of 60 °C was chosen which was appropriate to accomplish a suitable resolution of the compounds with the shortest retention times. This value was maintained for 1.5 min, because shorter times affected to the repeatability on the retention time and peak area of chloroform owing to the co-elution of this compound with the solvent peak. With the optimized conditions, the GC runtime was 5.94 min. Thus considering the time needed to achieve the initial conditions (4 min) it was possible to analyze an extracted sample every 10 min: i.e., approximately 6 analyses per hour.

3.2.2. µECD parameters

The temperature of the detector, 300 °C, was chosen taking into account the final temperature achieved in the oven and the recommendations of the manufacturer.

The makeup flow was studied for values of 10, 20, 30 and 40 mL/min. With a flow of 10 mL/min, an important peak tailing was found in the chromatogram. When a makeup flow of 20 mL/min was used, good peak shapes were obtained, with symmetry values ranging from 0.89 to 1.02. With makeup flows of 30 and 40 mL/min, no improvement in peak symmetry was obtained, whereas a progressive decrease in sensitivity occurred. Accordingly, we chose a makeup flow of 20 mL/min as the optimum value for this variable.

3.2.3. Optimized experimental conditions

Figure 4 shows the chromatograms of a blank and a 500 µg/L solution of THMs in EtOAc analyzed under the optimized conditions. The target compounds eluted in less than 3.8 min, and the widths at half height (w_h) rose from 0.41 to 0.82 s (Table 1). Therefore, both parameters match the specifications of fast gas chromatography (run times from 1 to 10 min and w_h from 0.3 to 3 s) [40].

3.3. Matrix effect

The existence of a matrix effect is very common in many of the analytical techniques used for the determination of VOCs in soils. To evaluate the possible existence of a matrix effect when the simplified QuEChERS procedure was applied, two different soil samples (a garden soil and a Vertisol) spiked at different concentration levels for each compound (50, 100, 150 and 200 µg/kg) were extracted. Additionally, a water sample spiked at the same concentration levels was subjected to the same extraction procedure applied to the soil samples. The organic extracts obtained from the soils and water samples were analyzed with the optimized GC method (three injections for each level), and the slopes of the calibration curves were compared. The results show that a matrix effect was present.

For most of the compounds there were significant differences in the slopes for the three matrices considered. Moreover, the influence of the

matrix was different for each of the compounds. Thus, the values of the slopes obtained for the garden and Vertisol soils with respect to the slopes in water were lower by 1 and 16% for the CFM, respectively, while these decreases had values of 6 and 14% for the BDCM; of 13 and 20% for DBCM, and of 19 and 27% for BFM. These differences could be explained in terms of the different interactions of the compounds in the two types of soils, which have a complex porous structure and contain different proportions of minerals and natural organic components. The differences in the recovery percentages were more evident as the K_{oc} of the compounds increased, as expected. To overcome this matrix effect, a standard additions protocol has been proposed, which has shown to work properly for soil matrices [21].

3.4. Analyte recoveries in different matrices.

In order to determine the extraction efficiency of the simplified version of QuEChERS for the target compounds, the slopes of the calibration curves in the garden soil, the Vertisol and water were compared with the curves obtained when EtOAc solutions of the compounds were injected directly at the same concentration levels (50, 100, 150 and 200 $\mu\text{g/L}$) into the GC system. To perform these experiments, a sample:solvent ratio of 1:1 was used in order to avoid any preconcentration factor. Upon comparing the slopes, the mean recoveries along the concentration range were considered. The values obtained were satisfactory, lying within the 65-94 % recovery range (Table 3). The highest recoveries for all the compounds were achieved in the water sample. Nevertheless, the extraction power of the technique in complex soil matrices was not as different as would be expected from the extraction efficiency in water samples. As can be seen in table 1, all the compounds have similar octanol-water coefficients (K_{ow}), and hence this parameter does not influence the different recoveries achieved for the compounds. The organic partition constant (K_{oc}), which provides information about the strength of binding of the compounds to the soil, is

relatively low for the THMs (from 40 to 126 L/kg) and therefore high extraction recoveries may be expected. However, the critical factor for these compounds is their high volatility, which increases the likelihood of losses during the different steps of the sample pre-treatment procedure. Nevertheless, the good recovery results obtained validate the applicability of the extraction technique to soil samples, even for highly volatile compounds.

3.5. Analytical characteristic of the method in fortified garden soil samples

A garden soil sample, spiked at different concentration levels (50, 100, 250, 350 and 500 µg/kg), was selected to study the analytical characteristics of the method (Table 4). Three aliquots of 5 g of each concentration level were subjected to the extraction procedure (Section 2.4.1.), and each of the extracts obtained was analyzed in triplicate. All the calibrations showed linear behaviour, with values of the coefficient of determination (R^2) above 0.9966. The validity of the models generated was checked using ANOVA, and none of the models generated was found to be subject of lack of fit.

The instrumental repeatability was evaluated by injecting ten times an extract obtained from a garden soil spiked at a concentration of 100 µg/kg. The repeatability of the method and the reproducibility of the whole procedure were calculated by injecting ten different extracts obtained from a garden soil sample spiked at the same concentration. The extracts were injected in a single day in the case of repeatability and over a period of two weeks in the case of reproducibility. The values (expressed as RSD) are shown in Table 4 and were highly satisfactory.

The detection limits (DLs) and quantitation limits (QLs) were estimated using the following equations [41]:

$$DL = \frac{3.3\sigma}{S}$$

$$QL = \frac{10\sigma}{S}$$

where σ is the standard deviation of peak response for ten replicates ($n = 10$) corresponding to an S/N ratio of approximately 3; S is the slope of the calibration curve, and 3.3 is Student's t factor ($n-1, 0.99$). The sample that provided the desired peak response was a garden soil sample spiked at 12.5 ng/kg for DBCM and BDCM and 50.0 ng/kg for BFM. Chloroform was present in the pure solvent, and hence 10 injections of EtOAc were used to estimate its limit of detection.

The proposed methodology afforded detection limits from 6 to 659 ng/kg. The detection limits obtained are in the same order as those reported by USEPA for the 5021 method (HS-GC-MS configuration) [2].

3.6. Determination of THMs in two different CRM soils

To validate the optimized method, two certified reference materials- a silty clay soil (RTC-CRM631) and a clay soil (RTC-CRM635) with certified contents of the four THMs- were analyzed.

A standard additions protocol was proposed for the accurate determination of trihalomethanes. A six-level calibration study was performed, analyzing three replicates from each level. Table 5 shows the calculated concentrations, the certified value, and the prediction interval for each compound. The confidence intervals of prediction were, in all cases, less than 8 %. The calculated concentrations were, in most cases, close to the reference values and, in all cases, those values were within the prediction interval specified in the certified material. This reveals the validity of the methodology proposed for the determination of these compounds in soil matrices.

4. Conclusions

For the first time a method based on QuEChERS extraction followed by fast gas chromatography and micro-electron capture detection has been implemented for the determination of THMs in soil samples. The method

meets the requirements of “green chemistry” and it uses instruments which are commonly affordable for any analytical laboratory and therefore it could be an interesting alternative to other existing methods which need specific and expensive instrumentation to perform the measurements.

With the optimized experimental conditions the target compounds elute in less than 3.8 min, with widths at half height (w_h) ranging from 0.41 to 0.82 s. The time needed to achieve initial conditions was 4 min, and hence it was possible to analyze an extract every 10 min.

The recoveries of the target compounds obtained from different types of matrices lie within the 65-94 % recovery range. The analytical characteristics of the method were calculated in a fortified garden soil sample. The detection limits achieved (6-659 ng/kg) are in the same order as those obtained using other methodologies reported in the literature. The repeatability of the method (2.5-6.7 %) and the reproducibility of the overall approach (2.8-8.3 %) can be considered excellent.

To validate the optimized method, two certified reference materials- a silty clay soil (RTC-CRM631) and a clay soil (RTC-CRM635) - were analyzed. The calibration strategy used was the standard additions protocol, and the results obtained were highly satisfactory.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of the DGI (CTQ2007-63157/BQU) and the Consejería de Educación y Cultura of the Junta de Castilla y León (Projects SA112A08 and GR87) for this research. S.H.M. is also grateful to Spain's MEC for an award doctoral fellowship.

References

- [1] N. Jakubowska, B. Zygmunt, Z. Polkowska, B. Zabiegała, J. Namiésnik, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 422
- [2] USEPA Method 5021, Volatile Organic Compounds in soils and other solid matrices using equilibrium headspace analysis, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 5000 series, USEPA, Washington, USA, 1996.
<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/5021.pdf>
- [3] USEPA Method 5035, Closed System Purge and Trap Extraction for Volatile Organics in Soil and Waste Samples, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 5000 series, USEPA, Washington, USA, 1996.
<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/5035.pdf>
- [4] USEPA Method 5032, Volatile Organic Compounds by Vacuum Distillation, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 5000 series, USEPA, Washington, USA, 1996.
<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/5032.pdf>
- [5] USEPA Method 5000, Sample Preparation for Volatile Organic Compounds, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 5000 series, USEPA, Washington, USA, 1996.
- [6] USEPA Method 8260B, Volatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS), Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 8000 series, USEPA, Washington, USA, 19.
<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8260b.pdf>
- [7] M. Llompart, K. Li, M. Fingas, *Talanta* 48 (1999) 451.

- [8] J. S. Alvarado, C. Rose, *Talanta* 62 (2004) 17.
- [9] J.L. Pérez Pavón, A. Gerrero Peña, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A* 1047 (2004) 101.
- [10] A. Serrano, M. Gallego, *J. Chromatogr. A* 1118 (2006) 261.
- [11] F.A. Esteve-Turrillas, S. Armenta, S. Garrigues, A. Pastor, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 587 (2007) 89.
- [12] O. Zuloaga, N. Etxebarria, J. Zubiaur, L.A. Fernández, J.M. Madariaga, *Analyst* 125 (2000) 477.
- [13] K.F. Haselmann, F. Laturnus, B. Svensmark, C. Gron, *Chemosphere* 41 (2000) 1769.
- [14] M.Rosell. S.Lacorte, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1132 (2006) 28.
- [15] M. Eriksson, J. Fäldt, G. Dalhammar, A.-K. Borg-Karlson, *Chemosphere* 44 (2001) 1641.
- [16] R.S. Dungan, *Anal. Lett.* 38 (2005) 2393.
- [17] O. Zuloaga, N. Etxebarria, L.A. Fernández, J.M. Madariaga, *Anal. Chim. Acta* 416 (2000) 43.
- [18] N. Campillo, P. Viñas, I. López-García, N. Aguinaga, M. Hernández-Córdoba, *Talanta* 64 (2004) 584.
- [19] Z. Zhang, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 67 (1995) 34.
- [20] O. Ezquerro, G. Ortiz, B. Pons, M.T. Tena, *J. Chromatogr. A* 1035 (2004) 17.
- [21] J.L. Pérez Pavón, S. Herrero Martín, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6063.
- [22] J.L. Pérez-Pavón, M. del Nogal-Sánchez, C. García-Pinto, M.E. Fernandez-Laespada, B. Moreno Cordero, A. Guerrero Peña, *Anal.Chem.* 75 (2003) 2034.

-
- [23] M. Ojala, I. Mattila, T. Särme, R.A. Ketola, T. Kotiaho, *Analyst* 124 (1999) 1421.
- [24] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, J. AOAC Int. 86 (2003) 412.
- [25] S.J. Lehotay, J. AOAC Int. 90 (2007) 485.
- [26] F. Plössl, M. Giera, F. Bracher, J. Chromatogr. A 1135 (2006) 19.
- [27] C.K. Fagerquist, A.R. Lightfield, S.J. Lehotay, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1473.
- [28] K. Mastovská, A.R. Lightfield, J. Chromatogr. A 1202 (2008) 118.
- [29] A. Posyniak, J. Zmudzki, K. Mitrowska, J. Chromatogr. A 1087 (2005) 259.
- [30] M.M. Aguilera-Luiz, J.L. Martínez Vidal, R. Romero-González, A. Garrido Frenich, J. Chromatogr. A 1205 (2008) 10.
- [31] G. Stubbings, T. Bigwood, *Anal. Chim. Acta* 637 (2009) 68.
- [32] B. Kinsella, S.J. Lehotay, K. Mastovská, A.R. Lightfield, A. Furey, M. Danaher, *Anal. Chim. Acta* 637 (2009) 196.
- [33] C. Lesueur, M. Gartner, A. Mentler, M. Fuerhacker, *Talanta* 75 (2008) 284.
- [34] L. Chen, X-S Li, Z-Q Wang, C-P Pan, R-C Jin, *Ecotox. Environ. Safe* 73 (2010) 73.
- [35] C. García Pinto, M.E. Fernández Laespada, S. Herrero Martín, A.M. Casas Ferreira, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, *Talanta* 81 (2010) 385.
- [36] J.L. Pérez Pavón, S. Herrero Martín, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr A* 1194 (2008) 103.

- [37] L. Zoccolillo, L. Amendola, C. Cafaro, S. Insogna, J. Chromatogr. A 1077 (2005) 181.
- [38] A. McCulloch, Chemosphere 50 (2003) 1291.
- [39] E.W. Washburn (Ed.), International Critical Tables of Numerical Data, Physics, Chemistry and Technology, first electronic ed., Knovel, Norwich, New York, 2003.
- [40] E. Matisová, M. Dömötörová, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 199.
- [41] International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology, Step 4, November 1996.

Figure legends

Figure 1: Schematic representation of the simplified QuEChERS procedure.

Figure 2: GC- μ ECD chromatograms of the CRM631 soil extracts obtained using different amounts of NaCl with 1g MgSO₄.

Figure 3: Comparison of the peak areas obtained for the target compounds when using the sample:solvent ratios of 1:1 and 2:1 for soil samples spiked at 50 μ g/kg (a) and 200 μ g/kg (b).

Figure 4: Chromatogram of a EtAOc blank and of a 500 μ g/L solution of THMs in EtOAc analyzed under the optimized conditions.

Figure 1:

Figure 2:

Figure 3:

Figure 4:

Table 1: Boiling points, retention times, widths at half height (w_h), octanol-water partition coefficients (K_{ow}) and organic carbon partition constant (K_{oc}).

Compounds	Boiling point (°C)	t_R (min)	w_h (s)	Log K_{ow}	K_{oc} (L/kg)
Chloroform (CFM)	61	2.44	0.41	1.97	40
Bromodichloromethane (BDCM)	90	2.76	0.83	2.0	87
Dibromochloromethane (DBCM)	117	3.25	0.81	2.16	107
Bromoform (BFM)	149	3.72	0.82	2.35	126

Table 2: Influence of different salts combinations on the recoveries of the target compounds from 2.5 g of the certified soil CRM635.

Salts		Compounds			
MgSO ₄ (g)	NaCl (g)	Normalized peak area ^a (RSD %) ^b			
		CFM	BDCM	DBCM	BMF
1*	0	1.00 (0.5)	0.95 (0.4)	0.95 (1.3)	0.98 (1.1)
	0.25*	1.00 (0.5)	1.00 (1.8)	1.00 (3.2)	1.00 (5.6)
	0.5	1.04 (4.9)	1.03 (2.6)	1.03 (4.3)	0.99 (4.3)
2	0	0.93 (1.4)	0.95 (3.1)	0.94 (4.4)	0.91 (4.3)
	0.25	0.99 (1.1)	1.01 (0.7)	1.02 (0.7)	0.98 (1.1)
	0.5	1.08 (1.0)	1.02 (0.1)	1.03 (0.8)	0.98 (1.1)

^a Value 1 assigned to the combination of salts proposed in the original QuEChERS; ^b n=3*Original QuEChERS: 0.5 g of salts per gram of sample in proportion 4:1 (MgSO₄:NaCl)

Table 3: Average recoveries of THMs from different matrixes

Matrix	Recoveries (%)			
	CFM	BDCM	DBCM	BFM
Water	69	78	86	94
Garden soil	70	73	74	76
Vertisol	65	67	69	68

Table 4: Analytical characteristics of the method in fortified garden soil samples

Compound	Slope	R ²	Repeatability (%) ^a		Reproducibility (%) ^a	DL (ng/kg)	QL (ng/kg)
			Instrumental	Method			
CFM	27.2±0.5	0.9966	3.7	6.7	8.3	659	1998
BDCM	238±4	0.9973	2.8	4.4	4.2	6	17
DBCM	206±3	0.9977	2.3	3.3	3.3	14	44
BFM	74±1	0.9975	2.0	2.5	2.8	159	483

^a 100 µg/kg; n=10

Table 5: Determination of the target compounds in the certified reference materials

CRM 631			
Compound	Calculated Value (µg/kg)	Reference Value (µg/kg) *	Prediction Interval (µg/kg) *
CFM	64±5	60.4	14.0-136
BDCM	97±7	74.9	45.9-135
DBCM	146±6	84.2	2.37-166
BMF	122±7	64.1	0-131
CRM 635			
CFM	76±5	98.7	46.0-151
BDCM	72±8	90.6	45.9-135
DBCM	130±10	131	63.8-198
BMF	81±7	74.5	27.5-122

* Values provided in the Certificates of Analysis of the CRM soils

VIII

APLICACIÓN DEL MÉTODO QuEChERS
SIMPLIFICADO-CROMATOGRFÍA DE
GASES RÁPIDA- ESPECTROMETRÍA DE
MASAS PARA LA DETERMINACIÓN
DE THMs Y BTEX EN SUELOS

1. INTRODUCCIÓN

El suelo es una matriz compleja y heterogénea, con una estructura porosa que contiene tanto componentes orgánicos como inorgánicos. Actualmente, el suelo está sujeto a una fuerte contaminación por compuestos químicos y juega un papel muy importante en el medio ambiente, mediante la prevención de la contaminación de los ecosistemas adyacentes.

Cuando los agentes contaminantes llegan al suelo, experimentan diversas interacciones fisicoquímicas con sus componentes orgánicos y minerales. Dentro de los diferentes agentes contaminantes del suelo y los sedimentos, los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) son los más prevalentes, móviles y, comparativamente, los menos estudiados [1]. De muchos de los VOCs y sus productos de degradación se sabe o se sospecha que son tóxicos y carcinógenos. Son especialmente peligrosos como fuentes potenciales de contaminación a largo plazo de las aguas subterráneas, la atmósfera o los cultivos agrícolas. La USEPA ha determinado, en la guía de monitorización de los suelos (*soil screening guidance*), las vías más probables de exposición a estos compuestos para los humanos, entre las que están: la ingestión de agua o alimentos contaminados, la inhalación y la exposición dérmica a estos compuestos [2]. Su impacto no se limita a los efectos adversos directos sobre la salud humana y de los animales, si no que estos compuestos también deterioran las propiedades del suelo y los procedimientos para eliminarlos son complicados, muy laboriosos e implican un alto coste.

Dentro de los VOCs considerados como contaminantes habituales del suelo en diferentes protocolos y normativas [3,4] están los trihalometanos (THMs: cloroformo, bromodiclorometano, dibromoclorometano y bromoformo) y los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno). La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer los ha clasificado en

diferentes grupos en función de su carcinogenicidad: el benceno [5] pertenece al Grupo 1 (carcinógeno para los humanos), el etilbenceno [6], el cloroformo [7] y el bromodiclorometano [8] se han clasificado en el Grupo 2B (posibles carcinógenos para humanos) y el tolueno, los xilenos, el dibromoclorometano y el bromoformo [8] pertenecen al Grupo 3 (no clasificables como carcinógenos en humanos). Además, todos estos compuestos están presentes en la lista de contaminantes prioritarios de la Ley de Responsabilidad, Compensación y Recuperación Ambiental de la USEPA (*Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act*, CERCLA) [9], en la que los compuestos están ordenados en función de una combinación de su toxicidad, frecuencia y exposición potencial para los humanos. A partir de esta lista se puede concluir que el benceno y el cloroformo son compuestos altamente prioritarios, ya que ocupan las posiciones 6 y 11 de la lista (con 275 compuestos).

La determinación de VOCS en suelos está condicionada por la complejidad de la matriz, las concentraciones de los compuestos a nivel de trazas y la alta volatilidad de los mismos. Estas características hacen que la etapa de extracción sea la más crítica en este tipo de análisis. Dentro de los procedimientos de extracción, se han utilizado procedimientos clásicos como extracción Soxhlet [10-12] y extracción líquido-sólido [10,11]. Sin embargo, estas técnicas necesitan grandes cantidades de disolvente y requieren tiempos prolongados. La nueva tendencia en química analítica es el desarrollo de técnicas de pretratamiento de la muestra respetuosas con el medio ambiente, que no utilizan disolventes orgánicos, o utilizan volúmenes muy pequeños de los mismos. Estas nuevas técnicas proporcionan numerosas ventajas desde el punto de vista toxicológico, medioambiental y económico. Algunos métodos que cumplen estos requerimientos “verdes” se han aplicado a la determinación de VOCs en suelos. Las técnicas más empleadas para este tipo de análisis son las distintas modalidades de generación de espacio de cabeza [13]: espacio de

cabeza estático (SHS) [14-20], Purga y Trampa (P&T) [21-25] y HS-microextracción en fase sólida (SPME) [26-29].

A pesar de las ventajas de estos métodos, todos ellos necesitan instrumentación especializada, que generalmente es bastante cara y requiere conocimientos técnicos y experiencia para utilizarla de forma satisfactoria. Además, algunos de estos procedimientos emplean tiempos de extracción del orden de 30 minutos, especialmente cuando se utilizan procedimientos en dos pasos, como P&T y HS-SPME.

Con el fin de proponer un método alternativo, capaz de proporcionar resultados satisfactorios sin necesidad de utilizar instrumentos complejos y costosos y manteniendo los requerimientos de mínimo tratamiento de la muestra y uso de pequeños volúmenes de disolvente, nuestro grupo de investigación ha explorado las posibilidades del procedimiento de extracción QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*) para el análisis de VOCs en muestras de suelos.

El método omite o reemplaza muchas etapas analíticas complejas o tediosas que se utilizan habitualmente en los procedimientos tradicionales y proporciona resultados de alta calidad, con una gran capacidad de procesamiento de muestra (tiempo de extracción de 10 min aproximadamente), pequeño consumo de disolvente y material y bajo coste de análisis por muestra.

El uso de QuEChERS con matrices de suelos ha sido muy limitado hasta la fecha [30,31], y en ambos casos el método se ha aplicado a la determinación de pesticidas. Sin embargo, la aplicación de esta técnica de extracción para la determinación de VOCs en muestras de suelos se ha propuesto recientemente [32,33].

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo consiste en estudiar las posibilidades de la utilización de un espectrómetro de masas para la determinación, mediante cromatografía de gases rápida, de THMs y BTEX en muestras de suelos que han sido sometidas a un proceso de extracción con el método QuEChERS simplificado.

El principal inconveniente comúnmente asociado al método QuEChERS, de baja preconcentración de los compuestos en los extractos, se solucionó utilizando la inyección de grandes volúmenes de muestra (LVI), mediante el uso de un PTV. Además, se utilizará el modo de adquisición de datos de seguimiento de iones seleccionados (SIM), que proporciona mejores límites de cuantificación en el análisis de compuestos específicos.

Se optimizarán las condiciones experimentales de análisis; se realizará un estudio para confirmar la existencia de efecto de matriz y se estudiarán las características analíticas del método en una muestra de suelo de jardín. Finalmente, el método se validará mediante el análisis de dos materiales de referencia certificados (CRMs).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos

El acetato de etilo de grado HPLC (CHROMASOLV® Plus) fue suministrado por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Los trihalometanos (cloroformo, bromodiclorometano, dibromoclorometano y bromoformo) se obtuvieron de Supelco (Bellefonte, PA, USA); tolueno, etilbenceno y m-xileno fueron suministrados por Acros Organics (Geel, Bélgica) y el benceno se obtuvo de Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania). Las sales: sulfato de magnesio anhidro (extra puro) y cloruro sódico (grado reactivo) eran de Scharlau (Barcelona, España). En todo el estudio se utilizó agua ultrapura obtenida con un sistema de purificación de agua Elgastat UHQ. La tabla 1 muestra las principales características de los compuestos objeto de estudio.

Tabla 1: Fórmula, puntos de ebullición, tiempos de retención, anchuras de pico a media altura y relaciones m/z seleccionadas para los ocho compuestos estudiados.

Compuestos	Formula	Punto de ebullición (°C)	Log K_{ow}	K_{oc} (L/kg)	t_R (min)	Anchura de pico a media altura ^a (s)	m/z	
							Ion de cuantificación	iones de identificación
Cloroformo (CFM)	CHCl ₃	61	1.97	40	4.26	0.36	83	85, 47
Bromodichlorometano (BDCM)	CHCl ₂ Br	90	2.0	87	4.55	0.61	83	85, 47
Dibromodichlorometano (DBCM)	CHClBr ₂	117	2.16	107	4.99	0.62	127	129, 131
Bromoformo (BMF)	CHBr ₃	149	2.35	126	5.45	0.66	173	171, 175
Benceno (BZN)	C ₆ H ₆	80	2.13	66	4.41	0.54	78	77, 51
Tolueno (TLN)	C ₇ H ₈	111	2.75	145	4.92	0.60	91	92, 65
Etilbenceno (ETB)	C ₈ H ₁₀	136	3.14	207	5.38	0.55	91	106, 77
m-xileno (m-XLN)	C ₈ H ₁₀	139	3.20	204	5.43	0.62	91	106, 77

^a Para el ión de cuantificación en una disolución de con 800 µg/L de CFM, 200 µg/L de BDCM y DBCM, 400 µg/L de BFM y BZN y 40 µg/L de ETB y m-XLN.

3.2. Disoluciones estándar y muestras

3.2.1. Disoluciones estándar

Se preparó una disolución madre de THMs y BTEX (20.00 mg/L) en metanol que se almacenó en frío a 4 °C. A partir de ella, se prepararon disoluciones en EtOAc que se utilizaron para optimizar las condiciones experimentales y para dopar las muestras de suelo.

3.2.2. Muestras de suelos

3.2.2.1. Suelos dopados

Se utilizaron dos tipos diferentes de suelos naturales: un suelo con un alto contenido orgánico, recogido en un jardín público (Salamanca, España) y un Vertisol, caracterizado por su alto contenido en arcilla (Tabasco, México). Estos suelos se doparon y se utilizaron para estudiar la posible existencia de efecto de matriz. Además, el suelo de jardín dopado se utilizó para evaluar las características analíticas del método propuesto.

El procedimiento para dopar los suelos fue el siguiente: las muestras de suelo se desecaron al aire mediante calentamiento en una placa a 90 °C durante 48 horas, removiendo frecuentemente. Con este procedimiento se consigue eliminar la humedad del suelo y, prácticamente, cualquier traza de compuesto orgánico volátil presente en él. Posteriormente, una alícuota de 20 g del suelo se coloca en un frasco de 100 mL y se añaden 2 mL de una disolución de THMs y BTEX en EtOAc con la concentración adecuada para cada estudio. El frasco se cierra herméticamente y se agita vigorosamente durante 15 minutos hasta conseguir la perfecta homogeneización de los compuestos en la matriz. Para obtener muestras que se asemejen lo más posible a muestras de suelo reales, los suelos dopados se almacenaron en frío (4 °C) durante 15 días, tiempo durante el cual se produce la interacción entre los analitos y la matriz.

3.2.2.2. Materiales de referencia certificados (CRMs)

Para la validación del método propuesto se analizaron dos suelos comerciales con contenidos certificados de los compuestos de interés. En concreto, un suelo arcilloso-limoso (RTC-CRM631) y un suelo arcilloso (RTC-CRM635), ambos suministrados por LGC Promochem (Barcelona, España).

3.3. Instrumentación PTV-GC-MS

La configuración instrumental utilizada es la descrita en el apartado 1 de la sección III “*Configuraciones instrumentales utilizadas*”.

Se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent 6890 con una columna capilar DB-VRX, adecuada para cromatografía rápida de gases (20 m x 0.18 mm x 1 μ m), de Agilent J&W. El gas portador fue helio N50 (99.995 % de pureza; Air Liquide). El cromatógrafo está equipado con un inyector de temperatura programada (PTV) (CIS-4; Gerstel, Baltimore, MD, USA) con un *liner* empaquetado con Tenax-TA®, de un volumen interno de 180 μ L. Para introducir las muestras en el PTV se utilizó un automuestreador CombiPAL (CTC analytics AG, Zwingen, Suiza) equipado con una bandeja para 42 muestras. Se seleccionó el modo de operación de inyección de líquidos y se utilizó una microjeringa de 10 μ L. Las medidas con el espectrómetro de masas de tipo cuadropolar (HP 5873) se realizaron en modo *scan* y SIM.

3.4. Procedimientos analíticos

3.4.1. Pretratamiento de la muestra (QuEChERS simplificado)

Las diferentes variables implicadas en el procedimiento de extracción mediante la versión simplificada de QuEChERS adaptada para la extracción de VOCs en suelos se estudiaron de forma detallada en un trabajo previo [32]. Como consecuencia, en el presente trabajo se utilizaron las condiciones experimentales optimizadas anteriormente. De esta manera, el

procedimiento propuesto para el análisis de 5 g de muestra incluye: la adición de 3 mL de agua para homogeneizar la humedad de las diferentes muestras, la extracción líquido-líquido con 2.5 mL de acetato de etilo, la separación de fases mediante adición de MgSO_4 anhidro (2 g) y la inyección directa del extracto orgánico, obtenido después de la etapa de centrifugación, en el sistema cromatográfico.

3.4.2. Inyección a temperatura programada

Los mejores resultados para la inyección de estos compuestos se obtuvieron con el modo *solvent vent*, utilizando CO_2 líquido para conseguir el enfriamiento. Con el procedimiento optimizado se inyectaron 7 μL del extracto en un *liner* empaquetado con Tenax-TA®, a una temperatura inicial de 5 °C. El flujo de purga fue de 50.0 mL/min y la presión de purga de 5.00 psi. Después de 1 minuto (tiempo de purga) se cerró la válvula de *split* y el *liner* se calentó hasta 300 °C con una velocidad de 12 °C/s. Después de un tiempo de inyección de 1.50 minutos se abre de nuevo la válvula de *split* y la temperatura de *liner* se mantiene a 300 °C durante 7 minutos para limpiar y evitar posibles efectos de memoria. Con fines comparativos se estudiaron los modos convencionales de inyección *split* y *splitless*.

3.4.3. Cromatografía de gases

Se seleccionó una temperatura inicial para la columna de 45 °C que se mantuvo durante 3.00 minutos; se incrementó hasta 250 °C con una velocidad de 50 °C/min y se mantuvo en este valor durante 1 minuto. El flujo de helio fue de 1.5 mL/min. Con estas condiciones experimentales los compuestos eluían en menos de 5.50 minutos y el tiempo total de desarrollo del cromatograma fue de 8.10 minutos.

3.4.4. Espectrometría de masas

Las experiencias realizadas para optimizar las condiciones analíticas del método se registraron en modo *scan*. El intervalo de relaciones masa/carga

(m/z) registradas fue 25-270 una y el valor del umbral de abundancia fue 0. Los diferentes compuestos se identificaron por comparación de los espectros experimentales con los correspondientes de la base de datos NIST'98 (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, versión 1.6).

El estudio del efecto de matriz, la determinación de las características analíticas del método y la predicción de la concentración de los compuestos en muestras de referencia con contenido certificado se realizaron en modo SIM. La información obtenida en el modo *scan* permitió establecer tres grupos SIM con seis iones cada uno. El primero (4.10-4.60 min) contenía los tres iones más abundantes del cloroformo y bromodiclorometano (83, 85, 47) y los tres del benceno (78, 77, 51); el segundo (4.60-5.20 min) contenía las relaciones m/z características del tolueno (91, 92, 65) y dibromoclorometano (127, 129 y 131) y el tercer grupo (4.30-6.10 min) estaba formado por los iones característicos del etilbenceno y xileno (91, 106, 77) y los característicos del bromoformo (171, 173, 175). Se fijó un tiempo de permanencia para cada uno de los iones de 5 ms.

