



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Química Analítica,
Nutrición y Bromatología

NUEVAS ESTRATEGIAS DE TRATAMIENTO DE MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS EN MATRICES MEDIOAMBIENTALES

*New sample treatment strategies for the
determination of organic contaminants
in environmental matrices*

Ana María Casas Ferreira
2011

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

**NUEVAS ESTRATEGIAS DE TRATAMIENTO DE MUESTRA
PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES
ORGÁNICOS EN MATRICES MEDIOAMBIENTALES**

*NEW SAMPLE TREATMENT STRATEGIES FOR THE
DETERMINATION OF ORGANIC CONTAMINANTS IN
ENVIRONMENTAL MATRICES*

ANA MARÍA CASAS FERREIRA

2011

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA

NUEVAS ESTRATEGIAS DE TRATAMIENTO DE MUESTRA PARA LA
DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS EN MATRICES
MEDIOAMBIENTALES

*NEW SAMPLE TREATMENT STRATEGIES FOR THE DETERMINATION OF
ORGANIC CONTAMINANTS IN ENVIRONMENTAL MATRICES*

Memoria que para optar al Grado de Doctor por la Universidad de
Salamanca presenta la licenciada Ana María Casas Ferreira.

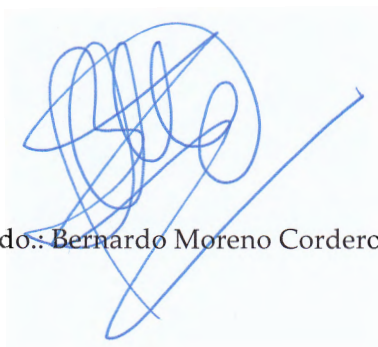
Salamanca, 20 de Junio del 2011

Una firma manuscrita en tinta azul, que parece ser "Ana María Casas Ferreira", escrita sobre un fondo blanco con un borde azul claro.

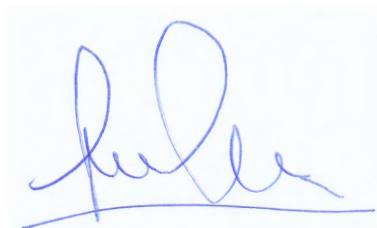
Fdo.: Ana María Casas Ferreira

D. Bernardo Moreno Cordero, Catedrático de la Universidad de Salamanca,
D. José Luis Pérez Pavón, Catedrático de la Universidad de Salamanca y
Dña. María Esther Fernández Laespada, Profesora Titular de la Universidad
de Salamanca, directores del trabajo **“Nuevas estrategias de tratamiento de
muestra para la determinación de contaminantes orgánicos en matrices
medioambientales”** realizado por la licenciada en Ciencias Químicas Ana
María Casas Ferreira 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.

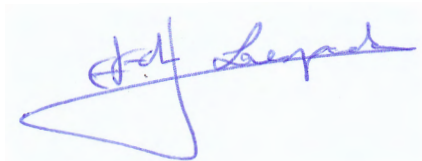
Salamanca, 20 de Junio del 2011



Fdo.: Bernardo Moreno Cordero



Fdo.: José Luis Pérez Pavón



Fdo.: María Esther Fernández Laespada

Deseo expresar mi agradecimiento al Ministerio de Educación por la concesión de una beca de Formación de Profesorado Universitario (2007-2011) AP2006-03739.

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 (2007-2010); Grupo de Excelencia GR87, Junta de Castilla y León (2009-2011) y CTQ2010-17514/BQU, Dirección General de Investigación (2011-2013).

Son muchas las personas a las que me gustaría expresar mi agradecimiento, sin las cuales no habría sido posible la realización de este trabajo.

Mi más sincero agradecimiento a los directores de esta Tesis, Bernardo Moreno Cordero, José Luis Pérez Pavón y María Esther Fernández Laespada, por confiar en mí y por su disposición constante a lo largo de todo este tiempo. Muchas gracias por vuestro apoyo, no solo a nivel profesional, sino también a nivel personal.

Al resto de los miembros del grupo de investigación, del cual me siento muy afortunada de haber pertenecido durante este tiempo. A Carmelo, por su apoyo y cordialidad a lo largo de estos años. A Miguel, por su ayuda, orientación en el inicio de mi Tesis y por su apoyo en los momentos menos buenos. A Gloria, por sus consejos y su apoyo. A las nuevas generaciones, Ana y Elena. Y a Sara, con la cual he pasado la mayor parte del tiempo durante mi Tesis, por su complicidad y por ser un pilar de apoyo durante todo este tiempo. Muchas gracias a todos por vuestra amistad.

Agradezco a todos y a cada uno de los miembros del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología su hospitalidad y amabilidad. Me habéis hecho sentir como en casa.

A todos los compañeros, amigos, que están o que han pasado por el Departamento, con los que he compartido experiencias a lo largo de estos últimos cinco años, con los que he pasado muy buenos ratos, tanto en el laboratorio como fuera, sin olvidar los diferentes viajes que hemos tenido la posibilidad de realizar juntos. Habéis marcado una etapa de mi vida que no olvidaré.

A Iria, y a toda la “mafia española”. Sin vosotros, mi estancia en Alemania no hubiera sido tan buena.

A mis padres, por su apoyo incondicional y fe ciega en mí, no solo en estos años sino a lo largo de toda mi vida. Muchas gracias.

A Pablo, por estar a mi lado todo este tiempo, enseñarme a afrontar los problemas, comprenderme y darme ánimos siempre que lo he necesitado.

Y a todos de los que me he olvidado (lo siento)...

GRACIAS

I would like to thank Prof. Monika Möder for the opportunity to work with her and her team in the Department of Analytical Chemistry of the Helmholtz Center for Environmental Research-UFZ (Leipzig, Germany), and for her invaluable help and support during my research stay.

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

THANKS

SIGLAS Y ACRÓNIMOS /ACRONYMS

AED	Detector de emisión atómica <i>Atomic emission detector</i>
ANOVA	Análisis de varianza <i>Analysis of variance</i>
AOAC	Asociación de Comunidades Analíticas <i>Association of Analytical Communities</i>
BSA	Bis(trimetilsilil)acetamida <i>Bis(trimethylsilyl)acetamide</i>
BSTFA	N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida <i>N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide</i>
BuP/BuPA	Butilparabeno / Acetato de butilparabeno <i>Buthylparaben / Buthylparaben acetate</i>
BzP/BzPA	Bencilparabeno / Acetato de bencilparabeno <i>Benzylparaben / Benzylparaben acetate</i>
CE	Electroforesis capilar <i>Capilar electrophoresis</i>
CFM	Cloroformo <i>Chloroform</i>
CLSA	Análisis por extracción en bucle cerrado <i>Close loop stripping analysis</i>
4C3MP/4C3MPA	4-Cloro-3-metilfenol / Acetato de 4-cloro-3-metilfenilo <i>4-Chloro-3-methylphenol /4-Chloro-3-methylphenyl acetate</i>
2CP/2CPA	2-Clorofenol / Acetato de 2-clorofenilo <i>2-Chlorophenol / 2-Chlorophenyl acetate</i>
μ-ECD	Micro-detector de captura electrónica <i>Micro-electron capture detector</i>

DAD	Detector de diodos <i>Diode array detector</i>
12DCB	1,2-Diclorobenceno <i>1,2-Dichlorobenzene</i>
DCC	N,N'-Diciclohexilcarbodiimida <i>N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide</i>
24DCP/24DCPA	2,4-Diclorofenol / Acetato de 2,4-diclorofenilo <i>2,4-Dichlorophenol / 2,4-Dichlorophenyl acetate</i>
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva <i>Dispersive liquid-liquid microextraction</i>
d-SPE	Extracción en fase sólida dispersiva <i>Dispersive solid phase extraction</i>
EDAN	N-(1-Naftil)etilendiamina <i>N-(1-Naphthyl)ethylenediamine</i>
EDC	N'-(3-Dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida <i>N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide</i>
EDCs	Compuestos disruptores endocrinos <i>Endocrine disruptor compounds</i>
EtOAc	Acetato de etilo <i>Ethyl acetate</i>
GC	Cromatografía de gases <i>Gas chromatography</i>
HCB	Hexaclorobenceno <i>Hexachlorobenzene</i>
HFME	Extracción mediante una membrana porosa <i>Hollow fiber microextraction</i>
HS	Generación de espacio de cabeza <i>Headspace sampling</i>

HSSE	Extracción con sorbente en espacio de cabeza <i>Headspace sorption extraction</i>
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta presión <i>High pressure liquid chromatography</i>
iPrP/iPrPA	Isopropilparabeno / Acetato de isopropilparabeno <i>Isopropylparaben / Isopropylparaben acetate</i>
LQ	Límite de cuantificación <i>Quantification limit</i>
LD	Límite de detección <i>Detection limit</i> o/or Desorción líquida <i>Liquid desorption</i>
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>
LVSS	Focalización de grandes volúmenes de muestra <i>Large-volume sample stacking</i>
MACH	Módulo de calentamiento acelerado de columna <i>Modular accelerated column heating system</i>
MAE	Extracción con disolventes asistida por microondas <i>Microwave assisted extraction</i>
MASE	Extracción con disolvente soportado en membrana <i>Membrane assisted solvent extraction</i>
MeCN	Acetonitrilo <i>Acetonitrile</i>

MeOH	Metanol <i>Methanol</i>
MeP/MePA	Metilparabeno / Acetato de metilparabeno <i>Methylparaben / Methylparaben acetate</i>
MEPS	Microextracción mediante adsorbente empaquetado <i>Microextraction by packed sorbent</i>
MeTCS	Metil triclosán <i>Methyl triclosan</i>
MIMS	Introducción en espectrometría de masas a través de membrana <i>Membrane introduction mass spectrometry</i>
MRM	Método multi-residuo <i>Multiresidue method</i>
MTBSTFA	N-tert-Butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida <i>N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide</i>
MS	Espectrómetro de masas <i>Mass spectrometer</i>
MSPD	Dispersión en matriz de fase sólida <i>Matrix solid phase dispersion</i>
MSTFA	N-Metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida <i>N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide</i>
NACE	Electroforesis capilar no acuosa <i>Non-aqueous capilar electrophoresis</i>
nPrP/nPrPA	n-Propilparabeno / Acetato de n-propilparabeno <i>n-Propylparaben / n-Propylparaben acetate</i>
NSAIDs	Antiinflamatorios no esteroideos <i>Non-steroidal anti-inflammatory drugs</i>
PAHs	Hidrocarburos policíclicos aromáticos <i>Polycyclic aromatic hydrocarbons</i>

PAM	Purga y membrana <i>Purge and membrane</i>
PCP	Productos de cuidado personal <i>Personal care products</i>
PDMS	Polidimetilsiloxano <i>Polydimethylsiloxane</i>
PFBCl	Cloruro de pentafluorobenzoílo <i>Pentafluorobenzoyl chloride</i>
P&T	Purga y trampa <i>Purge and trap</i>
PLE	Extracción líquida a presión <i>Pressurized liquid extraction</i>
PrOAc	Acetato de propilo <i>Propyl acetate</i>
PSA	Amina primaria-secundaria <i>Primary secondary amine</i>
PSWE	Extracción con agua subcrítica presurizada <i>Pressurized subcritical water extraction</i>
PTV	Inyector de temperatura programada <i>Programmed temperature vaporizer</i>
QuEChERS	Rápido, sencillo, barato, eficaz, robusto y seguro <i>Quick, easy, cheap, efficient, rugged and safe</i>
RSD	Desviación estándar relativa <i>Relative standard deviation</i>
SALLE	Extracción líquido-líquido asistida por sales <i>Salting-out assisted liquid-liquid extraction</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 estático <i>Static headspace generation</i>
SIM	Seguimiento de iones seleccionados <i>Selected ion monitoring</i>
SME	Microextracción con disolventes <i>Solvent microextraction</i>
S/N	Señal/ruido <i>Signal-to-noise</i>
SPE	Extracción en fase sólida <i>Solid phase extraction</i>
SPME	Microextracción en fase sólida <i>Solid phase microextraction</i>
TBA	Sales de tetrabutilamonio <i>Tetrabutylammonium salts</i>
TBDMS	Grupo tert-butildimetilsililo <i>tert-Butyldimethylsilyl group</i>
246TCP/246TCPA	2,4,6-Triclorofenol / Acetato de 2,4,6-triclorofenilo <i>2,4,6-Trichlorophenol / 2,4,6-Trichlorophenyl acetate</i>
TCS/TCSA	Triclosán / Acetato de triclosán <i>Triclosan / Triclosan acetate</i>
TD	Desorción térmica <i>Thermal desorption</i>
TDS	Sistema de desorción térmica <i>Thermal desorption system</i>

TDU	Unidad de desorción térmica <i>Thermal desorption unit</i>
TFEA	2,2,2-Trifluoroetilamina <i>2,2,2-Trifluoroethylamine</i>
TMAH	Hidróxido de tetrametilamonio <i>Tetramethylammonium hydroxide</i>
TMS	Grupo trimetilsililo <i>Trimethylsilyl group</i>
TMSH	Hidróxido de trimetilsulfonio <i>Trimethylsulfonium hydroxide</i>
TUV	Detector ultravioleta sintonizable <i>Tunable ultraviolet detector</i>
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra alta resolución <i>Ultra-high-performance liquid chromatography</i>
USAEME	Microextracción en fase líquida mediante emulsión asistida por ultrasonidos <i>Ultrasound-assisted emulsification–microextraction</i>
USE	Extracción con disolventes asistida por ultrasonidos <i>Ultrasonic solvent extraction</i>
USEPA	Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos de América <i>United States Environmental Protection Agency</i>
VHOCs	Compuestos orgánicos halogenados volátiles <i>Volatile halogenated organic compounds</i>
WHO	Organización Mundial de la Salud <i>World Health Organization</i>



ÍNDICE

SIGLAS Y ACRÓNIMOS/ACRONYMS

I. OBJETO.....	3
II. INTRODUCCIÓN.....	9
1. Técnicas de pretratamiento de muestra.....	12
1.1. Generación de espacio de cabeza.....	12
1.1.1. Fundamento teórico del análisis por generación de espacio de cabeza.....	17
1.2. Reacciones de derivatización.....	20
1.2.1. Reacciones de sililación.....	21
1.2.2. Reacciones de alquilación.....	23
1.2.3. Reacción de acilación de fenoles.....	23
1.2.4. Formación de ésteres y amidas a partir de ácidos carboxílicos.....	26
1.3. QuEChERS.....	30
1.4. Extracción por adsorción con barra agitadora (SBSE).....	36
1.4.1. Fundamento teórico de la extracción por adsorción con barra agitadora.....	40
2. Inyección de las muestras: inyector de temperatura programada (PTV).....	43
2.1. Inyección de muestras líquidas.....	44
2.2. Acoplamiento HS-PTV.....	49
2.3. Modos de inyección permitidos por el PTV.....	51

2.3.1. Inyección <i>split</i> y <i>splitless</i>	51
2.3.2. Inyección <i>solvent-vent</i>	52
3. Bibliografía.....	55
III. CONFIGURACIÓN INSTRUMENTAL.....	69
1. Cromatógrafo de gases con inyector de temperatura programada y espectrómetro de masas cuadrupolar.....	69
1.1. Cromatógrafo de gases.....	69
1.2. Inyector de temperatura programada.....	71
1.3. Espectrómetro de masas.....	72
1.4. Módulos de inyección de muestras.....	73
1.4.1. Generador de espacio de cabeza.....	73
1.4.2. Auto-muestreador CombiPAL.....	73
1.5. Esquema de la configuración instrumental.....	74
2. Cromatógrafo de gases con inyector de temperatura programada y detector de captura electrónica.....	78
2.1. Cromatógrafo de gases.....	78
2.2. Inyector de temperatura programada.....	78
2.3. Detector de captura electrónica.....	78
2.4. Sistema de inyección de muestras líquidas.....	79
2.5. Esquema de la configuración instrumental.....	79
3. Cromatógrafo de gases acoplado a un inyector de temperatura programada y a una unidad de desorción térmica con un espectrómetro de masas cuadrupolar.....	81

3.1. Cromatógrafo de gases.....	81
3.2. Inyector de temperatura programada.....	81
3.3. Espectrómetro de masas.....	81
3.4. Sistema de desorción térmica.....	81
3.5. Esquema de la configuración instrumental.....	83

IV. UTILIZACIÓN DE UN INYECTOR DE TEMPERATURA PROGRAMADA Y DE UNA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN <i>IN SITU</i> PARA EL AUMENTO DE LA SENSIBILIDAD EN EL ANÁLISIS POR HS. DETERMINACIÓN DE CLOROFENOLES EN MUESTRAS ACUOSAS.....	87
1. Introducción.....	87
2. Objetivo.....	89
3. Experimental.....	90
3.1. Disoluciones estándar y muestras.....	90
3.2. Reacción de derivatización.....	90
3.3. Medida instrumental HS-PTV-GC-MS.....	91
3.3.1. Generador de espacio de cabeza.....	91
3.3.2. Inyector de temperatura programada.....	91
3.3.3. Cromatografía de gases rápida.....	93
3.3.4. Espectrometría de masas.....	93
3.3.5. Análisis de datos.....	94
4. Resultados y discusión.....	95

4.1. Variables relacionadas con la generación de espacio de cabeza.....	95
4.2. Reacción de derivatización.....	97
4.3. PTV-GC-MS.....	98
4.3.1. Optimización del inyector de temperatura programada.....	98
4.3.2. Optimización de la separación cromatográfica.....	104
4.3.3. Modos de adquisición de datos.....	104
4.4. Evaluación del método HS-PTV-GC rápida-MS.....	105
5. Conclusiones.....	109
6. Bibliografía.....	110
Trabajo publicado IV / <i>Published article IV</i>	115

V. UTILIZACIÓN DE UNA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN <i>IN SITU</i> PARA LA DETERMINACIÓN DE IBUPROFENO EN MUESTRAS ACUOSAS MEDIANTE EL ANÁLISIS POR HS-PTV-GC-MS.....	125
1. Introducción.....	125
2. Objetivo.....	128
3. Parte experimental.....	129
3.1. Reactivos y disoluciones estándar.....	129
3.2. Procedimiento analítico.....	129
3.2.1. Reacción de derivatización.....	131
3.2.2. Generación de espacio de cabeza.....	131
3.2.3. Inyector de temperatura programada.....	131