3.4.5. Análisis de datos

La recogida de los datos cromatográficos se realizó con el software Enhanced ChemStation, G1701CA Ver. C 00.00 de Agilent Technologies.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Optimización de las condiciones experimentales (PTV-GC-MS)

Las condiciones experimentales de cada uno de los diferentes módulos que constituyen la configuración instrumental se seleccionaron con el fin de optimizar la separación cromatográfica y obtener los mejores límites de cuantificación para los compuestos estudiados. Para estas experiencias se utilizó una disolución de los analitos en EtOAc.

4.1.1. Variables experimentales del PTV

Con objeto de elegir el modo de inyección más apropiado para el grupo de compuestos estudiados, se investigaron dos de los modos de inyección permitidos por el PTV: el modo de inyección convencional, *splitless* en caliente, y el modo de inyección con eliminación de disolvente (*solvent vent*). Se utilizó una disolución de 200 ppb de THMs y BTEX en acetato de etilo y los análisis se realizaron por triplicado. Se optimizaron las variables que afectan a cada uno de los modos de inyección y, en las condiciones experimentales óptimas, se compararon los resultados obtenidos por ambos métodos.

En el modo de inyección *splitless* las variables consideradas fueron: temperatura del inyector, volumen de muestra y tiempo de inyección. Para la primera de ellas se seleccionó un valor de 300 °C. Esta temperatura es la máxima recomendada para Tenax-TA® y adecuada para evitar la retención de los analitos en el material empaquetado en el *liner*. El volumen de inyección se estudió para valores de 0.5, 1, 2 y 3 µL. La resolución cromatográfica y la forma de los picos era buena para todos los volúmenes estudiados; sin embargo, la repetitividad de las señales disminuía significativamente para valores superiores a 1 µL. Este efecto puede explicarse por el volumen de expansión del disolvente, que puede exceder

el volumen interno del *liner* y provocar problemas de discriminación de muestra y reducción de la reproducibilidad en la inyección. Por tanto, se seleccionó como óptimo un volumen de 1 μL , que permitía obtener la máxima relación señal/ruido sin pérdida en la repetitividad de la señal. Se seleccionó un tiempo de inyección de 1.5 minutos, que resultaba suficiente para la inyección completa de la muestra en la columna.

Las diferentes variables involucradas en el modo de inyección *solvent vent*, se optimizaron con el objetivo de conseguir las señales máximas sin pérdida de resolución cromatográfica. Un factor determinante para ello es el volumen de muestra inyectada. En este sentido, el inyector de temperatura programada permite la inyección de grandes volúmenes de muestra gracias a la eliminación del disolvente a través de la válvula de purga o venteo. Este modo de inyección ha sido recomendado en muchas publicaciones para la inyección de los extractos obtenidos con el método QuEChERS [34-36]. Generalmente, este modo de inyección se utiliza cuando el disolvente tiene un punto de ebullición bastante inferior a los puntos de ebullición de los analitos. En este caso, el acetato de etilo tiene un punto de ebullición de 77 °C, que es superior al del cloroformo (61 °C) y bastante similar a los del benceno y el bromodiclorometano (80 °C y 90 °C, respectivamente). El uso de *liners* empaquetados con diferentes materiales (Tenax-TA®, Carbotrap B, Carbotrap C, lana de vidrio) no resuelve de forma completa este problema, debido a la retención del disolvente (EtOAc) en los materiales mencionados a bajas temperaturas. Sin embargo, estos materiales pueden contribuir a la retención de los compuestos en el *liner* durante el proceso de venteo. Entre los materiales disponibles, se seleccionó un *liner* empaquetado con Tenax-TA® debido a su menor capacidad para retener al EtOAc y sus propiedades para atrapar los compuestos objeto de estudio [37].

La temperatura inicial del *liner* se estudió para los valores de 5, 10 y 20 °C. Para la mayoría de los compuestos, se obtuvieron resultados similares en el intervalo de temperaturas estudiado, sin embargo, para los analitos

más volátiles (cloroformo, benceno y bromodiclorometano) se produjeron pérdidas importantes al aumentar la temperatura. Las áreas de los picos de estos compuestos disminuyeron hasta un 50% para una temperatura inicial de 20 °C, con respecto a las áreas obtenidas para 5 °C. A partir de estos resultados se fijó 5 °C como temperatura inicial del *liner*.

Las variables que afectan a la eliminación del disolvente son: el tiempo durante el cual se elimina el disolvente y la velocidad de flujo a la cual se realiza el proceso de purga. El grado de eliminación de disolvente determina el volumen de muestra que se puede inyectar en el sistema, ya que un exceso del disolvente en la columna ocasiona problemas en la resolución cromatográfica y en la reproducibilidad.

El tiempo de purga se estudió para valores de 0.50, 1.00, 1.20 y 1.30 minutos y el flujo de purga para valores de 50, 100 y 150 mL/min. El aumento de ambas variables tiene efectos similares en la inyección: el volumen de disolvente que se elimina es mayor, con lo aumenta el volumen de muestra que se puede inyectar en la columna, pero, al mismo tiempo, se produce una pérdida de los analitos (especialmente los más volátiles). Además, los cromatogramas obtenidos con valores altos de estos parámetros eran menos reproducibles; este efecto era más desfavorable para valores altos de flujo de purga. Por tanto, se seleccionaron valores de flujo de purga (50 mL/min) y tiempo de purga (1.0 min) de compromiso. Con estos valores era posible inyectar volúmenes de muestra de hasta 7 µL con resultados reproducibles y pérdidas asumibles de los compuestos más volátiles.

La figura 1 muestra los cromatogramas obtenidos al analizar una disolución de 200 µg/L de los analitos en EtOAc con las condiciones experimentales optimizadas para cada uno de los modos de inyección. Se ha extraído la relación m/z más abundante para cada compuesto.

Figura 1: Comparación de los cromatogramas de ion extraído de los compuestos de interés con los modos de inyección splitless y solvent vent optimizados

Para cloroformo y benceno, los dos compuestos más volátiles, se observó una ligera disminución del área de pico con el modo *solvent vent* debido a la pérdida de los compuestos durante el proceso de eliminación del disolvente. Para los compuestos menos volátiles -menos influenciados por los efectos del disolvente- el modo de inyección *solvent vent* (inyección de 7 μL) presentaba claras ventajas, obteniéndose incrementos en las áreas de los picos entre 4 y 6 veces con respecto a la inyección en modo *splitless* (1 μL). Basándonos en estos resultados, se seleccionó el modo de inyección *solvent vent* debido a la importante mejora en la sensibilidad que se producía para los compuestos menos volátiles y a que en el caso de los más volátiles la sensibilidad se mantenía aproximadamente igual.

4.1.2. Variables experimentales de la cromatografía de gases rápida

Para obtener una buena resolución cromatográfica en el menor tiempo posible, se optimizaron las diferentes variables implicadas en el proceso de separación. En primer lugar, se utilizó la máxima rampa de temperatura permitida por el horno cromatográfico y se fijó una temperatura final de 250 °C, que es suficiente para garantizar la elución de los compuestos y apropiada para las especificaciones técnicas de la columna.

Así pues, la única variable que se estudió fue la temperatura inicial del horno. Se ensayaron los valores de 35, 45 y 55 °C. Para valores de 55 °C el cloroformo aparecía solapado con el frente del disolvente de EtOAc. Aunque era posible detectar el pico extrayendo la relación m/z 83, se observaron problemas de reproducibilidad. A medida que disminuía la temperatura inicial, aumentaban los tiempos de retención de los analitos distanciándose así del pico del disolvente, sin embargo, el tiempo necesario para recuperar las condiciones iniciales aumentaba considerablemente. Como consecuencia, se eligió una temperatura de compromiso de 45 °C, que resultaba adecuada para obtener una buena resolución cromatográfica,

con alta reproducibilidad, sin prolongar excesivamente el tiempo de análisis.

4.1.3. Variables experimentales del espectrómetro de masas

A partir de los cromatogramas registrados en modo *scan* (25-270 uma) se identificaron los compuestos estudiados y se determinaron sus tiempos de retención. Con esta información se establecieron los tres grupos adecuados para la detección en modo SIM (Sección 3.4.3). El ion de cuantificación y los de identificación, para cada compuesto, se recogen en la tabla 1. El tiempo de permanencia para cada ion se estudió para valores de 1, 5 y 10 ms. Con dichos valores de tiempo de permanencia, las velocidades de adquisición de datos del cuadrupolo para los tres grupos SIM (seis iones en cada grupo) eran de 32, 18 y 12 espectros por segundo, respectivamente. Se obtuvo la mejor definición de pico para un tiempo de permanencia de 5 ms, razón por la cual fue este valor el que se seleccionó para el resto de los estudios.

La figura 2 muestra el cromatograma de una disolución de los analitos en EtAOc, analizada en las condiciones experimentales seleccionadas. Para obtener áreas de pico similares para todos los compuestos se preparó la disolución con las siguientes concentraciones: 800 ppb para cloroformo, 200 ppb para bromodiclorometano y dibromoclorometano, 400 ppb para bromoformo y benceno y 40 ppb para tolueno, etilbenceno y m-xileno.

Figura 2: Cromatograma de una muestra de los compuestos en EtOAc, en las condiciones experimentales óptimas.

El tiempo necesario para la elución de los ocho compuestos fue de 5.50 minutos. Los tiempos de retención, las anchuras de pico a media altura (w_h), los puntos de ebullición y las relaciones m/z seleccionadas para cada compuesto se muestran en la tabla 1. Las anchuras de pico a media altura están comprendidas entre 0.36 y 0.66 minutos por lo que, considerando la clasificación basada en este parámetro [38], la separación obtenida corresponde a una cromatografía de gases rápida.

4.1.4. Tiempo de análisis

La versión simplificada del método QuEChERS es sencilla y rápida. Un único analista puede preparar un conjunto de 7 extractos por hora, utilizando material sencillo y consumiendo menos de 20 mL de EtOAc.

Una vez que se han extraído los compuestos del suelo con EtAOc, los extractos obtenidos se inyectaron directamente en el sistema cromatográfico. En las condiciones experimentales óptimas, el tiempo total de análisis fue 8.10 minutos.

4.2. Análisis de muestras de suelo

Se analizaron muestras de suelo para determinar la posible existencia de efecto de matriz en la determinación de los compuestos de interés. Se obtuvieron los rendimientos de extracción en dos matrices de suelo diferentes y se determinaron las características analíticas del método en una matriz de suelo de jardín dopado. Finalmente, para validar el método propuesto se analizaron dos materiales de referencia (CRMs) con contenido certificado para los analitos estudiados.

4.2.1. Efecto de matriz

La existencia de efecto de matriz en la determinación de compuestos orgánicos volátiles es muy común cuando se estudian en matrices de suelo. Esto se debe a la alta complejidad y heterogeneidad de las muestra y a las fuertes interacciones de los compuestos con los constituyentes del suelo. En este trabajo, se realizó un estudio para comprobar la existencia de efecto de matriz cuando se aplica el método analítico optimizado a la determinación de los analitos estudiados en muestras de suelos.

Se utilizaron dos tipos de suelos de diferentes características (suelo de jardín y Vertisol). Las muestras de suelos se secaron al aire (apartado 3.2.2.1.) y se analizaron para detectar la posible presencia de los compuestos de interés en estas matrices (blancos) antes de doparlas. Se comprobó que el cloroformo y los BTEX estaban presentes en las muestras a muy baja concentración; también se detectó la presencia de los mismos cuando se inyectaba directamente acetato de etilo en el sistema. Estos compuestos son ubicuos en el ambiente a niveles de traza y se han detectado habitualmente en diferentes tipos de muestras [20]. Por lo tanto, en cada matriz, a las áreas de pico correspondientes a estos compuestos se le restaron las señales del blanco.

Las muestras de suelo se doparon a diferentes niveles de concentración (50, 100, 150 and 200 µg/L) y se sometieron al proceso de extracción y al posterior análisis cromatográfico. En la tabla 2 se muestran las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas. Puede observarse que, para la mayoría de los compuestos, existe un efecto de matriz ya que se observan ligeras diferencias en las pendientes correspondientes a las dos matrices estudiadas. La magnitud de este efecto es más acusada, para cada grupo de compuestos, a medida que aumenta la constante de partición de carbono orgánico (K_{oc}) del compuesto.

Tabla 2: Pendientes de las rectas de calibrado en las dos matrices de suelo

Compuesto	Matriz	
	Suelo de jardín	Vertisol
Cloroformo	(11.4±0.3)10	(11.3±0.7)10
Bromodiclorometano	(84±1)10	(80±2)10
Dibromoclorometano	(70±2)10	(66±1)10
Bromoformo	(48.8±0.6)10	(44±1)10
Benceno	(13.8±0.1)10	(13.0±0.1)10
Tolueno	(278±5)10	(258±8)10
Etilbenceno	(620±10)10	(576±7)10
m-xileno	(506±8)10	(472±2)10

Debido a que el efecto de matriz no es constante, la utilización de un estándar interno no permitiría solucionar el problema. En este estudio se propone un protocolo de adición estándar para corregir el efecto de matriz, que ha demostrado funcionar correctamente con muestras de suelos [20].

4.2.2. Rendimiento de extracción para los compuestos en matrices de suelo

Para determinar la eficacia en la extracción del método QuEChERS propuesto, se inyectaron directamente en el sistema cromatográfico disoluciones de los compuestos en EtOAc a diferentes niveles de

concentración (50, 100, 150 y 200 µg/L). Además, dos muestras de suelo: un Vertisol y un suelo de jardín, dopados a los mismos niveles de concentración, se sometieron al proceso de extracción y los extractos se inyectaron en el cromatógrafo de gases. Para evitar un efecto de preconcentración en el proceso de extracción, la relación muestra:disolvente utilizada fue 1:1, es decir, 2.5 g de muestra se sometieron al procedimiento de extracción con 2.5 mL de acetato de etilo; el volumen de agua (1.5 mL) y la cantidad de MgSO_4 (1 g) se escalaron proporcionalmente para mantener las proporciones utilizadas en el método optimizado.

La comparación de las pendientes de las rectas de calibrado correspondientes a las disoluciones de los compuestos en EtOAc con las pendientes obtenidas para las muestras de suelos permite obtener un valor medio (a lo largo del intervalo de concentraciones estudiado) de los rendimientos de extracción para cada uno de los analitos objeto de estudio con la metodología propuesta.

Los valores obtenidos pueden considerarse satisfactorios, y estaban comprendidos entre el 65 y 76 % (tabla 3). Puede observarse que estos rendimientos de extracción aumentan a medida que lo hace el punto de ebullición de los compuestos. Este comportamiento puede ser debido a las pérdidas de los compuestos durante el proceso de preparación de la muestra, que son más acusadas en el caso de los compuestos más volátiles. Además, el valor del coeficiente octanol-agua (K_{ow}) no parece ser determinante, probablemente debido a que todas las especies presentan valores del mismo orden.

Tabla 3: Recuperaciones de los compuestos de interés en dos muestras de suelo

Compuesto	Recuperaciones (%)	
	Suelo de jardín	Vertisol
Cloroformo	68	68
Bromodichlorometano	70	67
Dibromodichlorometano	70	66
Bromoformo	76	69
Benceno	69	66
Tolueno	70	65
Etilbenceno	75	70
m-xileno	75	70

Con respecto a las dos matrices de suelo, se obtuvieron mejores rendimientos de extracción para todos los compuestos en el caso de la matriz de suelo de jardín. Estas diferencias pueden atribuirse a la diferente composición de los suelos y, por tanto, a las diferentes interacciones de los compuestos con ambos tipos de matrices. Los resultados están de acuerdo con los obtenidos en la sección anterior en la que se determinó la influencia de la matriz en el proceso de extracción.

4.2.3. Características analíticas del método

Para determinar las características analíticas del método propuesto, se dopó una muestra de suelo de jardín a distintos niveles de concentración (50, 100, 200, 300 y 500 µg/kg). Las muestras (5 g) se sometieron al proceso de extracción descrito en la sección 3.4.1. Los extractos obtenidos se analizaron por triplicado en las condiciones experimentales seleccionadas. Se determinaron las características de: linealidad, repetitividad y del método cromatográfico, reproducibilidad del procedimiento global y sensibilidad (límites de detección y cuantificación) (Tabla 4).

Como variable para la cuantificación se utilizó el área de pico correspondiente al cromatograma obtenido en modo SIM, para el ion de

cuantificación de cada compuesto. Se obtuvo una buena linealidad en el intervalo de concentraciones estudiado, con coeficientes de determinación superiores a 0.9932. Los modelos se validaron por ANOVA y ninguno de ellos presentaba fallo de ajuste.

Tabla 4: Características analíticas del método optimizado en una matriz de suelo de jardín

Compuesto	Pendiente	R ²	Repetitividad (%)	Reproducibilidad (%)	LD (µg/kg)	LQ (µg/kg)
CFM	(10.9±0.2)10	0.9955	2.0	7.3	8.4	25.4
BDCM	(90.6±0.7)10	0.9993	0.9	3.4	0.3	0.9
DBCM	(81±1)10	0.9978	1.4	2.9	0.4	1.2
BFM	(51.9±0.8)10	0.9970	1.7	2.1	1.6	4.9
Benceno	(11.7±0.3)10	0.9932	2.8	6.1	15	45
Tolueno	(284±2)10	0.9994	1.3	2.7	0.4	1.2
Etilbenceno	(629±9)10	0.9977	0.4	1.9	0.2	0.5
m-xileno	(516±7)10	0.9980	0.7	1.5	0.3	0.9

El estudio de la precisión (expresada como desviación estándar relativa, RSD) se realizó evaluando tanto la repetitividad como la reproducibilidad. La repetitividad, es decir, la precisión inherente al proceso de medida, se determinó analizando las señales correspondientes a la inyección repetida ($n=10$) del extracto procedente de un suelo de jardín dopado a un nivel de concentración de 100 $\mu\text{g/kg}$. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4 y los valores varían entre 0.4 y 2.8 %. Los valores más altos corresponden a los dos compuestos más volátiles, cloroformo y benceno, que son los que se ven más fuertemente influenciados por la etapa de eliminación del disolvente durante la inyección. No obstante, los buenos valores de RSD obtenidos demuestran la aplicabilidad del método analítico propuesto incluso para los compuestos muy volátiles, para los que las condiciones de inyección son desfavorables.

La reproducibilidad del procedimiento global (extracción y análisis cromatográfico) se calculó inyectando diez extractos procedentes de diez alícuotas de una muestra de suelo de jardín dopada a un nivel de concentración de 100 $\mu\text{g/kg}$. Los extractos se analizaron en días diferentes, a lo largo de un periodo de dos semanas. Cada uno de los extractos se inyectó por triplicado. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4 y están en el intervalo entre 1.5 y 7.3 %. De nuevo, los valores más altos corresponden a los compuestos más volátiles poniendo de manifiesto la dificultad de la determinación de los mismos debido a las pérdidas, difícilmente controlables, durante los procesos de preparación de muestra e inyección.

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) se estimaron a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\text{LD} = \frac{3.3\sigma}{S} \qquad \text{LQ} = \frac{10\sigma}{S}$$

donde σ es la desviación estándar de la señal de un pico (número de réplicas, $n=10$) correspondiente a una relación S/N de aproximadamente 3; S

es la pendiente de la curva de calibrado y 3.3 es el valor del parámetro t de Student (para $n-1$, 099).

Los límites de detección y cuantificación calculados se muestran en la tabla 4. Como cabía esperar, debido a su alta volatilidad, los límites de detección más altos corresponden a los compuestos más volátiles cloroformo y benceno (8.4 y 15 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente). Para el resto de los compuestos los límites de detección están comprendidos entre 0.2 y 1.6 $\mu\text{g/kg}$. Comparando los límites de detección obtenidos para los THMs con esta configuración instrumental, con los obtenidos para estos mismos compuestos en suelos mediante un proceso de extracción QuEChERS y análisis de los extractos mediante GC- μECD (0.01-0.66 $\mu\text{g/kg}$) [33], se observa que los valores obtenidos con espectrometría de masas son más altos, debido a la alta sensibilidad que presenta el detector de captura electrónica para los compuestos halogenados. No obstante, la utilización de un detector de masas permite la identificación inequívoca y la cuantificación de, prácticamente, cualquier compuesto volátil presente en la muestra, lo que resulta enormemente atractivo cuando se trata de hacer un análisis de criba de los grupos de compuestos presentes en la muestra, o cuando los compuestos no presentan grupos halógenos y, por tanto, no son adecuados para su detección mediante ECD, como es el caso de los BTEX.

4.2.4. Determinación de THMs y BTEX en materiales de referencia certificados

La validación de la metodología propuesta se llevó a cabo determinando el contenido de los analitos de interés en dos materiales de referencia con contenido certificado: un suelo arcilloso limoso (RTC-CRM631) y un suelo arcilloso (RTC-CRM635). Para ello, se utilizó un procedimiento de adición estándar, ya que, en el procedimiento de extracción existe un efecto de matriz (Sección 4.2.1).

En cada suelo se realizó un estudio a 6 niveles de concentración, analizando cada extracto por triplicado. Las concentraciones se distribuyeron de forma uniforme desde 0 µg/kg hasta el nivel más alto de concentración que, en cada caso, se determinó de forma que coincidiera con el doble del contenido en el material certificado; de esta forma se consigue que la incertidumbre asociada a la predicción sea mínima.

Sobre 5.0 g del material de referencia, pesados de forma precisa, se añadieron 50 µL de una disolución de los compuestos en EtOAc de la concentración adecuada en cada caso. La muestra se sometió al proceso de extracción según el procedimiento propuesto. Los extractos se analizaron en primer lugar con el modo de detección *scan*, para identificar los analitos a partir de sus tiempos de retención y por comparación de los espectros obtenidos con los correspondientes a los compuestos puros disponibles en la base de datos (se admite una diferencia máxima del 20 %). Posteriormente, la cuantificación se realizó en modo SIM. A modo de ejemplo, la figura 3 muestra los cromatogramas correspondientes a la muestra CRM635, obtenidos con los dos modos de detección.

Figura 3: Cromatogramas del extracto procedente del suelo CRM635 analizado en modo scan (a) y en modo SIM(b).

Los resultados obtenidos (Tabla 5) fueron altamente satisfactorios. Las concentraciones predichas estaban, en la mayoría de los casos, muy próximas al valor de referencia. Además, para todos los compuestos (excepto el benceno) las concentraciones calculadas están dentro de los intervalos de predicción especificados en el material certificado. Los valores predichos para el benceno están ligeramente por encima del intervalo de predicción; este resultado puede explicarse por las bajas concentraciones de

este compuesto en los materiales analizados (72.0 y 42.9 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente), que son muy próximas a los límites de cuantificación estimados para el benceno con la metodología propuesta (45 $\mu\text{g/kg}$).

Tabla 5: Determinación de los compuestos objeto de estudio en dos materiales de referencia certificados

CRM 631			
Compuesto	Valor predicho ($\mu\text{g/kg}$)	Valor de referencia ($\mu\text{g/kg}$)*	Intervalo de predicción ($\mu\text{g/kg}$)*
Cloroformo	74$\pm$9	60.4	14.0-136
BDCM	90$\pm$10	74.9	45.9-135
DBCM	95$\pm$10	84.2	2.37-166
Bromoformo	80$\pm$10	64.1	0-131
Benceno	90$\pm$20	72.0	35.6-108
Tolueno	78$\pm$4	77.5	37.1-118
Etilbenceno	130$\pm$20	124	59.3-188
m+p xileno	100$\pm$10	94.5	38.4-151
xileno, total	170$\pm$20	173	49.2-297
CRM 635			
Cloroformo	110$\pm$10	98.7	46.0-151
BDCM	96$\pm$8	90.6	45.9-135
DBCM	120$\pm$20	131	63.8-198
Bromoformo	79$\pm$8	74.5	27.5-122
Benceno	60$\pm$20	42.9	24.2-61.7
Tolueno	124$\pm$7	129	66.9-192
Etilbenceno	120$\pm$10	133	76.0-190
m+p xileno	220$\pm$20	206	126-286
xileno, total	280$\pm$20	263	152-375

* Valores proporcionados en el material de referencia certificado

Estos resultados demuestran que el método propuesto puede ser aplicado a la determinación de los analitos objeto de estudio en muestras de suelos. Los resultados más satisfactorios se obtienen para los compuestos menos volátiles debido, por un lado, a que son los menos afectados por las pérdidas durante la etapa de preparación de la muestra y, por otro, porque debido a sus características son más adecuados en la etapa de inyección y

análisis cromatográfico. Para estos compuestos es posible inyectar grandes volúmenes de muestra (eliminando el disolvente mientras los analitos se focalizan en el material empaquetado del *liner*) lo que se traduce en mejores resultados y límites de detección más bajos.

5. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método sencillo, rápido y sensible para la determinación de THMs y BTEX en muestras de suelo. El método se basa en la extracción de los compuestos mediante una versión simplificada del método QuEChERS y análisis directo de los extractos mediante inyección de grandes volúmenes- cromatografía de gases rápida y detección mediante espectrometría de masas.

La utilización de un PTV con un *liner* relleno con Tenax-TA® y programado en el modo de inyección *solvent vent* permitía la inyección de un gran volumen de muestra (7 µL), lo cual dio lugar a un aumento significativo de la sensibilidad para muchos de los compuestos objeto de estudio.

Las rampas de temperaturas rápidas utilizadas en el horno permitían la separación de los ocho compuestos en menos de 6 min. El uso del modo de detección SIM en el espectrómetro de masas da lugar a un incremento en la selectividad y selectividad del método.

La eficacia de extracción del método en diferentes muestras de suelo oscilaba entre el 65 y el 76 %. El método analítico proporciona valores de reproducibilidad y repetitividad excelentes, y límites de detección entre 0.3 y 15 µg/kg.

La metodología propuesta se ha validado mediante el análisis de dos materiales de referencia certificados (CRMs). Los resultados más satisfactorios se obtuvieron para los compuestos menos volátiles debido a que sus propiedades son más adecuadas para la técnica de inyección de grandes volúmenes de muestra.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] I. P. Breus, A. A. Mishchenko, *Soil Chemistry* 12 (2006) 1413.
- [2] Soil Screening Guidance: User's guide, Office of Solid Waste and Emergency Response, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, USA, 1996, p. 39.
- [3] Supplemental guidance for developing soil screening levels for superfund sites, Attachment D, Office of emergency and Remedial Response, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, USA, 2001, p. 177.
<http://www.epa.gov/superfund/health/conmedia/soil/pdfs/attachc.pdf>
- [4] USEPA Method 8260B, Volatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS), Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 8000 series, USEPA, Washington, USA, 1996.
<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8260b.pdf>
- [5] Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risk to humans, Summaries & Evaluations, vol. 29, International Agency for Research on Cancer (IARC), 1982, <http://monographs.iarc.fr/>.
- [6] Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risk to humans, Summaries & Evaluations, vol.77, International Agency for Research on Cancer (IARC), 2000.
- [7] Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risk to humans, Summaries & Evaluations, vol.73, International Agency for Research on Cancer (IARC), 1999.
- [8] Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risk to humans, Summaries & Evaluations, vol.71, International Agency for Research on Cancer (IARC), 1999.

-
- [9] 2007 Priority list of hazardous substances, Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act (CERCLA), Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Unites States, 2007, <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html>.
- [10] K.M. Meney, C.M. Davidson, D. Littlejohn, *Analyst* 123 (1998) 195.
- [11] L. Ramos, J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 891 (2000) 275.
- [12] M.D. Burford, S.B. Hawthornr, D.J. Miller, *J. Chromatogr. A* 685 (1994) 95.
- [13] N. Jakubowska, B. Zygmunt, Z. Polkowska, B. Zabiegala, J. Namiésnik, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 422
- [14] USEPA Method 5021, Volatile Organic Compounds in soils and other solid matrices using equilibrium headspace analysis, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 5000 series, USEPA, Washington, USA, 1996.
- [15] M. Llompart, K. Li, M. Fingas, *Talanta* 48 (1999) 451.
- [16] J.S. Alvarado, C. Rose, *Talanta* 62 (2004) 17.
- [17] J.L. Pérez-Pavón, A. Gerrero-Peña, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A* 1047 (2004) 101.
- [18] A. Serrano, M. Gallego, *J. Chromatogr. A* 1118 (2006) 261.
- [19] F.A. Esteve-Turrillas, S. Armenta, S. Garrigues, A. Pastor, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 587 (2007).
- [20] J.L. Pérez Pavón, S. Herrero Martín, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6063.
- [21] O. Zuloaga, N. Etxebarria, J. Zubiaur, L.A. Fernández, J.M. Madariaga, *Analyst* 125 (2000) 477.
- [22] K.F. Haselmann, F. Laturnus, B. Svensmark, C. Gron, *Chemosphere* 41 (2000) 1769.
- [23] M. Rosell, S. Lacorte, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1132 (2006) 28

-
- [24] O. Zuloaga, N. Etxebarria, L.A. Fernández, J.M. Madariaga, *Anal. Chim. Acta* 416 (2000) 43.
- [25] N. Campillo, P. Viñas, I. López-García, N. Aguinaga, M. Hernández-Córdoba, *Talanta* 64 (2004) 584.
- [26] M. Eriksson, J. Fäldt, G. Dalhammar, A.-K. Borg-Karlson, *Chemosphere* 44 (2001) 1641.
- [27] R.S. Dungan, *Anal. Lett.* 38 (2005) 2393.
- [28] Z. Zhang, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 67 (1995) 34.
- [29] O. Ezquerro, G. Ortiz, B. Pons, M.T. Tena, *J. Chromatogr. A* 1035 (2004) 17.
- [30] C. Lesueur, M. Gartner, A. Mentler, M. Fuerhacker, *Talanta* 75 (2008) 284.
- [31] L. Chen, X-S Li, Z-Q Wang, C-P Pan, R-C Jin, *Ecotox. Environ. Safe* 73 (2010) 73.
- [32] C. García Pinto, M.E. Fernández Laespada, S. Herrero Martín, A.M. Casas Ferreira, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, *Talanta* 81 (2010) 385.
- [33] S. Herrero Marín, C. García Pinto, J. L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A* submitted for publication.
- [34] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412.
- [35] S.J. Lehotay, A. de Kok, M. Hiemstra, P. van Bodergraven, *J. AOAC Int.* 88 (2005) 595-613.
- [36] S.J. Lehotay, *J. AOAC Int.* 90 (2007) 485.
- [37] J.L. Pérez Pavón, S. Herrero Martín, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A* 1194 (2008) 103.
- [38] E. Matisová, M. Dömötörövá, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 199.

ARTICLE SUBMITTED
FOR PUBLICATION

**A SIMPLIFIED QuEChERS APPROACH FOR THE
DETERMINATION OF TRIHALOMETHANES AND BENZENE,
TOLUENE, ETHYLBENZENE AND XYLENES IN SOIL MATRICES
BY FAST GAS CHROMATOGRAPHY WITH MASS
SPECTROMETRY DETECTION**

Carmelo García Pinto, Sara Herrero Martín, José Luis Pérez Pavón*, and
Bernardo Moreno Cordero

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Facultad de
Ciencias Químicas, Universidad de Salamanca. 37008 Salamanca, SPAIN

* Corresponding author: (fax) +34-923-294483; (e-mail) jlpp@usal.es

Abstract

A method based on simplified QuEChERS extraction followed by large-volume injection-fast gas chromatography and mass spectrometry detection has been developed for the determination of THMs (chloroform, bromodichloromethane, dibromochloromethane and bromoform) and BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes) in soil samples.

The simplified version of QuEChERS used meets the requirements of the “green chemistry” and provides reliable results with high sample throughput, low solvent consumption, little labour and the use of materials commonly employed in laboratories. The GC device used is equipped with a programmable temperature vaporizer (PTV), with a liner packed with Tenax-TA®. Using the solvent vent mode, this injector allows the injection of large volumes of sample, affording an improvement in the sensitivity of the method. The chromatographic conditions used here allowed the separation of the compounds in less than 5.50 min. Good linearity was obtained for all the target compounds, with highly satisfactory repeatability and reproducibility values. The limits of detection were in the 0.2 to 15 µg/kg range. The method was validated by the analysis of two certified reference materials (CRMs).