3.2.4. Cromatografía de gases rápida.....	133
3.2.5. Espectrómetro de masas.....	134
3.2.6. Análisis de datos.....	134
4. Resultados y discusión.....	135
4.1. Variables que afectan a la generación de espacio de cabeza y a la reacción de derivatización.....	135
4.2. PTV-GC-MS.....	138
4.2.1. Optimización del inyector de temperatura programada....	138
4.2.1.1. Tipo de liner utilizado.....	138
4.2.2. Optimización de la inyección <i>solvent-vent</i> en el inyector de temperatura programada.....	140
4.3. Evaluación del método HS-PTV-GC rápida-MS.....	145
5. Conclusiones.....	148
6. Bibliografía.....	149
Trabajo publicado V/ <i>Published article V</i>.....	153

VI. GENERACIÓN DE ESPACIO DE CABEZA CON UNA REACCIÓN <i>IN SITU</i> UTILIZANDO CARBODIIMIDAS PARA LA DETERMINACIÓN DE IBUPROFENO EN MUESTRAS ACUOSAS.....	163
1. Introducción.....	163
2. Objetivo.....	165
3. Parte experimental.....	166
3.1. Materiales, disoluciones estándar y muestras.....	166

3.2. Reacción de derivatización.....	167
3.3. Generación de espacio de cabeza.....	167
3.4. Inyector de temperatura programada.....	167
3.5. Cromatógrafo de gases.....	168
3.6. Espectrometría de masas.....	169
4. Resultados y discusión.....	170
4.1. Variables que afectan a la generación de espacio de cabeza y a la reacción de derivatización.....	170
4.2. PTV-GC-MS.....	174
4.2.1. Optimización del inyector de temperatura programada....	174
4.3. Evaluación del método HS-PTV-GC-MS.....	178
4.4. Tiempo de análisis.....	182
4.5. Muestras reales.....	183
5. Conclusiones.....	186
6. Bibliografía.....	187
Trabajo publicado VI / <i>Published article VI</i>.....	193

VII. DETERMINACIÓN DE PARABENOS, TRICLOSÁN Y METIL TRICLOSÁN EN AGUAS UTILIZANDO UNA REACCIÓN <i>IN SITU</i> Y EXTRACCIÓN POR ADSORCIÓN EN BARRA AGITADORA CON POSTERIOR ANÁLISIS GC-MS.....	203
1. Introducción.....	203
2. Objetivo.....	205

3. Experimental.....	206
3.1. Reactivos, disoluciones estándar y muestras.....	206
3.2. Procedimiento de derivatización y de extracción.....	207
3.3. Instrumentación.....	208
3.4. Condiciones de análisis TD-GC-MS.....	208
4. Resultados y discusión.....	210
4.1. Reacción de derivatización.....	210
4.2. Optimización del proceso de extracción por SBSE.....	211
4.3. Optimización de los parámetros de desorción.....	214
4.4. Eficacia de la extracción.....	217
4.5. Evaluación del método SBSE-TD-GC-MS.....	217
4.6. Comparación con otros métodos propuestos en bibliografía....	219
4.7. Muestras reales.....	222
5. Conclusiones.....	225
6. Bibliografía.....	226
Trabajo publicado VII / <i>Published article VII</i>.....	233

VIII. EXTRACCIÓN POR ADSORCIÓN EN BARRA AGITADORA DE PARABENOS, TRICLOSÁN Y METIL TRICLOSÁN EN SUELOS, SEDIMENTOS Y LODOS CON LA UTILIZACIÓN DE UNA REACCIÓN <i>IN SITU</i> Y DETERMINACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	245
1. Introducción.....	245

2. Objetivo.....	248
3. Experimental.....	249
3.1. Reactivos.....	249
3.2. Disoluciones estándar y suelos.....	251
3.2.1. Disoluciones estándar.....	251
3.2.2. Muestras de suelos.....	251
3.3. Reacción de derivatización y extracción.....	252
3.4. Instrumental.....	253
3.5. Condiciones instrumentales.....	253
4. Resultados.....	255
4.1. Reacción de derivatización.....	255
4.2. Optimización de la extracción por SBSE.....	257
4.3. Evaluación del método SBSE-TD-GC-MS.....	262
4.4. Muestras reales.....	266
5. Conclusiones.....	270
6. Bibliografía.....	271
Trabajo publicado VIII / <i>Published article VIII</i>.....	277

IX. PROPUESTA DE UNA VERSIÓN SIMPLIFICADA DE LA METODOLOGÍA QuEChERS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS CLORADOS EN SUELOS.....	287
1. Introducción.....	287
2. Objetivo.....	290

3. Parte experimental.....	292
3.1. Reactivos.....	292
3.2. Disoluciones estándar y muestras.....	292
3.2.1. Disoluciones estándar.....	292
3.2.2. Muestras de suelos.....	292
3.3. Instrumentación GC- μ ECD.....	293
3.4. Procedimiento analítico.....	294
4. Resultados y discusión.....	297
4.1. Optimización de las variables involucradas en el proceso de extracción.....	297
4.1.1. Selección del disolvente de extracción.....	297
4.1.1.1. Estudio de los dos disolventes en relación a su adecuación para el análisis cromatográfico.....	299
4.2.2.2. Estudio de los dos disolventes en relación a su eficacia en la extracción de compuestos de matrices de suelos.....	305
4.1.2. Adición de agua sobre las muestras.....	307
4.1.3. Relación entre tamaño de muestra y volumen de disolvente.....	308
4.1.4. Adición de diferentes combinaciones de sales.....	309
4.2. Recuperaciones y reproducibilidad obtenidas con el método de extracción optimizado.....	311
5. Conclusiones.....	313
6. Bibliografía.....	314

Trabajo publicado IX / <i>Published article IX</i>	319
--	-----

X. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA VERSIÓN SIMPLIFICADA DE LA METODOLOGÍA QuEChERS PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS C1-C3 HALOGENADOS Y CLOROBENCENOS EN SUELOS	329
1. Introducción.....	329
2. Objetivo.....	332
3. Experimental.....	333
3.1. Reactivos y disoluciones estándar.....	333
3.2. Muestras de suelos.....	334
3.3. Procedimiento analítico.....	335
3.3.1. Tratamiento de muestra.....	337
3.3.2. Inyector de temperatura programada.....	337
3.3.3. Análisis instrumental GC- μ ECD.....	338
4. Resultados y discusión.....	339
4.1. Extracción.....	339
4.2. PTV-GC- μ ECD.....	342
4.2.1. Optimización del inyector de temperatura programada.....	342
4.3. Estudio del efecto matriz.....	345
4.4. Rendimiento de la extracción.....	347
4.5. Validación del método.....	348
4.6. Determinación de los analitos estudiados en suelos de contenido certificado (CRM).....	351

5. Conclusiones.....	353
6. Bibliografía.....	354
<i>Trabajo enviado para su publicación X / Article submitted for publication X.....</i>	<i>361</i>
XI. CONCLUSIONES GENERALES.....	395
XII. VERSIÓN RESUMIDA EN INGLÉS	
<i>SUMMARY IN ENGLISH.....</i>	<i>403</i>
ANEXO I: Informes sobre el trabajo realizado / APPENDIX I: Reports on developed work	
1. Prof. Dr. Slavica Ražić	
2. Prof. Dr. Ari Ivaska	



I
OBJETO

El objeto general de esta memoria consiste en proponer y desarrollar nuevas estrategias de tratamiento de muestra para la determinación de contaminantes orgánicos en matrices medioambientales.

En muchos casos, cuando se trabaja con diferentes matrices, tales como aguas o suelos, es necesaria la utilización de técnicas de pretratamiento de muestra previas al análisis instrumental, cuyo objetivo principal es aislar los analitos de interés del resto de componentes presentes en la matriz original. Normalmente, esta etapa es la más compleja del proceso analítico y donde se comete un mayor número de errores. Consecuentemente, cuanto menor sea la manipulación de la muestra en la misma, mayor será la calidad de los resultados obtenidos. Dentro de esta tendencia se engloban las metodologías propuestas en este trabajo.

En cuanto a las muestras estudiadas, se han considerado diferentes matrices ambientales: aguas y suelos.

Respecto a los analitos determinados, su selección se ha llevado a cabo en base a su demostrada toxicidad para el medio ambiente (clorofenoles, compuestos volátiles halogenados o clorobencenos), o a la falta de información de su efecto en el medio ambiente (contaminantes emergentes, compuestos farmacéuticos o pertenecientes a productos de cuidado personal).

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.
- La utilización de reacciones de derivatización en medio acuoso para el aumento de la volatilidad de los analitos en estudio en el acoplamiento HS-GC.

- 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 utilización combinada de la extracción por adsorción en barra agitadora (*Twister*) con reacciones de derivatización *in situ* en muestras de agua y de suelos.
- La aplicación de la técnica de pretratamiento de muestra QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Simple*), basada en la extracción con disolventes asistida por sales (*salt assisted liquid-liquid extraction, SALLE*) para la extracción de compuestos orgánicos clorados en muestras de suelos.

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 clorofenoles en muestras acuosas mediante el uso simultáneo de una reacción de derivatización *in situ* y un inyector de temperatura programada en el acoplamiento espacio de cabeza-cromatografía de gases (HS-GC).
- Determinación de ibuprofeno en muestras acuosas mediante el acoplamiento HS-GC con un inyector de temperatura programada y una reacción de derivatización *in situ*.
- Optimización de una reacción de derivatización con la utilización de carbodiimidas para la determinación de ibuprofeno en muestras acuosas, utilizando generación en espacio de cabeza.
- Determinación de parabenos, triclosán y metil triclosán en muestras acuosas y suelos, mediante la utilización combinada de la extracción por adsorción en barra agitadora (SBSE) y

reacciones de derivatización *in situ*, y posterior análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas.

- Desarrollo de una simplificación del método QuEChERS para la extracción de compuestos clorados en muestras de suelos.
- Determinación de compuestos halogenados volátiles y clorobencenos en muestras de suelos mediante una versión modificada de QuEChERS-cromatografía de gases y detección mediante captura electrónica.



II

INTRODUCCIÓN

La cromatografía de gases (*gas chromatography*, GC) es una técnica muy consolidada 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. 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 requieren habitualmente del uso de grandes volúmenes 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, la Química Analítica Verde (*Green Analytical Chemistry*) que trata de restringir el uso de disolventes orgánicos, así como de generar la mínima cantidad de residuos, que, en muchos casos, son más tóxicos que los propios analitos que se quieren determinar. 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.

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), extracción con disolvente asistida por microondas (*microwave assisted extraction*, MAE) o el método de extracción QuEChERS (*quick, easy, cheap, efficient, rugged and safe*). 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), y de la técnica de extracción en fase sólida (*solid phase extraction*, SPE). Dentro de éstas se pueden citar técnicas como la de microextracción en una gota (*single-drop microextraction*, SDME), la extracción con disolvente soportado en membrana (*membrane assisted solvent extraction*, MASE), la técnica de microextracción líquido-líquido dispersiva (*dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME) y la microextracción mediante adsorbentes empaquetados (*microextraction by packed sorbent*, MEPS).

También se han desarrollado técnicas que no requieren el uso de disolventes, como la microextracción en fase sólida (*solid phase micro extraction*, SPME), extracción por adsorción en barra agitadora (*stir bar sorptive extraction*, SBSE) en la modalidad de desorción térmica, 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 dinámico (*Purge and Trap*, P&T), o en sus diferentes combinaciones, tales como el acoplamiento de HS con las técnicas de SPME, SDME o MASE.

A pesar de que la aceptación de estas nuevas técnicas de pretratamiento ha sido muy lenta por parte de los organismos oficiales, 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 distinguen dos bloques. En el primero de ellos se resumirán los orígenes y evolución de las técnicas de pretratamiento de muestra utilizadas a lo largo de la memoria. En el segundo, se describirán los aspectos más relevantes del sistema de introducción de muestras utilizado, un inyector de temperatura programada.

1. TÉCNICAS DE PRETRATAMIENTO DE MUESTRA

1.1. Generación de espacio de cabeza

La generación de espacio de cabeza (*headspace generation*, 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 (*gas chromatography*, GC) [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 pueden 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 analitos entre la fase gaseosa y el disolvente orgánico. Finalmente, el disolvente con los analitos preconcentrados se inyecta en el cromatógrafo de gases para su posterior 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. Sin embargo, el acoplamiento de esta modalidad estática a un cromatógrafo de gases 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 Bruno Kolb y Leslie S. Ettre [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, surgieron algunos avances para evitar la eliminación manual del líquido criogénico. En lugar de un baño se utilizó un tubo de teflón que rodea la trampa en forma de U y un flujo de agua caliente que desplaza al nitrógeno líquido una vez finalizada la preconcentración de los compuestos.

Más adelante surgieron trampas en las que el enfriamiento se conseguía 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, surgió

la idea de introducir el dispositivo en el interior del cromatógrafo de gases, de modo que, una vez que el flujo de gas frío dejaba de circular, la trampa adquiriría 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, sino 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 inferiores a 0 °C pueden producirse problemas de bloqueo del flujo en columnas capilares por congelación de agua [11-13].

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.

La presencia de agua en el sistema cromatográfico, además de poder bloquear la columna por formación de hielo, puede dar lugar a distorsión de la forma de pico, particularmente en 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 inyectores de temperatura programada (*Programmed temperature vaporizers*, PTVs).

1.1.1. Fundamento teórico del análisis por generación de espacio de cabeza

En el sistema del vial se pueden considerar tres volúmenes: volumen total del vial (V_v), volumen de muestra (V_s) y volumen de la fase gaseosa (V_g) [1]. La relación entre volumen de fase gaseosa y volumen de muestra está representada por el parámetro β , relación entre fases.

$$\beta = \frac{V_g}{V_s} \quad (1)$$

Teniendo en cuenta que $V_v = V_s + V_g$ (2)

$$\beta = \frac{V_g}{V_v - V_g} \quad (3)$$

La cantidad de analito transferido a la fase gaseosa durante el tiempo de equilibrado no modifica el volumen de muestra original V_s .

La cantidad original de analito se designa por W_0 y la concentración original será:

$$C_0 = \frac{W_0}{V_s} \quad (4)$$

Tras alcanzarse el equilibrio, la concentración de analito en cada una de las fases vendrá definida por las siguientes relaciones:

$$C_s = \frac{W_s}{V_s} \quad (5)$$

$$C_g = \frac{W_g}{V_g} \quad (6)$$

$$W_s + W_g = W_0 \quad (7)$$

La distribución de analito entre las dos fases una vez alcanzado el equilibrio está expresada por la constante de equilibrio o coeficiente de partición K .

$$K = \frac{C_s}{C_g} = \frac{W_s}{W_g} \times \beta \quad (8)$$

El coeficiente de partición es un parámetro fundamental que expresa la distribución de masa en un sistema de dos fases. Depende de la solubilidad del analito en la fase condensada: compuestos con solubilidad muy alta estarán en mayor concentración en la fase condensada, por lo que el valor de K será muy alto. Para analitos con baja solubilidad en la fase condensada,

la concentración en la fase condensada y gaseosa será similar o incluso mayor en la segunda, por lo que K será pequeño.

El balance de materia dado por la ecuación (7) se puede escribir de la siguiente manera:

$$C_0 \times V_s = C_g \times V_g + C_s \times V_s = C_g \times V_g + K \times C_g \times V_s = C_g (K \times V_s + V_g) \quad (9)$$

por lo que

$$C_g = \frac{C_0}{K + \beta} \quad (10)$$

La sensibilidad de la técnica, directamente proporcional a la concentración de analito en la fase gaseosa, puede modificarse variando los valores de K y β .

El valor de β se puede modificar fácilmente, variando el volumen de muestra o el tamaño del vial.

El valor de K depende de la presión parcial de vapor (p_i^0) y del coeficiente de actividad (γ_i) de cada compuesto:

$$K \propto \frac{1}{p_i^0 \times \gamma_i} \quad (11)$$

La presión de vapor de un compuesto puro (p_i^0) depende exponencialmente de la temperatura. Esta relación puede expresarse en función de la siguiente ecuación,

$$\log p_i^0 = -\frac{B}{T} + C \quad (12)$$

donde B y C son constantes específicas de cada analito y T es la temperatura absoluta. Cuanto mayor sea la temperatura mayor será el valor de p_i^0 y, por lo tanto, mayor será la sensibilidad del análisis, al disminuir K.

El coeficiente de actividad describe las relaciones intermoleculares entre el soluto y el disolvente. Su efecto es análogo al de p_i^0 , cuanto mayor sea el valor de γ_i , menor será el valor de K y, por tanto, mayor será la sensibilidad del análisis. Para el caso de disoluciones acuosas esto puede conseguirse añadiendo un electrolito al medio (efecto "salting out"). El comportamiento observado no es el mismo para todos los analitos; se obtienen mejores resultados para compuestos más polares con hidrógenos activos que para compuestos no polares. Sin embargo, el aumento de la sensibilidad conseguido no es exclusivo del efecto anteriormente descrito; al añadir grandes cantidades de sales se aumenta el volumen de fase condensada, disminuyendo el valor de β .

La principal limitación de la técnica de generación de espacio de cabeza radica en que solo es posible su aplicación a compuestos volátiles que pasan a la fase gaseosa. A lo largo de esta memoria se utilizará el procedimiento de generación de espacio de cabeza estático junto con reacciones de derivatización *in situ* en el propio vial del HS para la determinación de compuestos poco volátiles en matrices acuosas. Utilizando la combinación anteriormente señalada es posible ampliar el rango de compuestos que pueden ser determinados mediante HS.

1.2. Reacciones de derivatización

La utilización de reacciones de derivatización es una estrategia ampliamente utilizada en cromatografía de gases. Este pretratamiento químico de la muestra tiene el objetivo de eliminar los hidrógenos activos de los grupos reactivos de la molécula. Las razones predominantes para llevar a cabo esta etapa son el aumento de la volatilidad de los analitos en estudio, la mejora de las características cromatográficas de los mismos reduciendo su polaridad y/o el aumento de la sensibilidad en el detector [14]. Es deseable que este paso se realice de la forma más rápida y con un

mínimo número de etapas y reactivos, pero, en muchas ocasiones, se trata de un paso laborioso y que requiere de un elevado tiempo de trabajo.

La naturaleza química, así como la reactividad de los analitos, van a fijar el tipo de derivatización que se ha de llevar a cabo. Nos centraremos en las reacciones más utilizadas para los grupos fenólicos y ácidos carboxílicos, que son los que se han estudiado a lo largo de esta memoria. Las reacciones de sililación y alquilación, comunes para ambos grupos funcionales, se describirán de forma conjunta, mientras que las reacciones específicas para cada grupo funcional, como son la acilación de fenoles y la formación de ésteres y amidas a partir de ácidos carboxílicos, se describirán de forma separada.