1. Introduction

Soil is a complex and heterogeneous matrix with a porous structure that contains both inorganic and natural organic components. Currently, soils are subject to intensive pollution with chemical compounds and they play an important role in the environment by preventing the contamination of adjacent ecosystems. When contaminating agents reach the soil, they become involved in several types of physicochemical interactions with mineral and organic components. Volatile Organic Compounds (VOCs) are the most prevalent, but comparatively poorly studied, mobile contaminants of soil and sediments [1]. Many such compounds and their degradation products are either known to be or suspected of being toxic and carcinogenic, and they are especially hazardous as potential sources of long-term contamination of groundwater, the atmosphere, and crops. In soil screening guidance, the USEPA has determined some potential routes of human exposure to soil contaminants. Thus, the inhalation of volatiles, the ingestion of contaminated groundwater and food, and dermal absorption are the most probable routes [2]. The impact of such compounds is not limited to direct adverse effects on human health and animals; they also deteriorate the properties of the soil to a significant extent and clean-up is complicated, expensive, and time-consuming.

Within the VOCs considered in different protocols and legislative norms [3,4], trihalomethanes (THMs: chloroform, bromodichloromethane, bromodichloromethane and bromoform) and BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes) are common soil pollutants. The International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified them in different groups according to their carcinogenicity: benzene [5] (Group 1- carcinogenic to humans); ethylbenzene [6], chloroform [7] and bromodichloromethane [8] (Group 2B- possibly carcinogenic to humans); and toluene, xylenes, dibromochloromethane and bromoform [8] (Group 3-

not classifiable as regards their carcinogenicity in humans). Moreover, all these compounds are present in the priority list of hazardous substances of the Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act (CERCLA) [9], in which the compounds are ordered according to a combination of their frequency, toxicity and potential exposure to humans. From this list, it may be concluded that benzene and chloroform are high-priority pollutants, with positions 6 and 11 in the rank (1-275).

The determination of VOCs from soil samples is hampered by the complexity of the matrix and the trace-level concentrations and high volatility of the compounds in question. These characteristics mean that the extraction of the compounds from soils is the most critical step of the whole analytical method. Classical extraction procedures such as Soxhlet extraction [10-12] and liquid-solid extraction [10,11] have been applied to this type of analysis, but these techniques are time-consuming and often require the use of large amounts of solvent.

A new trend in analytical chemistry is the development of “environmentally friendly” sample pretreatment techniques, which are solvent-free or solvent-minimised and, at the same time, faster and more selective than classic procedures. These new sample pretreatment techniques offer several advantages as regards toxicological, environmental and economic aspects. Some techniques that fit in with these “green” requirements have been applied to the determination of VOCs in soil samples. The most widely employed techniques for this kind of analysis have been the different modalities of headspace [13]; static headspace (S-HS) [14-20], purge-and-trap (P&T) [21-25] and HS-solid-phase microextraction (HS-SPME) [26-29].

Despite the advantages of these methods, all of them require special instruments, which often are relatively expensive and require technical skill and expertise if satisfactory results are to be obtained. Moreover, some of

these procedures employ extraction times of the order of 30 min, especially when two-step procedures, such as P&T and HS-SPME, are used.

With a view to finding an alternative method able to provide satisfactory results without the need for complex and expensive instruments, and maintaining the requirements of minimum sample pre-treatment and low solvent consumption, our research group has explored the possibilities of the QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) extraction procedure for the analysis of VOCs in soil samples.

The method omits or replaces many complicated analytical steps commonly employed in traditional methods, and provides high-quality results with a high sample throughput (approx. 10 min extraction time), low solvent and glassware consumption, little work and low cost of analysis per sample. Moreover, the use of equipment commonly affordable for most analytical laboratories together with the fact that no technical expertise is required to perform the extraction make this method a powerful tool that could be used in routine analyses.

To the best of our knowledge, current use of QuEChERS with soil matrixes is very limited [30,31], and in those studies the technique was applied to the determination of pesticides. However, application of the technique for the extraction of VOCs from soil samples has only been proposed recently [32, 33].

Here we propose the use of a mass spectrometer detector after analysis with QuEChERS extraction and fast gas chromatography separation for the determination of THMs and BTEX in soil samples. The main drawback commonly associated with the QuEChERS method -that of the low preconcentration of the compounds in the extracts- was solved by using a large-volume injection technique, as recommended in many previous publications [34-36]. Moreover, the selected ion monitoring (SIM) mode was employed to provide lower LOQ in the analysis of the target compounds.

The experimental conditions of the instruments used were chosen, a study to explore the possible existence of a matrix effect was performed; the analytical characteristics of the method were studied in a fortified garden soil sample, and finally the method was validated by means of the analysis of two certified reference materials (CRMs).

2. Experimental

2.1. Chemicals

Ethyl acetate was HPLC grade (CHROMASOLV® Plus) and was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Trihalomethanes (chloroform, bromodichloromethane, dibromochloromethane and bromoform) were from Supelco (Bellefonte, PA, USA); toluene, ethylbenzene and m-xylene were from Acros Organics (Geel, Belgium), and benzene was from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Anhydrous magnesium sulfate (extra pure) and sodium chloride (reagent grade) were from Scharlau (Barcelona, Spain). Ultrapure water was obtained with an Elgastat UHQ water purification system.

2.2. Standard solutions and samples.

2.2.1. Standard solutions

Stock solutions of the trihalomethanes and BTEX (20.00 mg/L) in methanol (MeOH) were prepared and stored in a refrigerator at 4 °C. Dilutions of these stock solutions in EtOAc were used to optimize the experimental conditions and to spike the soil samples.

2.2.2. Soil samples

2.2.2.1. Spiked soils

Two different natural soils were used: one with a high organic content from a public garden (Salamanca, Spain), and a Vertisol, characterised by its high content in clay (Tabasco, Mexico). These soil samples were air-dried on

a heating plate at 90 °C for 48 h with frequent turning in order to remove any traces of organic compounds and humidity from the soil. The blank matrices obtained were checked to be free of the target VOCs before spiking. Chloroform, and BTEX were present in the blank soil samples, although these compounds were also found when fresh ethyl acetate was analysed directly with the same method. Chloroform and BTEX are ubiquitous in the environment, and trace levels have commonly been found in different types of samples [20]. Thus, for each matrix the peak areas found in the blank were subtracted from the areas in the different spiked levels. These soils were spiked and used to check the existence of a matrix effect. The analytical characteristics of the method were estimated using a fortified garden soil.

The procedure used to spike the samples was as follows: a portion of 20g of soil was placed in a 100 mL vial and a 2 mL aliquot of a THMs and BTEX solution in ethyl acetate was added (at a suitable concentration for each case). The vial was sealed hermetically and shaken vigorously for 15 minutes to achieve perfect homogenization of the compounds in the matrix. The samples were stored in a refrigerator (4 °C) for 15 days to allow the interaction between the compounds and the matrix to take place in order to obtain samples that would resemble natural soils as much as possible.

2.2.2.2. CRM soils

Two certified reference materials (CRMs) were analysed to validate the optimised method. The CRMs employed were a silty clay soil (RTC-CRM631) and a clay soil (RTC-CRM635), both of them purchased from LGC Promochem (Barcelona, Spain).

2.3. PTV-GC-MS instrumentation

An Agilent 6890 gas chromatograph, equipped with a DB-VRX capillary column for fast gas chromatography (20 m x 0.18 mm x 1 µm) from Agilent

J&W was used. The carrier gas was helium N50 (99.995 % pure, from Air Liquide).

The injector used was a Programmable Temperature Vaporizer (PTV) (CIS-4; Gerstel, Baltimore, MD, USA). The liner was a deactivated single baffle with an internal diameter of 2 mm, packed with Tenax-TA[®], with an internal volume of 180 μ L. To introduce the samples into the PTV, a CombiPAL autosampler (CTC analytics AG, Zwingen, Switzerland) operating in liquid injection mode was used. This sampler is equipped with a tray for 42 vials and a 10 μ L microsyringe was used.

The detector was a quadrupole mass spectrometer (HP 5973), equipped with an inert ion source operating in electron-impact mode, using a 70 eV ionization voltage. The temperature of the ion source was set at 230 °C and the temperature of the quadrupole was 150 °C. The analyses were performed in the scan and SIM modes.

2.4. Analytical procedures

2.4.1. Sample pretreatment (simplified QuEChERS)

The experimental extraction variables were optimized in a previous work [33]. Consequently, the procedure applied to 5 g of soil sample included the addition of water to moisten the sample (3 mL), liquid extraction with ethyl acetate (2.5 mL), salt-out partitioning of water with anhydrous MgSO₄ (2 g), and direct injection of the organic extract, obtained after the centrifugation step, into the gas chromatograph.

2.4.2. Programmed temperature vaporization

The injection mode used in the optimized method was solvent vent, and cooling was accomplished with liquid CO₂. To select the optimum injection technique, conventional split and splitless modes were also tested.

The liner used was packed with Tenax-TA[®]. The injection volume was adjusted to 7 μ L and the initial temperature was 5 °C. Vent flow was set at

50.0 mL/min and vent pressure at 5.00 psi. After 1 min (purge time), the split valve was closed and the liner was flash-heated at 12 °C/s to 300 °C. The injection time was 1.50 min, after which the split valve was opened again and the liner temperature was held at 300 °C for 7 min in order to avoid a possible memory effect.

2.4.3. Gas chromatography

The column oven temperature was set to an initial temperature of 45 °C for 3.00 min; this was increased at a rate of 50 °C/min to 250 °C and held for 1.0 min. The helium flow was 1.5 mL/min. Under these conditions, the compounds eluted in less than 5.50 min, and the total chromatographic run time was 8.10 min.

2.4.3. Mass spectrometry

The analyses carried out to optimize the analytical conditions were performed in scan mode. The m/z range was 25-270 amu and the abundance threshold value was set at 0. The different compounds were identified by comparison of the experimental spectra with those of the NIST'98 database (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, version 1.6).

Study of the matrix effect, determination of the analytical characteristics of the method, and prediction of the concentration of the target compounds in the certified samples were performed in SIM mode. The information obtained in scan mode allowed us to establish three SIM groups with six ions each. The first one (4.10-4.60 min) contained the three most abundant ions of chloroform and bromodichloromethane (83, 85, 47) and the three of benzene (78, 77, 51); the second (4.60-5.20 min) contained the m/z variables characteristic of toluene (91, 92, 65) and dibromochloromethane (127, 129, and 131), and the third group (4.30-6.10 min) comprised the characteristic ions of ethylbenzene and xylene (91, 106, 77) and those characteristic of

bromoform (171, 173, 175). The ions were acquired with a dwell-time of 5 ms.

2.5. Data analysis

Data collection was performed with Enhanced ChemStation, G1701CA Ver. C 00.00 software from Agilent Technologies.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of the experimental conditions (PTV-GC-MS)

The experimental conditions of the different modules comprising the instrumental configuration were studied in order to optimize the chromatographic separation. For these experiments, solutions of the target compounds in EtOAc were used.

3.1.1. PTV conditions

Two different injection modes (hot splitless and solvent vent) allowed by the PTV were investigated to evaluate the most appropriate injection mode for the group of compounds studied. For these experiments, a solution of 200 ppb of THMs and BTEX in EtOAc was used, and the analyses were performed in triplicate. The variables affecting each of these injection modes were optimized in order to compare the results obtained when the optimum conditions for both methods were used.

For the splitless injection mode, a temperature of injection of 300 °C (the maximum recommended for Tenax-TA® and adequate to prevent retention of the analytes in the packing material) and a splitless time of 1.5 min (sufficient to inject the entire sample into the column) were selected. The injection volume was studied for values of 0.5, 1, 2 and 3 µL. The chromatographic resolution and the shape of the peaks were good for all volumes studied, but the repeatability of the signals decreased significantly for volumes higher than 1 µL. This effect can be explained in terms of the solvent expansion volume, which may exceed the liner volume and cause

sample discrimination and a reduction in repeatability. Accordingly, a volume of 1 μL , which afforded the highest S/N ratios without losing signal repeatability, was chosen.

For the solvent-vent injection technique, a liner packed with Tenax-TA[®] was selected in view of its lower retention of EtOAc and its ability to trap the target compounds [37]. Values of the initial liner temperature of 5, 10 and 20 $^{\circ}\text{C}$ were studied. For most of the compounds, similar results were obtained in the temperature range studied, but the most volatile analytes- chloroform, benzene and bromodichloromethane- underwent significant losses as the temperature rose, losses of 50 % being reached when an initial temperature of 20 $^{\circ}\text{C}$ was used in comparison with the areas obtained with 5 $^{\circ}\text{C}$. In light of these results, a temperature of 5 $^{\circ}\text{C}$ was chosen.

The variables affecting solvent elimination are the time during which the solvent is eliminated and the flow rate at which this purging is performed. The degree of solvent elimination determines the volume of sample that can be injected, since an excess of solvent in the column gives rise to problems in resolution and reproducibility.

The purge time was studied for values of 0.50, 1.00, 1.20 and 1.30 min and the purge flow for values of 50, 100 and 150 mL/min. The increase in both parameters had similar effects on the injection: the volume of solvent eliminated was higher, which allowed the injection of higher volumes, but at the same time losses of the compounds (especially the more volatile ones) occurred. Additionally, the chromatograms obtained with high values of these parameters were less reproducible, and this effect was more pronounced for high purge flow values. Therefore, compromise purge flow (50 mL/min) and purge time (1.0 min) values were selected. With these values, an injection volume of up to 7 μL provided reproducible results with acceptable losses of the most volatile compounds.

Figure 1 shows the scan chromatograms of the target compounds corresponding to a 200 µg/L solution injected in both injection modes. The most abundant m/z for each compound was extracted. For chloroform and benzene, the most volatile compounds, a slight decrease in peak area was observed when the solvent vent mode was used owing to the losses of these compounds during the process of solvent elimination. For the least volatile compounds, less influenced by solvent effects, the solvent vent technique (injection volume of 7 µL) was clearly advantageous, 4 fold – 6 fold increases in peak areas being obtained in comparison with those obtained with 1 µL splitless injection. Based on these results, solvent vent injection was chosen as the technique owing to the improvement in sensitivity achieved for sparingly volatile compounds and the similar sensitivity obtained for highly volatile analytes.

3.1.2. Fast GC parameters

The different variables involved in the chromatographic separation were optimized. The temperature ramp used was the maximum permitted by the oven, and the final temperature was 250 °C, which was sufficient to guarantee the elution of the compounds and was appropriate for the technical specifications of the column.

Accordingly, the only parameter studied for a range of values was the initial temperature of the column. Values of 35, 45 and 55 °C were explored. For a temperature of 55 °C, chloroform appeared, overlapped by the EtOAc solvent front. Although it was possible to detect the peak by extracting m/z 83, problems of reproducibility were observed. As the initial temperature decreased the retention time of the compounds increased and the compounds became more distanced from the EtOAc peak. However, the time necessary to recover the initial conditions was increased considerably as the initial temperature of the column decreased. Therefore, an initial temperature of 45 °C was chosen. With this temperature, adequate

chromatographic resolution and reproducibility were achieved without unduly prolonging the analysis time.

3.1.3. MSD parameters

From the analysis performed in scan mode (25-270 amu) the compounds were identified and their retention times were determined. From these results, three SIM groups were established (Section 2.4.3). The quantitation ion and the two identification ions for each compound are specified in Table 1. The dwell time was studied for values of 1, 5 and 10 ms. The acquisition rates of the quadrupole for the three SIM groups (six ions in each group), with the different dwell-time values studied, were 32, 18 and 12 spectra/sec respectively. The best peak definition was obtained for a dwell-time of 5 ms and this was therefore the value chosen.

Figure 2 shows the chromatogram of a solution of the target compounds in EtOAc, analyzed with the optimized method. The solution was prepared such that the peak areas obtained for all the compounds would be similar.

The time necessary for the eight compounds to elute was 5.50 min. The retention times, widths at half-height (w_h), boiling points, and the m/z ratios selected for each target compound are shown in Table 1. The widths at half-height were in the 0.36 - 0.66 min range and hence, considering the classification based on this parameter [38], the separation achieved corresponded to fast gas chromatography.

3.1.4. Time of analysis

The simplified QuEChERS method is very simple and fast; a single analyst can prepare a batch of 7 extracts in an hour, using few materials and consuming less than 20 mL of EtOAc. Once the compounds had been extracted from the soils with EtOAc, the final extracts were subjected directly to chromatographic analysis. Under optimum conditions, the total chromatographic run time was 8.10 min.

3.2. Analysis of soil samples

A study aimed at addressing the possible existence of a matrix effect was carried out. Moreover, the recoveries of the target compounds from two different soil samples were determined and the analytical characteristics of the method were studied in the fortified garden soil sample. Finally, to validate the optimised method two certified reference materials (CRMs) were analysed.

3.2.1. Matrix effect

Owing to the considerable complexity and heterogeneity of the samples and to the strong interactions of the compounds with the soil constituents, the existence of a matrix effect is very common in this kind of sample. In this study two different types of soils were used (garden soil and a Vertisol).

The blank soils were spiked at different concentration levels for each compound (50, 100, 150 and 200 µg/L) and were subjected to the extraction procedure and chromatographic analysis. Table 2 shows the slopes of the calibration curves obtained. A matrix effect was observed for most of the analytes studied, since there were slight differences in the slopes for the two soil matrixes. The degree of the matrix effect for each group of target compounds was more evident as the organic carbon partition constant (K_{oc}) of the compounds increased.

The different degree of the matrix effect for the target compounds prevents the use of a single internal standard to overcome the matrix effect. Thus, in the present study we decided to use a standard additions protocol to overcome the matrix effect, which has been shown to work well for soil matrixes [20].

3.2.2. Analyte recoveries from soil matrixes

To determine the extraction efficiency of the QuEChERS method proposed here, EtOAc solutions of the target compounds at different

concentration levels (50, 100, 150 and 200 $\mu\text{g/L}$) were injected directly into the GC system. Moreover, two soil samples -a Vertisol and a garden soil - spiked at the same concentration levels as the EtOAc solutions- were extracted and analyzed. To extract the soil samples, a sample:solvent ratio of 1:1 was used in order to avoid the effect of any preconcentration factor; thus, 2.5 g of soil were extracted with 2.5 mL of EtOAc (water volume (1.5 mL) and MgSO_4 amount (1 g) were scaled proportionally).

Comparison of the slopes of the calibration curves obtained with standard solutions of the compounds in EtOAc with the slopes obtained from the soil samples afforded a mean value (along the range of concentrations considered) of the extraction efficiency of the proposed methodology for each target compound.

The values obtained were satisfactory, lying within the 65-76 % recovery range (Table 3). Regarding the different compounds, it may be observed that the recoveries rose as the boiling point of the analytes increased. This is due to losses of the compounds during the sample preparation step, which are more likely for the more volatile compounds. Nevertheless, the values of the octanol-water coefficients (K_{ow}) may not have a strong effect, since all of them are of the same order. The different composition of the two soil matrices, determined higher extraction efficiencies from the garden soil than from the Vertisol for all the compounds studied.

3.2.3. Analytical characteristics of the method

In order to determine the analytical characteristics of the method, a garden soil sample was spiked at different concentration levels (50, 100, 200, 300 and 500 $\mu\text{g/kg}$). Three aliquots of 5 g at each concentration level were subjected to the extraction procedure described in Section 2.4.1. The extracts obtained were analyzed in triplicate with the optimized conditions. The characteristics studied were linearity, repeatability of the chromatographic

method, reproducibility of the overall approach, and sensibility according to the limits of detection and quantitation (Table 4).

The variables used in the calibration were the area under the curve in the extracted ion chromatogram for the quantitation ions (Table 1). Good linearity was obtained for all the target compounds at concentrations within the interval tested (from 50 to 500 µg/kg), with determination coefficients higher than 0.9932. The validity of the models was checked using ANOVA and none of them was found to be subject to lack of fit.

Precision (expressed as the relative standard deviation, RSD) was studied by performing repeatability and reproducibility studies. Repeatability -i.e. the inherent precision of the measurement approach- was studied by intra-day analysis (n=10) of an extract from a garden soil sample spiked at a concentration of 100 µg/kg. The results obtained are shown in Table 4; values ranging between 0.4 % and 2.8 % were obtained. The highest values were for chloroform and benzene, the two most volatile compounds, which may be more strongly influenced by the solvent elimination step during the injection. However, the low RSD values obtained point to the highly satisfactory applicability of the analytical method even for highly volatile compounds, for which the injection conditions were unfavourable.

The reproducibility of the whole procedure was calculated by injecting ten different extracts obtained from ten aliquots of a garden soil sample spiked at the same concentration (100 µg/kg). The extracts were injected on different days over a period of two weeks and each extract was analyzed in triplicate. Table 4 shows the results obtained, which range between 1.5 % and 7.3 %.

The limits of detection (DLs) and quantitation (QLs) were estimated using the following equations:

$$DL = \frac{3.3\sigma}{S} \qquad \qquad \qquad QL = \frac{10\sigma}{S}$$

where σ is the standard deviation of the peak response for ten replicates ($n = 10$) corresponding to an S/N ratio of approximately 3; S is the slope of the calibration curve, and 3.3 is Student's t factor ($n-1, 0.99$).

The values obtained are shown in Table 4. Owing to their high volatility, the highest limits of detection were obtained for benzene and chloroform (15 and 8.4 $\mu\text{g/kg}$ respectively). The other compounds had detection limits in the 0.2 to 1.6 $\mu\text{g/kg}$ range. Upon comparing the detection limits obtained for the THMs with this analytical configuration with those observed when the same QuEChERS procedure was used to extract the compounds from the soil samples and the extracts were analysed by means of GC- μECD (0.01-0.66 $\mu\text{g/kg}$) [33], it was observed that the values obtained when a MS detector was used were higher, owing to the high selectivity of the μECD . Nevertheless, the use of a MS detector allows the unequivocal identification and quantification of essentially any volatile or semi-volatile compound present in the sample, which may be very useful when the analysis is focused on the screening of the group of compounds present in the sample, or when the target compounds are not halogenated, as in the case of BTEX.

3.2.4. Determination of THMs and BTEX in two different CRM soils

In order to validate the proposed methodology, a standard additions protocol with the two certified reference materials -a silty clay soil (RTC-CRM631) and a clay soil (RTC-CRM635)- was used.

In each soil, a six-level calibration study was performed, analyzing three replicates from each level. The concentrations of each compound added were selected in order to achieve the minimum uncertainty associated with prediction. Aliquots of 5.0 g of the CRM soil were weighed accurately and 50 μL of a solution of the compounds in EtOAc was added at the appropriate concentration for each case. Then, the sample was subjected to the extraction procedure.

The samples were first analyzed in the scan detection mode, and the compounds were identified according to their retention times and from comparisons of the spectra obtained with the spectra of the pure compound stored in the database (The maximum admitted difference in abundances was 20 %). Following this, quantitation was performed in SIM mode. Figure 3 shows the chromatograms obtained in the scan and SIM modes for CRM-635; the results obtained (Table 5) were highly satisfactory. The calculated concentrations were, in most cases, close to the reference value. For all compounds (except for benzene), the predicted values lay within the prediction intervals specified in the certified material. The predicted values for benzene were slightly above the prediction interval, but this result can be accounted for by the low concentrations of this compound in the certified reference materials (72.0 and 42.9 $\mu\text{g/kg}$, respectively), which are close to the quantification limit estimated for benzene with the optimized method (45 $\mu\text{g/kg}$).

Thus, it seems that the proposed method can be applied to the determination of the target compounds from soil samples. Additionally, it may be seen that the most satisfactory results were obtained for the least volatile compounds. This is due to the less likely losses of these compounds during the sample preparation step and, especially, to their better properties for sample injection. For sparingly volatile compounds it is possible to inject large volumes of sample (eliminating the solvent through the split line, while the compounds are concentrated in the packing material of the liner); this translates to lower limits of detection and better results.

4. Conclusions

A simple, fast and sensitive method has been developed for the determination of THMs and BTEX in soil samples. The method is based on the extraction of the compounds by a simplified version of QuEChERS and

direct analysis of the extracts by large-volume injection-fast gas chromatography and mass spectrometry detection.

The use of a PTV with a liner packed with Tenax-TA[®] and programmed in the solvent-vent mode allowed the injection of a high volume of sample (7 μ L), giving rise to a marked improvement in sensitivity for many of the target compounds. The fast temperature ramp used in the oven allowed the eight compounds to be separated in less than 6 min. The use of mass spectrometry detection in the SIM mode affords an improvement in the selectivity and sensitivity of the method.

The extraction efficiency of the method for different types of spiked soils was in the 60 to 76 % recovery range. The analytical method provides excellent values of repeatability and reproducibility, with detection limits ranging between 0.2-15 μ g/kg.

The proposed methodology was validated by analyzing two certified reference materials (CRMs). The most satisfactory results were obtained for the less volatile compounds owing to their better properties for large-volume injection.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from the DGI (CTQ2007-63157/BQU) and the Consejería de Educación y Cultura of the Junta de Castilla y León (GR87) for this research. S.H.M. is also grateful to the Spanish MEC for a doctoral fellowship.

References

- [1] I. P. Breus, A.A. Mishchenko, *Soil Chemistry* 12 (2006) 1413.
- [2] *Soil Screening Guidance: User's guide*, Office of Solid Waste and Emergency Response, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, USA, 1996, p. 39.
- [3] *Supplemental guidance for developing soil screening levels for superfund sites*, Attachment D, Office of emergency and Remedial Response, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, USA, 2001, p. 177.
<http://www.epa.gov/superfund/health/conmedia/soil/pdfs/attachc.pdf>
- [4] USEPA Method 8260B, *Volatile Organic Compounds by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS)*, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 8000 series, USEPA, Washington, USA, 1996.
<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8260b.pdf>
- [5] *Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risk to humans, Summaries & Evaluations*, vol. 29, International Agency for Research on Cancer (IARC), 1982, <http://monographs.iarc.fr/>
- [6] *Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risk to humans, Summaries & Evaluations*, vol.77, International Agency for Research on Cancer (IARC), 2000, <http://monographs.iarc.fr/>
- [7] *Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risk to humans, Summaries & Evaluations*, vol.73, International Agency for Research on Cancer (IARC), 1999, <http://monographs.iarc.fr/>
- [8] *Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risk to humans, Summaries & Evaluations*, vol.71, International Agency for Research on Cancer (IARC), 1999, <http://monographs.iarc.fr/>

-
- [9] 2007 Priority list of hazardous substances, Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act (CERCLA), Agency for Toxic Substances and Disease Registry, United States, 2007, <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html>
- [10] K.M. Meney, C.M. Davidson, D. Littlejohn, *Analyst* 123 (1998) 195.
- [11] L. Ramos, J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman, J. *Chromatogr. A* 891 (2000) 275.
- [12] M.D. Burford, S.B. Hawthorn, D.J. Miller, J. *Chromatogr. A* 685 (1994) 95.
- [13] N. Jakubowska, B. Zygmunt, Z. Polkowska, B. Zabiegala, J. Namiński, J. *Chromatogr. A* 1216 (2009) 422.
- [14] USEPA Method 5021, Volatile Organic Compounds in soils and other solid matrices using equilibrium headspace analysis, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 5000 series, USEPA, Washington, USA, 1996.
- [15] M. Llompart, K. Li, M. Fingas, *Talanta* 48 (1999) 451.
- [16] J.S. Alvarado, C. Rose, *Talanta* 62 (2004) 17.
- [17] J.L. Pérez Pavón, A. Guerrero Peña, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, J. *Chromatogr. A* 1047 (2004) 101.
- [18] A. Serrano, M. Gallego, J. *Chromatogr. A* 118 (2006) 261.
- [19] F.A. Esteve-Turrillas, S. Armenta, S. Garrigues, A. Pastor, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 587 (2007)
- [20] J.L. Pérez Pavón, S. Herrero Martín, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, J. *Chromatogr. A* 1216 (2009) 6063.
- [21] O. Zuloaga, N. Etxebarria, J. Zubiaur, L.A. Fernández, J.M. Madariaga, *Analyst* 125 (2000) 477.

- [22] K.F. Haselmann, F. Laturnus, B. Svensmark, C. Gron, *Chemosphere* 41 (2000) 1769.
- [23] M.Rosell, S.Lacorte, D. Barceló, J. *Chromatogr. A* 1132 (2006) 28
- [24] O. Zuloaga, N. Etxebarria, L.A. Fernández, J.M. Madariaga, *Anal. Chim. Acta* 416 (2000) 43.
- [25] N. Campillo, P. Viñas, I. López-García, N. Aguinaga, M. Hernández-Córdoba, *Talanta* 64 (2004) 584.
- [26] M. Eriksson, J. Fäldt, G. Dalhammar, A.-K. Borg-Karlson, *Chemosphere* 44 (2001) 1641.
- [27] R.S. Dungan, *Anal. Lett.* 38 (2005) 2393.
- [28] Z. Zhang, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 67 (1995) 34.
- [29] O. Ezquerro, G. Ortiz, B. Pons, M.T. Tena, J. *Chromatogr. A* 1035 (2004) 17.
- [30] C. Lesueur, M. Gartner, A. Mentler, M. Fuerhacker, *Talanta* 75 (2008) 284.
- [31] L. Chen, X-S Li, Z-Q Wang, C-P Pan, R-C Jin, *Ecotox. Environ. Safe.* 73 (2010) 73.
- [32] C. García Pinto, M.E. Fernández Laespada, S. Herrero Martín, A.M. Casas Ferreira, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, *Talanta* 81 (2010) 385.
- [33] S. Herrero Marín, C. García Pinto, J. L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A* submitted for publication.
- [34] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, J. *AOAC Int.* 86 (2003) 412.
- [35] S.J. Lehotay, A. de Kok, M. Hiemstra, P. van Bodergraven, J. *AOAC Int.* 88 (2005) 595-613.

-
- [36] S.J. Lehotay, J. AOAC Int. 90 (2007) 485.
- [37] J.L. Pérez Pavón, S. Herrero Martín, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1194 (2008) 103.
- [38] E. Matisová, M. Dömötörová, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 199.

Figure legends

Figure 1: Comparison of the signals obtained for the target compounds with the injection modes hot splitless and solvent vent in optimum conditions.

Figure 2: SIM chromatogram of a solution of the target compounds in EtOAc, analyzed with the optimized method.

Figure 3: Chromatograms, in scan (a) and SIM (b) modes, of the soil CRM635.

Figure 1:

Figure 2:

EtOAc solution with 800 ppb for chloroform, 200 ppb for bromodichloromethane and dibromochloromethane, 400 ppb for bromoform and benzene and 40 ppb for toluene, ethylbenzene and m-xylene.

Figure 3:

Table 1: Formula, boiling points, retention times, widths at half height and m/z ratios selected for the eight compounds studied.

Compounds	Formula	Boiling point (°C)	Log K _{ow}	K _{oc} (L/kg)	t _R (min)	width at half height ^a (s)	m/z	
							Quantitation ion	Qualifier ions
Chloroform (CFM)	CHCl ₃	61	1.97	40	4.26	0.36	83	85, 47
Bromodichloromethane (BDCM)	CHCl ₂ Br	90	2.0	87	4.55	0.61	83	85, 47
Dibromochloromethane (DBCM)	CHClBr ₂	117	2.16	107	4.99	0.62	127	129, 131
Bromoform (BMF)	CHBr ₃	149	2.35	126	5.45	0.66	173	171, 175
Benzene	C ₆ H ₆	80	2.13	66	4.41	0.54	78	77, 51
Toluene	C ₇ H ₈	111	2.75	145	4.92	0.60	91	92, 65
Ethylbenzene	C ₈ H ₁₀	136	3.14	207	5.38	0.55	91	106, 77
m-xylene	C ₈ H ₁₀	139	3.20	204	5.43	0.62	91	106, 77

Table 2: Slopes of the calibration curves

Compound	Matrix	
	Garden soil	Vertisol
Chloroform	(11.4±0.3)10	(11.3±0.7)10
Bromodichloromethane	(84±1)10	(80±2)10
Dibromochloromethane	(70±2)10	(66±1)10
Bromoform	(48.8±0.6)10	(44±1)10
Benzene	(13.8±0.1)10	(12±0.1)10
Toluene	(278±5)10	(258±8)10
Ethylbenzene	(620±10)10	(576±7)10
m-xylene	(506±8)10	(472±2)10

Table 3: Recoveries of the target compounds in two soil matrices

Compound	Recoveries (%)	
	Garden soil	Vertisol
CFM	68	68
BDCM	70	67
DBCM	70	66
BMF	76	69
Benzene	69	60
Toluene	70	65
Ethylbenzene	75	70
m-xylene	75	70

Table 4: Analytical characteristics of the method in fortified garden soil samples

Compound	Slope	R ²	Repeatability (%) ^a	Reproducibility (%) ^b	DL (µg/kg)	OL (µg/kg)
CFM	(10.9±0.2)10	0.9955	2.0	7.3	8.4	25.4
BDCM	(90.6±0.7)10	0.9993	0.9	3.4	0.3	0.9
DBCM	(81±1)10	0.9978	1.4	2.9	0.4	1.2
BFM	(51.9±0.8)10	0.9970	1.7	2.1	1.6	4.9
Benzene	(11.7±0.3)10	0.9932	2.8	6.1	15	45
Toluene	(284±2)10	0.9994	1.3	2.7	0.4	1.2
Ethylbenzene	(629±9)10	0.9977	0.4	1.9	0.2	0.5
m-xylene	(516±7)10	0.9980	0.7	1.5	0.3	0.9

^a Intra-day analysis of an extract obtained from a garden soil spiked at 100 µg/k
n=10.

^b Analysis of ten extracts of a garden soil spiked at 100 µg/kg and analyzed over
of two weeks.

Table 5: Determination of the target compounds in the certified reference materials

CRM 631			
Compound	Predicted Value ($\mu\text{g/kg}$)	Reference Value ($\mu\text{g/kg}$) *	Prediction Interval ($\mu\text{g/kg}$) *
Chloroform	74$\pm$9	60.4	14.0-136
BDCM	90$\pm$10	74.9	45.9-135
DBCM	95$\pm$10	84.2	2.37-166
Bromoform	80$\pm$10	64.1	0-131
Benzene	90$\pm$20	72.0	35.6-108
Toluene	78$\pm$4	77.5	37.1-118
Ethylbenzene	130$\pm$20	124	59.3-188
m+p xylene	100$\pm$10	94.5	38.4-151
xylene, total	170$\pm$20	173	49.2-297
CRM 635			
Chloroform	110$\pm$10	98.7	46.0-151
BDCM	96$\pm$8	90.6	45.9-135
DBCM	120$\pm$20	131	63.8-198
Bromoform	79$\pm$8	74.5	27.5-122
Benzene	60$\pm$20	42.9	24.2-61.7
Toluene	124$\pm$7	129	66.9-192
Ethylbenzene	120$\pm$10	133	76.0-190
m+p xylene	220$\pm$20	206	126-286
xylene, total	280$\pm$20	263	152-375

* Values provided in the Certificates of Analysis of the CRM soils.

IX

**DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS
EN NANOPARTÍCULAS DE AEROSOL
PROCEDENTES DE LA COMBUSTIÓN DE MADERA
MEDIANTE DIFERENTES MÉTODOS BASADOS
EN CROMATOGRFÍA DE GASES**

Este trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Helsinki, bajo la dirección de Marja-Liisa Riekkola y Tuulia Hyötyläinen y en colaboración con el grupo de investigación dirigido por Makku Kulmala de la División de Ciencias de la Atmósfera y Geofísica del Departamento de Física de La Universidad de Helsinki.

Los resultados de esta investigación han sido publicados y el correspondiente artículo científico se adjunta en esta memoria (*published article IX*). Sin embargo, los resultados que se exponen a continuación corresponden a las partes del trabajo en las que fui la principal responsable del desarrollo experimental, así como de la evaluación de los resultados y de la redacción de las correspondientes secciones del artículo científico. Del mismo modo, los objetivos y resultados de este capítulo se han centrado en los que conciernen a dicha parte del trabajo.

1. INTRODUCCIÓN

Las partículas que constituyen los aerosoles atmosféricos comprenden una compleja mezcla de compuestos volátiles y semi-volátiles, tanto orgánicos como inorgánicos. La determinación de compuestos orgánicos en partículas de aerosoles es de gran interés en la actualidad debido a los potenciales efectos adversos de estos compuestos para la salud humana y los ecosistemas. Aunque hoy día existen técnicas analíticas muy sofisticadas, la determinación de la composición orgánica de los aerosoles sigue siendo un reto complicado debido a la heterogeneidad de las partículas de aerosol, la dificultad involucrada en el proceso de muestreo y las concentraciones de los compuestos a niveles de trazas.

Tradicionalmente, las partículas de aerosol se recogen haciendo pasar el aire a través de un filtro y los compuestos de interés se extraen del filtro mediante un disolvente o por desorción térmica (*thermal desorption*, TD). Con este sistema de toma de muestra, se recolecta una mezcla de partículas de diferentes tamaños (por encima de un determinado tamaño de poro). Los filtros más utilizados son los de tamaño de poro de 2.5 y 10 μm , y las muestras recolectadas con dichos filtros se denominan respectivamente $\text{PM}_{2.5}$ y PM_{10} (*particulate matter*, PM).

Una de las técnicas analíticas más empleadas en este tipo de análisis es la cromatografía de gases seguida de detección por espectrometría de masas (GC-MS) [1-5]. Debido a la amplia variedad de compuestos presentes en las muestras, una sola etapa cromatográfica podría no ser suficiente para lograr una separación adecuada de sus componentes y los cromatogramas obtenidos con 1D GC suelen tener zonas en las que los compuestos aparecen solapados. Por tanto, es muy común incluir una etapa de fraccionamiento de los extractos procedentes de los filtros antes de someterlos al análisis cromatográfico. En esta etapa los componentes de la muestra se separan en dos o más fracciones, utilizando columnas de sílice o

alúmina, y cada una de las fracciones se analiza por separado [6-11]. Otra opción para solucionar la baja eficacia de separación de una sola columna cromatográfica es el uso de una técnica multidimensional. La cromatografía de gases en dos dimensiones completa ha demostrado ser una poderosa técnica en el análisis de aerosoles [12,13]. La combinación de desorción térmica con GC X GC y espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOFMS) [15-17] se ha utilizado de manera satisfactoria. Se han desarrollado métodos de análisis *in situ*, utilizando un sistema de muestreo fabricado en el laboratorio, seguido de desorción térmica y GC X GC [17-19]. También se han utilizado métodos en los que la extracción de los compuestos del filtro se consigue con un disolvente orgánico. Este método de extracción seguido de GC X GC con TOFMS o FID se ha aplicado a la determinación de especies orgánicas en aerosoles urbanos [20] y rurales [21].

Las fracciones más pequeñas de las partículas de aerosoles (diámetro de partícula por debajo de 100 nm) están recibiendo una especial atención actualmente, debido a su riesgo potencial para la salud humana. Estas partículas se transportan rápidamente a lo largo de grandes distancias y pueden penetrar fácilmente en los tejidos vivos [8,22]. En consecuencia, la caracterización química de las partículas de aerosoles más pequeñas es crítica para evaluar su impacto en la salud humana y los ecosistemas. Desafortunadamente, el análisis de la fracción orgánica de estas partículas tan pequeñas es muy complicado debido a la poca masa que suponen y al corto tiempo de vida de las partículas.

Como se ha descrito anteriormente, en muchos de los estudios destinados a determinar la composición de las partículas de aerosol, el procedimiento de toma de muestra consiste en recolectar una mezcla de partículas de diferentes tamaños en un solo filtro. Sin embargo, existen unos pocos estudios en los que se han recolectado nanopartículas de tamaños específicos y se han determinado los compuestos orgánicos presentes en las

partículas de un determinado tamaño. Ochiai et al. [23] analizaron partículas separadas por tamaños, incluyendo la fracción de nanopartículas con un diámetro de 29 a 58 nm, en muestras de aerosoles procedentes de carreteras. Las muestras se recolectaron con un impactador de baja presión y los compuestos objeto de estudio eran los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), que se determinaron mediante TD-GC X GC-QMS. La configuración TD-GC-MS también se ha utilizado para determinar n-alcanos en nanopartículas atmosféricas (29-58 nm) [24] y PAHs en partículas separadas por tamaños (120-330 nm) en aerosoles procedentes de la combustión de madera [25]. Otra técnica analítica utilizada para el análisis de estas partículas consiste en el uso de diferentes dispositivos en los que el flujo de partículas de aerosol se analiza directamente mediante espectrometría de masas, estos dispositivos se han denominado aerosol-MS. Esta técnica se ha utilizado de forma satisfactoria en el análisis de compuestos orgánicos en partículas separadas por tamaños. Una de las principales ventajas de la metodología aerosol-MS, además de la rapidez de análisis, es la posibilidad de utilizar estos dispositivos para análisis *in situ* [26-27]. Hasta el momento, estos dispositivos se han utilizado con fines cualitativos, sin embargo, su capacidad para proporcionar información cuantitativa sobre los compuestos presentes en la muestra es aún limitada.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es el de estudiar las posibilidades analíticas de tres métodos cromatográficos (GC-QMS, GC-TOFMS y GC X GC-TOFMS) para la determinación de compuestos orgánicos en nanopartículas de aerosoles. Como compuestos objeto de estudio se han seleccionado los alcanos y los PAHs, que se encuentran frecuentemente en los aerosoles ambientales y muchos de ellos son carcinógenos para el ser humano.

Se compararán las características analíticas de los tres métodos en relación a su sensibilidad, linealidad, reproducibilidad, tiempo de análisis, tiempo de muestreo y trabajo requerido.

Con los métodos propuestos, se analizarán nanopartículas de aerosoles, separadas por tamaños, procedentes de la combustión de una pieza de madera de pino. Dentro de la tendencia de minimizar la etapa de pretratamiento, las muestras (retenidas en filtros) se someterán a un sencillo procedimiento de extracción y los extractos obtenidos se analizarán directamente mediante los diferentes métodos cromatográficos. De esta manera se evaluarán las ventajas de la mayor eficacia en la separación de la técnica GC X GC frente a 1D-GC en el análisis de muestras complejas.

Como objetivo final, se determinarán las concentraciones de los compuestos objeto de estudio en las muestras de nanopartículas de diferentes tamaños.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos y disoluciones estándar

La acetona y el hexano (grado HPLC) fueron suministrados por Lb Scan Analytical Sciences (Dublín, Irlanda). La disolución estándar de 100 µg/L de n-alcenos (desde C10 hasta C40, CERTRAN®) fue suministrada por LGC Pomochem GMBH (Wesel, Alemania). La mezcla de PAHs (naftaleno (1), acenaftileno (2) acenafteno (3), fluoreno (4), fenantreno (5), antraceno (6), carbazol (7), fluoranteno (8), pireno (9), benzo(a)antraceno (10), criseno (11), benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno (13), benzo(a)pireno (14), indeno[1,2,3-cd]pireno (15), benzo[ghi]perileno (16), dibenzo[ah]antraceno (17)) que contenía 2.0 mg/mL de cada compuesto (Z-014G-R) era de AccuStandard (New Haven, USA). Se utilizaron dos estándares internos en el análisis cromatográfico: 4,4'-dibromo-octaflorobifenilo (estándar de cuantificación, 99%, Sigma Aldrich, Gillingham, UK) y 1-1'-binaftilo (98%, Across-organics, New Jersey, USA).

Se preparó una disolución estándar de 5.0 mg/L de PAHs y alcanos por dilución de las mezclas comerciales en hexano. A partir de ésta, se prepararon las diluciones necesarias en hexano, que se utilizaron para obtener las rectas de calibración y para calcular los límites de detección y cuantificación.

3.2. Sistema de muestreo

El sistema de muestro (Figura 1) utilizado se desarrolló en la División de Ciencias de la Atmósfera y Geofísica del Departamento de Física de La Universidad de Helsinki y se montó en una campana extractora del laboratorio. Las partículas de aerosol se generaron mediante la combustión de una porción de madera de pino con una llama de butano/propano. Las partículas generadas se cargaron al pasar a través del cargador bipolar y se separaron por tamaños con un analizador de movilidad diferencial

(*differential mobility analyzer*, DMA). Se utilizó una relación entre el flujo de aerosol y el flujo de aire limpio que circula en el interior del separador de 2:5.

Una vez que se ha conseguido un flujo de partículas de un tamaño determinado, parte de este flujo (0.3 mL/min) se lleva a un contador de partículas de condensación (*condensation particle counter*, CPC) (3022 A, TSI, MN, USA) que contabiliza el número de partículas/cm³ que llega en cada instante.

La otra parte del flujo de partículas de aerosol (0.7 mL/min) se hace pasar a través de un filtro, en el que las partículas quedan retenidas, para su posterior análisis mediante cromatografía de gases. El filtro utilizado era de un tamaño de poro de 0.45 µm, de celulosa regenerada, i.d. 15 mm, Phenomenex, CA, USA).

Figura 1: Diagrama esquemático del sistema de muestreo utilizado

3.3. Preparación de las muestras para el análisis cromatográfico

Los compuestos orgánicos retenidos en el filtro fueron extraídos con 1 mL de la mezcla de disolventes hexano/acetona (50/50, v/v%). Sobre el extracto obtenido se añadieron 10 μL de una disolución de 50 mg/L de 1,1'-binaftilo y el volumen de muestra se redujo a 100 μL bajo un flujo suave de nitrógeno. Finalmente, se añadieron 10 μL de una disolución de 50 mg/L del estándar de cuantificación (4,4'-dibromo-octaflorobifenilo). Cada muestra se analizó por triplicado. Antes de someter las muestras al procedimiento de análisis cromatográfico se analizó un blanco, que se obtuvo extrayendo un filtro limpio con 1 mL de la mezcla hexano/acetona (50/50, v/v%), y el

extracto se sometió a las mismas etapas de pretratamiento que una muestra real.

3.4. Instrumentación y métodos

3.4.1. GC-TOFMS y GC X GC-TOFMS

Los análisis desarrollados mediante GC-TOFMS y GC X GC-TOFMS se llevaron a cabo en un Agilent 7890 (Santa Clara, USA), que ha sido descrito en el apartado 3 de la sección III de esta memoria. El cromatógrafo está equipado con un inyector convencional *split/splitless* y acoplado a un detector LECO Pegasus® 4D TOFMS (LECO, St. Joseph, MI, USA). El cromatógrafo se ha modificado con la instalación de un horno secundario y de un modulador criogénico en dos etapas con cuatro chorros. La columna cromatográfica empleada en la primera dimensión es una HP-5 (29 m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm de espesor de fase estacionaria) de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania) y la de la segunda dimensión es una RTX-17 (79 cm x 0.1 mm x 0.1 µm) de Restek (Bellefonte, PA, USA). Las dos columnas se conectan mediante un conector universal Silket® Treated Universal Press-Thight® (Restek). Se utilizó una pre-columna de sílice desactivada de 2 m x 0.53 mm i.d. conectada a la columna de la primera dimensión para protegerla del posible deterioro.

Las condiciones analíticas empleadas en los métodos GC-TOFMS y GC X GC-TOFMS eran idénticas, salvo por el modulador, que se mantuvo desactivado para el análisis en una sola dimensión, en el que la segunda columna se comporta como una línea de transferencia entre la primera columna y el detector.

En ambos casos, se inyectó 1 µL de muestra en modo *splitless* (temperatura del inyector 250 °C) y se utilizó helio como gas portador, en el modo de flujo constante (1.00 mL/min). La temperatura de la columna de la primera dimensión se programó desde 50 °C (5 min) hasta 260°C (15 min)

con una velocidad de calentamiento de 5 °C/min y la de la columna de la segunda dimensión se programó desde 70 °C (5 min) hasta 280 °C (15 min) con una velocidad de calentamiento de 5°C/min. El tiempo cromatográfico total era de 62 min. El tiempo necesario para recuperar las condiciones iniciales después de un análisis era de 11 min. La línea de transferencia entre la columna de la segunda dimensión y el TOFMS se mantuvo a 280 °C y la fuente de ionización del detector a 200 °C. Se utilizó ionización de impacto electrónico (70 eV) y el rango de masas registrado fue de 50 a 500 uma, con una frecuencia de adquisición de 50 Hz.

Para el análisis mediante GC X GC, los principales parámetros del modulador criogénico se programaron de la siguiente forma: el tiempo óptimo de modulación era de 5 s, con un pulso caliente de 1.90 s y un pulso frío entre etapas de 0.60 s. El enfriamiento se consiguió con una corriente de nitrógeno gas presurizado, enfriado con nitrógeno líquido que se almacenaba en un tanque portátil del tipo Euro-Cyl 120/4.

La adquisición de datos se realizó con el software LECO®ChromaTOF™ optimizado para Pegasus® 4D (versión 3.34). El software tiene una gran variedad de funciones, tales como: búsqueda automática de picos, deconvolución de picos, búsqueda espectral en la librería, combinación e integración automática de todos los picos de la segunda dimensión que pertenecen a un mismo compuesto. Después del procesamiento de los datos, el software genera una tabla en la que se muestra la información de los picos encontrados. Algunos de los encabezados que se pueden seleccionar para la tabla son: nombre de pico, factores de concordancia de los espectros de masas (similitud, probabilidad y reverso) respecto a los de la base de datos, altura, relación señal/ruido o tiempos de retención. Para el propósito de este estudio, el máximo número de picos desconocidos se fijó en 600 y se utilizó una sola masa (la más abundante para cada compuesto) para calcular el área y la altura de pico. Para procesar los cromatogramas de GC X GC se fijó una anchura de pico de 0.5 s, mientras que para procesar

los registros obtenidos con el análisis en 1D se utilizó otro método de procesamiento de datos, en el que el único parámetro que cambiaba respecto a lo descrito anteriormente (para GC X GC) era la anchura de pico considerada, que se fijó en 3 s. Para la búsqueda espectral se utilizó la base de datos NIS'98 (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, versión 1.6).

3.4.2. GC-QMS

El equipo utilizado era un Agilent 6890, equipado con un inyector *on column*. La columna cromatográfica utilizada era una DB-5HT (30 m x 0.25 mm x 0.1 μ m) acoplada a una pre-columna de sílice desactivada (3 m x 0.53 mm i.d., Agilent, USA, mediante un conector universal del tipo Silket® Treated Universal Press-Thight® (20480) de Restek (Bellefonte, PA, USA). El horno del cromatógrafo se programó de la siguiente manera: temperatura inicial desde 50 °C (2 min) y gradiente de temperaturas de 10 °C/min hasta 380 °C (1 min). La muestra (1 μ L) se introdujo en la columna mediante inyección en columna. El tiempo cromatográfico total era de 36 min y el tiempo necesario para regresar a las condiciones iniciales de análisis era de 11 min. Se utilizó helio como gas portador, con un flujo constante de 0.8 mL/min. El espectrómetro de masas era un cuadrupolo, modelo HP 5973 de Agilent Technologies, equipado con una fuente de ionización inerte, que operaba en el modo de ionización por impacto electrónico (70 eV). La temperatura de la fuente de ionización era de 150 °C y la interfase entre la columna cromatográfica y el espectrómetro de masas se fijó en 380 °C.

Para la optimización de las condiciones analíticas del método se utilizó el modo de adquisición de datos *scan*. El intervalo de masas registrado fue de 50 a 500 uma, el valor umbral de abundancia se fijó en cero. Los compuestos se identificaron por comparación de los espectros obtenidos con los de la base de datos NIS'98 (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, versión 1.6) y se determinaron sus tiempos de retención.

A partir de la información obtenida en modo *scan* se establecieron 17 grupos SIM. En cada grupo se registraron los dos iones más abundantes de cada uno de los compuestos que formaban el grupo (masas 43 y 57 para los hidrocarburos y los iones moleculares para los PAHs, ver tabla 1). Los iones fueron registrados con un tiempo de permanencia de 10 ms.

La adquisición de los datos se realizó con el software Enhanced Chemstation, G1710CA Ver. C 00.00. de Agilent Technologies.

Tabla 1: Grupos SIM para el método GC-QMS

Grupo	Intervalo de tiempo (min)	Compuestos	m/z
1	0-8	decano	57,43
2	8-10	dodecano, naftaleno	(57,43) (128,129)
3	10-12	tetradecano	57,43
4	12-13.5	acenaftileno, acenafteno	152,153
5	13.5-14.40	hexadecano, fluoreno	(57,43) (166,167)
6	14.40-15.50	4,4'-dibromo-octafluorobifenilo	296,456
7	15.50-16.30	octadecano, phenantreno, anthraceno	(57,43) (178,176)
8	16.30-17.50	carbazol	167,166
9	17.50-18.30	eicosano	57,43
10	18.30-19.60	fluoranteno, pireno	202,203
11	19.60, 20.60	docosano	57,43
12	20.60-21.30	1,1'-binaftilo	254,253
13	21.30-21.80	tetracosano	57,43
14	21.80-22.40	criseno	228,226
15	22.40-24	hexacosano	57,43
16	24-25.50	octacosano, benzo(b)fluoranteno	252,253
17	25.50-36	Triacontano	57,43

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se han puesto a punto tres métodos cromatográficos para la determinación de n-alcanos y PAHs en partículas de aerosoles. En primer lugar se compararán las características analíticas de los métodos en relación a su sensibilidad, linealidad y reproducibilidad. A continuación se utilizarán los métodos optimizados en el análisis de muestras de nanopartículas de aerosoles (30-100 nm) generadas en la combustión de madera.

4.1. Características analíticas de los métodos

Los tres métodos basados en cromatografía de gases se optimizaron con el fin de conseguir la mejor resolución cromatográfica en el menor tiempo posible. Para obtener los calibrados, las áreas consideradas fueron las que resultaban de dividir el área de pico, para el ion más abundante de cada compuesto (Tabla 7), entre el área de pico para el ion más abundante del estándar interno de cuantificación (4,4'-dibromo-octaflorobifenilo, m/z 296). Se estudiaron siete niveles de concentración desde 50 µg/L hasta 2000 µg/L. En todos los niveles de calibración se añadieron los dos estándares internos con una concentración de 5 mg/L para ambos. Cada nivel fue analizado por triplicado.

Se estimaron los parámetros de validación para cada uno de los métodos (linealidad, reproducibilidad y límites de detección y cuantificación). Los límites de detección se calcularon como 3.3 veces la desviación estándar de una señal (n=10), que corresponde a una relación S/N aproximadamente igual a 3. Los límites de cuantificación se calcularon multiplicando por un factor de 10 la desviación estándar de la señal.

4.1.1. GC X GC-TOFMS

En el desarrollo del método basado en GC X GC se optimizó la frecuencia de modulación y la programación de temperaturas con el fin de obtener una buena separación de los compuestos. La combinación de columnas utilizada se seleccionó en base a estudios anteriores [20].

En la figura 2 se puede observar la separación optimizada de los compuestos objeto de estudio. Se muestran dos posibles visualizaciones permitidas por el equipo; la representación en dos dimensiones con líneas de contorno (superior) y la representación en tres dimensiones (inferior). Las designaciones de pico utilizadas se basan en el número de átomos de carbono para los hidrocarburos (C10-C28), mientras que los PAHs se nombraron según los números asignados en la sección 3.1. Debido a su alto punto de ebullición, los PAHs del 15 al 17 fueron excluidos del estudio. En la figura se ha extraído el ion más abundante para cada compuesto, que es el que se utilizó para la cuantificación.

Figura 2: cromatogramas en 2D (superior) y 3D (inferior) obtenidos al analizar una disolución estándar de 500 ppb de PAHs y n-alcenos y 5 ppm de los estándares internos 1,1'-binaftilo (IS1) y 4,4'-dibromo-octafluorobifenilo (IS2) con el método GC X GC-TOFMS

En GC X GC la muestra completa se somete a una separación bidimensional. La muestra se separa primero en una columna no polar, en la que los analitos se separan principalmente en función de su volatilidad. El modulador atrapa, focaliza y transfiere de forma rápida fracciones adyacentes del eluyente de la primera columna a la segunda (de polaridad media).

La separación en la segunda columna es mucho más rápida que en la primera (el tiempo de retención del triacontano es de 0.84 s frente a 57.66 min respectivamente) y por tanto tiene lugar en condiciones prácticamente isotérmicas. Puesto que todos los analitos presentes en una fracción de muestra tienen prácticamente la misma volatilidad, la separación en la segunda columna sólo depende de las interacciones específicas de los compuestos con la fase estacionaria.

En los cromatogramas de la figura 2 se puede observar cómo los compuestos relacionados químicamente aparecen como estructuras ordenadas, lo que es muy útil para el análisis de compuestos de un grupo determinado en muestras complejas [12,17,20,29-31].

Con las condiciones optimizadas se construyeron las rectas de calibración para los n-alcenos y los PAHs. El conjunto de picos de la segunda dimensión que pertenecían a un solo compuesto fueron automáticamente integrados y sumados por el software específico. Debido a que se encontraron concentraciones traza de algunos de los alcanos en el análisis de los blancos, e incluso en el hexano, las áreas de estos compuestos presentes en el blanco se restaron a las áreas de pico obtenidas al analizar las disoluciones estándar y las muestras.

Se seleccionaron diez compuestos para hacer una comparación de las características analíticas de los métodos. La tabla 2 muestra los tiempos de retención en las dos dimensiones, la RSD (%), el R^2 y los límites de detección y cuantificación. La linealidad de las rectas de calibración era buena en el

intervalo de concentraciones estudiado; los valores de R^2 fueron como mínimo de 0.9928 para todos los compuestos. La reproducibilidad, para un nivel de 500 ppb y $n=10$, era satisfactoria con valores de RSD de 7.8 % o inferiores.

Los límites de detección se estimaron utilizando una disolución de 1 $\mu\text{g/L}$ para todos los PAHs, excepto para el criseno y el benzo(a)pireno, para los que era necesaria una disolución de 5 $\mu\text{g/L}$. En el caso de los alcanos, debido a la presencia de concentraciones traza de estos compuestos en el hexano analizado, se utilizó la desviación de la línea base del cromatograma obtenido al analizar una muestra de hexano. Los límites de cuantificación oscilaban de 0.6 $\mu\text{g/L}$ a 24.0 $\mu\text{g/L}$.

Tabla 2: Características analíticas del método GC X GC-TOFMS

Compuesto	Tiempo de retención		R ²	Pendiente	RSD % ^b	LD (µg/L)	LQ (µg/L)
	1 ^a (min)	2 ^a (s)					
Alcanos							
Dodecano (C12) ^a	19.4	0.52	0.9974	(16.4±0.4)*10 ⁴	4.03	0.21	0.63
Hexadecano (C16)	29.6	0.54	0.9980	(7.8±0.2)*10 ⁴	4.88	1.44	4.36
Eicosano(C20)	37.7	0.56	0.9978	(6.1±0.1)*10 ⁴	5.00	1.43	4.33
TetracosanoC24)	44.6	0.58	0.9962	(4.5±0.1)*10 ⁴	4.28	3.73	11.32
Octacosano(C28)	51.5	0.70	0.9943	(3.5±0.1)*10 ⁴	2.29	7.91	23.97
PAHs							
Acenafteno (3)	26.9	0.80	0.9989	(14.0±0.2)*10 ⁴	1.57	1.08	3.28
Fenantreno (5)	33.7	0.86	0.9956	(14.4±0.4)*10 ⁴	5.42	0.60	1.82
Pireno (9)	40	0.96	0.9949	(11.1±0.4)*10 ⁴	4.74	0.51	1.55
Criseno (11)	57.7	1.00	0.9928	(2.7±0.1)*10 ⁴	8.5	1.30	3.96
Benzo(a)pireno (14)	52.8	1.58	0.9929	(1.73±0.06)*10 ⁴	7.78	3.04	9.22

^a Designaciones utilizadas para los compuestos en la figura 1

^b Calculada para una concentración de 500 $\mu\text{g/L}$ y $n=10$

4.1.2. GC-TOFMS

En este método se utilizaron las mismas condiciones de inyección y separación cromatográfica que las utilizadas en el método de GC X GC-TOFMS, con la diferencia de que en este caso el modulador criogénico estaba desactivado.

En la figura 3 se muestra el cromatograma obtenido al analizar una disolución de 500 ppb de los compuestos en hexano (3a-se ha extraído la m/z 57, característica de los alcanos; 3b-se ha extraído la relación m/z más abundante para cada uno de los PAHs). Se puede observar que la eficacia de la separación de los PAHs es menor que cuando se utiliza la técnica GC X GC-TOFMS.

Los cromatogramas de ion extraído no solucionan el problema, porque muchos de los compuestos con mayores tiempos de retención tienen los mismos iones moleculares. Este efecto se observa de forma discreta al tratarse de una disolución estándar de los compuestos, pero en el caso de muestras de aerosoles los problemas de solapamiento podrían ser críticos.

Figura 3: Cromatograma obtenido al analizar una disolución estándar de 500 ppb de PAHs y *n*-alcanos y 5 ppm de los estándares internos 1,1 binaftilo (IS1) y 4,4'-dibromo-octafluorobifenilo (IS2) con el método GC-TOFMS

En la tabla 3 se muestran las principales características analíticas del método GC-TOFMS. Los valores de R^2 fueron siempre superiores a 0.9956; la RSD para una disolución de 500 ppb y $n=10$ era igual o inferior a 6.9 %; los límites de detección oscilaban entre 2.7 $\mu\text{g/L}$ y 21.2 $\mu\text{g/L}$ y los de cuantificación entre 8.1 $\mu\text{g/L}$ y 64.3 $\mu\text{g/L}$.

Tabla 3: Características analíticas del método GC-TOFMS

Compuesto	Tiempo de retención (min)	R ²	Pendiente	RSD % ^b	LD (µg/L)	LQ (µg/L)
Alcanos						
Dodecano (C12) ^a	19.28	0.9963	(15.0±0.5)*10 ⁴	2.97	2.69	8.15
Hexadecano (C16)	29.47	0.9979	(7.2±0.2)*10 ⁴	5.03	14.7	44.58
Eicosano(C20)	37.68	0.9971	(6.1±0.2)*10 ⁴	5.64	13.22	40.06
Tetracosano(C24)	44.54	0.9990	(4.90±0.09)*10 ⁴	4.91	14.03	42.53
Octacosano(C28)	51.47	0.9982	(2.99±0.07)*10 ⁴	4.01	21.24	64.35
PAHs						
Acenafteno (3)	26.85	0.9957	(13.0±0.4)*10 ⁴	4.50	4.8	14.7
Fenantreno (5)	33.54	0.9969	(13.1±0.4)*10 ⁴	5.96	3.29	9.98
Pireno (9)	39.92	0.9956	(11.6±0.4)*10 ⁴	6.18	4.73	14.33
Criseno (11)	45.63	0.9966	(4.1±0.1)*10 ⁴	6.88	6.24	18.92
Benzo(a)pireno (14)	52.72	0.9966	(1.89±0.06)*10 ⁴	5.54	13.55	41.07

^a Designaciones utilizadas para los compuestos en la figura 1

^b Calculada para una concentración de 500 µg/L y n=10

4.1.3. GC-QMS

Las condiciones experimentales optimizadas para el método GC-QMS eran muy similares a las del método GC-TOFMS. La principal diferencia era la rampa de temperaturas del horno, que era más rápida en el método GC-QMS. La eficacia de la separación no mejoraba al utilizar rampas de temperaturas más lentas, sin embargo, el tiempo de análisis aumentaba significativamente, por lo que se decidió seleccionar una rampa de temperaturas más rápida.