1.2.1. Reacciones de sililación

Las reacciones de sililación han sido ampliamente utilizadas para ambos grupos funcionales, ya que mejoran parámetros cromatográficos tales como reproducibilidad, sensibilidad y forma de pico (supresión de cola). Existen dos grupos de agentes sililantes, los que generan derivados trimetilsililo (TMS) y los que generan derivados *tert*-butildimetilsililo (TBDMS). Los derivados TMS se generan utilizando como reactivos de derivatización bis(trimetilsilil)acetamida (BSA) [15], bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) [16,17] o N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) [18-21]. Los derivados TBDMS se generan utilizando N-metil-N-(*tert*-butildimetilsilil)trifluoroacetamida (MTBSTFA) [22,23]. Los derivados TBDMS son más resistentes a altas temperaturas y a la presencia de pequeñas cantidades de agua (pueden tolerar hasta un 1 % de agua) que los derivados trimetilsililo. Además, generan espectros de masas fácilmente identificables cuyo pico base corresponde a la pérdida del grupo *tert*-butilo. Sin embargo, la principal desventaja que presentan es la baja reactividad de los agentes derivatizantes correspondientes.

Cuando se utilizan este tipo de reacciones es necesario transferir los analitos a un medio aprótico, ya que los reactivos se degradan en presencia de agua. Las técnicas de extracción que más se han utilizado han sido la extracción en fase sólida (*solid-phase extraction*, SPE) [18,20,22], extracción líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*, LLE) [24] o la extracción asistida por microondas (*microwave assisted extraction*, MAE) [17]. Los analitos pasan a un medio orgánico donde tiene lugar la reacción [17,20,22,25]. En los últimos años ha aumentado el número de aplicaciones que utilizan técnicas acordes a la nueva tendencia de minimizar volúmenes de disolventes orgánicos, tales como microextracción en fase sólida (SPME), microextracción con disolventes, extracción por adsorción con barra agitadora (SBSE) o extracción asistida por membranas. Una posibilidad que ofrecen estas nuevas técnicas es la de combinar el paso de extracción con el de derivatización [26], como, por ejemplo, la extracción de los analitos en una fibra de extracción en fase sólida y posterior derivatización en la propia fibra [27,28], extracción de los compuestos en una gota de disolvente orgánico (SDME) [15,29] o mediante una membrana porosa (*hollow fiber microextraction*, HFME) [30], en cuyo interior se encuentra disuelto el reactivo derivatizante o extracción por adsorción en barra agitadora (SBSE) y posterior derivatización en el propio tubo de desorción térmica [31] donde se ha alojado previamente el reactivo derivatizante.

Otra posibilidad es llevar a cabo la reacción en el mismo puerto de inyección a temperatura elevada, bien mezclando previamente los analitos con el reactivo en un medio orgánico [32], o utilizando fibras de extracción de SPME, las cuales se introducen directamente en el inyector, en el cual se inyectan de forma previa los reactivos de derivatización [33]. De esta manera, es posible reducir el tiempo necesario para que tenga lugar la reacción.

A pesar de que las reacciones de sililación han sido las que más se han utilizado, presentan una serie de desventajas. En primer lugar, como ya se

ha señalado anteriormente, los reactivos son sensibles al agua, lo que establece la necesidad de llevar a cabo una etapa de extracción previa, que complica el proceso. En segundo lugar, es necesario calentar la muestra para acelerar la reacción y que tenga lugar en un tiempo relativamente corto, lo que genera subproductos de reacción que interfieren en el análisis cromatográfico.

1.2.2. Reacciones de alquilación

Las reacciones de alquilación son otra alternativa ampliamente utilizada, tanto para fenoles como para ácidos carboxílicos. La alquilación con diazometano en medio orgánico es la reacción que más se ha utilizado [14,34-36], ya que es rápida, sencilla desde el punto de vista experimental y produce cantidades mínimas de subproductos de reacción. Sin embargo, la elevada toxicidad del reactivo, así como su carácter explosivo y la necesidad de sintetizarlo *in situ* establecen la necesidad de buscar nuevas alternativas.

Como alternativa específica al diazometano se ha propuesto el uso de trimetilsilildiazometano [37-39], reactivo no explosivo y comercialmente disponible. Otros agentes alquilantes propuestos son los haluros de alquilo, tales como bromuro de bencilo [40,41] o bromuro de pentafluorobencilo [42,43], el hidróxido de trimetilsulfonio [44] o las sales de amonio cuaternarias [45]. En todos los casos la reacción tiene lugar en un medio aprótico, bien en medio orgánico o en el propio puerto de inyección, donde tiene lugar la descomposición del reactivo y la consiguiente alquilación del analito.

1.2.3. Reacciones de acilación de fenoles

Para el caso de los compuestos fenólicos, la reacción más ampliamente utilizada ha sido la de acilación, ya que se puede llevar a cabo *in situ* en

medio acuoso en pocos minutos, con un rendimiento alto y bajo coste de reactivos. Se han utilizado varios reactivos: cloruro de pentafluorobenzoílo (PFBCl) [46], utilizado específicamente cuando el objetivo es aumentar la sensibilidad al usar un detector de captura electrónica (*electron capture detector*, ECD), cloroformatos de alquilo [47,48] o anhídrido acético en medio básico (utilizando carbonato/hidrogenocarbonato potásico o, más recientemente, hidrogenofosfato sódico). Este último es el más utilizado, debido a la rapidez y la alta eficacia con la que transcurre la reacción, incluso a temperatura ambiente [49-51], y es el que se ha utilizado en esta memoria.

Los agentes acilantes pueden reaccionar con fenoles tanto en el anillo aromático (C acilación) como en el oxígeno del hidroxilo (O acilación).

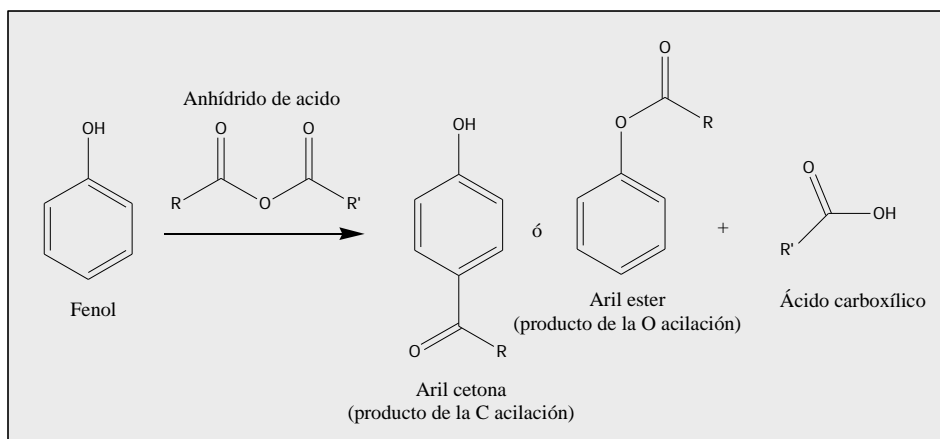


Figura 1: Reacción de acilación del fenol

La C acilación de fenoles se observa con un agente acilante en presencia de cloruro de aluminio (condiciones habituales de la reacción de Friedel-Crafts). Sin embargo, en ausencia de cloruro de aluminio ocurre la O acilación. La preferencia por la O acilación se produce porque estas reacciones están cinéticamente controladas. La O acilación es más rápida que la C acilación. Sin embargo, el isómero C acilo es más estable. Así, se observa la acilación de fenoles bajo las condiciones de Friedel-Crafts porque

la presencia de cloruro de aluminio provoca que la reacción esté sometida a un control termodinámico.

La reacción de acilación con los anhídridos de ácido supone la ruptura del enlace entre el oxígeno y uno de los grupos carbonilos del anhídrido. Un grupo acilo se transfiere al nucleófilo que ataca; el otro retiene su enlace simple al oxígeno y se convierte en el grupo acilo de un ácido carboxílico.

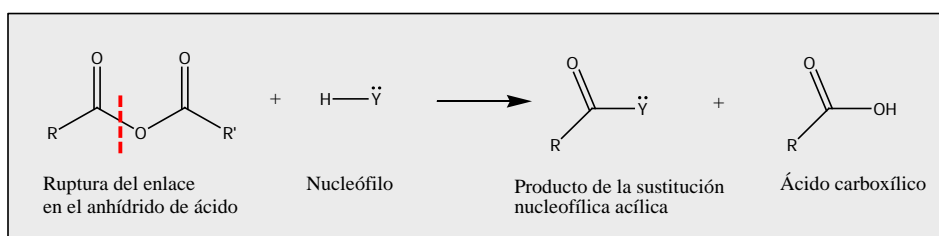


Figura 2: Ruptura de un anhídrido de ácido

La reacción de *O* acilación puede ser favorecida por dos caminos. Un método supone convertir el anhídrido de ácido en un agente de transferencia de acilo más efectivo por protonación de uno de sus oxígenos carboxílicos con la adición de unas pocas gotas de ácido sulfúrico. Otra alternativa es aumentar el carácter nucleófilo del fenol, convirtiéndolo en su anión fenóxido en disolución básica.

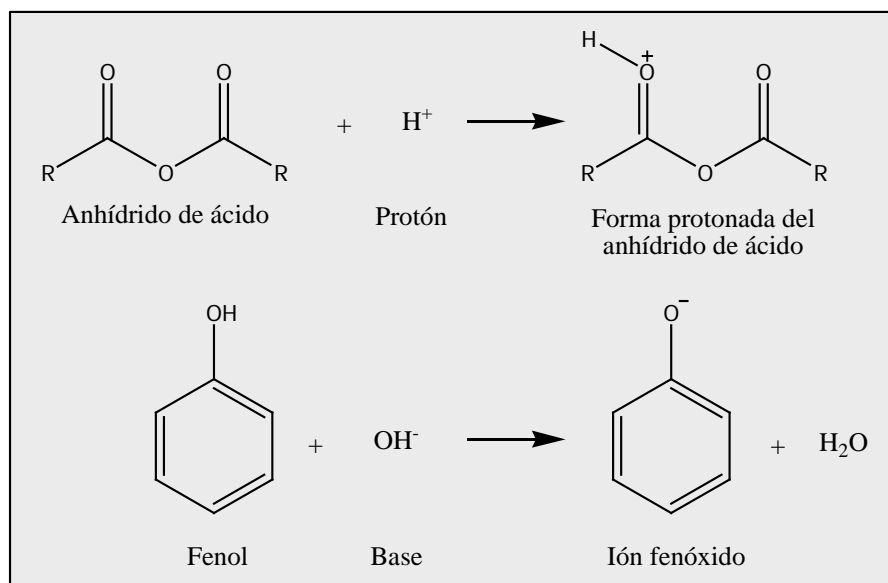


Figura 3: Posibilidades de favorecer la reacción

Los ésteres formados son moderadamente polares. Dado que carecen de grupos hidroxilo, las moléculas de éster no pueden formar enlaces por puentes de hidrógeno unos con otros; consecuentemente, los ésteres tienen puntos de ebullición menores que los alcoholes de peso molecular comparable. También son bastante estables en medio acuoso neutro, pero se rompen cuando se calientan en medios ácidos o básicos.

En la presente memoria se ha utilizado la reacción de formación de ésteres con anhídrido acético en medio acuoso básico para la determinación de clorofenoles en aguas, así como para la determinación de parabenos, triclosán y metil triclosán en muestras de aguas y suelos.

1.2.4. Formación de ésteres y amidas a partir de ácidos carboxílicos

Para el caso de los ácidos carboxílicos, existe la posibilidad de utilizar reacciones de esterificación o de formación de amidas con la utilización de agentes de condensación.

Un ácido carboxílico se convierte directamente a un éster al calentarlo con un alcohol en presencia de un ácido mineral. En la figura 4 se muestra el mecanismo de reacción. Como reactivos se han utilizado metanol en presencia de ácidos inorgánicos, tales como ácido sulfúrico, ácido clorhídrico ó trifluoruro de boro [19,52].

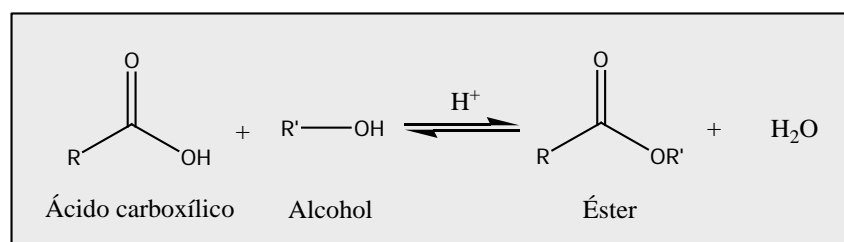


Figura 4: Reacción de esterificación de un ácido carboxílico con un alcohol en medio ácido

La reacción solo puede tener lugar si se desplaza el equilibrio hacia la derecha. Existen varias posibilidades, (1) añadir un exceso de alguno de los reactivos, normalmente el alcohol; (2) eliminar el éster o el agua por destilación; (3) eliminar el agua por destilación azeotrópica; (4) eliminar el agua utilizando agentes deshidratantes. La presencia de grupos voluminosos próximos al lugar de la reacción en el alcohol o en el ácido disminuye la velocidad de la esterificación. El impedimento estérico puede ser tan marcado que se necesitan métodos especiales para preparar ésteres de alcoholes terciarios.

La formación de amidas mediante la reacción de un ácido carboxílico y una amina con la utilización de carbodiimidas como agentes de condensación es una reacción que se ha utilizado frecuentemente, sobre todo para la formación de péptidos [53] y para la inmovilización de proteínas sobre electrodos o nanopartículas [54]. Como agentes de condensación se han utilizado *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) [55] y 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDC) [56,57], aunque el

segundo presenta la ventaja de ser soluble en agua, lo que permite llevar a cabo la reacción *in situ* en medio acuoso. Se han utilizado varios tipos de aminas, 2,2,2-trifluoroetilamina (TFEA) [56] cuando se utiliza un detector de captura electrónica, *N*-(1-naftil)etilendiamina (EDAN) [57] cuando se utiliza un detector fluorimétrico, etc.

En la figura 5 se muestra el mecanismo de la reacción cuando se utiliza EDC como agente de condensación y TFEA como amina. El ácido carboxílico reacciona con la carbodiimida para formar un intermedio de reacción más reactivo con un mejor grupo saliente.

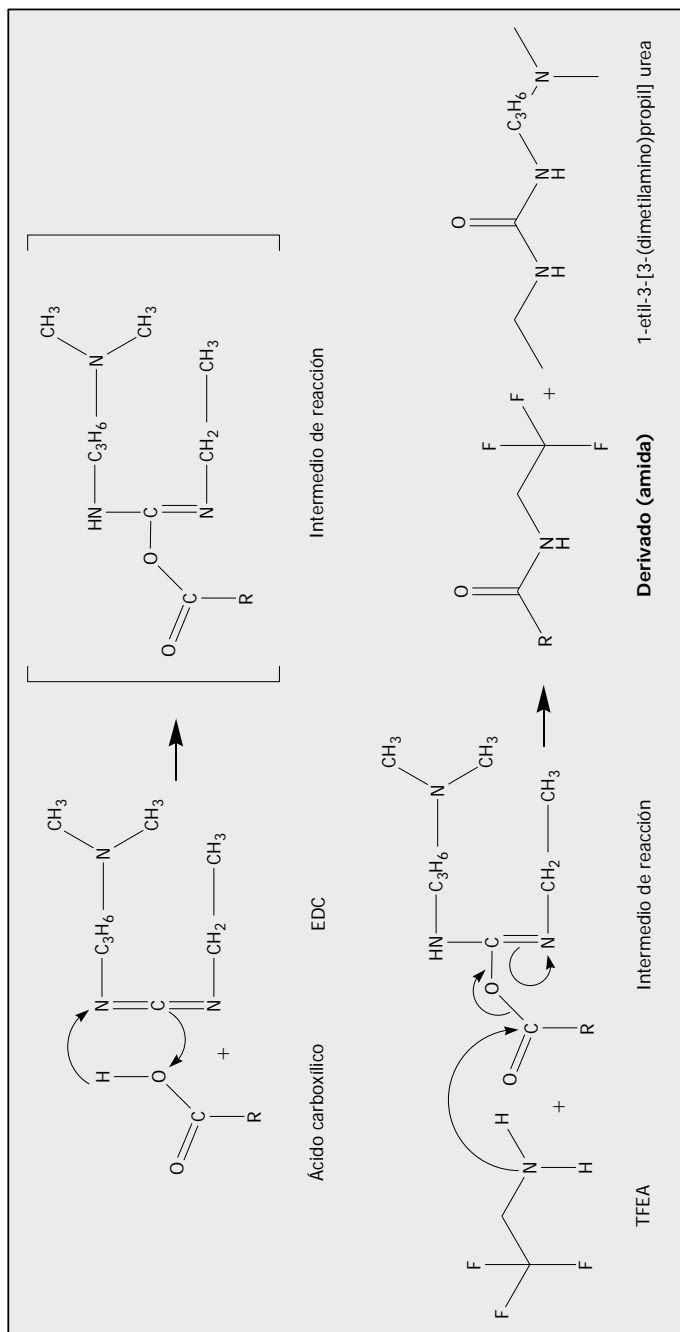


Figura 5: Mecanismo de la reacción entre un ácido carboxílico y una amina utilizando una carbodiimida como agente de condensación

En la presente memoria se propone la utilización de las reacciones anteriormente descritas para ácidos carboxílicos, más concretamente la esterificación en presencia de metanol y ácido sulfúrico, y la formación de una amida en presencia de EDC y TFEA, para la determinación de ibuprofeno en muestras acuosas.

Como ya se ha citado anteriormente, la metodología de trabajo que se propone es la utilización de generación de espacio de cabeza con una reacción de derivatización *in situ* utilizando el vial del generador de espacio de cabeza como reactor. En todas las aplicaciones propuestas se utiliza un inyector de temperatura programable (*programmed temperature vaporizer*, PTV) para la introducción de la muestra en el sistema cromatográfico.

1.3. 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. Sin embargo, implica elevada manipulación de la muestra, tiempos de análisis prolongados y utiliza grandes cantidades de disolventes orgánicos cuyo uso está cada vez más restringido. Por ello, en busca de nuevas alternativas que se ajusten más a los nuevos requerimientos medioambientales, se han desarrollado un conjunto de técnicas que minimizan los volúmenes de disolventes orgánicos utilizados.