En la tabla 4 se muestran las características analíticas de la técnica GC-QMS. Se utilizó una disolución de 30 µg/L para estimar los límites de detección de PAHs y alcanos. Los valores de R² eran como mínimo de 0.9952 para todos los compuestos. La reproducibilidad, para un nivel de concentración de 500 µg/L y n=10, era satisfactoria con valores de RSD

inferiores a 8.9%. Los límites de detección oscilaban de 9 µg/L a 49 µg/L y los de cuantificación entre 26 µg/L y 150 µg/L.

Tabla 4: Características analíticas del método GC-QMS

Compuesto	Tiempo de retención (min)	R ²	Pendiente	RSD % ^b	LD (µg/L)	LQ (µg/L)
Alcanos						
Dodecano (C12) ^a	9.16	0.9996	$(7.13 \pm 0.08) \cdot 10^4$	1.6	17	52
Hexadecano (C16)	14.03	0.9991	$(5.4 \pm 0.1) \cdot 10^4$	6.6	32	99
Eicosano (C20)	18.07	0.9978	$(5.3 \pm 0.1) \cdot 10^4$	7.2	14	42
Tetracosano (C24)	21.50	0.9977	$(4.1 \pm 0.1) \cdot 10^4$	7.1	32	99
Octacosano (C28)	24.50	0.9952	$(3.5 \pm 0.1) \cdot 10^4$	8.9	49	150
PAHs						
Acenafteno (3)	12.70	0.9982	$(19.6 \pm 0.1) \cdot 10^4$	4.9	24	72
Fenantreno (5)	15.93	0.9964	$(18.4 \pm 0.5) \cdot 10^4$	6.1	14	42
Pireno (9)	19.07	0.9998	$(22.1 \pm 0.2) \cdot 10^4$	5.6	9	26
Criseno (11)	21.98	0.9957	$(20.6 \pm 0.7) \cdot 10^4$	6.2	23	68
Benzo(a)pireno (14)	24.92	0.9987	$(23.8 \pm 0.4) \cdot 10^4$	7.7	17	51

^a Designaciones utilizadas para los compuestos en la figura 1

^b Calculada para una concentración de 500 µg/L y n=10

4.2. Comparación de las características analíticas de las técnicas cromatográficas

Cuando se comparan las características analíticas de los tres métodos cromatográficos optimizados (Tablas 2, 3 y 4) se observa que las reproducibilidades obtenidas son del mismo orden y las rectas de calibración para los analitos objeto de estudio eran lineales en el margen de concentraciones estudiado (aproximadamente un orden de magnitud). La principal diferencia entre las características analíticas estudiadas para los tres métodos optimizados es la sensibilidad. La técnica cromatográfica más sensible era GC X GC-TOFMS, con límites de detección entre 3 y 13 veces

más bajos que los obtenidos con GC-TOFMS y entre 6 y 80 veces inferiores a los obtenidos con GC-QMS.

Las técnicas GC X GC-TOFMS y GC-TOFMS difieren únicamente en el uso del modulador entre las dos columnas cromatográficas, con lo que se pone de manifiesto que el incremento de sensibilidad obtenido se debe a la crío-focalización de los compuestos que eluyen de la primera columna. En un cromatograma de ion extraído obtenido mediante GC X GC, el área de pico que resulta de sumar los diferentes picos que corresponden a un mismo compuesto coincidía con el área de pico obtenida al analizar la misma muestra con GC-TOFMS. Sin embargo, la anchura de pico a media altura era unas 58 veces mayor en los picos obtenidos con 1D GC. Esto se traduce en un incremento de la relación señal/ruido del orden de 14 veces con la técnica GC X GC respecto a 1D GC. Como consecuencia, los límites de detección eran significativamente inferiores con la técnica GC X GC, lo cual coincide con las conclusiones obtenidas por otros autores, como ha sido recopilado recientemente [31]. Lee y sus colaboradores [33] encontraron un incremento en la sensibilidad de 4 a 5 veces con GC X GC-FID y Dallüge y su grupo de investigación [29] calcularon un incremento de 2 a 5 veces con GC X GC-TOFMS. Se han descrito resultados similares con el método GC X GC- μ ECD, con límites de detección de 3 a 5 veces inferiores que los obtenidos con 1D GC [34].

El aumento de sensibilidad conseguido con 1D GC-TOFMS respecto a GC-QMS es del orden de 1 a 6 veces. Esto se debe probablemente al detector empleado, ya que en ambos casos se inyectó 1 μ L de muestra y las columnas cromatográficas utilizadas eran muy similares (el hecho de que se añadiera una segunda columna al final de la columna principal en el método 1D GC-TOFMS no tiene ningún efecto en la separación). El TOFMS se programó con una frecuencia de adquisición de datos de 50 espectros/s, por lo que la reconstrucción de pico es mucho más precisa que con el detector de tipo cuadrupolar en el modo de adquisición de datos SIM, donde se

registraron unos 24 espectros/s en los grupos SIM que contenían dos iones y 16 espectros/s en los grupos SIM con cuatro iones.

Para poder detectar los compuestos presentes a niveles de trazas en una muestra de nanopartículas de aerosol, el tiempo de muestreo necesario (y por tanto la cantidad de muestra recolectada en el filtro) será distinto en función del método de análisis que se vaya a emplear. Es decir, el tiempo de muestreo necesario para lograr concentraciones detectables con los métodos basados en 1D GC será superior al que se requiere cuando se utiliza el método GC X GC-TOFMS.

Un inconveniente de GC X GC respecto a 1D GC es que se requiere un mayor tiempo de análisis cromatográfico. Esto es debido a que para obtener resultados óptimos es necesario realizar al menos tres o cuatro modulaciones por cada pico de la primera dimensión, lo cual limita las rampas de temperaturas que se pueden utilizar en el horno principal (normalmente en el margen de 0.5-5 °C/min) [12]. En este trabajo se ha utilizado una rampa de 5 °C/min en el método de GC X GC-TOFMS y el tiempo cromatográfico total era de 62 min; la rampa utilizada en el método GC-QMS era de 10 °C/min, dando lugar a un tiempo cromatográfico total de 36 min; es decir, prácticamente la mitad. Además, el equipo GC-QMS es menos costoso y más común en los laboratorios de análisis.

Otro inconveniente asociado al uso de GC X GC es que el procesamiento de la gran cantidad de datos que se generan es complejo y requiere emplear mucho tiempo. Afortunadamente, la nueva versión de software Pegasus® 4D (versión 3.34) simplifica substancialmente la etapa de tratamiento de los datos. Sin embargo, sigue siendo necesaria la supervisión detallada de los resultados por un analista con experiencia, lo que hace que el tratamiento de los datos sea más complejo que con el análisis convencional en 1D.

4.3. Comparación de las técnicas en la determinación de los compuestos de interés en muestras de aerosoles

Se recolectó una muestra de partículas de aerosol de 100 nm durante 15 min. A continuación se procedió al procedimiento de extracción de los compuestos descrito en el apartado 3.3. y el extracto se analizó inmediatamente mediante los métodos cromatográficos.

En primer lugar, la muestra procedente de la extracción del filtro se analizó mediante GC X GC-TOFMS. Las concentraciones de los analitos eran del mismo orden, e incluso inferiores para algunos de los compuestos, que los límites de cuantificación del método GC-QMS, por lo que se decidió excluir este método de esta parte del estudio.

La figura 5 muestra los cromatogramas de ion extraído para los n-alcanos (m/z 57) de la muestra de 100 nm analizada mediante los métodos GC X GC-TOFMS y GC-TOFMS. En ambos cromatogramas se observa una región, que se ha denominado “mezcla compleja no resuelta” (*unresolved complex mixture*, UCM), cuyo espectro de masas corresponde principalmente con el del levoglucosano (un biomarcador específico de la combustión de biomasa). En el cromatograma obtenido mediante GC-TOFMS se observa que, para la relación m/z extraída, algunos de los alcanos están totalmente enmascarados por los interferentes no resueltos de la matriz, lo cual impide su identificación y por tanto su cuantificación. Se intentó solucionar este problema utilizando otras relaciones m/z presentes en el espectro de los alcanos, sin embargo se observó el mismo problema para todas las relaciones m/z estudiadas. Por tanto, para poder lograr una correcta identificación y cuantificación de los n-alcanos mediante GC-TOFMS sería necesario someter el extracto a algún procedimiento de pretratamiento (e.j., extracción en fase sólida), antes de someterlo al análisis cromatográfico. La inclusión de esta etapa de pretratamiento implicaría un aumento del tiempo total de análisis, así como del error asociado, ya que la etapa de

pretratamiento de la muestra suele suponer la principal fuente de error del método analítico.

Figura 5: Comparación de los cromatogramas de ion extraído obtenidos al analizar una muestra de partículas de aerosol de 100 nm mediante GC X GC-TOFMS (superior) y GC-TOFMS (inferior)

En el cromatograma en dos dimensiones, obtenido mediante GC X GC-TOFMS, se observa una mayor resolución de los compuestos presentes en la muestra. En este caso, los n-alcanos están perfectamente separados de los elementos interferentes de la matriz, por lo que es posible identificarlos y cuantificarlos sin necesidad de incluir etapas adicionales. Como ejemplo, la figura 6 muestra el cromatograma en 3D del tetradecano, junto con el cromatograma obtenido mediante el análisis en 1D. Como se puede observar, la separación alcanzada con GC X GC da lugar a una capacidad

de resolución de pico mucho mayor, lo que es muy útil cuando se trabaja con muestras complejas, aspecto que puede considerarse la principal razón del éxito de la técnica. Otros autores han descrito resultados similares [12,17,30,31].

Figura 6: Comparación de los cromatogramas de ion extraído de tetradecano en una muestra de 100 nm mediante GC X GC-TOFMS (superior) y GC-TOFMS (inferior)

En la tabla 5 se muestran las concentraciones de los compuestos de interés en la muestra de 100 nm cuando se analiza mediante los métodos GC-TOFMS y GC X GC-TOFMS. El intervalo de confianza se ha expresado para tres réplicas y un nivel de confianza del 95 %. Para determinar la concentración de los compuestos se utilizó, en cada caso, la porción de calibrado adecuada para que el intervalo de confianza asociado a la predicción fuese mínimo.

Tabla 5: Concentraciones de los compuestos objeto de estudio en una muestra de partículas de aerosol de 100 nm analizada mediante los métodos GC X GC-TOFMS y GC-TOFMS

Compuestos	Concentración (pg/μg)	
	GC X GC-TOFMS	GC-TOFMS
n-alcános		
Decano	$(1.8 \pm 0.3)10^2$	$(1.0 \pm 0.5)10^2$
Dodecano	$(2.5 \pm 0.1)10^2$	$(3.1 \pm 0.4)10^2$
Tetradecano	$(8 \pm 1)10^2$	$(8 \pm 1)10^2$
Hexadecano	$(7.9 \pm 0.5)10^2$	$(7.0 \pm 0.5)10^2$
Octadecano	$(15 \pm 1)10^2$	-
Eicosano	$(14 \pm 1)10^2$	-
Docosano	$(17 \pm 1)10^2$	-
Tetracosano	$(16 \pm 1)10^2$	-
Hexacosano	$(21 \pm 1)10^2$	-
Octacosano	$(9 \pm 2)10^2$	$(8 \pm 1)10^2$
Triacotano	$(10 \pm 2)10^2$	$(9 \pm 1)10^2$
PAHs		
Naftaleno	$(0.9 \pm 0.3)10^2$	$(0.9 \pm 0.3)10^2$
Acenaftileno	$(0.9 \pm 0.2)10^2$	$(0.6 \pm 0.3)10^2$
Acenaftaleno	$(3.7 \pm 0.2)10^2$	<LQ
Fluoreno	$(5.8 \pm 0.3)10^2$	<LQ
Fenantreno	$(6.3 \pm 0.5)10^2$	$(5.3 \pm 0.5)10^2$
Antraceno	$(1.4 \pm 0.2)10^2$	$(1.7 \pm 0.5)10^2$
Carbazol	$(0.5 \pm 0.4)10^2$	$(0.4 \pm 0.1)10^2$
Fluoranteno	$(18 \pm 1)10^2$	$(16.2 \pm 0.5)10^2$
Pireno	$(19 \pm 1)10^2$	$(15.9 \pm 1)10^2$
Benz(a) antraceno	$(5 \pm 1)10^2$	$(5 \pm 2)10^2$
Criseno	$(3.2 \pm 0.5)10^2$	$(5 \pm 2)10^2$
Benzo(b)fluoranteno	$(4 \pm 1)10^2$	$(4 \pm 2)10^2$
Benzo(k)fluoranteno	$(2.7 \pm 0.3)10^2$	$(2.6 \pm 0.5)10^2$
Benzo(a)pireno	$(3.7 \pm 0.5)10^2$	$(2.1 \pm 0.4)10^2$

- No fue posible determinar la concentración de este compuesto, puesto que estaba solapado con componentes interferentes de la matriz.
LQ: límite de cuantificación

A continuación se realizó un estudio en el que se analizaron, mediante el método GC X GC-TOFMS, varias muestras de aerosoles de diferentes tamaños de partícula. Se estudiaron los tamaños de 30, 50, 70 y 100 nm. En el proceso de generación de la muestra se quemó, en todos los casos, una porción de la misma pieza de madera y, en cada caso, se seleccionó el voltaje adecuado en el separador para recolectar el tamaño de partícula determinado. El contador de partículas monitoriza el número de partículas/cm³ que llega al filtro. Esta concentración era similar para los distintos tamaños de partícula estudiados y osciló entre valores de 10⁴ a 10⁶ a lo largo de los diferentes tiempos de muestreo. En concreto, los valores medios de concentración de partículas, a lo largo del tiempo de muestreo, fueron del orden 10⁶ partículas/cm³ para las partículas de 50 a 100 nm y de 10⁵ partículas/cm³ para las de 30 nm. Por tanto, cuanto mayor es el tamaño de partícula el tiempo de muestreo necesario para recolectar una masa de partículas apropiada es menor. Como consecuencia, se seleccionaron diferentes tiempos de muestreo para cada tamaño de partícula, con el fin de obtener una masa de partículas suficiente para que la concentración de los compuestos fuese detectable, pero utilizando tiempos de muestreo razonables. Los tiempos de muestreo seleccionados fueron: 15 min para muestras de 100 nm, 30 min para 70 nm, 45 min para 50 nm y 150 min para 30 nm. Utilizando estos tiempos de muestreo, se obtuvieron las siguientes masas de partículas en los filtros: 30 nm ~1.7 µg/muestra, 50 nm ~8 µg/muestra, 70 nm ~14 µg/muestra, 100 nm ~19 µg/muestra.

Si el sistema de muestreo se utilizara para tomar muestras de aire ambiente - donde las concentraciones de partículas son mucho más bajas que en los aerosoles procedentes de la combustión de madera (de 10² a 10³ partículas/cm³ frente a 10⁴-10⁶ partículas/cm³, respectivamente) - los tiempos de recolección necesarios para obtener concentraciones detectables con los métodos cromatográficos estudiados en este trabajo serían del orden de días.

En la tabla 6 se muestran las concentraciones de los compuestos objeto de estudio encontradas en las muestras de partículas de aerosol de diferentes tamaños.

Tabla 6: Concentraciones de los compuestos objeto de estudio en muestra de partículas de aerosol de diferentes tamaños analizadas mediante GC X GC-TOFMS

Compuestos	Concentración en muestras de diferentes tamaños (pg/μg)			
	30 nm	50 nm	70 nm	100 nm
n-alcános				
Decano	$(14 \pm 3)10^2$	$(3.3 \pm 0.6)10^2$	$(2.9 \pm 0.3)10^2$	$(1.8 \pm 0.3)10^2$
Dodecano	$(18 \pm 1)10^2$	$(5.0 \pm 0.2)10^2$	$(3.5 \pm 0.1)10^2$	$(2.5 \pm 0.1)10^2$
Tetradecano	$(46 \pm 6)10^2$	$(15 \pm 1)10^2$	$(13.4 \pm 0.7)10^2$	$(8 \pm 1)10^2$
Hexadecano	$(23 \pm 6)10^2$	$(6 \pm 1)10^2$	$(11.3 \pm 0.7)10^2$	$(7.9 \pm 0.5)10^2$
Octadecano	$(60 \pm 10)10^2$	$(10 \pm 2)10^2$	$(21 \pm 2)10^2$	$(15 \pm 1)10^2$
Eicosano	$(41 \pm 6)10^2$	$(15 \pm 1)10^2$	$(25 \pm 1)10^2$	$(14 \pm 1)10^2$
Docosano	$(76 \pm 6)10^2$	$(23 \pm 2)10^2$	$(33 \pm 1)10^2$	$(17 \pm 1)10^2$
Tetracosano	$(87 \pm 6)10^2$	$(25 \pm 1)10^2$	$(42 \pm 1)10^2$	$(16 \pm 1)10^2$
Hexacosano	$(116 \pm 6)10^2$	$(29 \pm 2)10^2$	$(63 \pm 6)10^2$	$(21 \pm 1)10^2$
Octacosano	$(80 \pm 20)10^2$	$(15 \pm 2)10^2$	$(39 \pm 3)10^2$	$(9 \pm 2)10^2$
Triacotano	$(90 \pm 20)10^2$	$(18 \pm 4)10^2$	$(34 \pm 3)10^2$	$(10 \pm 2)10^2$
PAHs				
Naftaleno	$(6 \pm 3)10^2$	$(1.9 \pm 3)10^2$	$(1.4 \pm 0.4)10^2$	$(0.9 \pm 0.3)10^2$
Acenaftileno	$(6 \pm 2)10^2$	$(9.9 \pm 0.5)10^2$	$(1.3 \pm 0.3)10^2$	$(0.9 \pm 0.2)10^2$
Acenaftaleno	< LQ	$(2.1 \pm 0.5)10^2$	$(0.8 \pm 0.3)10^2$	$(3.7 \pm 0.2)10^2$
Fluoreno	$(6 \pm 3)10^2$	$(4.1 \pm 0.5)10^2$	$(1.3 \pm 0.3)10^2$	$(5.8 \pm 0.3)10^2$
Fenantreno	$(21 \pm 3)10^2$	$(40 \pm 1)10^2$	$(3.7 \pm 0.4)10^2$	$(6.3 \pm 0.5)10^2$
Antraceno	$(6 \pm 2)10^2$	$(7.9 \pm 0.4)10^2$	$(1.5 \pm 0.3)10^2$	$(1.4 \pm 0.2)10^2$
Carbazol	<LQ	<LQ	$(1.3 \pm 0.5)10^2$	$(0.5 \pm 0.4)10^2$
Fluoranteno	$(8 \pm 5)10^2$	$(110 \pm 6)10^2$	$(3.8 \pm 0.5)10^2$	$(18 \pm 1)10^2$
Pireno	$(7 \pm 3)10^2$	$(109 \pm 7)10^2$	$(4.7 \pm 0.5)10^2$	$(19 \pm 1)10^2$
Benz(a) antraceno	<LQ	$(41 \pm 6)10^2$	$(1.5 \pm 0.3)10^2$	$(5 \pm 1)10^2$
Criseno	<LQ	$(34 \pm 1)10^2$	$(1.0 \pm 0.4)10^2$	$(3.2 \pm 0.5)10^2$
Benzo(b)fluoranteno	ND	$(41 \pm 5)10^2$	<LQ	$(4 \pm 1)10^2$
Benzo(k)fluoranteno	ND	$(25 \pm 2)10^2$	$(1.1 \pm 0.4)10^2$	$(2.7 \pm 0.3)10^2$
Benzo(a)pireno	ND	$(34 \pm 4)10^2$	<LQ	$(3.7 \pm 0.5)10^2$

LQ: límite de cuantificación

ND: No detectado

Las concentraciones para los alcanos eran similares en las muestras de partículas de 50, 70 y 100 nm. Sin embargo, las concentraciones de estos compuestos en la muestra de 30 nm eran significativamente superiores (de 3 a 9 veces superiores respecto a los valores más bajos obtenidos para el resto de muestras analizadas). Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores al analizar muestras de aerosoles procedentes de las proximidades de una carretera [24]. Respecto a los PAHs, las mayores concentraciones se encontraron en la muestra de 50 nm y las menores concentraciones en la de 30 nm.

Con el fin de explorar la reproducibilidad del proceso de generación de muestra, se recolectaron tres muestras de aerosol de tamaño de partícula de 70 nm. Cada una de las muestras se obtuvo al quemar durante 30 min una porción de la misma pieza de madera. En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos. Como se puede observar, existen diferencias significativas en las concentraciones determinadas en las tres muestras para un mismo compuesto. Sin embargo, las inyecciones repetidas de un mismo extracto son altamente reproducibles, por lo que las diferencias encontradas no se deben al método de análisis, si no que se deben a que la muestra de madera no es totalmente homogénea y ,sobre todo, a que el proceso de combustión es muy variable.

Tabla 7: Concentraciones de los compuestos objeto de estudio en tres muestras de partículas de aerosol de 70 nm analizadas mediante GC X GC-TOFMS

Compuestos	Concentración (pg/kg)		
	70 nm (muestra 1)	70 nm (muestra 2)	70 nm (muestra 3)
n-alcános			
Decano	$(2.9 \pm 0.3)10^2$	$(2.1 \pm 0.4)10^2$	$(2.3 \pm 0.4)10^2$
Dodecano	$(3.5 \pm 0.1)10^2$	$(3.3 \pm 0.1)10^2$	$(3.2 \pm 0.1)10^2$
Tetradecano	$(13.4 \pm 0.7)10^2$	$(10.6 \pm 0.7)10^2$	$(10.8 \pm 0.7)10^2$
Hexadecano	$(11.3 \pm 0.7)10^2$	$(2.4 \pm 0.7)10^2$	$(2.7 \pm 0.7)10^2$
Octadecano	$(21 \pm 2)10^2$	$(4.6 \pm 0.6)10^2$	$(6.2 \pm 0.6)10^2$
Eicosano	$(25 \pm 1)10^2$	$(4.8 \pm 0.6)10^2$	$(4.8 \pm 0.6)10^2$
Docosano	$(33 \pm 1)10^2$	$(9.2 \pm 0.7)10^2$	$(9.9 \pm 0.7)10^2$
Tetracosano	$(42 \pm 1)10^2$	$(8.5 \pm 0.7)10^2$	$(9.2 \pm 0.7)10^2$
Hexacosano	$(63 \pm 6)10^2$	$(10 \pm 1)10^2$	$(13 \pm 1)10^2$
Octacosano	$(39 \pm 3)10^2$	$(3.9 \pm 0.4)10^2$	$(6 \pm 1)10^2$
Triacotano	$(34 \pm 3)10^2$	$(4.0 \pm 0.2)10^2$	$(5.1 \pm 0.2)10^2$
PAHs			
Naftaleno	$(1.4 \pm 0.4)10^2$	$(0.8 \pm 0.4)10^2$	$(0.8 \pm 0.4)10^2$
Acenaftileno	$(1.3 \pm 0.3)10^2$	$(0.7 \pm 0.3)10^2$	$(0.8 \pm 0.3)10^2$
Acenaftaleno	$(0.8 \pm 0.3)10^2$	<LQ	<LQ
Fluoreno	$(1.3 \pm 0.3)10^2$	$(0.6 \pm 0.4)10^2$	$(0.5 \pm 0.3)10^2$
Fenantreno	$(3.7 \pm 0.4)10^2$	$(2.5 \pm 0.4)10^2$	$(0.8 \pm 0.4)10^2$
Antraceno	$(1.5 \pm 0.3)10^2$	$(5 \pm 3)10^2$	<LQ
Carbazol	$(1.3 \pm 0.5)10^2$	<LQ	<LQ
Fluoranteno	$(3.8 \pm 0.5)10^2$	$(3.8 \pm 0.5)10^2$	$(1.3 \pm 0.6)10^2$
Pireno	$(4.7 \pm 0.5)10^2$	$(3.7 \pm 0.5)10^2$	$(1.4 \pm 0.3)10^2$
Benz(a) antraceno	$(1.5 \pm 0.3)10^2$	<LQ	<LQ
Criseno	$(1.0 \pm 0.4)10^2$	<LQ	<LQ
Benzo(b)fluoranteno	<LQ	<LQ	<LQ
Benzo(k)fluoranteno	$(1.1 \pm 0.4)10^2$	ND	<LQ
Benzo(a)pireno	<LQ	ND	<LQ

LQ: límite de cuantificación

ND: No detectado

4. CONCLUSIONES

Se han evaluado las características analíticas de tres métodos cromatográficos (GC X GC-TOFMS, GC-TOFMS y GC-QMS) para el análisis de n-alcanos y PAHs a niveles de trazas y con todos ellos se han obtenido buenos resultados.

Respecto a la aplicación de estos métodos al análisis de los compuestos de interés en nanopartículas de aerosoles procedentes de la combustión de madera, se puede concluir que la eficacia de la separación obtenida con el método GC X GC es superior a la de los métodos de 1D GC. Este hecho hace que la técnica GC X GC sea muy ventajosa para el análisis de muestras complejas, ya que permite obtener resultados altamente satisfactorios aplicando un proceso de preparación de la muestra muy sencillo, que no es suficiente cuando las muestras se analizan mediante 1D GC. Además, con GC X GC se obtienen cromatogramas “estructurados” que facilitan el reconocimiento de los compuestos y la identificación de los mismos es más fiable. Por otro lado, la técnica en 2D es más sensible, por lo que es posible utilizar tiempos de muestreo más bajos para lograr cantidades de muestra con concentraciones de los compuestos a niveles detectables.

Las concentraciones de los compuestos en las tres muestras de un mismo tamaño de partícula (70 nm) diferían entre sí significativamente, debido a la irregularidad en el proceso de combustión de la madera. A pesar de esto, se puede concluir que dentro del conjunto de muestras analizadas (30 nm, 50 nm, 70 nm y 100 nm) las concentraciones de alcanos eran significativamente superiores en la muestra de partículas más pequeñas (30 nm), mientras que los hidrocarburos policíclicos aromáticos se encontraban en concentraciones superiores en las muestras con mayores tamaños de partícula.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Feng, Z. Guo, C.K. Chan, M. Fang, *Atmos. Env.* 41 (2007) 1924.
- [2] M. Li, S. R. McDow, D. J. Tollerud, M.A. Mazurek, *Atmos. Env.* 40 (2006) 2260.
- [3] T. Rissanen, T. Hyötyläinen, M. Kallio, J. Kronholm, M. Kulmala, M-L. Riekkola, *Chemosphere* 64 (2006) 1185.
- [4] S.S.H. Ho, J.Z. Yu, J.C. Chow, B. Zielinska, J.G. Watson, E.H.L. Sit, J.J. Schauer, *J. Chromatogr. A* 1200 (2008) 217.
- [5] S.S. Park, M-S. Bae, J.J. Schauer, Y.J. Kim, S.Y. Cho, S.J. Kim, *Atmos. Env.* 40 (2006) 4182.
- [6] A. Cincinelli, M.D. Bubba, T. Martellini, A. Gambaro, L. Lepri, *Chemosphere* 68 (2007) 472.
- [7] R. Ladji, N. Yassaa, A. Cecinato, B.Y. Meklati, *Atmos. Res.* 86 (2007) 249.
- [8] A. Cincinelli, S. Mandorlo, R.M. Dickhut, L. Lepri, *Atmos. Env.* 37 (2003) 3125.
- [9] A.I. Gogou, M. Apostolaki, E.G. Stephanou, *J. Chromatogr. A* 799 (1998) 215.
- [10] J. Feng, C.K. Chan, M. Fang, M. Hu, L. He, X. Tang, *Chemosphere* 64 (2006) 1393.
- [11] G. Wang, L. Huang, X. Zhao, H. Niu, Z. Dai, *Ams. Res.* 81 (2006) 54.
- [12] J. Dallüge, J. Beens, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 69.
- [13] M. Adahchour, J. Beens, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 1186 (2008) 67.
- [14] J.F. Hamilton, P.J. Webb, A.C. Lewis, J.R. Hopkins, S. Smith, P. Davy, *Atmos. Chem. Phys.* (2004) 1279.
- [15] J. Schelle-Kreis, W. Welthagen, M. Sklorz, R. Zimmermann, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1648.
- [16] O. Pani, T. Górecki, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 1013.

-
- [17] X. Xu, L.L.P. van Stee, J. Williams, J. Beens, M. Adahchour, R.J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman, J. Lelieveld, *Atmos. Chem. Phys.* 3 (2003) 665.
- [18] X. Xu, J. Williams, C. Plass-Dülmer, H. Berresheim, G. Salisbury, L. Lange, J. Lelieveld, *Atmos. Chem. Phys.* 3 (2003) 1461.
- [19] A.H. Goldstein, D.R. Worton, B.J. Williams, S.V. Hering, N.M. Kreisberg, O. Panic, T. Górecki, *J. Chromatogr. A* 1186 (2008) 340.
- [20] M. Kallio, T. Hyötyläinen, M. Lehtonen, M. Jussila, K. Hartonen, M. Shimmo, M.-L. Riekkola, *J. Chromatogr. A* 1019 (2003) 251.
- [21] M. Kallio, M. Jussila, T. Rissanen, P. Anttila, K. Hartonen, A. Reissell, R. Vreuls, M. Adahchour, T. Hyötyläinen, *J. Chromatogr. A* 1125 (2006) 234.
- [22] D.J. Burleson, M.D. Driessen, R.L. Penn, *J. Environm. Science and Health Vol A39*, 10 (2004) 2707.
- [23] N. Ochiai, T. Ieda, K. Sasamoto, A. Fushimi, S. Hasegawa, K. Tanabe, S. Kobayashi, *J. Chromatogr. A* 1150 (2007) 13.
- [24] A. Fushimi, K. Tanabe, S. Hasegawa, S. Kobayashi, *Sci.Total Environ.* 386 (2007) 83.
- [25] M.D. Hays, N.D. Smith, J. Kinsey, Y. Dong, P. Kariher, *J. Aerosol Sci.* 34 (2003) 1061.
- [26] D.G. Nash, T. Baer, M.V. Johnston, *Int. J. Mass Spectrom.* 258 (2006) 2.
- [27] J.D. Allan, M.R. Alfarra, K.N. Bower, H. Coe, J.T. Jayne, D.R. Worsnop, P.P. Aalto, M. Kulmala, T. Hyötyläinen, F. Cavalli, A. Laaksonen, *Atmos. Chem. Phys.* 6 (2006) 315.
- [28] T. Laitinen, K. Hartonen, M. Kulmala, M.-L. Riekkola, *Boreal Env. Res.* 14 (2009) 539.
- [29] J. Dallüge, R. J.J. Vreuls, J. Beens, U.A.Th. Brinkman, *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 201.
- [30] X. Lu, M. Zhao, H. Kong, J. Cai, J. Wu, M. Wu, R. hua, J. Liu, G. Xu, *J. Chromatogr. A* 1043 (2004) 265.

- [31] M. Adahchour, J. Beens, R.J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman, Trends Anal. Chem. 25 (2006) 438.
- [32] A.C. Lewis, N. Carslaw, P.J. Marriott, R.M. Kinghorn, P. Morrison, A.L. Lee, K.D. Bartle, M.J. Pilling, Letters to Nature 405 (2000) 778.
- [33] A.L. Lee, K.D. Bartle, A.C. Lewis, Anal. Chem. 73 (2001) 1330.
- [34] P. Koriyár, P.E.G. Leonards, J. de Boer, U.A.Th. Brinkman, J. Chromatogr. A 958 (2002) 203.