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, etc.). 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. Por la solvatación de los iones con las moléculas de agua, se consigue la separación de las dos fases miscibles (acuosa/orgánica) [58]. 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) [59].

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 análisis instrumental [59]. Otra posibilidad es 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 (*multiresidue method*, MRM) que se desarrolló para el análisis de pesticidas en matrices alimentarias data de 1963 y es el denominado método Mills. La extracción de los compuestos se conseguía con acetonitrilo

(MeCN), y para lograr la separación de fases (acetonitrilo/agua) se utilizaron éter de petróleo y cloruro sódico [60].

También se desarrollaron métodos que utilizaban acetona, como disolvente de extracción, en lugar de acetonitrilo [61-63]. 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 [64]. Otros autores lograron esta separación de fases utilizando diferentes combinaciones de sales [65,66]. Sin embargo, todos estos procedimientos tienen diversos inconvenientes debido a que la acetona es en exceso 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 [67] 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 [68-72].

Otro disolvente que se ha utilizado en el análisis de pesticidas es el acetato de etilo (EtOAc) [73-77]. Éste tiene la ventaja de ser lo suficientemente miscible con el agua como para lograr una adecuada penetración en los tejidos vegetales [78] 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 [79,80].

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 [81]. 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 [82]. 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 [83].

En el año 2003, Anastassiades y Lehotay [79] 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 una 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 6 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.

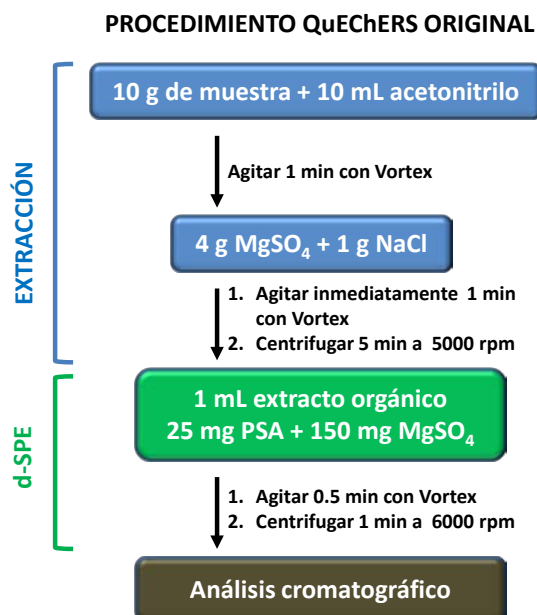


Figura 6: *Etapas del procedimiento QuEChERS original*

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 [84-87]. Otra variación que ha surgido es la adición de agua sobre muestras secas, con el fin de obtener la humedad adecuada [88-92]. 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 [85,93]. Por otro lado, el uso de negro de grafito ha demostrado su eficacia en la eliminación de clorofilas de los extractos [93]. También se han desarrollado algunas aplicaciones en las que

se utiliza el procedimiento de limpieza mediante SPE clásica, en cartuchos [94-96].

El método ha recibido gran aceptación a nivel mundial y ha sido validado en estudios interlaboratorios para numerosos pesticidas en diversas matrices de alimentos [97-108]. Recientemente, ha recibido la distinción de Método Oficial de la AOAC Internacional (*Association of Analytical Communities*) [109].

A pesar de que originalmente QuEChERS surgió como un método específico para el análisis de pesticidas en matrices alimentarias, su eficacia y flexibilidad lo han convertido en una potente herramienta, que ha sido utilizada para la determinación de otros compuestos en otro tipo de matrices, tales como la determinación de compuestos farmacéuticos [110-114], antibióticos β -lactámicos [115,116] o hidrocarburos aromáticos policíclicos (*polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAHs) [117] en muestras de tipo biológico.

Respecto a matrices de suelos, se ha utilizado recientemente para la determinación de pesticidas, insecticidas y fungicidas [118-122] así como fenoles y cresoles [123] en diferentes tipos de suelos.

En la presente memoria se recoge la puesta a punto de una versión simplificada del método QuEChERS, adaptada a muestras de suelos, para la extracción de hidrocarburos clorados y clorobenzenos de dichas matrices.

1.4. Extracción por adsorción con barra agitadora (SBSE)

Como ya se ha mencionado anteriormente, las nuevas tendencias dentro del campo de la Química Analítica están dirigidas a la simplificación y miniaturización del tratamiento de muestra, así como a la minimización del volumen de disolventes orgánicos y de cantidad de muestra.

A lo largo de los últimos años se han introducido nuevas técnicas de enriquecimiento de muestra sin la necesidad de utilización de disolventes, tales como microextracción en fase sólida (SPME) o extracción por adsorción en barra agitadora (SBSE) con desorción térmica. Utilizando estas técnicas, la extracción y preconcentración de las muestras se realiza en una sola etapa, reduciendo el tiempo de trabajo.

La extracción por adsorción en barra agitadora fue introducida en el año 1999 por Baltussen y colaboradores [124]. Esta técnica de extracción se basa en la partición de los analitos entre la muestra y una fase extractante. Cuanto mayor sea la afinidad del soluto por la fase extractante respecto a la muestra, mayor será el rendimiento de la extracción. La fase extractante más comúnmente utilizada ha sido el polidimetilsiloxano (PDMS). Este polímero se ha utilizado ampliamente como fase estacionaria en cromatografía de gases (GC) y se caracteriza por su estabilidad térmica, pudiéndose utilizar en un rango muy amplio de temperaturas (se comporta como líquido entre -20 y 320 °C).

Las barras agitadoras utilizadas para extraer los analitos (también denominadas *Twisters*®) consisten en un cuerpo magnético encapsulado en una funda de vidrio, en cuya superficie se coloca la capa de PDMS. Durante el proceso de extracción el *twister* se pone en contacto con los analitos, bien por inmersión en la propia muestra o bien en el modo de espacio de cabeza. En la figura 7 se muestran ambas posibilidades.

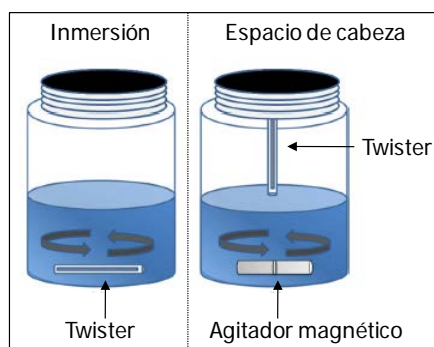


Figura 7: Modos de trabajo en SBSE

En el modo de inmersión (normalmente llamado simplemente SBSE) el *twister* se introduce en un vial en el que está contenida la muestra, la cual se agita bajo condiciones físicas y químicas controladas. Una vez que ha tenido lugar la extracción, se retira el *twister* de la muestra con ayuda de unas pinzas, se aclara con agua destilada para eliminar restos de otros componentes de la matriz, secándolo posteriormente con un papel libre de celulosa y se introduce en un tubo de desorción térmica donde tiene lugar el proceso de desorción. El proceso de aclarado es esencial cuando la desorción tiene lugar de forma térmica, para eliminar la formación de material no volátil que puede llegar a bloquear la unidad de desorción. El mayor número de aplicaciones de SBSE utilizan este modo de trabajo [125-130].

La utilización de la SBSE en el modo espacio de cabeza fue introducida por Bicchi y colaboradores [131] en el año 2002 y se conoce como extracción con sorbente en espacio de cabeza (*headspace sorption extraction*, HSSE). En HSSE el proceso de extracción tiene lugar colocando el *twister* sobre la muestra líquida o sólida, de tal manera que el polímero está en contacto estático con la fase vapor que se encuentra dentro del vial. Normalmente es necesaria la agitación de la muestra para favorecer el paso de los analitos a la fase gaseosa. Una vez que ha tenido lugar la extracción es recomendable

el aclarado del *twister* con agua destilada, así como su secado con papel. Trabajando en este modo se protege al polímero de la extracción de compuestos no volátiles y se aumenta el tiempo de vida del mismo. A pesar de la elevada selectividad de este modo de trabajo, no son muchos los trabajos que se pueden encontrar en bibliografía [132-134].

Una vez que ha tenido lugar el proceso de extracción, es necesario desorber los analitos para su introducción en el sistema cromatográfico. Existen dos posibilidades, la desorción térmica (*thermal desorption*, TD) o bien la desorción líquida (*liquid desorption*, LD) con disolventes orgánicos. La mayoría de las aplicaciones de SBSE o HSSE utilizan la desorción térmica, ya que implica la no utilización de disolventes orgánicos y la completa transferencia de los analitos extraídos al sistema cromatográfico. El proceso de desorción puede tener lugar en un rango de temperaturas de 150 a 300 °C. Sin embargo, la principal desventaja que presenta esta alternativa es la necesidad de un equipo específico acoplado al cromatógrafo de gases: un sistema de desorción térmica (TDS) o una unidad de desorción térmica (TDU). El *twister* se introduce en un tubo de vidrio específico para estos dispositivos, el cual se coloca en el horno del sistema, donde se produce la desorción. También existe la posibilidad de colocar varios *twisters* en un mismo tubo de desorción [135].

La desorción líquida (LD) se suele utilizar cuando no se dispone de un sistema de desorción térmica, cuando los compuestos estudiados son termolábiles [136] o el análisis se lleva a cabo mediante cromatografía líquida (LC) o electroforesis capilar (CE). En este modo de trabajo, el *twister* se introduce en el disolvente o mezcla de disolventes extractantes para la desorción química de los analitos retenidos. Los disolventes más comúnmente utilizados han sido el acetonitrilo (MeCN), metanol (MeOH), mezcla de estos o mezclas con agua o tampones [137-141], aunque también se han evaluado el isooctano [142] o el acetato de etilo [143]. La desorción líquida se ha combinado fundamentalmente con cromatografía líquida,

aunque también con cromatografía de gases. En este último caso, la forma habitual de trabajo es utilizar inyección de grandes volúmenes de muestra para introducir la mayor cantidad posible de disolvente orgánico en el sistema.

Las nuevas tendencias de trabajo con SBSE se enfocan en el desarrollo de nuevo instrumental y de nuevas fases de recubrimiento, ya que, actualmente, los únicos *twisters* comercialmente disponibles (Gerstel) utilizan PDMS. Aunque se ha demostrado que el PDMS ofrece buenos resultados, es necesario estudiar otro tipo de sorbentes que posibiliten la extracción de analitos más polares [144,145].

1.4.1. Fundamento teórico de la extracción por adsorción con barra agitadora

Los procesos de extracción por adsorción son procesos de equilibrio, y para el caso de muestras acuosas, la extracción de los solutos de la matriz a la fase extractante está controlada por el coeficiente de partición de los analitos entre el polímero (PDMS) y la fase acuosa. Muchos estudios han correlacionado este parámetro con el coeficiente octanol-agua ($K_{o/w}$) [146,147]. Aunque no es estrictamente correcto, el valor de $K_{o/w}$ puede dar una idea preliminar de si la extracción por SBSE va a tener lugar de forma adecuada.

El proceso de extracción también depende de la relación de fases y de la cantidad de PDMS utilizada. La relación se muestra en la ecuación:

$$K_{o/w} \approx K_{PDMS/W} = \frac{C_{PDMS}}{C_W} = \frac{m_{PDMS}}{m_W} \frac{V_W}{V_{PDMS}} = \frac{m_{PDMS}}{m_W} \beta \quad (13)$$

El coeficiente de distribución entre el PDMS y la fase acuosa ($K_{PDMS/W}$) se define como el cociente entre la concentración de soluto en la fase de polidimetilsiloxano (C_{PDMS}) y la concentración en la fase acuosa (C_W) una

vez que se ha alcanzado el equilibrio. Esta relación es igual al cociente entre la masa de analito en el PDMS (m_{PDMS}) y en la fase acuosa (m_W) multiplicado por la relación de fases (β),

$$\beta = \frac{V_W}{V_{PDMS}} \quad (14)$$

El rendimiento del proceso, expresado como la relación entre la masa de soluto extraído (m_{PDMS}) y la cantidad original de analito en la muestra acuosa ($m_0 = m_{PDMS} + m_W$), va a depender tanto del coeficiente de distribución como de la relación de fases, como puede observarse en la siguiente ecuación,

$$R = \frac{m_{PDMS}}{m_0} = \frac{K_{PDMS/W}}{K_{PDMS/W} + \beta} \quad (15)$$

Como ya se ha mencionado anteriormente, $K_{PDMS/W}$ puede equipararse al $K_{o/w}$ del compuesto. La eficacia de la extracción disminuirá a medida que aumenta la polaridad de los analitos. Respecto a la relación de fases, cuanto mayor sea la cantidad de PDMS contenida en los *twisters*, mayor será el rendimiento de la extracción.

En la figura 8 se muestra la influencia del $K_{o/w}$ y de la relación de fases en el rendimiento de la extracción. Se obtienen curvas en forma de S cuya posición va a depender del valor de β . Se comparan las curvas obtenidas con SBSE y con microextracción en fase sólida (SPME). Las dos técnicas se basan en los mismos principios, pero la principal diferencia radica en el volumen de PDMS utilizado. En la SPME, el volumen de PDMS es de aproximadamente 0.5 μ L. En el caso de la extracción por adsorción sobre barra agitadora, el volumen de PDMS es de unos 25 μ L (*twisters* de 1 cm de longitud y un espesor de película de 0.5 mm). Para un mismo volumen de muestra, los valores de β obtenidos son menores para SBSE ($\beta=200$) que para SPME ($\beta=10000$). Esto se traduce en que con la utilización de SBSE

pueden extraerse compuestos que en principio, por su polaridad, no podrían extraerse por SPME.

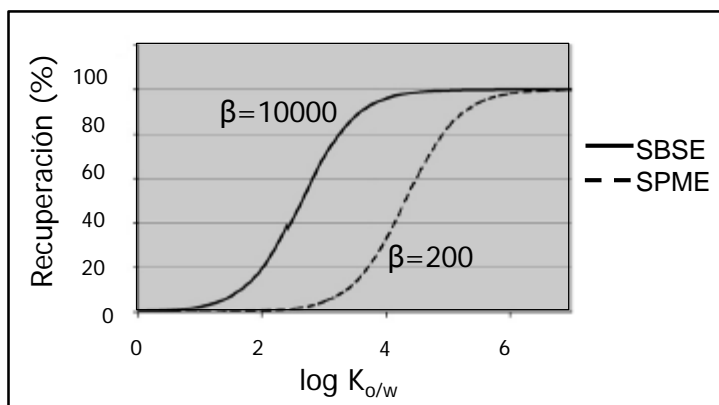


Figura 8: Curvas de recuperación en función de $K_{o/w}$ de los analitos. Los valores de β expresados son para un volumen constante de muestra (5 mL)

En la presente memoria se pondrá a punto un método para la determinación de parabenos, triclosán y metil triclosán en muestras de agua y suelos, con la utilización de la extracción por adsorción en barra agitadora en el modo de inmersión y una reacción de derivatización *in situ*, y posterior desorción térmica y análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas.

2. INYECCIÓN DE LAS MUESTRAS: INYECTOR DE TEMPERATURA PROGRAMADA (PTV)

En este apartado se detallarán los aspectos relacionados con la inyección de la muestra en el sistema cromatográfico. El inyector utilizado en todas 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 cuyas características más importantes se describirán en ese apartado. En la aplicación descrita para el análisis de contaminantes orgánicos en muestras acuosas y suelos por SBSE, el PTV se utilizó como sistema de focalización criogénica durante el proceso de desorción térmica.

El concepto de introducción de muestra a temperatura programada fue descrito por K. Abel en 1964 [148]. En 1979 Vogt y colaboradores presentaron por primera vez un sistema de inyección PTV [149,150].

A principios de los ochenta, los grupos de Poy [151] y Schomburg [152] exploraron las posibilidades de la inyección en frío y desarrollaron sistemas de inyección universales.

A partir de ese 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 [153].

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

2.1. Inyección de muestras líquidas

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 [154]. 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 [153,155,156]. 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 éstas 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 las mismas 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 [155,157].

El PTV consta de los mismos elementos que un inyector tradicional, pero está equipado de un sistema de enfriamiento y calentamiento muy eficiente (figura 9), 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*).

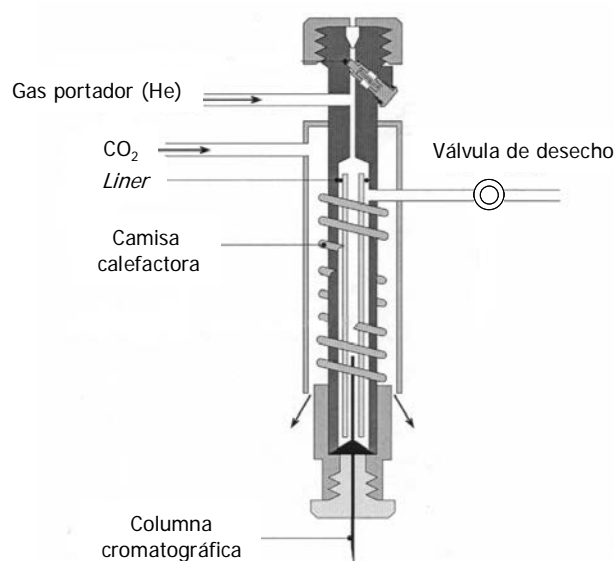


Figura 9: Inyector de temperatura programada (PTV)

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 [153,158].

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 [151,152,157,159], 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 [157,159].

La otra gran ventaja del inyector PTV cuando se trabaja en inyección de líquidos es la posibilidad de inyectar grandes volúmenes de muestra (*large volume injection, LVI*) [149,150]. Con este dispositivo es posible introducir en el sistema cromatográfico volúmenes de muestra superiores a 100 μL . Esto permite 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 . 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* [153].

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 *liners* con diferentes materiales de relleno. En los primeros estudios realizados por Herraiz [160] y colaboradores se utilizaron Tenax® y lana de vidrio. Más adelante se estudiaron otras alternativas como el politetrafluoroetileno y la poliiimida [161]. Hoy día existen *liners* empaquetados comercialmente disponibles con diferentes tipos de rellenos, tanto de sílice (lana de vidrio o lana de cuarzo) como polímeros orgánicos, como Tenax-TA®, polidimetilsiloxano, Carbotrap B y Carbotrap C. Sin embargo, en algunas ocasiones, estos rellenos pueden tener efectos negativos, tales como degradación de los compuestos, retención excesiva o irreversible de los analitos como consecuencia de su afinidad con el material de relleno, problemas de contaminación cruzada (*carry over*) y limitaciones en cuanto a la temperatura de trabajo [162]. Como alternativa también están disponibles *liners* vacíos con diferentes configuraciones: recto convencional, con configuración en zig-zag o recto con muesca, utilizándose fundamentalmente para el análisis de compuestos poco volátiles que no se eliminan al purgar el disolvente.

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 [157].

Las ventajas del PTV, junto a la disponibilidad comercial de este tipo de inyectores, 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. El número de publicaciones que utilizan esta metodología es muy elevado [153], aplicándose, entre otras, para la determinación de compuestos con actividad estrogénica [163], fenoles [164], compuestos polibromados [165], hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) [166,167], pentaclorobencil hidroxilamina [168] y pesticidas [169-171].

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 [32,33]. Además, permite la inyección directa de muestras acuosas mediante el uso de adsorbentes hidrofóbicos en el interior del *liner* [153].

2.2. Acoplamiento HS-PTV

En bibliografía 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 [172]. 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 [173].

Recientemente, la configuración HS-PTV-GC automatizada se ha utilizado para la determinación de monóxido de carbono en filetes de atún [174] y benceno, tolueno, etilbenceno y xileno en aceite de oliva [175]. Nuestro grupo de investigación ha adquirido una amplia experiencia en la utilización de este acoplamiento [176-182].

En relación con el acoplamiento HS dinámico con un PTV, el número de publicaciones que se han encontrado tampoco es muy elevado. Esta configuración se ha utilizado para la determinación de compuestos organoestánicos [183] y compuestos halogenados volátiles [184] en muestras acuosas.

Uno de los objetivos de esta memoria es el de estudiar las posibilidades del acoplamiento SHS-PTV con la utilización de reacciones de derivatización *in situ* en el propio vial del HS. En este trabajo, el acoplamiento de ambos módulos se realizó, bien mediante una línea de transferencia inerte termostatada o mediante la inyección automática del espacio de cabeza en el PTV mediante una jeringa.

El control programado de la temperatura permite seleccionar la temperatura del inyector durante el tiempo en el 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.

La primera etapa es común en ambas modalidades de introducción de muestra. La muestra procedente del espacio de cabeza es conducida hasta el PTV. Sin embargo, 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, 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, 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, donde 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.

En cada una de estas dos modalidades es posible seleccionar diferentes modos de inyección. En los apartados que siguen se describirán las principales características de los modos de inyección permitidos por el PTV.

2.3. 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.

2.3.1. Inyección *split* y *splitless*

En el modo de 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 [185]. La relación de división suele oscilar de 1:10 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.

En el modo de 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*.

2.3.2. Inyección *solvent-vent*

Esta técnica combina la inyección en frío con la vaporización controlada del disolvente y es la que se ha aplicado en todas las metodologías propuestas en esta memoria. El *liner* se encuentra a baja temperatura durante el proceso de transferencia de la muestra desde el HS al PTV, mientras que la válvula de desecho permanece abierta. De este modo, el conjunto de compuestos más volátiles que los analitos de interés y el disolvente que también forman parte de la fase gaseosa se purga a través de dicha válvula mientras que los analitos 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 10).

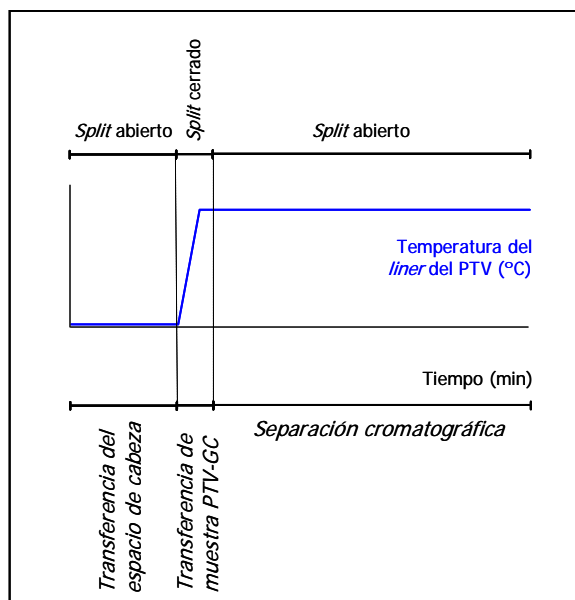


Figura 10: Inyección solvent-vent

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 [170].

Sin embargo, 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 [176-178].

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 [176-179].

3. BIBLIOGRAFÍA

- [1] B. Kolb, L. S. Ettre, *Static Headspace-Gas Chromatography*, Wiley Interscience, 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. Zhao, W. Lao, X. Xu, *Talanta* 62 (2004) 751.
- [6] N. Vora-adisak, P. Varanusupakul, *J. Chromatogr. A* 1121 (2006) 236.
- [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. Godula, K. Mastovská, *J. Chromatogr. A* 937 (2001) 73.
- [13] B. Kolahgar, E. Pfannkock, *Technical Note 36*, Gerstel, Mülheim/Ruhr.
- [14] R.J. Wells, *J. Chromatogr. A* 843 (1999) 1.
- [15] M. Saraji, M. Bakhshi, *J. Chromatogr. A* 1098 (2005) 30.
- [16] S.L. Rice, S. Mitra, *Anal. Chim. Acta* 589 (2007) 125.
- [17] N. S. Ávila, F.P. Capote, M.D. Luque de Castro, *J. Chromatogr. A* 1165 (2007) 158.
- [18] Á. Sebók, A. Vasánits-Zsigrai, Gy. Palkó, Gy. Zárny, I. Molnár-Perl, *Talanta* 76 (2008) 642.
- [19] E.M. Antolín, D.M. Delange, V.G. Canavaciolo, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 194.
- [20] A. Togola, H. Budzinski, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 627.
- [21] L.K. Ng, P. Lafontaine, J. Harnois, *J. Chromatogr. A* 873 (2000) 29.
- [22] T. Heberer, H.J. Stan, *Anal. Chim. Acta* 341 (1997) 21.

-
- [23] R. Gibson, E. Becerril-Bravo, V. Silvia-Castro, B. Jiménez, J. Chromatogr. A 1169 (2007) 31.
- [24] T. Gunnar, K. Ariniemi, P. Lillsunde, J. Chromatogr. B 818 (2005) 175.
- [25] J.B. Quintana, R. Rodil, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, J. Chromatogr. A 1174 (2007) 27.
- [26] C.D. Stalikas, Y.C. Fiamegos, TrAC 27 (2008) 533.
- [27] C. Pizarro, N. Pérez-del-Notario, J.M. González-Sáiz, J. Chromatogr. A 1143 (2007) 26.
- [28] I. Rodriguez, J. Carpinteiro, J.B. Quintana, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, J. Chromatogr. A 1024 (2004) 1.
- [29] M. Saraji, S. Mirmahdieh, J. Sep. Sci 32 (2009) 988.
- [30] C. Basheer, A. Jayaraman, M. K. Kee, S. Valiyaveettil, H. K. Lee, J. Chromatogr. A 1100 (2005) 137.
- [31] M. Kawaguchi, N. Sakui, N. Okanouchi, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa, J. Chromatogr. A 1062 (2005) 23.
- [32] C. Basheer, H. K. Lee, J. Chromatogr. A 1057 (2004) 163.
- [33] F. Jaber, C. Schummer, J.A. Chami, P. Mirabel, M. Millet, Anal. Bioanal. Chem. 387 (2007) 2527.
- [34] N. Neeman, M.C. Caserio, J.D. Roberts, W.S. Johnson, Tetrahedron 6 (1959) 36.
- [35] S. Öllers, H.P. Singer, P. Fässler, S.R. Müller, J. Chromatogr. A 911 (2001) 225.
- [36] T.A. Ternes, M. Stumpf, B. Schuppert, K. Haberer, Wasser 90 (1998) 295.
- [37] D.A. Rimmer, P.D. Johnson, R.H. Brown, J. Chromatogr. A 755 (1996) 245.
- [38] P.D. Johnson, D.A. Rimmer, R.H. Brown, J. Chromatogr. A 765 (1997) 3.
- [39] T.J. van 't Erve, R.H. Rautiainen, L.W. Robertson, G. Luthe, Environ. Int. 36 (2010) 835.

-
- [40] T. Nilsson, D. Baglio, I. Galdo-Miguez, J. O. Madsen, S. Facchetti, J. Chromatogr. A 826 (1998) 211.
- [41] G. Wittmann, H. Van Langenhove, J. Dewulf, J. Chromatogr. A 874 (2000) 225.
- [42] V. Koutsouba, T. Heberer, B. Fuhrmann, K. Schmidt-Baumler, D. Tsipi, A. Hiskia, Chemosphere 51 (2003) 69.
- [43] C.L. Gabelish, P. Crisp, R.P. Schneider, J. Chromatogr. A 749 (1996) 165.
- [44] A. Geibler, H.F. Schöler, Wat. Res. 28 (1994) 2047.
- [45] M. Amijee, J. Cheung, R.J. Wells, J. Chromatogr. A 738 (1996) 43.
- [46] F. Bianchi, M. Careri, C. Mucchino, M. Musci, Chromatographia 55 (2002) 595.
- [47] V. Maurino, C. Minero, E. Pelizzetti, S. Angelino, M. Vincenti, J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 10 (1999) 1328.
- [48] M. Vincenti, S. Biazzi, N. Ghiglione, M.C. Valsania, S.D. Richardson, J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 16 (2005) 803.
- [49] M. Llompart, M. Lourido, P. Landín, C. García-Jares, R. Cela, J. Chromatogr. A 963 (2002) 137.
- [50] I. Turnes, I. Rodríguez, C.M. García, R. Cela, J. Chromatogr. A 743 (1996) 283.
- [51] J. Regueiro, E. Becerril, C. García-Jares, M. Llompart, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 4693.
- [52] S.S. Verenitch, C.J. Lowe, A. Mazumder, J. Chromatogr. A 1116 (2006) 193.
- [53] S.Y. Han, Y.A. Kim, Tetrahedron 60 (2004) 2447.
- [54] B. Teste, J. Vial, S. Descroix, T. Georgelin, J.M. Siaugue, J. Petr, A. Varenne, M.C. Hennion, Talanta 81 (2010) 1703.
- [55] M. Kibler, K. Bächmann, J. Chromatogr. A 836 (1999) 325.
- [56] Q. L. Ford, J.M. Burns, J.L. Ferry, J. Chromatogr. A 1145 (2007) 241.
- [57] F. Robert-Peillard, E. Palacio-Barco, Y. Dudal, B. Coulomb, J.L. Boudenne, Anal. Chem. 81 (2009) 3063.

-
- [58] G.B. Frankforter, L. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.* 36 (1914) 1103.
- [59] R.E. Majors, LCGC North America, Jul 1 (2009).
- [60] P.A. Mills, J.H. Orley, R.A. Gaither, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 46 (1963) 186.
- [61] G. Becker, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 67 (1971) 125.
- [62] M. Luke, J.E. Froberg, H.T. Masumoto, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 58 (1975) 1020.
- [63] W. Specht, M. Tilkes, *Fresenius J. Anal. Chem.* 301 (1980) 300.
- [64] M. Luke, I. Cassias, S. Yee, *Lab. Inform. Bull.* N° 4178, Office of Regulatory Affairs, U.S. Food and Drug Administration, 1999, Rockville, MD.
- [65] F.J. Schenck, P. Callery, P.M. Gannett, J.R. Daft, S.J. Lehotay, *J. AOAC Int.* 85 (2002) 1177.
- [66] C.H. Parfitt, *Lab. Inform. Bull.* N° 3616, Office of Regulatory Affairs, U.S. Food and Drug Administration, 1991, Rockville, MD.
- [67] S.M. Lee, M.L. Papatkakis, H.C. Feng, G.F. Hunter, J.E. Carr, *Fresenius J. Anal. Chem.* 339 (1991) 376.
- [68] W. Liao, T. Joe, W.G. Cusick, *J. AOAC Int.* 74 (1991) 554.
- [69] J. Fillion, R. Hindle, M. Lacroix, J. Selwyn, *J. AOAC Int.* 78 (1995) 1352.
- [70] J. Cook, M.P. Beckett, B. Reliford, W. Hammock, M. Engel, *J. AOAC Int.* 82 (1999) 1419.
- [71] R.S. Sheridan, J.R. Meola, *J. AOAC Int.* 82 (1999) 982.
- [72] S.J. Lehotay, A.R. Lightfield, J.A. Harman-Fetcho, D.A. Donoghue, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4589.
- [73] W. Krigsmann, G.C. Van de Kamp, *J. Chromatogr.* 177 (1968) 482.
- [74] A. Andersson, H. Palsheden, *Fresenius J. Anal. Chem.* 339 (1991) 365.
- [75] D.M. Holstege, D.L. Scharberg, E.R. Tor, L.C. Hart, F.D. Galey, *J. AOAC Int.* 77 (1994) 1263.
- [76] A.R. Fernández-Alba, A. Valverde, A. Agüera, M. Contreras, *J. Chromatogr.* 686 (1993) 263.

- [77] K. Banerjee, D.P. Oulkar, S. Dasgupta, S.B. Patil, S.H. Patil, R. Savant, P.G. Adsule, *J. Chromatogr. A* 1173 (2007) 98.
- [78] A. Hercegová, M. Dömötöróvá, E. Matisová, *J. Chromatogr. A* 1153 (2007) 54.
- [79] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412.
- [80] K. Mastovská, S.J. Lehotay, *J. Chromatogr. A* 1040 (2004) 259.
- [81] C.E. Matkovich, G.D. Christian, *Anal. Chem.* 45 (1973) 1915.
- [82] D.C. Leggett, T.F. Jenkins, P.H. Miyares, *Anal. Chem.* 62 (1990) 1355.
- [83] USEPA Method 8330B, nitroaromatics, nitroamines 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>
- [84] S.J. Lehotay, A. de Kok, M. Hiemstra, P. Van Bodegraven, *J. AOAC Int.* 88 (2005) 595.
- [85] S.J. Lehotay, K. Mastovská, S.J. Yun, *J. AOAC Int.* 88 (2005) 630.
- [86] S. J. Lehotay, K. A. Son, H. Kwon, U. Koesukwiwat, W. Fu, K. Mastovska, E. Hoh, N. Leepipatpiboon, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2548.
- [87] S.J. Lehotay, K. Mastovská, A.R. Lightfield, *J. AOAC Int.* 88 (2005) 615.
- [88] C. Díez, W.A. Traag, P. Zommer, P. Marinero, J. Atienza, *J. Chromatogr. A* 1131 (2006) 11.
- [89] 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.
- [90] U. Koesukwiwat, K. Sanguankaew, N. Leepipatpiboon, *Anal. Chim. Acta* 626 (2008) 10.
- [91] P. Payá, M. Anastassiades, D. Mack, I. Sigalova, B. Tasdelen, J. Oliva, A. Barba, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 1697.

-
- [92] T.D. Nguyen, B.S. Lee, B.R. Lee, D.M. Lee, G-H. Lee, *Rapid. Commun. Mass Sp.* 21 (2007) 3115.
- [93] www.quechers.com
- [94] F.J. Schenck, A.N. Brown, L.V. Podhorniak, A. Parker, M. Reliford, J.W. Wong, J. *AOAC Int.* 91 (2008) 422.
- [95] M.A. Aramendía, V. Borau, F. Lafont, A. Marinas, J.M. Marinas, J.M. Moreno, F.J. Urbano, *Food Chem.* 105 (2007) 855.
- [96] A. Garrido-Frenich, J.L. Martínez-Vidal, E. Pastor-Montoro, R. Romero-González, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 947.
- [97] F.J. Schenck, J.E. Hobbs, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 73 (2004) 24.
- [98] D.A. Lambropoulou, T.A. Albanis, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 1663.
- [99] K. Banerjee, D.P. Oulkar, S. Dasgupta, S.B. Patil, S.H. Patil, R. Savant, P.G. Adsule, *J. Chromatogr. A* 1173 (2007) 98.
- [100] C. Lesueur, P. Knittl, M. Gartner, A. Mentler, M. Fuerhacker, *Food Control* 19 (2008) 906.
- [101] J. Hernández-Borges, J. Cabrera-Cabrera, M.A. Rodríguez-Delgado, E.M. Hernández-Suárez, V. G. Saúco, *Food Chemistry* 113 (2009) 313.
- [102] C.C. Leandro, R.J. Fussell, B.J. Keely, *J. Chromatogr. A* 1085 (2005) 207.
- [103] C.C. Leandro, P. Hancock, R.J. Fussel, B.J. Keely, *J. Chromatogr. A* 1103 (2006) 94.
- [104] E. Cieřlik, A. Sadowska-Rociek, J. M. M. Ruiz, M. Surma-Zadora, *Food Chem.* 125 (2011) 773.
- [105] T. Cajka, J. Hajslova, O. Lacina, K. Mastovská, S.J. Lehotay, *J. Chromatogr. A* 1186 (2008) 281.
- [106] S.C. Cunha, J.O. Fernandes, A. Alves, M.B.P.P. Oliveira, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 119.
- [107] S.C. Cunha, S.J. Lehotay, K. Mastovská, J. O. Fernandes, M. Beatriz, P.P. Oliveira, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 620.

-
- [108] R. Romero-González, A. Garrido-Frenich, J.L. Martínez-Vidal, *Talanta* 76 (2008) 211.
- [109] S.J. Lehotay, *J. AOAC Int.* 90 (2007) 485.
- [110] F. Plössl, M. Giera, F. Bracher, *J. Chromatogr. A* 1135 (2006) 19.
- [111] A. Posyniak, J. Zmudzki, K. Mitrowska, *J. Chromatogr. A* 1087 (2005) 259.
- [112] M.M. Aguilera-Luiz, J. L. Martínez-Vidal, R. Romero-González, A. Garrido-Frenich, *J. Chromatogr. A* 1205 (2008) 10.
- [113] G. Stubbings, T. Bigwood, *Anal. Chim. Acta* 637 (2009) 68.
- [114] B. Kinsella, S.J. Lehotay, K. Mastovská, A.R. Lightfield, A. Furey, M. Danaher, *Anal. Chim. Acta* 637 (2009) 196.
- [115] C.K. Fagerquist, A.R. Lightfield, S.J. Lehotay, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1473.
- [116] K. Mastovská, A.R. Lightfield, *J. Chromatogr. A* 1202 (2008) 118.
- [117] M.J. Ramalhosa, P. Paíga, S. Morais, C. Delerue-Matos, M.B.P.P. Oliveira, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 3529.
- [118] C. Lesueur, M. Gartner, A. Mentler, M. Fuerhacker, *Talanta* 75 (2008) 284.
- [119] L. Chen, X-S Li, Z-Q Wang, C-P Pan, R-C Jin, *Ecotox. Environ. Safe.* 73 (2010) 73.
- [120] D. Drożdżyński, J. Kowalska, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 2241.
- [121] A. Rashid, S. Nawaz, H. Barker, I. Ahmad, M. Ashraf, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2933.
- [122] M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, L.M. Ravelo-Pérez, M.A. Rodríguez-Delgado, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 2307.
- [123] J.A. Padilla-Sánchez, P. Plaza-Bolaños, R. Romero-González, A. Garrido-Frenich, J.L. Martínez-Vidal, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 5724.
- [124] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, *J. Microcolumn. Sep.* 11 (1999) 737.