PUBLISHED ARTICLE

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Determination of organic compounds from wood combustion aerosol nanoparticles by different gas chromatographic systems and by aerosol mass spectrometry

Totti Laitinen^a, Sara Herrero Martín^b, Jevgeni Parshintsev^a, Tuulia Hyötyläinen^a, Kari Hartonen^a, Marja-Liisa Riekkola^{a,*}, Markku Kulmala^c, José Luis Pérez Pavón^b

^a University of Helsinki, Department of Chemistry, Laboratory of Analytical Chemistry, P.O. Box 55, FIN-00014 Helsinki, Finland

^b University of Salamanca, Department of Analytical Chemistry, 37008 Salamanca, Spain

^c University of Helsinki, Department of Physics, Division of Atmospheric Sciences and Geophysics, P.O. Box 64, FIN-00014 Helsinki, Finland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 August 2009

Received in revised form 28 October 2009

Accepted 10 November 2009

Available online 14 November 2009

Keywords:

Aerosols

Nanoparticles

Wood pyrolysis

GC × GC–MS

GC–MS

Aerosol MS

ABSTRACT

Organic compounds in atmospheric nanoparticles have an effect on human health and the climate. The determination of these particles is challenged by the difficulty of sampling, the complexity of sample composition, and the trace-level concentrations of the compounds. Meeting the challenge requires the development of sophisticated sampling systems for size-resolved particles and the optimization of sensitive, accurate and simple analytical techniques and methods. A new sampling system is proposed where particles are charged with a bipolar charger and size-segregated with a differential mobility analyzer. This system was successfully used to sample particles from wood pyrolysis with particle sizes 30–100 nm. Particles were analyzed by four techniques: comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry, gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry, gas chromatography–quadrupole mass spectrometry, and aerosol mass spectrometry (aerosol MS). In the chromatographic techniques, particles were collected on a filter and analyzed off-line after sample preparation, whereas in the aerosol MS, particle analysis was performed directly from the particle source. Target compounds of the samples were polyaromatic hydrocarbons and n-alkanes. The analytical techniques were compared and their advantages and disadvantages were evaluated. The sampling system operated well and target compounds were identified in low concentrations.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Atmospheric aerosol particles comprise a complex mixture of volatile and semivolatile inorganic and organic compounds. The determination of organic compounds in aerosol particles is of great current interest owing to the potential effects of these compounds on human health and the climate. Although sophisticated analytical techniques are now available, the determination of aerosol composition remains a challenging task owing to the complexity of atmospheric aerosol particles, the difficulty involved in sampling, and the trace-level concentrations of the compounds. Traditionally, aerosol particles have been collected onto filters and the compounds of interest removed by solvent extraction or thermal desorption. Usually, a mixture of particles below a given filter pore size (e.g., PM_{2.5}, PM₁₀) has been collected and analyzed. One of the main analytical techniques for this kind of analysis has been gas

chromatography followed by mass spectrometry (GC–MS) [1–5]. Owing to the broad variety of compounds present in the samples, a single chromatographic step may fail to separate the components of the mixture, and chromatograms will suffer from severe peak overlap. Such analyses are often preceded therefore, by a fractionation step, in which two or more fractions are separated on a silica or alumina column and analyzed separately [6–11]. Another option to overcome the poor separation efficiency of a single chromatographic column is a multidimensional technique. Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC × GC) has proven to be a powerful technique for air and aerosol analysis [12–14]. Thermal desorption combined with GC × GC and time-of-flight mass spectrometry (TOFMS) [15–17] has also been used satisfactorily. *In situ* analyses have been performed with a lab-made sampling system, followed by thermal desorption and GC × GC [17–19], and solvent extraction followed by GC × GC with TOFMS or a flame ionization detector (FID) has been applied to the determination of organic species in urban [20] and rural aerosols [21].

The smallest fractions of aerosol particles (particles below 100 nm) are receiving special attention because of their potential

* Corresponding author. Tel.: +358 9 191 50 268; fax: +358 9 191 50 253.
E-mail address: marja-liisa.riekkola@helsinki.fi (M.-L. Riekkola).

to affect both human health and cloud formation. Unfortunately analyzing the organic fraction of the smallest aerosol particles is challenging owing to the tiny mass and shortest lifetime of the particles. The particles are readily transported over long distances and can reach deep into living tissue [8,22]. There is growing evidence, moreover that smaller particles are more reactive than larger ones. As noted above, many of the studies addressing the organic composition of aerosol particles deal with a mixture of particle sizes collected onto a single filter. However, only few studies have been carried out where nanoparticles of specific sizes been collected and analyzed to determine specific organic compounds. Ochiai et al. [23] analyzed size-resolved particles, including the nanoparticle fraction with a diameter of 29–58 nm, in roadside atmospheric samples. The samples were collected with a low-pressure impactor, and PAHs were determined by TD-GC $\times$ GC-QMS. TD-GC-MS has also been used to determine n-alkanes in atmospheric nanoparticles (29–58 nm) [24] and to determine PAHs in size-segregated particles (120–330 nm) from residential wood combustion [25]. Various aerosol mass spectrometer set-ups have successfully been applied for the analysis of size-segregated organic aerosol particles. Although aerosol mass spectrometry methods are usually non-separative, they are also suitable for *in situ* analysis [26,27].

In this work, we tested the applicability of a particle size-segregation system in which particles are charged with a bipolar charger and size-separated with a differential mobility analyzer (DMA). For GC analysis, the particles were collected on a cellulose filter. The system was used to collect nanoparticles (30–100 nm) generated in wood combustion. Four analytical techniques were compared for the determination of PAHs and n-alkanes in the particles: GC $\times$ GC-TOFMS, 1D GC-TOFMS, 1D GC-QMS, and a non-separative aerosol MS technique. Following this, PAHs and n-alkanes were analyzed in a selected aerosol samples by the two best chromatographic techniques and by aerosol MS.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and standard solutions

Acetone and n-hexane (HPLC grade) were purchased from Lab Scan Analytical Sciences (Dublin, Ireland). A standard solution of n-alkanes (even members C10–C40, 100 μ g/mL, CERTAN) was purchased from LGC Promochem GmbH (Wesel, Germany). The PAH mixture (naphthalene (1), acenaphthylene (2), acenaphthene (3), fluorine (4), phenanthrene (5), anthracene (6), carbazole (7), fluoranthene (8), pyrene (9), benz(a)anthracene (10), chrysene (11), benzo(b)fluoranthene (12), benzo(k)fluoranthene (13), benzo(a)pyrene (14), indeno[1,2,3-cd]pyrene (15), benzo [ghi]perylene (16), dibenzo[ah]anthracene (17)), containing 2.0 mg/mL of each compound (Z-014G-R) was from AccuStandard (New Haven, USA). Two internal standards were used for the chromatographic analysis: 4,4'-dibromo-octafluorobiphenyl (quantification standard, 99%, Sigma-Aldrich, Gillingham, UK) and 1,1'-binaphthyl (98%, internal standard, Across Organics, New Jersey, USA).

2.2. Sampling system

The sampling system (Fig. 1) was set-up in a lab fume cupboard. Aerosol particles were produced by heating a piece of Scotts pinewood with a butane/propane flame. The particles were charged with a bipolar charger and size-separated with a differential mobility analyzer (ratio to aerosol flow to sheath air flow 2:5). In the case of chromatographic analysis the particle sizes of interest were 30–100 nm in diameter, and sampling times were 15–150 min. In the case of aerosol MS the particle sizes were from 30 nm to 90 nm

Fig. 1. Aerosol particle sampling system used in the study of particle emission from wood pyrolysis.

and sampling times between 5 min and 30 min. A condensation particle counter (CPC) (3022 A, TSI, MN, USA) was used to count the particles entering the sample syringe filter (0.45 μ m, regenerated cellulose, i.d. 15 mm, Phenomenex, CA, USA) or directly passing to the aerosol MS.

2.3. Sample preparation for chromatographic techniques

Aerosol samples were extracted from the filters with 1 mL of hexane/acetone (50/50, v/v%) mixture. Then, 10 μ L of 1,1'-binaphthyl stock solution (500 mg/L) was added, and sample volume was reduced to 100 μ L under a gentle stream of nitrogen. Finally, 10 μ L of the quantification standard solution (50 mg/L 4,4'-dibromo-octafluorobiphenyl) was added to the samples. Each sample was analyzed three times. A blank sample, obtained by extracting a clean filter with 1 mL of the hexane/acetone (50/50%) mixture and pre-treated as a real sample, was analyzed before each sample.

2.4. Analytical instrumentation and methods

2.4.1. GC-TOFMS and GC $\times$ GC-TOFMS

GC-TOFMS and GC $\times$ GC-TOFMS experiments were carried out on an Agilent 7890A gas chromatograph (Santa Clara, USA) equipped with a split/splitless injector and interfaced with a LECO Pegasus[®] 4D TOFMS system (LECO, St. Joseph, MI, USA). The Agilent GC was equipped with a secondary oven and a dual-stage thermal modulator. An HP-5 column (29 m $\times$ 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness) was used as the first-dimension column and an RTX-17 column (79 cm $\times$ 0.1 mm i.d., 0.1 μ m film thickness) as the second-dimension column (housed in the secondary oven). The two columns were connected by a Silket[®] Treated Universal Press-Tight[®] connector (20480) (Restek, Bellefonte, PA, USA). A 2 m $\times$ 0.53 mm i.d. DPTMDS deactivated retention gap was connected to the first-dimension column to protect it from deterioration.

The analytical conditions for the GC-TOFMS and GC $\times$ GC-TOFMS were identical except for the modulator, which

was turned off for 1D GC analysis. 1 μ L sample was introduced by splitless injection (injector temperature 250 °C), and helium was used as carrier gas in constant flow mode (1.00 mL/min). The temperature of the first-dimension column was programmed from 50 °C (5 min) to 260 °C (15 min) at a rate of 5 °C/min and that of the second-dimension column from 70 °C (5 min) to 280 °C (15 min) at a rate of 5 °C/min. The total GC run-time was 62 min. The time needed to achieve the initial conditions after the analysis was 11 min. The transfer line between the second-dimension column and the (TOFMS) was maintained at 280 °C and the ionization source at 200 °C. Electron impact ionization (70 eV) was used, and a mass range of 50–500 amu was recorded with an acquisition rate of 50 Hz.

For GC $\times$ GC analysis, the main parameters of the cryogenic modulator were programmed as follows: the modulator temperature offset, relative to the main GC oven, was 30 °C and the optimum modulation time was 5 s, with a 1.90-s hot pulse time and a 0.60-s cooling time between stages. Cooling was done with pressurized gaseous nitrogen cooled by liquid nitrogen using a Euro-Cyl 120/4 portable liquid cylinder to store and dispense the liquid.

Data acquisition and processing were accomplished with LECO® ChromaTOF™ optimized for the Pegasus® 4D software (version 3.34). The software has a large number of functions, such as auto peak find, peak deconvolution, full spectral library search, peak combination, and automatic integration of all peak areas belonging to the same second-dimension peak. After data processing, the software generates a peak table which displays information about the peaks found. Peak name, mass spectral match factors (similarity, probability and reverse), height, signal-to-noise ratio (S/N), and retention time are some of the headings in the table. In this work, data processing was used to find all peaks with an S/N larger than 3. For purposes of this study, the maximum number of unknown peaks to be found was set at 600, and unique mass was used for area/height calculations. For GC $\times$ GC chromatograms, the peak width was set at 0.5 s, and a different data processing method was applied to GC–TOFMS chromatograms in which peak width was set at 3 s (all other parameters were kept identical with those used in the GC $\times$ GC data processing method). The NIST EI mass spectrum database was used for the spectral search.

2.4.2. GC–QMS

An Agilent 6890N GC equipped with an on-column injector was used for GC–QMS. The GC column was a DB-5HT (30 m $\times$ 0.250 mm $\times$ 0.1 μ m) coupled with a 3-m deactivated retention gap (i.d. 0.53 mm, Agilent, USA) via a Silket® treated universal press-tight® connector (20480) from Restek (Bellefonte, PA, USA). The GC oven temperature was programmed as follows: initial temperature 50 °C (2 min), temperature gradient 10 °C/min and final temperature 380 °C (1 min). The sample (1 μ L) was introduced by on-column injection. The injector temperature was in oven tracking mode. The GC run-time was 36 min, and the time needed to return to the initial conditions was 11 min. Helium was used as carrier gas, with a constant flow of 0.8 mL/min. The mass spectrometer was a quadrupole instrument (HP 5973) equipped with an inert ion source operating in electron impact mode and using 70 eV ionization energy. The ion source temperature was 150 °C and the interface between the GC and the quadrupole MS was set to 380 °C.

For the optimization of the analytical conditions of the method, detection was done in scan mode. The m/z range was 50–500 amu, and the abundance threshold value was set to zero. The compounds were identified by comparison of the experimental spectra with those of the NIST®98 database (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, version 1.6).

The information obtained in scan mode allowed establishing of 17 SIM groups. The two most abundant ions of each compound (for hydrocarbons masses 43 and 57, and for PAHs molecular ions) were

recorded. Each ion was acquired with a dwell time of 10 ms. Data analysis was performed with Enhanced ChemStation, G1701A Ver. D 00.01.27 software from Agilent Technologies.

2.4.3. Aerosol mass spectrometry

The aerosol mass spectrometer set-up has been presented elsewhere [28]. Some improvements of the system have since been made, and the operation of the modified system is briefly described here. The charged and size-separated particle flow was directed to an oppositely charged stainless steel collection surface, which is part of the specially designed sampling valve. The collected sample was introduced to the high vacuum of the mass spectrometer (MS) by rotating the sampling valve and, after the vacuum recovered (about 60 s), the sample was desorbed from the collection surface with an IR-laser, operating at 1064 nm wavelength. The sample desorption produces a gaseous plume of mostly neutral molecules in the vacuum, which expanded rapidly. Immediately after the desorption pulse, the sample molecules in the plume were ionized with one laser shot from an ArF excimer laser operating at wavelength 193 nm. The ions were then diverted to the TOFMS, separated, and detected according to their m/z ratios. In our previous aerosol MS set-up [28] we used a self-made TOFMS as analyzer and an oscilloscope for data acquisition, but here the system was upgraded by using a commercial TOFMS (C-TOF, ToFwerk, Thun, Switzerland) and a data acquisition card (Agilent Acqiris DP211, Switzerland). The sampling surface was changed from platinum to stainless steel.

The aerosol MS system required little parameter optimization and no pre-treatment of samples. The only variables affecting the system were collection efficiency, aerosol flow rate, and mass window in the TOFMS. The mass window is the range on the m/z axis where the ions are most efficiently detected and it depends on the ion analysis frequency and timing scheme of the mass spectrometer. The range was between about 50 amu and 200 amu and for one data acquisition, depending on the m/z ratio. Thus, during at the one data acquisition the system can detect only a limited number of masses. However, the signal can be divided into different parts so that the whole mass range can be analyzed if required. One can measure a sample with several ranges along the m/z axis, for example, the first 0–50 amu, second 50–150 amu, and so on.

The system was used here only for compound identification while the quantitative manner of the instrument was only tested and used for comparison with results obtained by other techniques. The same standard mixture (1 mg/L) containing PAHs and n-alkanes, as used for calibration in chromatographic techniques, was used with the aerosol MS. All aerosol samples were collected on the sampling valve collection surface by using +2.5 kV collection voltage. The aerosol flow rate was 2 LPM and the mass window was adjusted and switched between 100 amu and 350 amu.

3. Results and discussion

In this study, three gas chromatographic techniques were developed for the determination of n-alkanes and PAHs in aerosol particles. The techniques were compared with each other and with aerosol MS in terms of sensitivity, sampling time, amount of work required, and reusability. Analyses of nanoparticles (30–100 nm) from wood pyrolysis collected via the sampling system were used for the comparison. Particle concentrations in the different particle sizes during the sampling periods varied between about 10^4 and 10^6 particles/cm³.

3.1. Analytical characteristics of the techniques

The GC and GC $\times$ GC techniques were optimized to achieve the best peak resolution in the shortest possible time. The validation

Fig. 2. GC × GC–TOFMS plot of a standard solution of 500 µg/L of PAHs and n-alkanes and 5 mg/L of internal standards 1,1'-binaphthyl and 4,4'-dibromo-octafluorobiphenyl.

parameters, including linearity, repeatability, and limits of detection and quantification, were then determined for each technique. The detection limits (LODs) were calculated as 3.3 times the standard deviation of the peak response for ten replicates ($n = 10$), corresponding to an S/N ratio of about three. The quantitation limits (LOQs) were calculated as LODs using a factor of ten for the deviation [29].

3.1.1. GC × GC–TOFMS

In developing the GC × GC technique, we optimized the modulation frequency and temperature programming to obtain good separation of target analytes. The column combination was chosen on the basis of earlier studies [20]. Fig. 2 shows the optimized separation of the target compounds. As can be seen, all compounds are well separated because of the second column. The peak designations for n-alkanes used in Fig. 2 are based on the number of carbon atoms in hydrocarbon molecule (C10–C28), while the PAHs were numbered according to the numbering in Section 2.1. Because of their high boiling point and thus long analysis time, PAH's 16–18 were excluded from the chromatographic study. The most abundant ion (57 Da) was used for the quantitation of hydrocarbons, while molecular ions were used for PAHs. The separation in the second column was much faster than that in the first (0.84 s vs. 57.66 min for triacontane, the target compound with the longest retention time) and was therefore performed under essentially isothermal conditions. Since all the components of an individual fraction are of virtually the same volatility, the separation on the second column depends only on the specific interactions of

the compounds with the stationary phase. This two-dimensional separation provides chromatograms in which chemically related compounds show up as ordered structures. The structured chromatograms have been cited as a primary advantage of the GC × GC technique [12,17,20,30–33] and they are highly useful for group-type analyses.

Calibration curves for n-alkanes and PAHs were constructed with the optimized conditions. Seven concentration levels ranging from LOQ to 2000 µg/L were used. Each standard was analyzed in triplicate. Peak areas of the extracted ion chromatograms were used to determine the concentration dependence. The individual second-dimension peaks of each analyte were automatically integrated and summed by the Pegasus® 4D software. Ten compounds were selected for comparison of the analytical characteristics of the methods. Table 1 shows the retention time relative standard deviations (RSD), and limits of detection and quantification. The linearity of the calibration curves was good in the concentration range studied; R^2 values were at least 0.9928 for all compounds. Repeatability, for a concentration level of 500 µg/L, was satisfactory, with an RSD of 7.8% or less.

The detection limits (LODs) were estimated using a 1-µg/L solution for all PAHs except chrysene and benzo(a) pyrene: for these a 5-µg/L solution was needed. Fresh hexane was used for the determination of the baseline deviation under possible n-alkane peaks. The LOD values ranged from 0.2 µg/L to 5.0 µg/L. The quantitation limits (LOQs) ranged from 0.6 µg/L to 24.0 µg/L.

Since the GC × GC–TOFMS detected trace concentrations of some of the n-alkanes in the blank sample and even in fresh hex-

Table 1
Analytical characteristics of different chromatographic techniques for ten selected analytes ($n = 10$).

Compound	GC × GC–TOFMS			GC–TOFMS			GC–QMS		
	RSD ^a	LOD ^b (µg L ⁻¹)	LOQ ^b (µg L ⁻¹)	RSD ^a	LOD ^b (µg L ⁻¹)	LOQ ^b (µg L ⁻¹)	RSD ^a	LOD ^b (µg L ⁻¹)	LOQ ^b (µg L ⁻¹)
n-Alkanes									
Dodecane (C10) ^c	4.03	0.2	0.6	2.97	2.7	8.2	1.6	17	52
Hexadecane (C16)	4.88	1.4	4.3	5.03	14.7	44.6	6.6	32	99
Eicosane (C20)	5.00	1.4	4.3	5.64	13.2	40.0	7.2	14	42
Tetracosane (C24)	4.28	3.7	11.3	4.91	14.0	42.5	7.1	32	99
Octacosane (C28)	2.29	7.9	23.9	4.01	21.2	64.4	8.9	49	150
PAHs									
Acenaphthene (3)	1.57	1.1	3.2	4.50	4.8	14.7	4.9	24	72
Phenanthrene (5)	5.42	0.6	1.8	5.96	3.3	9.9	6.1	14	42
Pyrene (9)	4.74	0.5	1.5	6.18	4.7	14.3	5.6	9	26
Chrysene (11)	8.5	1.3	3.9	6.88	6.2	18.9	6.2	23	68
Benzo[a]pyrene (14)	7.78	3.0	9.2	5.54	13.6	41.1	7.7	17	51

^a Determined at 500 µg L⁻¹ level ($n = 10$).
^b See text Section 3.1.
^c Designations used for compound identification in chromatograms of Fig. 2.

Fig. 3. Aerosol MS spectra of different particle sizes in samples from wood combustion and standard liquid sample. (A) 30 nm particles collected for 15 min, (B) 50 nm particles collected for 15 min, (C) 70 nm particles collected for 15 min, (D) 70 nm particles collected for 30 min and (E) 1 µl of 10 µg/L standard solution containing PAHs and n-alkanes. The marked ions represent fluoranthene (202), pyrene (202), benz(a)anthracene (228), chrysene (228), benzo(b)fluoranthene (252), benzo(k)fluoranthene (252), benzo(a)pyrene (252), indeno[1,2,3-cd]pyrene (276), benzo [ghi]perylene (276), dibenzo[ah]anthracene (278). Other marked ions were tentatively identified as fragments of high molecular mass alkanes.

ane, the peak areas found in the blanks were subtracted from the peak areas of the standard solutions and the samples.

3.1.2. GC-TOFMS

The column settings and temperature program for the GC-TOFMS separation, were the same as those used in GC×GC-TOFMS. It is clear that the separation of PAHs is not sufficient when compared with the two-dimensional separation. Extracting ion chromatograms will not solve the problem because the molecular ions for the last eluting compounds are the same. We used a relatively simple standard mixture in this research, but in ambient aerosol samples overlapping could be critical.

Table 1 shows the main analytical characteristics of the optimized GC-TOFMS technique. The calibration curves were constructed as described in the GC×GC-TOFMS section. The peak areas from the extracted ion chromatograms were used for quantitation. For the determination of LODs, a 10-µg/L solution was used for all compounds selected except chrysene and benzo(a)pyrene; for these a 50-µg/L solution was used. The R^2 was always above 0.9956; the RSD for a 500-µg/L sample and $n=10$ was equal to 6.9% or less; the limits of detection ranged between 2.7 µg/L and 21.2 µg/L and the quantitation limits from 8.1 µg/L to 64.3 µg/L.

3.1.3. GC-QMS

The optimized conditions for GC-QMS analysis were similar to those for GC-TOFMS, the main difference was being the faster temperature program. The separation efficiency was not better with slower temperature programming, but the analysis time was increased substantially and so the faster program was used. Five levels ranging from 200 µg/L to 2000 µg/L were used to construct the calibration curves. Each standard solution was analyzed in triplicate. The peak areas for the quantitation ions in the extracted ion chromatograms were used as calibration variables.

The analytical characteristics of the GC-QMS technique are shown in Table 1. A 30-µg/L solution was used for the determination of LODs of the PAHs and n-alkanes. The R^2 values were at least 0.9952 for all compounds. Repeatability, for a concentration level of 500 µg/L and $n=10$, was satisfactory, with an RSD of 8.9% or less. The limits of detection ranged from 9 µg/L to 49 µg/L and the quantitation limits between 26 µg/L and 150 µg/L.

3.1.4. Aerosol MS

The aerosol MS system showed good sensitivity for the standard PAH and n-alkane solutions. 1 µl of the 10 µg/L standard solution was sufficient to give detectable signals of PAHs 8–17. Higher concentrations (1 mg/L solution) were needed to see the

Fig. 4. Comparison of GC $\times$ GC-TOFMS (top) and GC-TOFMS (bottom) extracted ion chromatograms of a 100-nm sample collected for 15 min.

alkanes because fragmentation of the n-alkanes makes the individual identifications difficult. When mass window was adjusted to 50–100 amu the alkane pattern (chain loss of 14 amu corresponds to loss of CH_2) could be identified. Unfortunately there was too much variation between the standard samples at every concentration level to allow quantitative analysis. This variation is probably due to the varying cleanliness of the sample collection surface and artifact formation during the laser desorption process. The data acquisition card also had its limitations: signals of greater than 50 mV intensity were recorded as of 50 mV intensity. Many signals at standard samples should have been stronger signals. It is also relevant that aerosol MS produces many different spectra from the same sample. Normally a single sample will produce about 20–30 spectra, which are subsequently added together manually. The sample compounds and desorption laser intensity determine how long the sample is viable. This feature of the aerosol MS will also generate some uncertainties for the instrument's quantitative nature.

The standard aerosol MS spectrum was compared with the average spectrum of the total ion chromatogram (TIC) from GC-MS, and many of the same peaks were seen in the two spectra. These peaks include PAH molecular ions (all those for standard solution except naphthalene) and some alkane peaks (e.g., m/z 43, 57, 71 and up to 295). These ionization methods (EI in the chromatographic techniques and photo ionization in aerosol MS) are comparable at least in some degree since the photo ionization produced a similar spectrum with less fragments in the area of small m/z values. Occasionally the M^+ ion was seen more easily with photo ionization.

The aerosol MS was sensitive and able to detect target compounds in wood smoke aerosol particles. Particle collection times were generally shorter than in filter collections but signals were still detected, especially for PAH compounds. An example of an aerosol MS spectra is presented in Fig. 3. From this figure, some PAHs and alkanes were identified by comparison with the spectrum of the standard solution. Further, there was some variation

in the ions detected in different samples because wood is not uniform material, and nor is burning process ever the same. Considerable differences in the produced aerosol particles can therefore be expected. Particle concentrations were roughly the same in all samples (10^5 particles/ cm^3) and since the collection time was kept constant the peak intensities increased with the particle size. (Particle size has a cubic dependence on the particle mass.)

3.2. Comparison of the chromatographic techniques

Comparison of the analytical characteristics of the three optimized chromatographic techniques showed the repeatabilities to be closely similar and the calibration plots for the target compounds to be linear over the range studied (about one order of magnitude). The main difference between the analytical characteristics of the techniques studied is the sensitivity. The most sensitive chromatographic technique was GC $\times$ GC-TOFMS, with limits of detection 3–13 times lower than those obtained with GC-TOFMS, and 6–80 times lower than those obtained with GC-QMS.

The GC $\times$ GC-TOFMS and GC-TOFMS techniques differed only in a use of the modulator between the two chromatographic columns, which means that the increase in sensitivity achieved with GC $\times$ GC must be due to the cryofocusing of the compounds eluted from the first column.

The area obtained upon summing the peaks corresponding to a compound in the extracted ion chromatogram obtained by GC $\times$ GC-TOFMS was the same as the peak area obtained on analyzing the same solution by GC-TOFMS. However, the peak width at half-height was about 58 times greater for the peaks obtained by 1D GC. This was reflected as an increase of about 14-fold in the signal-to-noise ratio (S/N) with the GC $\times$ GC technique relative to the ratio for 1D GC. As a result, the limits of detection (described above) were significantly lower with the GC $\times$ GC technique, in agreement with the findings of others, as recently reviewed [32]. Thus, Lee et al. [34] reported a 4–5-fold sensitivity gain for GC $\times$ GC-FID and Dal-

lüge and co-workers [30] calculated a 2–5-fold improvement for GC $\times$ GC–TOFMS. Similar results were reported for GC $\times$ GC– μ ECD, with LODs 3–5 times lower than in 1D GC [35].

The increase in sensitivity obtained with using 1D GC–TOFMS relative to 1D GC–QMS is of the order of 1–6-fold. This is probably due to the detector employed, since 1 μ L of sample was injected in both cases and the chromatographic columns were similar. The addition of a second column to 1D GC–TOFMS has no effect on the separation in 1D mode. Moreover, the TOFMS was programmed with an acquisition rate of 50 spectra/s (can be increased up to 500), so that a much more precise reconstruction was obtained with TOFMS than with the QMS detector in SIM mode, where about 24 spectra/s were recorded for SIM groups composed of two ions and 16 spectra/s for SIM groups with four ions.

To achieve limits of detection of the same order as those obtained by GC $\times$ GC–TOFMS it would be necessary to increase the sampling time of the aerosol particles and simultaneously increase the particle mass at the filter. Sample volume could also be increased.

One drawback of GC $\times$ GC relative to 1D GC is that more time is required for analysis. This is because optimal results it require the use of at least three or four modulations over each first-dimension peak, and this limits the temperature ramps used in the main oven, usually in the 0.5–5 $^{\circ}$ C/min range [12]. We used a ramp of 5 $^{\circ}$ C/min in the GC $\times$ GC–TOFMS analysis and the total time to record the chromatogram was 62 min; the ramp used in the GC–QMS technique was 10 $^{\circ}$ C/min, affording a GC run-time of 36 min; i.e., a reduction of almost 50%. Additionally, the equipment for 1D GC is less expensive and more common in analytical laboratories. Another drawback consistently associated with the use of GC $\times$ GC is that processing of the large data files that are generated is complex and time-consuming. Fortunately, the new Pegasus[®] 4D software (version 3.34) with its built-in automatic functions simplifies the data treatment substantially. However, manual supervision of an experienced analyst is still required, which makes data treatment more complex than in conventional 1D analysis.

3.3. Comparison of techniques for determining the target compounds in aerosol samples

A 100-nm aerosol sample collected for 15 min was used for comparison of the chromatographic techniques. The compounds were extracted from the filter and the sample was analyzed immediately by the chromatographic techniques. The aerosol MS technique is compared separately since the samples were different from those used in the chromatographic techniques.

First, the collected sample was analyzed by GC $\times$ GC–TOFMS. Concentrations were of the same order as the limits of quantitation estimated for the GC–QMS, and even lower for some compounds, and we therefore excluded the GC–QMS technique from this part of the study.

Fig. 4 shows the extracted ion chromatograms for n-alkanes (m/z 57) obtained from the 100-nm sample by GC $\times$ GC–TOFMS and GC–TOFMS techniques. Both chromatograms show a region, called the unresolved complex mixture (UCM), whose spectrum mainly corresponds to that of levoglucosan (a specific biomarker of biomass combustion). In the chromatogram obtained by GC–TOFMS, it is seen that for the extracted m/z ratio, some of the n-alkanes are totally overlapped by the non-resolved interfering matrix constituents, preventing their identification and hence their quantification. An attempt was made to solve this problem by selecting another m/z ratio from the spectrum of the n-alkanes. The same overlap was observed for all m/z ratios studied, however. Thus, to achieve correct identification and quantification of all the n-alkanes by GC–TOFMS the sample would have to be subjected to a pre-treatment step (e.g., solid-phase extraction) before analy-

Fig. 5. Comparison of GC $\times$ GC–TOFMS (top) and GC–TOFMS (bottom) extracted ion chromatograms of tetradecane in a 100-nm sample.

sis. Including this pre-treatment step would increase the analysis time and also the associated error, since sample pre-treatment is typically a major source of error in an analytical technique.

The two-dimensional chromatogram, obtained by GC $\times$ GC–TOFMS, showed a better separation of the analytes from interfering matrix constituents. In this case, the n-alkanes were perfectly separated from the interfering matrix elements and could be identified and quantified without the inclusion of additional steps. As an example, Fig. 5 shows the 3D chromatogram of tetradecane in comparison with that obtained by 1D GC. As can be seen, the comprehensive separation achieved by GC $\times$ GC affords a much larger peak capacity, which is highly useful for complex real samples and hence can be considered the main reason for the success of the comprehensive approach. The same result has been widely reported elsewhere [12,17,31,32].

Table 2 shows the concentrations of the target compounds found in the 100-nm sample by the GC–TOFMS and GC $\times$ GC–TOFMS techniques. The confidence interval is expressed for three replicates with a confidence level of 95%. The portion of the calibration curve of a compound that provides the lowest confidence interval was selected for determining the concentration of that compound in samples.

There was some variation in the compounds detected in the filter samples of different particle size (Tables 3 and 4). In general concentrations were at the same level for the n-alkanes but differed widely for the PAHs. The PAH concentrations were highest in the 50-nm particle samples and the lowest in the smallest particles (30 nm). Concentrations of heavier n-alkanes (<C12) increased as the particle size increased from 30 nm to 70 nm. In the 100-nm sample, however, alkane concentrations were generally lower than in 70-nm samples. Repeated injections of a single

Table 2
Concentrations of the target compounds found in a 100-nm aerosol sample analyzed by GC × GC–TOFMS and GC–TOFMS.