-
- [125] M. Kawaguchi, R. Ito, N. Sakui, N. Okanouchi, K. Saito, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. A* 1105 (2006) 140.
- [126] C. Huertas, J. Morrillo, J. Usero, I. Gracia-Manarillo, *Talanta* 72 (2007) 1149.
- [127] A.R.M. Silva, F.C.M. Portugal, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. A* 1209 (2008) 10.
- [128] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1303.
- [129] G. Roy, R. Vuillemin, J. Guyomarch, *Talanta* 66 (2005) 540.
- [130] A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L.A. Fernández, N. Etxebarria, O. Zuloaga, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2642.
- [131] C. Bicchi, C. Iori, P. Rubiolo, P. Sandra, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 449.
- [132] A. Prieto, O. Zuloaga, A. Usobiaga, N. Etxebarria, L.A. Fernández, C. Marcic, A. de Diego, *J. Chromatogr. A* 1185 (2008) 130.
- [133] S. Nakamura, S. Daishima, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 99.
- [134] C. Bicchi, C. Cordero, E. Liberto, P. Rubiolo, B. Sgorbini, F. David, P. Sandra, *J. Chromatogr. A* 1094 (2005) 9.
- [135] M. Kawaguchi, Y. Ishii, N. Sakui, N. Okanouchi, R. Ito, K. Inoue, K. Saito, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. A* 1049 (2004) 1.
- [136] E. Baltussen, C.A. Cramers, P. Sandra, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 3.
- [137] L.P. Melo, A.M. Nogueira, F.M. Lancas, M.E.C. Queiroz, *Anal. Chim. Acta* 633 (2009) 57.
- [138] F.C.M. Portugal, M.L. Pinto, J.M.F. Nogueira, *Talanta* 77 (2008) 765.
- [139] R.H.C. Queiroz, C. Bertucci, W.R. Malfará, S.A.C. Dreossi, A.R. Chaves, D.A.R. Valério, M.E.C. Queiroz, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 428.
- [140] P. Serôdio, M.S. Cabral, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. A* 1141 (2007) 259.

-
- [141] L. Brossa, R.M. Marce, F. Borrull, E. Pocurull, *Chromatographia* 61 (2005) 61.
- [142] P. Seriodo, J.M.F. Nogueira, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1141.
- [143] J.B. Quintana, R. Rodil, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahia, D. Prada-Rodriguez, *J. Chromatogr. A* 1174 (2007) 27.
- [144] J.P. Lambert, W.M. Mullett, E. Kwong, D. Lubda, *J. Chromatogr. A* 1075 (2005) 43.
- [145] W. Liu, H. Wang, Y. Guan, *J. Chromatogr. A* 1045 (2004) 15.
- [146] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, H.G. Janssen, C. Cramers, *Anal. Chem.* 71 (1999) 5213.
- [147] A. Pasche, P. Popp, in: J. Pawliszyn (Ed.), *Applications of Solid Phase Microextraction*, RSC Chromatography Monographs, in: R.M. Smith (Series Ed.), Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999, pp. 140-155.
- [148] K. Abel, *J. Chromatogr.* 13 (1964) 14.
- [149] W. Vogt, K. Jacob, H. W. Obwexer, *J. Chromatogr.* 174 (1979) 437.
- [150] W. Vogt, K. Jacob, A-B. Ohnesorge, H. W. Obwexer, *J. Chromatogr.* 186 (1979) 197.
- [151] F. Poy, S. Visani, F. Terrosi, *J. Chromatogr.* 217 (1981) 81.
- [152] G. Schomburg, H. Husmann, H. Behlau, F. Schulz, *J. Chromatogr.* 279 (1983) 251.
- [153] W. Engewald, J. Teske, J. Efer, *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 259.
- [154] K. Grob, in: *On-Column Injection in Capillary Gas Chromatography*, Heidelberg, Germany, 1987.
- [155] J. Teske, W. Engewald, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 584.
- [156] H. J. Stan, H. M. Müller, *J. High Resolut. Chromatogr.* 11 (1988) 140.
- [157] Sistema de inyección refrigerado CIS4, manual de usuario, Ver. Española 1.0, Andaluza de Instrumentación, Sevilla, España, 2000.
- [158] J. Zrostlíková, J. Hajslová, M. Godula, K. Mastovská, *J. Chromatogr. A* 937 (2001) 73.

-
- [159] H.M. Müller, H.J. Stan, J. High Resolut. Chromatogr. 13 (1990) 759.
- [160] M. Herraiz, G. Reglero, E. Loyola, T. Herraiz, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun. 10 (1987) 598.
- [161] 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.
- [162] E. Hoh, K. Mastovska, J. Chromatogr. A 1186 (2008) 2.
- [163] A. Vallejo, L.A. Fernández, M. Olivares, A. Prieto, N. Etxebarria, A. Usobiaga, O. Zuloaga, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 8327.
- [164] A. Vermeulen, K. Welvaert, J. Vercammen, J. Chromatogr. A 1071 (2005) 41.
- [165] A. Covaci, J. de Boer, J. J. Ryan, S. Voorspoels, P. Schepens, Anal. Chem. 74 (2002) 790.
- [166] V. Yusà, G. Quintas, O. Pardo, A. Pastor, M. de la Guardia, Talanta 69 (2006) 807.
- [167] B.S. Crimmins, J. E. Baker, Atmos. Environ. 40 (2006) 6764.
- [168] V. Ferreira, L. Culleré, N. Loscos, J. Cacho, J. Chromatogr. A 1122 (2006) 255.
- [169] R.M. Toledano, J.M. Cortés, J.C. Andini, J. Villén, A. Vázquez, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 4738.
- [170] M. Hada, M. Takino, T. Yamagami, S. Daishima, K. Yamaguchi, J. Chromatogr. A 874 (2000) 81.
- [171] D. Stajnbaher, L. Zupancic-Kralj, J. Chromatogr. A 1190 (2008) 316.
- [172] A.C. Heiden, B. Kolahgar, E. Pfannkoch, AppNote 7/2001, Gerstel, Mülheim/Ruhr.
- [173] J. Efer, S. Müller, W. Engewald, Th. Knobloch, K. Levsen, Chromatographia 37 (1993) 361.
- [174] G. Bartolucci, E. Droghetti, C. Focardi, M. Bambagiotti-Alberti, M. Nocentini, G. Smulevich, J. Mass Spectrom. 45 (2010) 1041.
- [175] B. Gilbert-López, J. Robles-Molina, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, Talanta 83 (2010) 391.

-
- [176] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1175 (2007) 106.
- [177] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández Laespada, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1141 (2007) 123.
- [178] J.L. Pérez Pavón, S. Herrero Martín, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1194 (2008) 103.
- [179] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, Anal. Bioanal. Chem. 394 (2009) 1463.
- [180] J.L. Pérez Pavón, S. Herrero Martín, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 6063.
- [181] M. del Nogal, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Anal. Bioanal. Chem. 397 (2010) 2579.
- [182] M. del Nogal, P. Glanzer, J.L. Pérez Pavón, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, Anal. Bioanal. Chem. 398 (2010) 3215.
- [183] R. Eiden, H.F. Schöller, M. Gastner, J. Chromatogr. A 809 (1998) 151.
- [184] N.R. Auer, B.U. Manzke, D.E. Schulz-Bull, J. Chromatogr. A 1131 (2006) 24.
- [185] D.C. Harris, Análisis Químico Cuantitativo 2ª edición, 2001, Editorial Reverté S.A., Barcelona.



III

CONFIGURACIÓN INSTRUMENTAL

En el desarrollo de los diferentes métodos analíticos que se han optimizado en este trabajo se han utilizado tres configuraciones instrumentales: (1) un cromatógrafo de gases (GC) equipado con un inyector de temperatura programada (PTV) 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 equipado con un inyector de temperatura programada acoplado con un sistema de desorción térmica (TDS) y con un detector de masas de tipo cuadrupolo (q-MS).

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

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, rango de trabajo -10 a 260 °C) 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).

En una de las aplicaciones descritas en la memoria, el horno convencional de este 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 alcanzada 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 1 se muestran las fotografías de una columna sin la carcasa protectora (a) y con la carcasa (b).

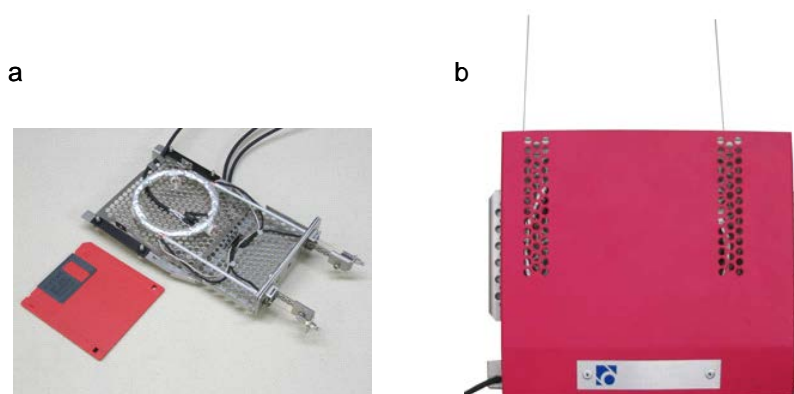


Figura 1: Columna empaquetada sin carcasa (a) y con carcasa (b)

1.2. Inyector de temperatura programada

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

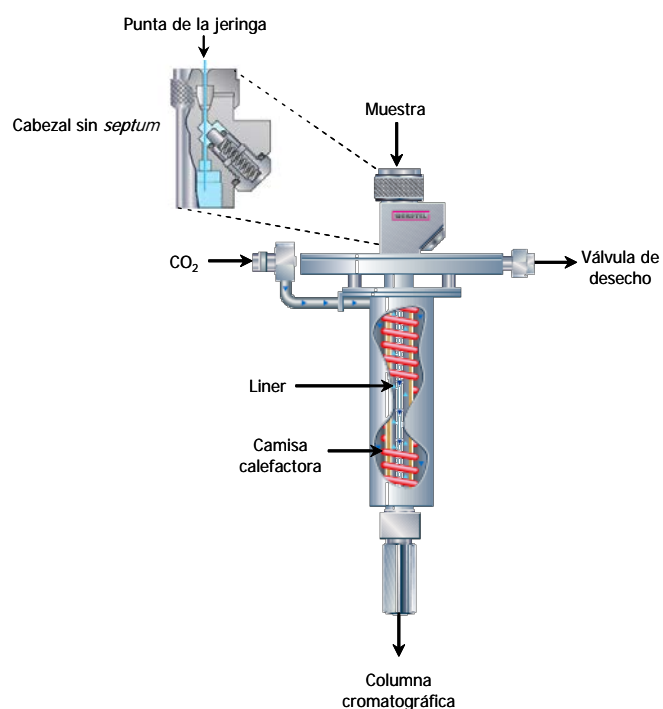


Figura 2: Inyector PTV CIS 4 de Gerstel

El cabezal del inyector utilizado no tiene *septum*, sino 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 CO_2 líquido, que permite alcanzar la temperatura de $-78\text{ }^\circ\text{C}$. 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 para ser utilizados con este inyector, 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 o polidimetilsiloxano). Todos ellos tienen unas dimensiones de 71 mm x 2.0 mm.

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 introducción 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 tiempo de análisis entre ellas se reduzca considerablemente.

Este 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 termostataada. 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.

1.4.2. Auto-muestreador CombiPAL

Otro dispositivo para la introducción de muestras que se ha acoplado 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, cuya temperatura puede programarse de 35 °C a 200 °C. Este horno permite la agitación orbital de las muestras en un intervalo de velocidades de 250 a 750 rpm.

El módulo de inyección de espacio de cabeza permite utilizar jeringas de diferentes tamaños (desde 1.0 mL hasta 5.0 mL) y tiene la posibilidad de seleccionar diferentes velocidades de inyección de muestra (desde 0.01 $\mu\text{L/s}$ hasta 250 $\mu\text{L/s}$). La temperatura de la jeringa puede ser programada en un intervalo de 35 °C a 150 °C. Una vez que la inyección de la muestra tiene lugar, la jeringa se limpia con un flujo de helio durante un tiempo predeterminado.

1.5. Esquema de la configuración instrumental

En la figura 3 se muestra la configuración instrumental formada por el acoplamiento del generador de espacio de cabeza estático con el inyector de temperatura programada, el cromatógrafo de gases y el espectrómetro de masas.

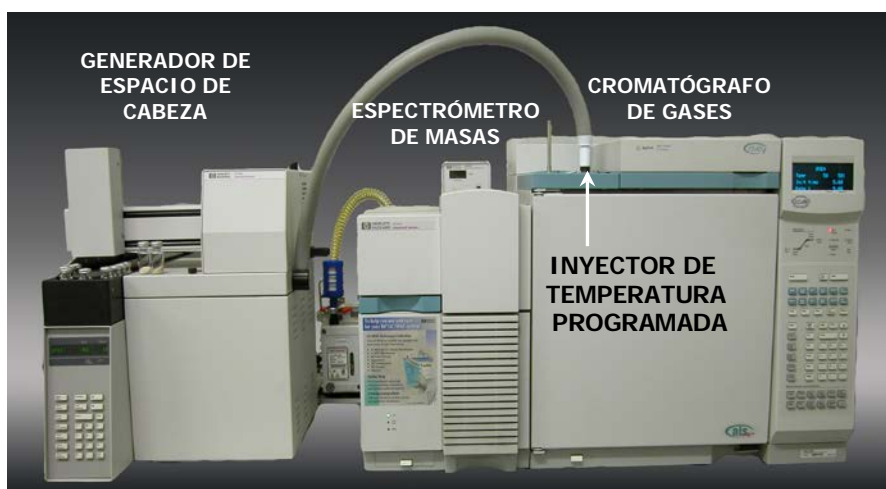


Figura 3: Configuración instrumental HS-PTV-GC-MS

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.

Esta configuración instrumental se ha utilizado en la aplicación optimizada para la determinación de clorofenoles en muestras acuosas. Las condiciones experimentales de cada uno de los módulos se especificarán en dicho capítulo.

En la figura 4 se muestra una imagen de la configuración instrumental con el MACH™ montado en la parte exterior de la puerta del cromatógrafo.



Figura 4: Configuración instrumental HS-PTV-GC-MS con MACH™

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

Esta configuración instrumental se ha utilizado en el desarrollo de la aplicación descrita para la determinación de ibuprofeno en muestras acuosas utilizando como agente de derivatización metanol en medio ácido.

Por último, en la figura 5 se muestra la imagen de la configuración instrumental CombiPAL-GC-PTV-MS.

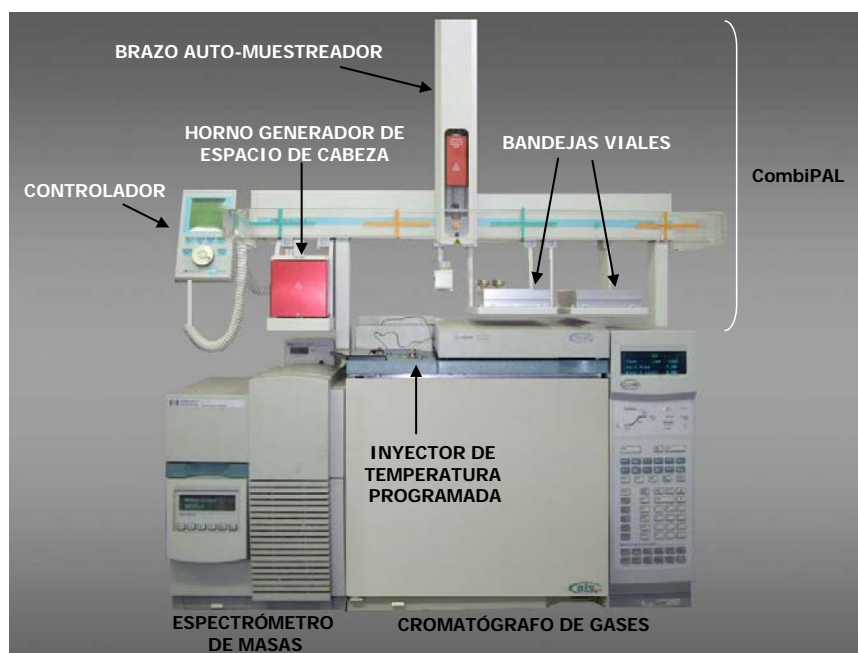


Figura 5: Configuración instrumental CombiPAL-PTV-GC-MS

La programación del CombiPAL se hace desde un controlador independiente propio, en el que se 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.

Este auto-muestreador se ha utilizado en el desarrollo de la aplicación descrita en la determinación de ibuprofeno en muestras acuosas con una reacción de derivatización en medio acuoso utilizando una carbodiimida como agente de condensación. Se utilizó operando con el módulo de inyección de espacio de cabeza.

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 un detector ECD convencional. 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, cuyo tamaño puede variar desde 5 hasta 100 μ L. Para la jeringa de 10 μ L (la utilizada en la aplicación descrita en la presente memoria) es posible seleccionar tres velocidades para el émbolo de la jeringa: baja (5 μ L/s), alta (100 μ L/s) o variable (entre 0.03 y 100 μ L/s).

2.5. Esquema de la configuración instrumental

En la figura 6 se muestra una fotografía de esta configuración instrumental. Se ha utilizado en el desarrollo de las aplicaciones descritas en la determinación de compuestos volátiles halogenados en suelos utilizando como técnica de extracción una versión modificada del protocolo QuEChERS.