Compounds	Concentration (μg/L)	
	GC × GC–TOFMS	GC–TOFMS
n-Alkanes		
Decane	35 ± 5	20 ± 10
Dodecane	48 ± 2	60 ± 8
Tetradecane	160 ± 20	150 ± 2
Hexadecane	150 ± 10	130 ± 10
Octadecane	280 ± 20	–
Eicosane	260 ± 20	–
Docosane	320 ± 20	–
Tetracosane	310 ± 20	–
Hexacosane	400 ± 20	–
Octacosane	180 ± 30	150 ± 20
Triacontane	200 ± 30	170 ± 30
PAHs		
Naphthalene	18 ± 6	18 ± 6
Acenaphthylene	17 ± 4	11 ± 5
Acenaphthene	7 ± 4	<LOQ
Fluorene	11 ± 5	<LOQ
Phenanthrene	120 ± 10	100 ± 10
Anthracene	26 ± 4	33 ± 9
Carbazole	9 ± 4	7 ± 3
Fluoranthene	350 ± 20	300 ± 10
Pyrene	360 ± 20	300 ± 10
Benz(a)anthracene	100 ± 20	90 ± 20
Chrysene	60 ± 10	90 ± 30
Benzo(b)fluoranthene	70 ± 20	80 ± 30
Benzo(k)fluoranthene	52 ± 6	50 ± 10
Benzo(a)pyrene	70 ± 10	40 ± 7

Compound overlapped with matrix.
LOQ = Limit of quantitation.

extract showed that the difference was not due to the analytical performance. The main cause of the variability may have been the burning system; sampling conditions were never identical. Also, the sampling time may have influenced the results. Some

Table 3
Concentration of the target compounds in samples of different particle sizes analyzed by GC × GC–TOFMS.

Compounds	Concentration in different size samples (μg/L)			
	30 nm	50 nm	70 nm	100 nm
n-Alkanes				
Decane	24 ± 5	26 ± 5	41 ± 5	35 ± 5
Dodecane	31 ± 2	40 ± 2	49 ± 2	48 ± 2
Tetradecane	80 ± 10	120 ± 10	190 ± 10	160 ± 20
Hexadecane	40 ± 10	50 ± 10	160 ± 10	150 ± 10
Octadecane	100 ± 20	82 ± 20	300 ± 30	280 ± 20
Eicosane	70 ± 10	120 ± 10	350 ± 20	260 ± 20
Docosane	130 ± 10	180 ± 20	460 ± 20	320 ± 20
Tetracosane	150 ± 10	200 ± 10	600 ± 20	310 ± 20
Hexacosane	200 ± 10	230 ± 20	890 ± 90	400 ± 20
Octacosane	140 ± 30	120 ± 20	550 ± 40	180 ± 30
Triacontane	150 ± 30	140 ± 30	480 ± 50	200 ± 30
PAHs				
Naphthalene	11 ± 6	15 ± 6	20 ± 6	18 ± 6
Acenaphthylene	10 ± 4	79 ± 4	19 ± 4	17 ± 4
Acenaphthene	<LOQ	17 ± 4	11 ± 4	7 ± 4
Fluorene	11 ± 5	33 ± 4	19 ± 4	11 ± 5
Phenanthrene	37 ± 6	320 ± 10	52 ± 6	120 ± 10
Anthracene	11 ± 4	63 ± 3	22 ± 4	26 ± 4
Carbazole	<LOQ	<LOQ	19 ± 7	9 ± 7
Fluoranthene	14 ± 8	880 ± 50	54 ± 7	350 ± 20
Pyrene	12 ± 5	870 ± 60	67 ± 7	360 ± 20
Benz(a)anthracene	<LOQ	330 ± 50	22 ± 7	100 ± 20
Chrysene	<LOQ	270 ± 10	15 ± 6	60 ± 10
Benzo(b)fluoranthene	ND	330 ± 40	<LOQ	70 ± 20
Benzo(k)fluoranthene	ND	200 ± 20	16 ± 6	52 ± 6
Benzo(a)pyrene	ND	270 ± 30	<LOQ	70 ± 10

ND = not determined.
LOQ = limit of quantitation.

of the results can be explained by the different particle mass of the samples: 30 nm ~1.7 μg/sample, 50 nm ~8 μg/sample, 70 nm ~14 μg/sample, 100 nm ~19 μg/sample. It needs to be added here that, in the case of aerosol MS (15 min collection), the particle

Table 4
Concentration of the target compounds in three different 70 nm size samples analyzed by GC × GC–TOFMS.

Compounds	Concentration (μg/L)		
	70 nm (Sample 1)	70 nm (Sample 2)	70 nm (Sample 3)
n-Alkanes			
Decane	41 ± 5	30 ± 5	33 ± 5
Dodecane	49 ± 2	47 ± 2	46 ± 2
Tetradecane	190 ± 10	150 ± 10	153 ± 10
Hexadecane	160 ± 10	34 ± 10	38 ± 10
Octadecane	300 ± 30	65 ± 8	88 ± 9
Eicosane	350 ± 20	68 ± 8	68 ± 8
Docosane	460 ± 20	130 ± 10	140 ± 10
Tetracosane	600 ± 20	120 ± 10	130 ± 10
Hexacosane	890 ± 90	140 ± 20	190 ± 20
Octacosane	550 ± 40	55 ± 6	90 ± 20
Triacontane	480 ± 50	57 ± 3	73 ± 3
PAHs			
Naphthalene	20 ± 6	11 ± 6	12 ± 6
Acenaphthylene	19 ± 4	10 ± 4	12 ± 4
Acenaphthene	11 ± 4	<LOQ	<LOQ
Fluorene	19 ± 4	9 ± 5	7 ± 5
Phenanthrene	52 ± 6	35 ± 6	12 ± 6
Anthracene	22 ± 4	7 ± 4	<LOQ
Carbazole	19 ± 7	<LOQ	<LOQ
Fluoranthene	54 ± 7	54 ± 7	19 ± 8
Pyrene	67 ± 7	53 ± 7	20 ± 4
Benz(a)anthracene	22 ± 7	<LOQ	<LOQ
Chrysene	15 ± 6	<LOQ	<LOQ
Benzo(b)fluoranthene	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Benzo(k)fluoranthene	16 ± 6	ND	<LOQ
Benzo(a)pyrene	<LOQ	ND	<LOQ

ND = not determined.
LOQ = limit of quantitation.

masses were 30 nm ~5 ng/sample, 50 nm ~200 ng/sample, 70 nm ~1.3 µg/sample.

In our comparison of techniques, we conclude that the separation efficiency is higher in GC × GC than in conventional analyses with 1D GC. With a simple sample pre-treatment the GC × GC system provides a comprehensive picture of the sample. Moreover, the “structured” chromatograms that are obtained facilitate the recognition of unknowns and improve the reliability of the identification. The particle collection time required to obtain a representative sample for qualitative analysis was least with the aerosol MS. When the same collection times as in aerosol MS were tested with GC × GC–MS analyte amounts were under the detection limits.

The identification of compounds was best with the GC × GC system and most difficult with aerosol MS because library search could not be performed. Also the lack of chromatographic separation makes the analysis difficult. Aerosol MS was nevertheless a selective technique, and more sensitive for PAHs than for alkanes because of the better ionization efficiency for PAHs. Also liquid (standard) and aerosol samples behave differently due to their crystallization on the collection surface. Sensitivity was poorest for the GC–QMS technique but target compounds could still be identified in the samples. In general, it can be said that if our sampling system is to be used for ambient air measurements, where particle concentrations in the air are much lower, care must be taken to choose the appropriate analytical technique. When particle concentrations in the air are about 10^2 – 10^3 particles/cm³ the collection times on filters will be several days, while the time to obtain a representative sample for aerosol MS is more like hours. To date, the ability of the aerosol MS techniques, in general, to provide quantitative information about sample compounds is limited. The technique is relatively new and not as well studied as conventional chromatographic techniques. There is still much to do to achieve the same quantitative level as in conventional mass spectrometric techniques. Moreover, our aerosol MS is a more limited technique because there is no possibility for MS–MS experiments. All in all, it is good to have a choice of different analytical techniques available, especially when samples are complex. Identification of the compounds will then be more reliable.

4. Conclusions

A new sampling technique with particle charging and size segregation was successfully applied in the analysis of wood combustion particles of selected sizes. All four analytical techniques employed (GC × GC–TOFMS, 1D GC–TOFMS, 1D GC–QMS, and aerosol MS) performed successfully. In the chromatographic techniques, particles were collected on a filter and analyzed off-line after sample preparation, whereas in aerosol MS the analysis was performed directly from the particle source. Although the individual samples varied widely due to irregular burning of the wood during the sampling, the results show that the developed sampling system is useful for this kind of analysis. The GC × GC–TOFMS provided the best separation efficiency and most reliable identification and quantitation of compounds. Collection and analysis times were shortest for aerosol MS, because the particle mass needed for the analysis was least. We conclude that all these techniques are useful for this type of analysis, and compound identification is more reliable when the results from different techniques can be combined.

Acknowledgments

This research was supported by the Academy of Finland Center of Excellence program (project number 1118615). Sara Herrero Martín and José Luis Pérez Pavón acknowledge the financial support of the DGI (CTQ2007-63157/BQU) and the Consejería de Educación y Cultura de the Junta de Castilla y León (Project SA112A08). Sara Herrero Martín acknowledges an FPU grant from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación. The authors thank Kati Vainikka, Pekka Tarkiainen, Mikael Ehn, Heikki Junninen, Matti Jussila, Minna Kallio, Doug Worsnop and Tofwerk Co. for technical help and assistance.

References

- [1] J. Feng, Z. Guo, C.K. Chan, M. Fang, *Atmos. Environ.* 41 (2007) 1924.
- [2] M. Li, S.R. McDow, D.J. Tollerud, M.A. Mazurek, *Atmos. Environ.* 40 (2006) 2260.
- [3] T. Rissanen, T. Hyötyläinen, M. Kallio, J. Kronholm, M. Kulmala, M.-L. Riekkola, *Chemosphere* 64 (2006) 1185.
- [4] S.S.H. Ho, J.Z. Yu, J.C. Chow, B. Zielinska, J.G. Watson, E.H.L. Sit, J.J. Schauer, *J. Chromatogr. A* 1200 (2008) 217.
- [5] S.S. Park, M.-S. Bae, J.J. Schauer, Y.J. Kim, S.Y. Cho, S.J. Kim, *Atmos. Environ.* 40 (2006) 4182.
- [6] A. Cincinelli, M.D. Bubba, T. Martellini, A. Gambaro, L. Lepri, *Chemosphere* 68 (2007) 472.
- [7] R. Ladji, N. Yassaa, A. Cecinato, B.Y. Meklati, *Atmos. Res.* 86 (2007) 249.
- [8] A. Cincinelli, S. Mandorlo, R.M. Dickhut, L. Lepri, *Atmos. Environ.* 37 (2003) 3125.
- [9] A.I. Gogou, M. Apostolaki, E.G. Stephanou, *J. Chromatogr. A* 799 (1998) 215.
- [10] J. Feng, C.K. Chan, M. Fang, M. Hu, L. He, X. Tang, *Chemosphere* 64 (2006) 1393.
- [11] G. Wang, L. Huang, X. Zhao, H. Niu, Z. Dai, *Atmos. Res.* 81 (2006) 54.
- [12] J. Dallüge, J. Beens, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 69.
- [13] M. Adachour, J. Beens, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 1186 (2008) 67.
- [14] J.F. Hamilton, P.J. Webb, A.C. Lewis, J.R. Hopkins, S. Smith, P. Davy, *Atmos. Chem. Phys.* (2004) 1279.
- [15] J. Schelle-Kreis, W. Welthagen, M. Sklorz, R. Zimmermann, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1648.
- [16] O. Pani, T. Görecki, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 1013.
- [17] X. Xu, L.L.P. van Stee, J. Williams, J. Beens, M. Adachour, R.J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman, J. Lelieveld, *Atmos. Chem. Phys.* 3 (2003) 665.
- [18] X. Xu, J. Williams, C. Plass-Dülmer, H. Berresheim, G. Salisbury, L. Lange, J. Lelieveld, *Atmos. Chem. Phys.* 3 (2003) 1461.
- [19] A.H. Goldstein, D.R. Worton, B.J. Williams, S.V. Hering, N.M. Kreisberg, O. Panik, T. Görecki, *J. Chromatogr. A* 1186 (2008) 340.
- [20] M. Kallio, T. Hyötyläinen, M. Lehtonen, M. Jussila, K. Hartonen, M. Shimmo, M.-L. Riekkola, *J. Chromatogr. A* 1019 (2003) 251.
- [21] M. Kallio, M. Jussila, T. Rissanen, P. Anttila, K. Hartonen, A. Reissell, R. Vreuls, M. Adachour, T. Hyötyläinen, *J. Chromatogr. A* 1125 (2006) 234.
- [22] D.J. Burleson, M.D. Driessen, R.L. Penn, *J. Environ. Sci. Health A39* (10) (2004) 2707.
- [23] N. Ochiai, T. Ieda, K. Sasamoto, A. Fushimi, S. Hasegawa, K. Tanabe, S. Kobayashi, *J. Chromatogr. A* 1150 (2007) 13.
- [24] A. Fushimi, K. Tanabe, S. Hasegawa, S. Kobayashi, *Sci. Total Environ.* 386 (2007) 83.
- [25] M.D. Hays, N.D. Smith, J. Kinsey, Y. Dong, P. Kariher, *J. Aerosol Sci.* 34 (2003) 1061.
- [26] D.G. Nash, T. Baer, M.V. Johnston, *Int. J. Mass Spectrom.* 258 (2006) 2.
- [27] J.D. Allan, M.R. Alfarra, K.N. Bower, H. Coe, J.T. Jayne, D.R. Worsnop, P.P. Aalto, M. Kulmala, T. Hyötyläinen, F. Cavalli, A. Laaksonen, *Atmos. Chem. Phys.* 6 (2006) 315.
- [28] T. Laitinen, K. Hartonen, M. Kulmala, M.-L. Riekkola, *Boreal Environ. Res.* 14 (2009) 539.
- [29] D.L. Massart, B.G.M. Vadegeest, L.M.C. Buydens, S. de Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*, Elsevier, Amsterdam, 1997.
- [30] J. Dallüge, R.J.J. Vreuls, J. Beens, U.A.Th. Brinkman, *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 201.
- [31] X. Lu, M. Zhao, H. Kong, J. Cai, J. Wu, M. Wu, R. Hua, J. Liu, G. Xu, *J. Chromatogr. A* 1043 (2004) 265.
- [32] M. Adachour, J. Beens, R.J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 438.
- [33] A.C. Lewis, N. Carslaw, P.J. Marriott, R.M. Kinghorn, P. Morrison, A.L. Lee, K.D. Bartle, M.J. Pilling, *Lett. Nat.* 405 (2000) 778.
- [34] A.L. Lee, K.D. Bartle, A.C. Lewis, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1330.
- [35] P. Koriyär, P.E.G. Leonards, J. de Boer, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 958 (2002) 203.

X

CONCLUSIONES GENERALES

En el trabajo realizado se han propuesto nuevas metodologías analíticas para la determinación de compuestos orgánicos a niveles de trazas en diferentes matrices ambientales.

Con el fin de estudiar las posibilidades de las nuevas metodologías propuestas, se han puesto a punto diferentes métodos analíticos destinados a la resolución de problemas ambientales concretos.

A continuación se exponen las principales conclusiones obtenidas, unas de carácter general, referidas a las metodologías utilizadas, y otras particulares de las diferentes aplicaciones que se han desarrollado.

➤ **Acoplamiento de un generador de espacio de cabeza con un inyector de temperatura programada:**

La utilización de un inyector de temperatura programada para introducir las muestras procedentes del generador de espacio de cabeza en el cromatógrafo de gases ha demostrado ser una alternativa muy atractiva.

Con esta configuración es posible resolver los problemas, de ensanchamiento de banda inicial y mala definición de la forma de pico, asociados a la introducción de este tipo de muestra con los inyectores *split/splitless* convencionales. Los modos de inyección en frío consiguen la focalización de los compuestos en el *liner* y su transferencia rápida a la columna cromatográfica, lo que se traduce en un incremento de la relación S/N y consecuentemente un aumento de la sensibilidad. El modo de inyección *solvent vent* aporta las ventajas de la inyección en frío y además da lugar a mejores niveles de sensibilidad, gracias a la eliminación del disolvente (que puede distorsionar la resolución cromatográfica y deteriorar la fase estacionaria de la columna) antes de la introducción de los analitos en la columna.

A lo largo de esta memoria, este acoplamiento se ha utilizado en la determinación de VOCs, tanto en muestras líquidas (aguas), como en muestras sólidas complejas (diferentes tipos de suelos) y en ambos casos se han obtenido resultados altamente satisfactorios. Las principales ventajas de la configuración HS-PTV-FGC-MS consisten en que se trata de un método sencillo, rápido, automático, con mínima manipulación de la muestra y altamente sensible. Los límites de detección obtenidos en las dos aplicaciones desarrolladas se encuentran dentro de los más bajos en comparación con los obtenidos con otras metodologías descritas en bibliografía, que requieren de varias etapas de preconcentración y mayores tiempos de análisis. Por tanto, la nueva configuración instrumental propuesta en este trabajo tiene un gran potencial en el análisis de VOCs a nivel de trazas.

➤ **El uso combinado de cromatografía de gases rápida con inyección *solvent vent*:**

A lo largo de este trabajo se han demostrado las posibilidades de este acoplamiento, tanto en la inyección de muestras líquidas como gaseosas.

El modo de inyección *solvent vent*, gracias a la eliminación controlada del disolvente, permite introducir grandes volúmenes de muestra en columnas capilares estrechas. De esta manera se soluciona la principal limitación de este tipo de columnas (baja capacidad, y por tanto menor sensibilidad del método).

➤ **Posibilidades del método QuEChERS en la extracción de compuestos orgánicos de muestras de suelos:**

Se ha puesto a punto una simplificación del método QuEChERS para la extracción de compuestos orgánicos de muestras de suelos. Los resultados obtenidos en las diferentes aplicaciones que se han desarrollado ponen de manifiesto la validez de este método de

extracción. Se han obtenido altos % de recuperación y buena reproducibilidad con un procedimiento rápido, sencillo, económico, que utiliza pequeños volúmenes de disolvente y que no requiere instrumentación compleja.

Como método de análisis de los extractos se ha utilizado la cromatografía de gases rápida con detección mediante micro detector de captura electrónica (en el caso de los compuestos clorados), o con espectrometría de masas (en el análisis de compuestos no halogenados como los BTEX).

Con el detector de captura electrónica, gracias a su alta selectividad, se han obtenido límites de detección muy satisfactorios. Con el método que utiliza detección mediante espectrometría de masas los límites de detección eran superiores, sin embargo, este detector permite la identificación inequívoca y la cuantificación de, prácticamente, cualquier compuesto volátil o semi-volátil presente en la muestra.

Los buenos resultados obtenidos para los compuestos volátiles, así como para el 1,2 diclorobenceno y el hexaclorobenceno, ponen de manifiesto las grandes posibilidades de esta técnica en la extracción de compuestos orgánicos semi-volátiles, cuya extracción mediante HS sería menos efectiva, e incluso en algunos casos no sería posible.

➤ **Uso combinado de mínimo tratamiento de muestra y separación mediante GC X GC en el análisis de muestras complejas:**

Con la configuración propuesta se consigue simplificar y automatizar el procedimiento convencional de análisis de este tipo de muestras, que habitualmente requiere diversas etapas de pretratamiento y limpieza de los extractos.

Esta configuración instrumental se ha aplicado a la determinación de compuestos orgánicos en nanopartículas de aerosoles procedentes de la combustión de madera.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto las ventajas de la técnica GC X GC respecto a 1D GC en el análisis de muestras complejas. El gran poder de separación de la técnica GC X GC, hace posible detectar y cuantificar todos los compuestos objeto de estudio, a partir del análisis directo del extracto procedente del filtro. Además, se consiguen mejores niveles de sensibilidad, gracias a la focalización de los compuestos en el modulador. Esto hace que el tiempo de muestreo necesario para lograr concentraciones detectables de los compuestos con un método basado en GC X GC sean inferiores a los que se requerirían en caso de utilizar un método de 1D GC. En conclusión, el tiempo total de análisis es considerablemente inferior cuando se combinan mínimo tratamiento de la muestra y separación mediante GC X GC, y el método es más sencillo, automático y sensible.

XI

VERSIÓN RESUMIDA EN INGLÉS/
SUMMARY IN ENGLISH

The following chapter is a summary of the developed work. It includes: a table of contents in which the different chapters and sections translated into English have been marked, general aims of this work, a brief introduction about the new trend in analytical chemistry, instrumental configurations used, aim and conclusions for each studied application and finally, the general conclusions of the whole work.

The five published articles and the two articles submitted for publication have been included in each chapter of the Thesis, after the Spanish version. These articles cover the experimental and the results and discussion sections of each one of the applications developed.

CONTENTS

I. GENERAL AIMS (In English)	445
<hr/>	
II. INTRODUCTION (In English)	449
1. SAMPLE PRE-TREATMENT TECHNIQUES	
1.1. <u>Headspace generation</u>	
1.2. <u>QuEChERS</u>	
2. GAS CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS	
2.1. <u>Sample injection: programmed temperature vaporizer (PTV)</u>	
2.1.1. Injection of liquid samples	
2.1.2. HS-PTV coupling	
2.1.2.1. Differences between hot and cold injection modes	
2.1.2.2. Injection modes allowed by the PTV	
2.1.2.2.1. <i>Split</i>	
2.1.2.2.2. <i>Splitless</i>	
2.1.2.2.3. <i>Solvent vent</i>	
2.2. <u>Chromatographic separation</u>	
2.2.1. Fast gas chromatography	
2.2.2. Comprehensive two-dimensional gas chromatography	
<hr/>	
III. INSTRUMENTAL CONFIGURATIONS (In English)	453
1. GAS CHROMATOGRAPH WITH PROGRAMMED TEMPERATURE VAPORIZER AND MASS SPECTROMETER DETECTOR.....	453
1.1. <u>Gas chromatograph</u> (In English).....	453
1.2. <u>Programmed temperature vaporizer</u> (In English).....	453
1.3. <u>Quadrupole mass spectrometer detector</u> (In English)	454

1.4. <u>Modules for sampling injection</u> (In English).....	455
1.4.1. Static headspace (In English)	455
1.4.2. CombiPAL auto-sampler (In English).....	457
2. GAS CHROMATOGRAPH WITH PROGRAMMED TEMPERATURE VAPORIZER AND ELECTRON CAPTURE DETECTOR.....	458
2.1. <u>Gas chromatograph</u> (In English).....	458
2.2. <u>Programmed temperature vaporizer</u> (In English).....	458
2.3. <u>Electron capture detector</u> (In English)	458
2.4. <u>Liquid samples injector</u> (In English).....	459
3. GAS CHROMATOGRAPH (GC X GC) WITH SPLIT/SPLITLESS INJECTOR AND TIME OF FLIGHT MASS SPECTROMETER DETECTOR.....	460
3.1. <u>Gas chromatograph</u> (In English).....	460
3.2. <u>Time of flight mass spectrometer detector</u> (In English).....	461
3.3. <u>Liquid samples injector</u> (In English).....	461

IV. Headspace-programmed temperature vaporizer-fast gas chromatography-mass spectrometry coupling for the determination of trihalomethanes in water (In English). 463

1. INTRODUCTION	
2. AIM (In English)	463
3. EXPERIMENTAL	
3.1. <u>Chemicals</u>	
3.2. <u>Standard solutions and samples</u>	
3.3. <u>HS-PTV-GC-MS instrumentation</u>	
3.4. <u>HS-PTV-GC-MS procedures</u>	
3.4.1. Headspace sampling	
3.4.2. Programmed temperature vaporization	
3.4.3. Gas chromatography	

3.4.4. Mass spectrometry	
3.5. <u>Data analysis</u>	
4. RESULTS AND DISCUSSION	
4.1. <u>HS-PTV- Fast GC-MS data</u>	
4.1.1. Optimization of chromatographic separation	
4.1.2. Study of injection modes	
4.1.3. Data acquisition modes	
4.2. <u>Calibration curves</u>	
4.3. <u>Determination of trihalomethanes in different aqueous matrices</u>	
5. CONCLUSIONS (In English)	464
6. REFERENCES	
PUBLISHED ARTICLE IV1 (In English).....	119
PUBLISHED ARTICLE IV2 (In English).....	129

V. Programmed temperature vaporizer based method for the sensitive determination of trihalomethanes and benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in soils (In English) 465

1. INTRODUCCION	
2. AIM (In English)	465
3. EXPERIMENTAL	
3.1. <u>Chemicals</u>	
3.2. <u>Standard solutions and samples</u>	
3.2.1. Water samples	
3.2.2. Soil samples	
3.2.2.1. Spiked soils	
3.2.2.2. CRM soils	
3.3. <u>HS-PTV-GC-MS instrumentation</u>	
3.4. <u>HS-PTV-GC-MS procedure</u>	

3.4.1. Headspace sampling	
3.4.2. Programmed temperature vaporizer	
3.4.3. Gas chromatography	
3.4.4. Mass spectrometry	
3.5. <u>Data analysis</u>	
4. RESULTS AND DISCUSSION	
4.1. <u>Optimization of the experimental conditions in water matrices</u>	
4.1.1. HS-PTV-fast GC-MS parameters	
4.1.2. Fast GC parameters	
4.1.3. MS conditions	
4.1.4. Time of analysis	
4.2. <u>Analysis of soil samples</u>	
4.2.1. Addition of water and NaCl	
4.2.2. Matrix effect	
4.2.3. Analytical characteristics of the method	
4.2.4. Determination of the target compounds in three different CRM soils	
5. CONCLUSIONS (In English)	466
6. REFERENCES	
PUBLISHED ARTICLE V (In English)	189

VI. Simplified QuEChERS approach for the extraction of chlorinated compounds from soil samples (In English)	467
1. INTRODUCTION	
2. AIM (In English)	467
3. EXPERIMENTAL	
3.1. <u>Chemicals</u>	
3.2. <u>Standard solutions and samples</u>	

3.2.1. Standard solutions	
3.2.2. Soil samples	
3.3. <u>Apparatus</u>	
3.4. <u>Analytical procedure</u>	
4. RESULTS AND DISCUSSION	
4.1. <u>Optimization of the variables involved in the extraction method</u>	
4.1.1. Selection of solvent for PTV-GC analysis	
4.1.1.1. Study of solvents regarding their suitability for chromatographic analysis	
4.1.1.2. Study of solvents regarding their extraction efficiency for the target compounds	
4.1.2. Water addition	
4.1.3. Selection of sample:solvent ratio	
4.1.4. Addition of different salt combinations	
4.2. <u>Analyte recoveries and reproducibility</u>	
5. CONCLUSIONS (In English)	468
6. REFERENCES	
PUBLISHED ARTICLE VI (In English).....	231

VII. Determination of trihalomethanes in soil matrices by simplified QuEChERS extraction and fast gas chromatography with electron capture detection (In English) 469

1. INTRODUCTION	
2. AIMS (In English)	469
3. EXPERIMENTAL	
3.1. <u>Chemicals</u>	
3.2. <u>Standard solutions and samples</u>	
3.2.1. Standard solutions	
3.2.2. Soil samples	

3.2.2.1. Spiked soils	
3.2.2.2. CRM soils	
3.2.2. Water samples	
3.3. <u>Apparatus</u>	
3.4. <u>Analytical procedures</u>	
3.4.1. Sample pre-treatment (QuEChERS)	
3.4.2. GC- μ ECD analysis	
4. RESULTS AND DISCUSSION	
4.1. <u>Variables involved in the pre-treatment step for the extraction of trihalomethanes from soil samples</u>	
4.2. <u>Experimental chromatographic variables</u>	
4.2.1. Chromatographic parameters	
4.2.2. μ ECD parameters	
4.2.3. Optimized experimental conditions	
4.3. <u>Matrix effect</u>	
4.4. <u>Analyte recoveries in different matrices</u>	
4.5. <u>Analytical characteristic of the method in fortified garden samples</u>	
4.6. <u>Determination of THMs in different CRM soils</u>	
5. CONCLUSIONS (In English)	470
6. REFERENCES	
ARTICLE SUBMITTED FOR PUBLICATION VII (In English)..	273

VIII. Simplified QuEChERS extraction for the determination of trihalomethanes and benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in soil matrices by fast gas chromatography with mass spectrometry detection (In English)	471
---	------------

1. INTRODUCTION	
2. AIM (In English)	471
3. EXPERIMENTAL	

3.1. <u>Chemicals</u>	
3.2. <u>Standard solutions and samples</u>	
3.2.1. Standard solutions	
3.2.2. Soil samples	
3.2.2.1. Spiked soils	
3.2.2.2. CRM soils	
3.3. <u>PTV-GC-MS instrumentation</u>	
3.4. <u>Analytical procedures</u>	
3.4.1. Sample pre-treatment (simplified QuEChERS)	
3.4.2. Programmed temperature vaporization	
3.4.3. Gas chromatography	
3.4.4. Mass spectrometry	
3.4.5. Data analysis	
4. RESULTS AND DISCUSION	
4.1. <u>Optimization of the experimental conditions (PTV-GC-MS)</u>	
4.1.1. PTV conditions	
4.1.2. Fast GC parameters	
4.1.3. MS parameters	
4.1.4. Time of analysis	
4.2. <u>Analysis of soil samples</u>	
4.2.1. Matrix effect	
4.2.2. Analytes recoveries in soil matrices	
4.2.3. Analytical characteristics of the method	
4.2.4. Determination of THMs and BTEX in two different CRM soils	
5. CONCLUSIONS (In English)	472
6. REFERENCES	

ARTICLE SUBMITTED FOR PUBLICATION VIII (In English).....	341
---	------------

IX. Determination of organic compounds from wood combustion aerosol nanoparticles by different gas chromatographic systems (In English)	473
--	------------

1. INTRODUCTION	
2. AIM (In English)	475
3. EXPERIMENTAL	
3.1. <u>Chemicals and standard solutions</u>	
3.2. <u>Sampling system</u>	
3.3. <u>Sample preparation for chromatographic techniques</u>	
3.4. <u>Analytical instrumentation and methods</u>	
3.4.1. GC-TOFMS and GC X GC-TOFMS	
3.4.2. GC-QMS	
4. RESULTS AND DISCUSSION	
4.1. <u>Analytical characteristics of the techniques</u>	
4.1.1. GC X GC- TOFMS	
4.1.2. GC-TOFMS	
4.1.3. GC-QMS	
4.2. <u>Comparison of the chromatographic techniques</u>	
4.3. <u>Comparison of techniques for determining the target compounds in aerosol samples</u>	
5. CONCLUSIONS (In English)	476
6. REFERENCES	

PUBLISHED ARTICLE IX (In English)	415
--	------------

X. GENERAL CONCLUSIONS (In English)	477
--	------------

I

GENERAL AIMS

The main aim of this PhD Thesis is to propose and develop new, fast and sensitive methodologies based on gas chromatography, with minimal sample treatment, for the determination of organic compounds at trace levels in different environmental matrices.

The presence of contaminants in environmental samples has become an issue of great relevance and global concern in recent years. This fact is due to the higher knowledge that we have nowadays about the persistence, bio-accumulative character and toxic and carcinogenic effects of many substances that are present in environmental matrices. As consequence, new environmental regulations have emerged, which establish maximum permitted levels of these substances, which tend to be increasingly restrictive. In this context, there is an indisputable need to develop new analytical methods able to determine the pollutants at the levels established by law and, at the same time, following the requirements of the new trend in analytical chemistry of minimization of the solvent use and simplification and automatization of the methods. The methodologies proposed in this work are included within this trend.

Regarding the samples studied, different environmental matrices have been considered (water, soils and air) in order to cover a representative sample of the actual environmental problems.

Regarding the analytes determined, common pollutants of each matrix have been considered. Moreover, the selected analytes are considered priority pollutants by the main official organisms.