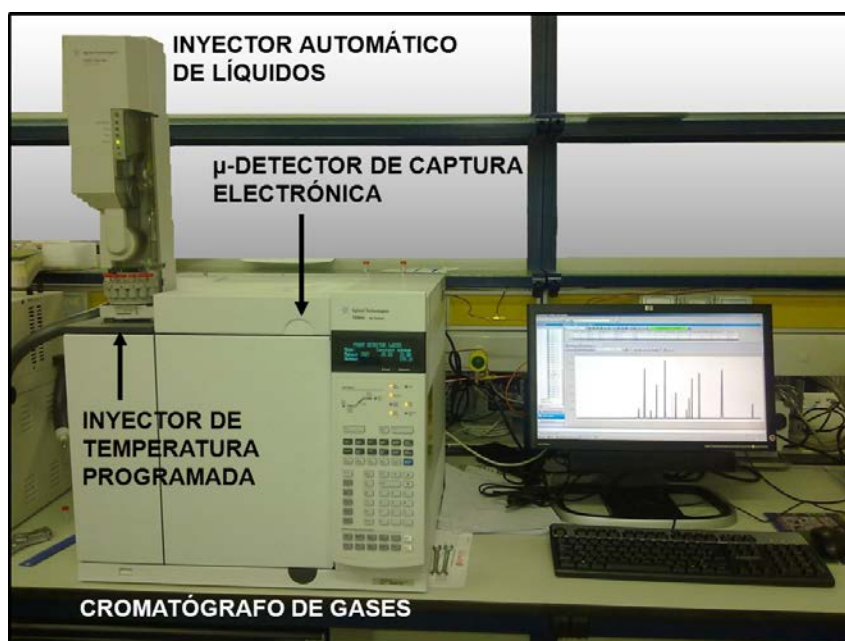


Figura 6: Configuración instrumental PTV-GC-ECD

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.

3. CROMATÓGRAFO DE GASES ACOPLADO A UN INYECTOR DE TEMPERATURA PROGRAMADA Y A UN SISTEMA DE DESORCIÓN TÉRMICA CON UN ESPECTRÓMETRO DE MASAS CUADRUPOLO

3.1. Cromatógrafo de gases

El modelo de cromatógrafo de gases es un Agilent 6890, equipado con una columna capilar HP-5MS (30 m x 250 μm x 0.25 μm) de Agilent Technologies (J&W Scientific Columns, Waldbronn, Alemania). Las rampas de temperatura permitidas son las mismas que las anteriormente especificadas para el mismo cromatógrafo, 70 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de 45 a 175 $^{\circ}\text{C}$, 45 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de 175 a 300 $^{\circ}\text{C}$ y 35 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de 300 a 450 $^{\circ}\text{C}$. El gas portador utilizado es helio N50 (99.999% puro; Air Liquid).

3.2. Inyector de temperatura programada

El PTV utilizado en esta configuración es un modelo de Gerstel (CIS-4; Gerstel, Linthicum, MD, USA). En la sección 1.2. se encuentran las especificaciones de este dispositivo.

3.3. Espectrómetro de masas

El espectrómetro de masas cuadrupolo es un HP 5973 N de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania). Las características del mismo se encuentran en el apartado 1.3.

3.4. Sistema de desorción térmica

Como sistema de inyección de muestras se utilizó un sistema de desorción térmica (TDS) de Gerstel (Mülheim an der Ruhr, Alemania). Este

módulo consta de una bandeja donde se pueden colocar hasta un total de 20 tubos, un horno de termodesorción y un capilar de transferencia unido al inyector de temperatura programada.

Esta unidad se utiliza para la desorción de los analitos de un sólido adsorbente (lana de vidrio, Tenax-TA, etc), de una barra agitadora (*Twister*), o bien directamente de una muestra sólida o muestra viscosa que se ha introducido previamente en un tubo de desorción térmica. Los tubos son introducidos en el horno por medio de un brazo automático y los analitos son sometidos a temperaturas y flujo de desorción elevados, de tal manera que son transferidos, a través de la línea de transferencia, al inyector de temperatura programada, que actúa como sistema de criofocalización. La rampa máxima permitida por el horno del TDS es de 12 °C/s hasta una temperatura máxima de 400 °C. De la misma manera, la temperatura máxima permitida por la línea de transferencia es de 350 °C. Una vez que ha finalizado la desorción de los analitos, el PTV se calienta rápidamente y comienza la transferencia de los analitos a la columna cromatográfica. En la figura 7 se muestra de forma más detallada esta configuración.

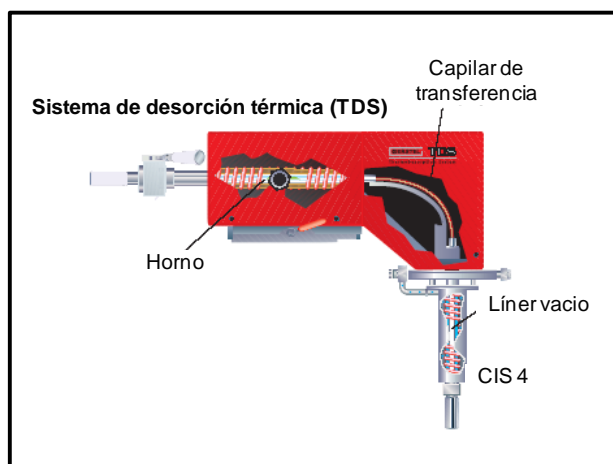


Figura 7: Configuración del horno del sistema de desorción térmica

3.5. Esquema de la configuración instrumental

En la figura 8 se muestra una fotografía del equipo instrumental utilizado.



Figura 8: Configuración instrumental TDS-PTV-GC-MS

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.

Esta configuración instrumental se ha utilizado para la determinación de parabenos, triclosán y metil triclosán en muestras acuosas y sólidas con la utilización de una derivatización *in situ* y posterior extracción de los analitos mediante adsorción en barra agitadora.

IV

**UTILIZACIÓN DE UN INYECTOR DE
TEMPERATURA PROGRAMADA Y DE UNA
REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN *IN SITU*
PARA EL AUMENTO DE LA SENSIBILIDAD EN
EL ANÁLISIS POR HS. DETERMINACIÓN DE
CLOROFENOLES EN MUESTRAS ACUOSAS**

1. INTRODUCCIÓN

La utilización de la generación de espacio de cabeza (HS) resuelve muchos problemas analíticos, minimizando la etapa de tratamiento de muestra. Sin embargo, en muchos casos, los límites de detección alcanzados son insuficientes para la detección y cuantificación de los analitos de interés [1]. Esto significa que, habitualmente, es necesaria la utilización de una etapa de preconcentración previa al análisis instrumental. Entre las técnicas utilizadas con este objetivo se incluyen la microextracción en fase sólida (SPME) y la microextracción en gota de disolvente, en la modalidad espacio de cabeza (HS-SDME). Ambas técnicas implican la transferencia de los analitos en una microfibra o en una microgota desde el generador de espacio de cabeza hasta el puerto de inyección del cromatógrafo [2].

La utilización de un inyector de temperatura programada (PTV) ofrece una alternativa para aumentar la sensibilidad cuando se trabaja con HS [3,4]. Durante el tiempo que dura la transferencia del espacio de cabeza al sistema cromatográfico, los analitos (diluidos en un volumen de 3 – 5 mL) son focalizados térmicamente en el *liner* del inyector. La posterior aplicación de una rampa de temperatura rápida permite la transferencia de los analitos a la columna en un tiempo corto, consiguiéndose un estrechamiento de los picos cromatográficos [5]. Adicionalmente, la utilización del modo de inyección *solvent-vent* permitido por este tipo de inyectores permite que, con una elección adecuada de la temperatura del *liner*, del flujo y del tiempo de venteo, sean eliminados los compuestos mayoritarios más volátiles que los analitos de interés, y que pueden producir saturación en el detector o sobrecarga de la columna cromatográfica [6].

El inyector de temperatura programada, al igual que los inyectores convencionales, permite la utilización de diferentes tipos de *liners*, tanto vacíos, como empaquetados con diferentes materiales, lo que permite modificar la selectividad del proceso [7,8].

Además, la formación de compuestos derivados más volátiles es una práctica habitual cuando se trabaja en cromatografía de gases, y puede ser utilizada también como un paso previo al análisis por HS [5]. Es posible utilizar el propio vial de HS para llevar a cabo reacciones de derivatización, tanto metilaciones, como esterificaciones, transesterificaciones, acetilaciones, etc.

Con la utilización de este tipo de reacciones, en las cuales se generan derivados más volátiles que los analitos originales, se puede ampliar el rango de compuestos que pueden ser analizados por HS incluyendo a aquellos que, en principio, no podrían serlo, como consecuencia de su baja volatilidad.

2. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es combinar las ventajas de la utilización de reacciones de derivatización para ampliar el rango de compuestos que pueden ser analizados con la técnica de HS, con los beneficios obtenidos al utilizar un inyector de temperatura programada, que permite aumentar la sensibilidad de la técnica.

Se escogieron cuatro analitos prueba, 2-clorofenol (2CP), 2,4-diclorofenol (24DCP), 4-cloro-3-metilfenol (4C3MP) y 2,4,6-triclorofenol (246TCP). Todos ellos son compuestos semi-volátiles y polares, no muy adecuados para ser analizados por HS, ya que tienden a dar picos con colas si no se derivatizan de forma previa a su análisis cromatográfico, con lo que se compromete la separación cromatográfica, la integración de los picos y la fiabilidad del método.

En este trabajo se propone un método rápido y sensible para la determinación de estos compuestos en muestras acuosas, utilizando una reacción de acetilación con anhídrido acético. Se seleccionó esta reacción en lugar de una reacción de sililación [9,10] o metilación [11,12], ya que puede llevarse a cabo en medio acuoso [13-15].

Los clorofenoles elegidos se encuentran dentro de los denominados contaminantes emergentes en aguas, de acuerdo con la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (EPA) [16] y la Organización Mundial de la Salud (WHO) [17], fijando, esta última, un nivel máximo permitido para la concentración de 2,4,6-triclorofenol en aguas potables de 200 µg/L. La directiva de la Unión Europea 80/778/EC establece una concentración máxima permitida para la concentración total de fenoles en aguas potables de 0.5 µg/L. La concentración de forma individual no puede superar 0.1 µg/L.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Disoluciones estándar y muestras

Los clorofenoles utilizados en este estudio (2CP, 24DCP, 4C3MP y 246TCP), fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El metanol fue suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania), y el anhídrido acético y el cloruro sódico por Scharlau (Barcelona, España). Se prepararon disoluciones patrón de cada uno de los compuestos (500 mg/L en metanol) que se almacenaron a una temperatura de 4 °C. Estas disoluciones se utilizaron para dopar las muestras de agua a las diferentes concentraciones analizadas. La optimización del método se llevo a cabo con agua ultrapura.

El método propuesto se utilizó para la determinación de los analitos objeto de estudio en muestras dopadas de agua de grifo (Salamanca, España), agua de río (Río Tormes, Salamanca, España) y agua de mar (Santander, España).

3.2. Reacción de derivatización

En un vial de 20 mL de HS se añaden 2.5 g de NaCl. A continuación se añaden los diferentes reactivos (volumen total de líquido, 5 mL) en el siguiente orden: en primer lugar, una disolución acuosa de hidrogeno carbonato potásico 0.4 M; a continuación 50 µL de una disolución de los compuestos en metanol, y, finalmente, 100 µL de anhídrido acético como agente de derivatización. El vial se cierra herméticamente con un tapón que posee un *septum* de teflón recubierto de silicona y la mezcla se agita durante 1 min con un Vortex. A continuación el vial se vuelve a abrir, para eliminar el CO₂ generado durante la reacción. Finalmente, el vial vuelve a cerrarse, y se procede a su análisis instrumental.

3.3. Medida instrumental HS-PTV-GC-MS

3.3.1. Generador de espacio de cabeza

El muestreo mediante generación de espacio de cabeza se llevó a cabo con el muestreador modelo A 7694, de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania). El sistema de muestreo consta de los siguientes elementos: una aguja de acero inoxidable, una válvula de seis vías modelo 316-SS con un bucle de níquel (mantenida a una temperatura de 120 °C) y dos válvulas solenoides (de presurización y de purga). Las condiciones experimentales del HS fueron las siguientes: temperatura del horno, 90 °C; tiempo de equilibrado, 30 min; tiempo entre muestras, 12 min; agitación de la muestra a la velocidad máxima permitida por el sistema; tiempo de presurización del vial, 0.30 min; presión del vial, 12.5 psi; tiempo de llenado del bucle, 0.15 min; tiempo de equilibrado del bucle, 0.02 min; tiempo de inyección, 1 min. El HS se acopló con un PTV a través de una línea termostatada de níquel, que se mantuvo a una temperatura de 125 °C. Como gas portador se utilizó helio N50 (grado de pureza del 99.999 %; Air Liquide).

3.3.2. Inyector de temperatura programada

Todos los experimentos se llevaron a cabo con un inyector de temperatura programada, PTV (CIS-4, Gerstel, Baltimore, MD, USA). Se utilizaron tres tipos de *liners*: uno vacío en zigzag y dos empaquetados con diferentes tipos de rellenos, lana de vidrio y Tenax-TA. En el método optimizado, el modo de inyección utilizado fue *solvent-vent* con un *liner* vacío en zigzag. El enfriamiento del inyector se consigue utilizando CO₂ líquido.

En el modo de inyección *solvent-vent*, el espacio de cabeza fue introducido en el inyector frío (10 °C). El tiempo de purga se fijó en 1.65

min. La temperatura inicial del *liner* se mantuvo durante 1.70 min, como mecanismo de seguridad para que la rampa de calentamiento del PTV no comenzara antes de que la válvula de desecho estuviera cerrada. El flujo de gas portador que circulaba por la válvula de *split* durante el tiempo de purga se fijó en 50 mL/min. Con este flujo de purga, la presión en cabeza de columna era de 5 psi.

Una vez que la etapa de purga finalizó, la válvula de *split* se cerró y el *liner* se calentó rápidamente a una velocidad de 12 °C/s hasta 250 °C, produciéndose la transferencia de los analitos a la columna cromatográfica. Transcurrido un tiempo, suficiente para que todos los analitos pasaran a la columna (1 min), la válvula de *split* volvió a abrirse y la temperatura del *liner* se mantuvo a 250 °C durante 8 min con un flujo de helio de 20 mL/min, como mecanismo de limpieza. En la figura 1 se muestra un esquema de las etapas implicadas en el proceso de inyección *solvent-vent*.

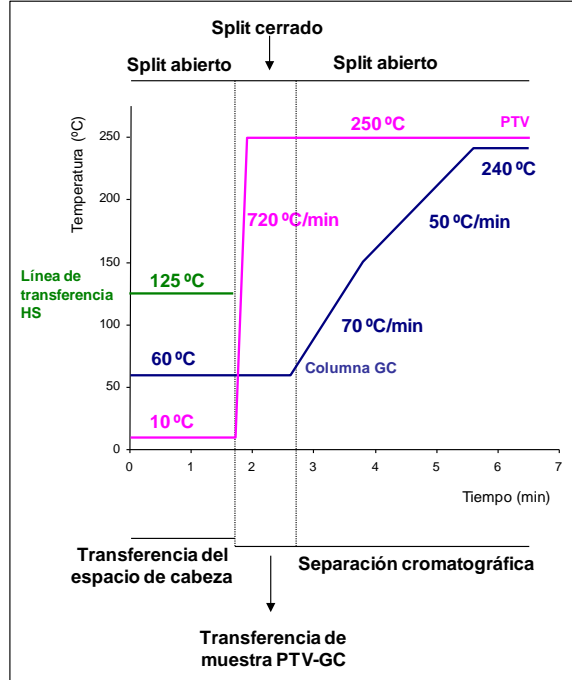


Figura 1: Secuencia de eventos en el modo de inyección *solvent-vent*

3.3.3. Cromatografía de gases rápida

El cromatógrafo de gases utilizado fue un Agilent 6890 equipado con una columna capilar de baja polaridad DB-VRX (20 m x 0.18 mm x 1 μ m, rango de trabajo -10 – 260 °C) de J&W Scientific (Folsom, CA, USA). Como gas portador se utilizó helio N50 (99.999 % pureza; Air Liquide). Las dimensiones de la columna, junto con el control del flujo y de las rampas de temperatura en el horno permitieron que la separación se produjera dentro de lo que se conoce como cromatografía de gases rápida.

El programa de temperaturas del horno (que comenzaba simultáneamente con la inyección en el PTV) implicaba una temperatura inicial de 60 °C durante 0.80 min, esta temperatura se incrementó hasta 150 °C a una velocidad de 70 °C/min, incrementándose posteriormente hasta 240 °C a una velocidad de 50 °C/min y manteniéndose durante 0.91 min. Las rampas de temperatura seleccionadas fueron las máximas permitidas por la configuración instrumental utilizada. El tiempo total del cromatograma fue de 4.8 min.

3.3.4. Espectrometría de masas

El detector utilizado fue un espectrómetro de masas de tipo cuadrupolar (HP 5973). Se trabajó en la modalidad de impacto electrónico (voltaje de ionización, 70 eV; temperatura de la fuente de ionización, 230 °C, y del cuadrupolo, 150 °C). El filamento se mantuvo apagado hasta el minuto 1.80 del análisis cromatográfico, para protegerlo de la llegada de disolvente. En el modo de adquisición de datos *scan* se registraron las relaciones m/z (masa/carga) entre 25 y 350 uma, la velocidad de registro se fijó en 4.32 ciclos/segundo y se seleccionó un valor umbral de abundancia de 0. Este modo de adquisición se utilizó para llevar a cabo los diferentes estudios de optimización. La identificación de los compuestos se realizó por comparación del espectro experimental con el correspondiente a la base de

datos NIST'98 (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, versión 1.6). En el modo de adquisición SIM, se seleccionaron tres grupos. El primero de ellos (1.80 – 2.90 min) contenía las relaciones m/z más abundantes para el derivado acetilado del 2-clorofenol (2CPA), m/z 43, 128 y 130. El segundo grupo (2.90 – 4.30 min) contenía las m/z más abundantes para los derivados acetilados del 2,4-diclorofenol y 4-cloro-3-metilfenol (24DCPA y 4C3MPA), m/z 43, 107, 142, 162 y 164. El tercer grupo (4.30 – 4.80 min) contenía las m/z más abundantes para el derivado acetilado del 2,4,6-triclorofenol (246TCPA), m/z 43, 196 y 198. La adquisición de señales para cada ion se realizó con un tiempo de permanencia de 10 ms. El número de puntos por segundo analizados en cada grupo fue 57, para el primer y tercer grupo, y 67 para el segundo grupo. En la tabla 1 se muestran los iones de cuantificación y confirmación para cada compuesto en particular.