The methodological objectives of this work consist of studying the analytical possibilities of:

- The coupling of a headspace autosampler with a programmable temperature vaporizer.
- The combination of fast gas chromatography with sample introduction by means of solvent vent mode, allowed by the programmable temperature vaporizer.
- The application of the sample pre-treatment technique QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*) to the extraction of volatile organic compounds (VOCs) from soil samples.
- The combination of minimum sample pre-treatment with a highly efficient separation method (comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC X GC)) for the analysis of complex samples.

In order to prove the analytical possibilities of the proposed methodologies, different methods have been developed to solve specific environmental problems:

- Headspace-programmed temperature vaporizer-fast gas chromatography-mass spectrometry coupling for the determination of trihalomethanes (THMs) in water.
- Programmed temperature vaporizer based method for the sensitive determination of trihalomethanes and benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX) in soils.
- Simplified QuEChERS approach for the extraction of chlorinated compounds from soil samples.

-
- Determination of Trihalomethanes in soil matrices by simplified QuEChERS extraction and fast gas chromatography with electron capture detection.
 - Simplified QuEChERS approach for the determination of trihalomethanes and benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in soil matrices by fast gas chromatography with mass spectrometry detection.
 - Determination of organic compounds from wood combustion aerosol nanoparticles by comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry and aerosol mass spectrometry.

II

INTRODUCTION

Determination of organic volatile/semivolatile compounds in environmental samples, such as air, water, soil or sediments usually requires special pre-treatment prior to the final determination, most often performed by gas chromatography. This pre-treatment involves the isolation from the matrix of the compounds of interest and their transfer to other medium, ideally with the simultaneous removal of interfering substances and selective enrichment in the receiving medium to a concentration higher than the detection limit of the proposed procedure [1].

The choice of sample treatment applied depends heavily on the complexity of the matrix. Water, in general, represents a less complicated matrix than air, sediment or soil samples. This choice is also related to the detection method. The more sensitive and specific detection method is used, the less stages of sample treatment will be required [2]. Modern analytical strategies tend towards automatization and integration of sample pre-treatment in the chromatographic systems as far as possible [3].

Development of solventless (or at least with low solvent consumption) sample preparation techniques constitutes a pillar of green analytical chemistry [4] and has experienced a rapid development during last years. The great interest in this approach is due to toxicological, environmental and economical aspects. A number of techniques with those characteristics have been developed [5, 6]. Some examples of techniques which use low volumes of solvent are: supercritical fluid extraction (SFE), pressurized liquid extraction (PLE) and microwave assisted extraction (MAE). Some other techniques are based on the miniaturization of the technique liquid-liquid extraction (LLE) and are known as solvent microextraction (SME) or liquid phase microextraction (LPME). The most representative examples of

these techniques are: single drop microextraction (SDME), membrane assisted solvent extraction (MASE), dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and the QuEChERS extraction technique.

The most representative examples of solventless techniques are: solid phase microextraction (SPME), microextraction by packed solvents (MEPS), stir-bar sorptive extraction (SBSE) or membrane introduction mass spectrometry (MIMS). Among techniques based in gas extraction, static headspace (SHS), purge and trap (P&T) and HS-SPME, or the new possibilities of coupling HS with SDME or MASE can be mentioned.

The aims of this PhD Thesis follow this trend of analytical chemistry. Different fast, sensitive and with minimum sample pre-treatment methods will be proposed for the determination of organic compounds in different environmental matrices.

1. REFERENCES

- [1] N. Jakubowska, B. Zygmunt, Z. Polkowska, B. Zabiegała, J. Namiésnik, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 422.
- [2] B. Gilbert-López, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, Talanta 79 (2009) 109.
- [3] T. Hyötyläinen, J. Chromatogr. A 1186 (2008) 39.
- [4] W. Wardencki, J. Curyło, J. Namiésnik, J. Biochem. Biophys. Methods 70 (2007) 275.
- [5] K. Demeestere, J. Dewulf , B. De Witte, H. Van Langenhove, J. Chromatogr. A 1153 (2007) 130.
- [6] T. Hyötyläinen, M.-L. Riekkola, Anal. Chim. Acta 614 (2008) 27.

III

INSTRUMENTAL CONFIGURATIONS

Three different instrumental configurations have been used: (1) a gas chromatograph equipped with a programmed temperature vaporizer and a quadrupole mass spectrometer detector (q-MS); a gas chromatograph equipped with a programmed temperature vaporizer and a micro-electron-capture detector (μ -ECD) and (3) a gas chromatograph (GC X GC) with a time of flight mass spectrometer detector (TOF-MS).

1. GAS CHROMATOGRAPH WITH PROGRAMMED TEMPERATURE VAPORIZER AND QUADRUPOLE MASS SPECTROMETER DETECTOR

1.1. Gas chromatograph

The GC used was an Agilent 6890 equipped with a DB-VRX capillary column (20 m x 0.18 mm x 1 μ m) from Agilent Technologies (J&W Scientific Columns, USA). The maximum temperature ramps allowed by the oven were 70 °C /min from 45 to 175 °C, 45 °C/min from 175 to 300 °C and 35 °C/min from 300 to 450 °C. The carrier gas was helium N50 (99.999% pure; Air Liquid).

1.2. Programmed temperature vaporizer

The PTV used was from Gerstel (CIS-4; Gerstel, Baltimore, MD, USA). A schematic representation of the device used is shown in figure 1. It has a septumless sampling head. Cooling was accomplished with liquid CO₂, and the heating was achieved by means of a heating coil, which provides a homogenous heating of the injector body.

There are different kinds of liners commercially available: empty (straight, baffled) and with different packings (Tenax- TA®, glass wool, quartz wool, Carbotrap B, Carbotrap C y polydimethylsiloxane).

Figure 1: PTV injector CIS 4 from Gerstel

1.3. Quadrupole mass spectrometer detector

The quadrupole mass spectrometer used was an HP 5973, equipped with an inert ion source operated in the electron impact mode using a 70 eV ionization voltage. The recommended temperatures for the ion source and the quadrupole were 230 °C and 150 °C, respectively. Scan and SIM acquisition modes were allowed.

The NIST'98 (NIST/EPA/NIH Mass spectral Library, version 1.6.) mass spectrum database was used for the spectral search.

1.4. Modules for sampling injection

1.4.1. Static headspace

The static headspace sampler was a 7694 from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany) equipped with a tray for 44 consecutive samples and an oven with positions for 6 sample vials. The oven can be heated from 40 °C to 195 °C. The sampling system consisted of a stainless steel needle, a 316-SS six-port valve with a 3-mL nickel loop and two solenoid valves (for pressurization and venting). All the system is connected by nickel tubes and can be heated to 200 °C.

The headspace sampler is coupled to the PTV injector through an inert transfer line of 80 cm length, which can be heated to a maximum temperature of 220 °C. Figure 2 shows the instrumental configuration described.

Figure 2: HS-PTV-GC-MS.

This instrumental configuration has been used in the development of the application described in chapter IV.

A modification of this instrumental configuration in which the Agilent 6890 GC was equipped with a Modular Accelerated Column Heater (MACH™) has also been used. This module is mounted outside the conventional GC oven. The capillary column, a DB-VRX (20 m x 0.18 mm x 1 μ m) from Agilent J&W, is mounted in a protective case. It is coiled with an insulated heating wire and a temperature sensor wire along its entire length. Temperatures between ambient and 400 °C can be programmed at a maximum temperature ramp of 1800 °C/min. Fast cooling is performed by a set of ventilators mounted underneath each column module. This module can be heated and cooled very rapidly, making total analysis cycle times very short. This instrumental configuration was used in chapter V and an image of it is shown in figure 3.

Figure 3: *HS-PTV-GC-MS with MACH™*

1.4.2. CombiPAL auto-sampler

Another device for sample introduction that has been recently coupled to the PTV-GC-MS configuration is the CombiPAL (CTC analytics AG, Zwingen, Switzerland). This auto-sampler adds versatility to the equipment due to the possibility to choose different modalities of sample injection (liquid injection, static headspace and solid phase microextraction). This auto-sampler has been used, in liquid mode, in the application described in chapter VIII. An image of the instrumental configuration is shown in figure 4.

Figure 4: *Combi-PAL-HS-PTV-GC-MS*

2. GAS CHROMATOGRAPH WITH PROGRAMMED TEMPERATURE VAPORIZER AND ELECTRON-CAPTURE DETECTOR

2.1. Gas chromatograph

The gas chromatograph was an Agilent 7890A from Agilent Technologies equipped with a DB-VRX capillary column (20 m x 0.18 mm x 1 µm) for fast gas chromatography from Agilent (J&W Scientific Columns, USA). The oven allows five temperature ramps. The maximum temperature ramps allowed are 120 °C/min to 70 °C, 95 °C/min from 70 to 115 °C, 65 °C/min from 115 to 175 °C, 45 °C from 175 to 300 °C and 35 °C/min from 300 to 400 °C/min. The carrier gas was helium N50 (99.999 % pure; Air Liquid).

2.2. Programmed temperature vaporizer

The PTV was a 6890 from Agilent Technologies. It has the same technical specifications as the PTV from Gerstel, described in the previous section, and can use the same liners. The only difference is that the sampling head has a septum, and therefore is more similar to conventional *split/splitless* injectors.

2.3. Micro-electron-capture detector

The detector was a ⁶³Ni micro-electron-capture detector (µECD) from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). According to the specifications, the detection zone volume of this detector is 10 times smaller than any other ECD, which translates into greater sensitivity and decreases the chance of cell contamination.

2.3. Liquid samples injector

The automatic liquid sample injection system was an Agilent 7683 equipped with a 10 µL microsyringe.

Figure 5 shows an image of this instrumental configuration, which has been used in the development of the applications described in chapters VI and VII of this work.

Figure 5: *PTV-GC-ECD*

3. GAS CHROMATOGRAPH (GC X GC) WITH SPLIT/SPLITLESS INJECTOR AND MASS SPECTROMETER DETECTOR.

3.1. Gas chromatograph

The gas chromatograph was an Agilent 7890A from Agilent Technologies, equipped with a split/splitless injector. The GC was equipped with a secondary oven and a dual-stage thermal modulator. An HP-5 column (29 m $\times$ 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness) was used as the first-dimension column and an RTX-17 column (79 cm $\times$ 0.1 mm i.d., 0.1 μ m film thickness) as the second-dimension column (housed in the secondary oven). The two columns were connected by a Silket® Treated Universal Press-Tight® connector (20480) (Restek, Bellefonte, PA, USA). A 2 m $\times$ 0.53 mm i.d. DPTMDS deactivated retention gap was connected to the first dimension column to protect it from deterioration. Figure 6 shows an image of the oven with the secondary oven and the modulator installed.

Figure 6: *Chromatographic oven with the modulator and secondary oven installed.*

Cooling was done with pressurized gaseous nitrogen cooled by liquid nitrogen using a Euro-Cyl 120/4 portable liquid cylinder to store and dispense the liquid. The carrier gas was helium N50 (99.999% pure; Air Liquid).

3.2. Time of flight mass spectrometer detector

The TOFMS system was a LECO Pegasus® 4D (LECO, St. Joseph, MI, USA). The recommended temperature for the ion source was 200 °C and operated in the electron impact mode using a 70 eV ionization voltage. The detector allows choosing the registered mass range and the frequency of data acquisition, which can be 500 Hz.

The PTV was a 6890 from Agilent Technologies. It has the same technical specifications than PTV from Gerstel.

3.3. Liquid samples injector

The automatic liquid sample injection system was an Agilent 7683 equipped with a 10 µL microsyringe.

Figure 7 shows an image of the instrumental configuration, which has been used in the development of the application described in chapter IX.

Data acquisition and processing were accomplished with LECO®ChromaTOF™ optimized for the Pegasus® 4D software (version 3.34). The NIST'98 (NIST/EPA/NIH Mass spectral Library, version 1.6.) mass spectrum database was used for the spectral search.

Figure 7: GC X GC-TOFM

IV

HEADSPACE-PROGRAMMED TEMPERATURE VAPORIZER-FAST GAS CHROMATOGRAPHY- MASS SPECTROMETRY COUPLING FOR THE DETERMINATION OF TRIHALOMETHANES IN WATER

1. AIM

The aim of this work is to propose a new methodology for the screening and rapid quantitative determination of THMs in water. The instrumental configuration used consists of a headspace autosampler in combination with a GC equipped with a programmed temperature vaporizer (PTV) and a MS detector. The PTV injector allows the analytes present in the gas phase of the headspace to be concentrated by means of a cryogenic effect, enabling large amounts of sample to be injected into the chromatographic column without the drawback of initial band broadening. In this way it is possible to improve sensitivity, maintaining the simple headspace instrumentation.

2. CONCLUSIONS

A new method for the determination of THMs in water has been implemented based on the coupling of headspace sampling, solvent vent injection and fast gas chromatographic separation with mass spectrometry detection. The main advantages obtained are as follows:

The use of headspace generation for introducing the sample has the advantage that no prior treatment of the sample is required, thus minimizing the creation of analytical artifacts and the errors associated with this step of the analytical process.

The solvent vent injection mode allows rapid sample injection in splitless mode, very low detection limits being attained without the critical problem of initial sample bandwidth.

The capillary column used allows rapid separations with half-height widths ranging from 1.68 s (chloroform) to 0.66 s (bromoform). The GC run time was 7.3 min.

The use of mass spectrometry allows the identification and quantification of the analytes at the low ppt level. The S/N ratio was at least 10-fold higher when the SIM mode was used in data acquisition as compared with the scan mode.

The proposed method is extremely sensitive, with detection limits from 0.4 to 6 ppt.

V

PROGRAMMED TEMPERATURE VAPORIZER BASED METHOD FOR THE SENSITIVE DETERMINATION OF TRIHALOMETHANES AND BENZENE, TOLUENE, ETHYLBENZENE AND XYLENES IN SOILS

1. AIM

The aim of this work is to propose a methodology based on the use of a headspace autosampler followed by fast gas chromatography and mass spectrometry, using a programmable temperature vaporizer (PTV) for the determination of THMs and BTEX in soils. With this configuration it is possible to retain the advantages of the simple headspace instrumentation, achieving high sensitivity thanks to the preconcentration of the analytes in the PTV and rapid separation of the compounds via fast gas chromatography.

2. CONCLUSIONS

A simple and very sensitive method has been implemented for the determination of volatile organic compounds in soils. The instrumental configuration is based on the coupling of headspace sampling, solvent vent injection, and fast-gas chromatography separation with mass-spectrometry detection.

It is demonstrated that for BTEX the addition of water to the soils affords higher extraction yields than NaCl. Owing to the presence of the matrix effect a standard additions protocol is proposed for the determination of the target compounds in soil samples.

The use of headspace generation for introducing the sample has the advantage that no prior treatment of the sample is required, thus reducing the experimental errors associated with this step of the analytical process. Fast gas chromatography allows the separation of the eight compounds in less than 4.60 min and the MACHTM can be heated and cooled very rapidly, making the total analysis cycle time very short (9 min). The cryo-trapping of the compounds in the PTV (solvent vent injection mode) together with mass spectrometry detection in SIM mode gives rise to a highly sensitive method with limits of detection in the order of ng/kg in sand samples.

The optimized method was successfully applied in three different certified reference materials. The soils chosen had different percentages of sand, clay and organic matter, such that the results obtained can be extrapolated to most natural soils. In all cases, the predicted concentrations by the calibrations are within the prediction interval specified in the certified material. In view of the results obtained the method proposed here is fast, reliable, accurate and highly sensitive.

VI

SIMPLIFIED QuEChERS APPROACH FOR THE EXTRACTION OF CHLORINATED COMPOUNDS FROM SOIL SAMPLES

1. AIM

In this work, a new and simplified version of the QuEChERS method is proposed for the extraction of chlorinated pollutant compounds from soil samples. To solve the main disadvantage associated to the QuEChERS methodology (low preconcentration of the compounds in the extracts), analysis by gas chromatography with a micro-electron capture detector (μ -ECD), which improves the selectivity and sensitivity with respect to conventional detectors, is proposed.

The main advantage of the proposed version is related to the elimination of the dispersive SPE step after the extraction. In consequence, the new QuEChERS version includes fewer treatment stages of the sample, which makes the final procedure simpler, faster, and cheaper and minimizes the errors associated with this step.

In order to prove the suitability of the proposed approach, chlorinated compounds of different characteristics related to their volatility and polarity have been chosen. Two solvents (acetonitrile and ethyl acetate) have been evaluated in terms of their suitability for chromatographic analysis and of their extraction efficiency from different soil matrices.

2. CONCLUSIONS

A modified and simplified QuEChERS approach has been evaluated for the determination of chlorinated compounds in soil matrices.

Both MeCN and EtOAc can be used for analyte extraction, although EtOAc is preferred because it shows chromatographic advantages. Different injection techniques have been evaluated with good results in all cases.

The proposed method does not require a clean-up step and single liquid-liquid partitioning is achieved with the addition of just MgSO_4 to the sample:solvent mixture.

Future work must be developed to address more extensive validation of this method in order to extend it to different organic compounds in soil matrices.

VII

DETERMINATION OF TRIHALOMETHANES IN SOIL MATRICES BY SIMPLIFIED QuEChERS EXTRACTION AND FAST GAS CHROMATOGRAPHY WITH ELECTRON CAPTURE DETECTION

1. AIM

The aim of this work is to propose the use of the simplified QuEChERS extraction method for the determination of trihalomethanes (chloroform, bromodichloromethane, dibromochloromethane and bromoform) in soil samples by fast GC with electron capture detection. The high selectivity and sensitivity of the detector used for halogenated compounds would achieve good detection limits, in spite of the low preconcentration factors obtained with the QuEChERS extraction technique.

The chromatographic determination of the target compounds will be optimized, the existence of a matrix effect will be checked and the analytical characteristics of the method will be determined in a fortified garden soil sample. Two certified reference materials (CRMs) will be used to validate the proposed methodology.

2. CONCLUSIONS

A method based on QuEChERS extraction followed by fast gas chromatography and micro-electron capture detection has been implemented for the determination of THMs in soil samples. The simplified QuEChERS method, optimized for the extraction of THMs from soil samples, meets the characteristics of the original QuEChERS method and includes more advantages, since it is simpler, faster and cheaper, with the consequent reduction in errors associated with sample manipulation.

The experimental conditions of the fast chromatographic separation have been optimized. With the final method, the target compounds elute in less than 3.8 min. The time needed to achieve initial conditions was 4 min, and hence it was possible to analyze an extract every 10 min.

Upon comparing the slopes of the calibration curves in different matrices, the existence of a matrix effect has been demonstrated.

The recoveries of the target compounds obtained from different types of matrices lie within the 65-94 % recovery range.

The analytical characteristics of the method have been calculated in a fortified garden soil sample. The detection limits achieved (6-659 ng/kg) are of the same order as those obtained using other methodologies reported in the literature. The repeatability of the method (2.5-6.7 %) and the reproducibility of the overall approach (2.8-8.3 %) can be considered excellent.

To validate the optimized method, two certified reference materials- a silty clay soil (RTC-CRM631) and a clay soil (RTC-CRM635) - have been analyzed. The calibration strategy used was the standard additions protocol, and the results obtained were highly satisfactory.

VIII

SIMPLIFIED QuEChERS APPROACH FOR THE DETERMINATION OF TRIHALOMETHANES AND BENZENE, TOLUENE, ETHYLBENZENE AND XYLENES IN SOIL MATRICES BY FAST GAS CHROMATOGRAPHY WITH MASS SPECTROMETRY DETECTION

1. AIM

In this work we propose the use of a mass spectrometer detector after the analysis performed by QuEChERS extraction and fast gas chromatography separation for the determination of THMs and BTEX from soil samples. The main drawback commonly associated with the QuEChERS method, of low preconcentration of the compounds in the extracts, was solved by using a large volume injection technique. Moreover, the selected ion monitoring (SIM) will be employed to provide lower LOQ in the analysis of the target compounds.

The experimental conditions of the apparatus will be chosen; a study to explore the existence of matrix effect will be performed; the analytical characteristics of the method will be studied in a fortified garden soil sample; and finally the method will be validated by means of the analysis of two certified reference materials (CRMs).

2. CONCLUSIONS

A simple, fast and sensitive method has been developed for the determination of THMs and BTEX from soil samples. The method is based on the extraction of the compounds by a simplified version of QuEChERS and direct analysis of the extracts by large volume injection-fast gas chromatography and mass spectrometry detection.

The use of a PTV with a liner packed with Tenax-TA[®] and programmed in the solvent vent mode allowed the injection of a high volume of sample (7 μ L), which gives rise to a great improvement of sensitivity for many of the target compounds. The fast ramp of temperatures used in the oven allowed the separation of the eight compounds in less than 6 min. The use of mass spectrometry detection in SIM mode results in an improvement of the selectivity and sensitivity of the method.

The extraction efficiency of the method for different types of spiked soils lied within the 65 to 76 % recovery range. The analytical method provides excellent values of repeatability and reproducibility with detection limits ranged between 0.2-15 μ g/kg.

The proposed methodology was validated by the analysis of two certified reference materials (CRMs). The most satisfactory results were obtained for the less volatile compounds due to their best properties for large volume injection.

IX

DETERMINATION OF ORGANIC COMPOUNDS FROM WOOD COMBUSTION IN AEROSOL NANOPARTICLES BY DIFFERENT GAS CHROMATOGRAPHIC SYSTEMS

This work was developed in the Laboratory of Analytical Chemistry of the University of Helsinki under the supervision of Marja-Liisa Riekkola y Tuulia Hyötyläinen and in collaboration with the research group headed by Makku Kulmala from the Division of Atmospheric Sciences and Geophysics of the Department of Physics of the University of Helsinki.

The results obtained from this research have been published and the scientific article is included in this thesis (*published article IX*). Nevertheless, the results that are exposed in this PhD Thesis correspond to the parts of the work in which I took the main responsibility for the experimental work, data evaluation and writing of the sections of the paper related. Therefore the aim and the conclusions presented here have been focused on those affecting that part of the work.

1. AIM

The aim of this work is to study the analytical possibilities of three chromatographic methods (GC-QMS, GC-TOFMS y GC X GC-TOFMS) for the determination of organic compounds in aerosol nanoparticles. As target compounds alkanes and PAHs have been selected, they are commonly present in environmental aerosols and many of them are carcinogenic to humans.

The analytical characteristics of the three methods will be compared in terms of sensitivity, sampling time, amount of work required, and repeatability.

Aerosol nanoparticles (30-100 nm), size separated, from wood pyrolysis will be analyzed. Samples will be submitted to a simple pre-treatment method and the extracts obtained will be directly analyzed by the chromatographic methods. The advantages of the higher separation efficiency of GC X GC in the analysis of complex samples will be evaluated.

As a final aim the concentrations of the target compounds in different size aerosol nanoparticles samples will be determined.

2. CONCLUSIONS

The analytical characteristics of three chromatographic methods (GC X GC-TOFMS, GC-TOFMS y GC-QMS) have been evaluated for the analysis of alkanes and PAHs at trace levels and with all of them good results have been achieved.

Regarding the application of these methods to the determination of the target compounds in aerosol nanoparticles from wood combustion, it can be concluded that the separation efficiency is higher in GC x GC than in conventional analyses with 1D GC. With a simple sample pre-treatment the GC x GC system provides a comprehensive picture of the sample. Moreover, the “structured” chromatograms that are obtained facilitate the recognition of unknowns and improve the reliability of the identification. Additionally, the 2D technique is more sensitive and therefore it is possible to use lower sampling times to achieve amounts of sample with detectable concentrations of the compounds.

The concentrations of compounds found in three samples of the same size (70 nm) were significantly different, due to the variability in the process of wood burning. Despite this, it can be concluded that within the set of samples analyzed (30 nm, 50 nm, 70 nm y 100 nm) n-alkanes concentrations were significant higher in smaller particle sizes (30 nm); however, higher concentrations of PAHs were found in higher particle sizes.

II

GENERAL CONCLUSIONS

In this PhD Thesis new analytical methodologies for the determination of organic compounds at trace levels in different environmental matrices have been proposed.

In order to prove the possibilities of the new methodologies, different analytical methods for the resolution of specific environmental problems have been developed.

The main conclusions are set out below. Some are general conclusions of the methodologies used and others are particular conclusions of the different applications developed.

➤ **Coupling of a headspace autosampler with a temperature programmed vaporizer:**

The use of a programmable temperature vaporizer to introduce the headspace samples into the gas chromatograph has proved to be a very attractive alternative.

With this configuration is possible to eliminate the drawback usually linked to HS-GC coupling, of initial band broadening, when conventional split/splitless are used. Cold injection modes achieve the focalization of the analytes in the liner, resulting in an increment in the S/N ratio and consequently in an increase in sensitivity. The solvent vent mode provides the advantages of cold injection and also leads to an improvement in sensitivity, thanks to solvent elimination (which may cause low reproducibility and deterioration of the column stationary phase) before injecting the analytes into the column.

In the present work this coupling has been used in the determination of VOCs in liquid samples (water) and in complex solid samples (soils)

and in both cases results have been highly satisfactory. The main advantages of the instrumental configuration HS-PTV-FGC-MS are that it is simple, fast, automatic, with minimal sample handling and highly sensitive. The detection limits achieved in both applications were among the lowest in comparison with those obtained with other methodologies described in literature, which require several stages of preconcentration and longer analysis times. Therefore, the instrumental configuration proposed here has a great potential in the analysis of VOCs at trace levels.

➤ **Combination of fast gas chromatography with sample introduction by means of solvent vent mode:**

The possibilities of this coupling, for the injection of both liquid and gaseous samples, have been proved in the different applications developed in this work.

Solvent vent injection mode allows the introduction of large amounts of sample in narrow capillary columns, thanks to the solvent elimination. This will solve the main limitation of these columns (low capacity and, therefore less sensitivity of the method).

➤ **Possibilities of the QuEChERS method for the extraction of organic compounds in soil samples:**

A simplified version of the QuEChERS method for the extraction of organic compounds from soil samples has been developed. The results obtained in the different applications show the validity of this extraction method. High recoveries and good reproducibility have been achieved with a quick, easy, cheap, rugged and safe method, which uses low solvent volumes and does not need complex instrumentation.

Gas chromatography with electron capture detection (for chlorinated compounds) or with mass spectrometry detection (for non halogenated compounds such as BTEX) has been used to analyze the extracts.

With the electron capture detector, thanks to its high selectivity, very satisfactory detection limits have been achieved. The limits of detection obtained with the mass spectrometry detector were higher; nevertheless, this detector allows the unequivocal identification and quantification of essentially any volatile or semi-volatile compound present in the sample.

The good results obtained for the volatile compounds and for 1,2 dichlorobenzene and hexachlorobenzene, show the great potential of this technique in the extraction of semi-volatile organic compounds, whose extraction by means of HS would be less effective and even in some cases not possible.

➤ **Combination of minimum sample pre-treatment and separation by GC X GC in the analysis of complex samples:**

With the instrumental configuration proposed it is possible to simplify the conventional analytical procedures applied to complex samples, which generally require several pre-treatment steps and cleaning of the extracts.

This instrumental configuration has been applied to the determination of organic compounds from wood combustion aerosol nanoparticles.

The results obtained highlight the advantages of GC X GC over 1D GC in the analysis of complex samples. The high separation efficiency of the technique GC X GC allows detecting and quantifying all the target compounds with a simple sample pre-treatment. Moreover better sensitivity levels are achieved, thanks to the focalization of the compounds in the modulator. As a result the sampling time needed to

achieve detectable concentrations of the target compounds is shorter with GC X GC on comparing with the sampling times that would be needed for 1D GC. In conclusion the analysis time is considerably shorter when minimum sample pre-treatment is combined with GC X GC analysis and the resulting method is simpler, automatic and highly sensitive.

ANEXO I:
**Informes sobre el trabajo
realizado**

APPENDIX I:
Reports on developed work

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
INFORME DOCTORES EUROPEOS
TESIS DOCTORAL

REFEREE REPORT ON THE PhD TESIS PRESENTED
IN THE UNIVERSITY OF SALAMANCA (SPAIN) BY

Sara Herrero Martin

TITLE OF THE THESIS:	Development of fast methodologies for the detection and determination of organic compounds in environmental matrices
----------------------	--

REFEREE:

Prof.:	Bo Karlberg				
Position:	Professor				
Department:	Department of Analytical Chemistry				
Institution:	Stockholm University				
Address:	SE-10691 Stockholm, Sweden				
Phone:	+46705141186	Fax	+468156391	E-mail:	bo.karlberg@anchem.su.se

This thesis meets the requirements for presentation as an oral dissertation	YES	NO
	☒	☐

Rating	Originality	Scientific /technical merit	Planning /methodology
Outstanding			
Excellent	x	x	x
Very Good			
Good			
Sound			
Defficient			

COMMENTS (Please use additional sheets, if necessary):

See attached sheet.

DATE: 2010-05-06

SIGNATURE:

REFEREE REPORT ON THE PhD TESIS PRESENTED
IN THE UNIVERSITY OF SALAMANCA (SPAIN) BY
Sara Herrero Martin

Title of the thesis:

Development of fast methodologies for the detection and determination of organic compounds in environmental matrices

This thesis comprises four already published original papers, one published review and two submitted manuscripts. All published papers have appeared in internationally recognized, peer-reviewed journals with high impact factors. These journals have a large refusal rate of submitted papers and it should therefore be seen as a merit to get papers accepted for publication.

The review paper, published in *Analytica Chimica Acta*, provides a profound insight of the analytical problems arising when trihalomethanes are determined in water samples. Various methods are examined and compared.

The published original papers as well as the submitted manuscripts all deal with the determination of toxic organic substances in soil and water using modern analytical techniques. The presented analytical problems are relevant and have a definite social importance and impact. New and innovative technical solutions are presented.

In summary, the thesis is solid and technically sound and the work has been performed with great skill and profession.

Stockholm 2010-05-06

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Ola Karlén", with a long horizontal stroke extending to the right.

Report

In the last years the quality control of environment became a very important task. This imposed the developing of new analytical methods having in mind the pollutants level, the requirements of the new trend in analytical chemistry, the minimization of the solvent used and the simplification and automatisation of the methods.

The aim of this PhD Thesis it was to propose and develop new, fast and sensitive methodologies based on gas chromatography, with minimal sample treatment, for the determination of organic compounds at trace levels in different environmental matrices, such as water, soil and air.

Thus, a new method for the determination of THMs in water has been implemented based on the coupling of headspace sampling, solvent vent injection and fast gas chromatographic separation with mass spectrometry detection.

Also, a simple and very sensitive method has been implemented for the determination of volatile organic compounds in soils. The instrumental configuration is based on the coupling of headspace sampling, solvent vent injection, and fast gas chromatography separation with mass-spectrometry detection.

A modified and simplified QuEChERS approach has been evaluated for the determination of chlorinated compounds in soil matrices. A method based on QuEChERS extraction followed by fast gas chromatography and micro-electron capture detection has been implemented for the determination of THMs in soil samples. The simplified QuEChERS method, optimized for the extraction of THMs from soil samples, meets the characteristics of the original QuEChERS method and includes more advantages, since it is simpler, faster and cheaper, with the consequent reduction in errors associated with sample manipulation.

A simple, fast and sensitive method has been developed for the determination of THMs and BTEX from soil samples. The method is based on the extraction of the compounds by a simplified version of QuEChERS and direct analysis of the extracts by large volume injection-fast gas chromatography and mass spectrometry detection.

The analytical characteristics of three chromatographic methods (GCXGC-TOFMS, GC-TOFMS y GC-QMS) have been evaluated for the analysis of alkanes and PAHs at trace levels and with all of them good results have been achieved.

The results obtained during the Ph.D. stage were published in prestigious analytical journals, with a high impact factor, as Journal of Chromatography A (3 papers), Analytica Chimica Acta (a review), Talanta (1 paper) and two were sent for publication.

The thesis it is well presented and structured, the subject it is very important and the material of thesis can be used also by the students and specialists in the field of chromatography.

In conclusion, I should like to congratulate the supervisors and also the Ph.D. Student, for their work and very good results obtained.

Bucharest, May 10, 2010

Dr. Anca-Iulia Stoica
Department of Analytical Chemistry
Faculty of Chemistry
University of Bucharest