Tabla 1: Iones de cuantificación y confirmación para cada compuesto

		Compuesto			
		2CPA	4C3MPA	24DCPA	246TCPA
m/z	Ión de cuantificación	128	142	162	196
	Iones de confirmación	43, 130	43, 107	43, 164	43, 198

3.3.5. Análisis de datos

La recogida de los datos cromatográficos se realizó con el software Enhanced ChemStation, G1701CA Ver. C 00.00 de Agilent Technologies [18].

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Variables relacionadas con la generación de espacio de cabeza

Como ya se detalló más específicamente en la introducción de esta memoria, en la sección 1.1.1. “Fundamento teórico del análisis por generación de espacio de cabeza”, la concentración de analito en la fase gaseosa (C_g) viene definida por la siguiente ecuación:

$$C_g = \frac{C_0}{K + \beta}$$

donde C_0 es la concentración inicial de analito, K es la constante de equilibrio o coeficiente de partición, y β es el cociente entre el volumen de fase gaseosa y el volumen de fase condensada [5]. El valor de C_g puede variarse modificando tanto K como β .

El valor de β puede modificarse de forma sencilla variando el volumen de muestra o el tamaño del vial utilizado. En este trabajo se utilizaron viales de 20 mL, para facilitar la mezcla y agitación de los reactivos de derivatización con el Vortex. Se ha de tener especial cuidado para prevenir salpicaduras en el tapón de los viales, que pueden provocar la consiguiente contaminación de la aguja del HS al perforar el *septum*. Manteniendo el volumen del vial constante, para aumentar el valor de C_g , el valor de β debe reducirse, y, por lo tanto, el volumen de la fase condensada debe aumentar. Sin embargo, para volúmenes superiores a 10 mL ($\beta = 1$), se observó el problema de posible contaminación arriba mencionado. Finalmente, se tomó como volumen de trabajo 5 mL ($\beta = 3$). La disminución de señal producida respecto a trabajar con $\beta = 1$ variaba entre el 42 % para el acetato de 2-clorofenilo y el 25 % para el acetato de 2,4,6-triclorofenilo, un inconveniente asumible para evitar la contaminación del sistema.

El valor de K , definido como el cociente entre la concentración de analito en la fase condensada y la fase gaseosa una vez alcanzado el equilibrio, depende de la presión parcial de vapor (p_i^0) y del coeficiente de actividad (γ_i) de cada compuesto [5]:

$$K \propto \frac{1}{p_i^0 \times \gamma_i}$$

Este parámetro puede modificarse variando la temperatura de equilibrado o la fuerza iónica del medio.

Como temperatura de equilibrado se seleccionó 90 °C, un valor adecuado cuando se trabaja con muestras acuosas.

La variación del coeficiente de actividad (γ_i), que describe las interacciones intermoleculares entre el soluto y el disolvente, se estudió modificando la matriz de la muestra. El objetivo final era reducir el valor de K aumentando el valor del coeficiente de actividad. Un valor de K bajo indica una reducción de la solubilidad del analito en la fase condensada, lo que se traduce en un aumento de la concentración en la fase gaseosa. En el caso de muestras acuosas y analitos polares, esto se consigue añadiendo grandes cantidades de un electrolito al medio (*salting-out*).

Se compararon las señales obtenidas cuando no se añadía ningún electrolito al medio y cuando se trabajaba con NaCl en condiciones de sobresaturación (2.5 g en 5 mL de muestra). Se observó un incremento en la señal analítica en el segundo caso, que iba desde 4.4 veces para el 246TCPA hasta 5.7 veces para el 4C3MPA.

Finalmente, se estudió la influencia de la agitación de los viales durante el tiempo de equilibrado, con objeto de facilitar la transferencia de las especies volátiles al espacio de cabeza. Se compararon las señales cuando no se agitaban y cuando sí se agitaban los viales, observándose un incremento en los valores de señal analítica en el segundo caso, entre el 27 % para el

246TCPA y el 58 % para el 24DCPA, por lo que se seleccionó la agitación en las condiciones óptimas de trabajo.

4.2. Reacción de derivatización

La acetilación de compuestos fenólicos es una reacción ampliamente utilizada para la determinación de los mismos en diferentes matrices [13-15].

Las variables estudiadas en esta sección fueron el tipo de medio básico utilizado, concentración del mismo y volumen de agente derivatizante y de metanol. Se probaron dos medios básicos diferentes, un tampón $K_2CO_3/KHCO_3$ 0.1 M y una disolución de $KHCO_3$ 0.4 M, con resultados análogos. Esto indicaba que un pH superior a 8.4 era suficiente para que la proporción de iones fenóxido fuera alta, y tuviera lugar así la reacción. Se observó que, al aumentar la concentración de tampón (hasta 0.4 M) la señal se los compuestos derivatizados disminuía. Esto se debía a que, en este caso, el pH del medio, una vez transcurrida la reacción, era demasiado básico para asegurar la estabilidad de los ésteres formados, que llegaban a hidrolizarse [19]. Se decidió trabajar con una disolución de $KHCO_3$ 0.4 M.

Respecto a la cantidad de anhídrido acético, se añadieron diferentes volúmenes, entre 20 y 100 μ L. Los mejores resultados se obtuvieron con 100 μ L, por lo que se seleccionó éste como valor óptimo.

Finalmente, se estudió la influencia de la adición de diferentes volúmenes de metanol, ya que era el disolvente en el que estaban contenidos los analitos, y es volátil. El intervalo estudiado fue entre 10 y 50 μ L, manteniendo el volumen de muestra constante. No se observaron cambios en la señal analítica, por lo que se seleccionó trabajar con 50 μ L.

4.3. PTV-GC-MS

4.3.1. Optimización del inyector de temperatura programada

Hasta este momento, todos los estudios se realizaron utilizando un *liner* relleno con lana de vidrio. Sin embargo, a la hora de llevar a cabo la optimización de la inyección *solvent-vent*, uno de los parámetros que se tomó en consideración fue el tipo de *liner* utilizado. Se compararon las señales analíticas generadas por tres tipos de *liners*: uno vacío en zigzag, y dos empaquetados con diferentes materiales de relleno, lana de vidrio y un adsorbente químico (Tenax-TA). Este estudio se realizó en combinación con la optimización de la temperatura inicial (o temperatura de atrapamiento) en el PTV. Los valores estudiados fueron 0, 10, 35, 60 y 90 °C.

Como se muestra en la figura 2, para el caso del *liner* vacío, a medida que se aumentó la temperatura, se produjo una disminución de la señal, indicando que la retención de los analitos no era suficiente, y que se eliminaban a través de la válvula de *split*. Respecto al *liner* de lana de vidrio, el comportamiento observado fue similar para el caso del acetato de 2-clorofenilo, y ligeramente diferente para el resto de los analitos en estudio, los cuales eran retenidos en el *liner* a 0 y 10 °C, pero se eliminaban a temperaturas mayores. Para el *liner* de Tenax-TA, el comportamiento era totalmente diferente a los anteriormente descritos. A medida que se aumentó la temperatura, también aumentó la señal, hasta un determinado valor, a partir del cual permanecía constante. Una posible explicación puede ser que este tipo de *liner* retenía excesivamente los analitos a bajas temperaturas, obstaculizando su posterior desorción a la temperatura máxima de trabajo seleccionada (250 °C).

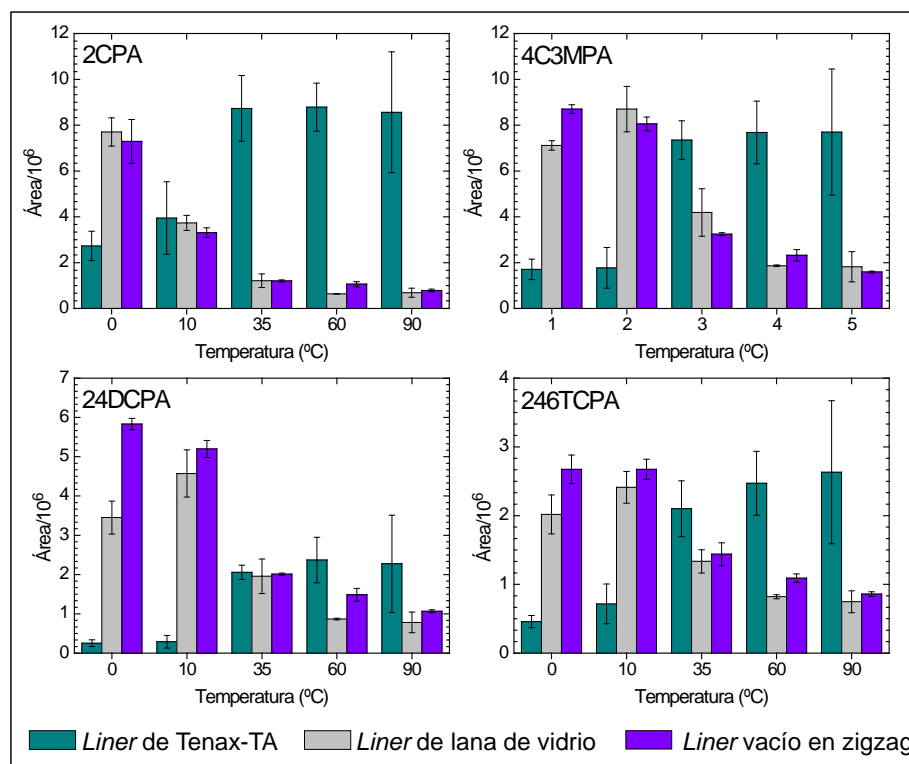


Figura 2: Comparación de las señales obtenidas para cada compuesto con los diferentes liners y temperaturas estudiadas. Cada barra representa el valor medio de 3 medidas y las barras de error desviaciones estándar

A la vista de los resultados obtenidos, los valores óptimos para cada uno de los liners estudiados fueron 10 °C para el liner vacío y el de lana de vidrio, y 90 °C para el liner de Tenax.

Para el caso del 2CPA, se obtendrían mejores resultados seleccionando una temperatura de trabajo de 0 °C (para el liner vacío y de lana de vidrio); sin embargo, se seleccionó 10 °C para evitar un uso excesivo de CO₂ al enfriar el PTV y para reducir el tiempo de análisis entre muestras, ya que el tiempo necesario para estabilizar el PTV a la temperatura seleccionada aumenta drásticamente cuanto menor sea ésta.

Se realizó un estudio de reproducibilidad para cada *liner* a la temperatura óptima seleccionada. En la tabla 2 se muestran las desviaciones estándar relativas obtenidas (%), resultado de tres réplicas en cada caso.

Tabla 2: Desviaciones estándar relativas (%) para cada *liner*, a la temperatura óptima seleccionada en cada caso

T (°C)	<i>Liner</i>	2CPA	4C3MPA	24DCPA	246TCPA
10	Lana de vidrio	8.8	11.2	11.4	9.6
10	Vacío en zigzag	6.3	4.2	3.7	5.5
90	Tenax-TA	33.1	46.9	33.7	30.0

Se observó que, en el caso del *liner* de Tenax-TA, la irreproducibilidad era excepcionalmente alta.

Adicionalmente, se observó que al realizar inyecciones sucesivas con el mismo *liner* de Tenax-TA, aparecían señales cromatográficas correspondientes a los analitos sin derivatizar, cuya intensidad era variable. Esto podría ocurrir si los analitos derivatizados, al llegar al PTV, interaccionaran con el relleno del *liner*, produciéndose la ruptura del enlace éster. En la figura 3 se comparan los cromatogramas obtenidos con un *liner* vacío (a) y un *liner* de Tenax-TA (b), tres réplicas en cada caso. Con el *liner* vacío, no se observaban señales de los compuestos sin derivatizar, y la reproducibilidad de las medidas era buena.

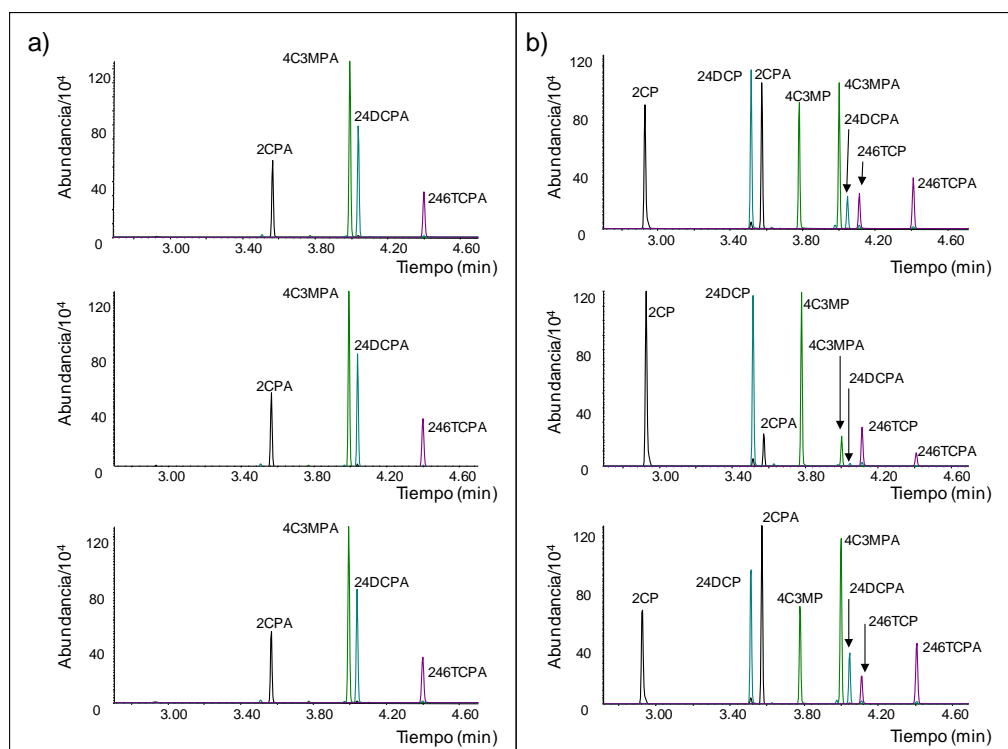


Figura 3: Comparación de los cromatogramas obtenidos con un liner vacío en zigzag (a) y un liner de Tenax-TA (b), a las temperaturas óptimas de trabajo, 10 y 90 °C, respectivamente (3 réplicas)

Para descartar la posibilidad de que lo que se estuviera extrayendo del vial de HS fueran directamente los compuestos sin derivatizar, se realizaron dos extracciones en paralelo. En la figura 4 se comparan las señales obtenidas cuando se extraían los compuestos sin derivatizar y en condiciones óptimas de transferencia al espacio de cabeza (medio ácido, pH 3, ajustado con ácido fosfórico) con las señales de los analitos no derivatizados que aparecían en los cromatogramas cuando el proceso de derivatización sí tenía lugar.

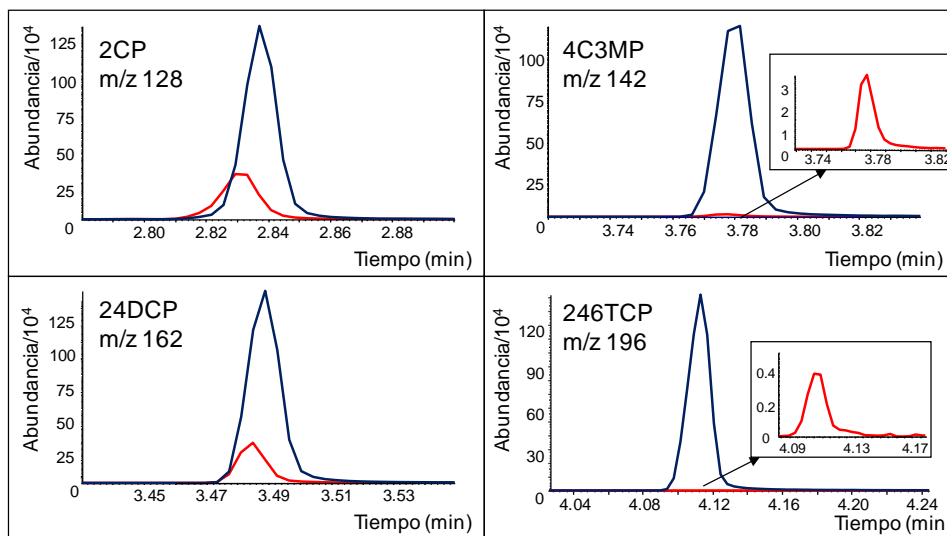


Figura 4: Comparación de las señales obtenidas cuando se extraían directamente los compuestos en medio ácido (línea de color rojo) y cuando sí tenía lugar la reacción de derivatización (línea de color azul)

Se puede observar que la señal generada cuando sí tenía lugar la reacción de derivatización era mucho mayor que la que se obtenía al extraer los compuestos directamente en medio ácido, efecto especialmente notorio para el 4-cloro-3-metilfenol y el 2,4,6-triclorofenol. Este comportamiento conduce a la confirmación de que lo que se extraía del vial eran los compuestos derivatizados. La posterior interacción de los mismos con el relleno de Tenax-TA producía la ruptura de los enlaces éster, llegando a la columna y al detector los compuestos sin derivatizar.

En la bibliografía no existen referencias acerca de este tipo de interacciones cuando se utilizan Tenax-TA como material de relleno para los *liners*. Sin embargo, se ha descrito previamente que este polímero puede presentar reactividad con compuestos adsorbidos en su superficie [20,21] (cuando se trabaja en análisis de aire por enriquecimiento por adsorción y posterior desorción térmica). Además, se ha propuesto un método para la determinación de ácido tricloroacético en agua [22], en el cual se utiliza la

descarboxilación del mismo a cloroformo en el propio *liner* de Tenax-TA en el PTV.

En consecuencia, la selección del *liner* más apropiado para el análisis se centró entre el *liner* de lana de vidrio y el vacío. Se seleccionó este último ya que las relaciones señal-ruido eran mejores (tabla 3). La optimización de las variables de la reacción de derivatización se repitió de nuevo con este *liner*, obteniéndose resultados análogos.

Tabla 3: Relaciones señal-ruido para el *liner* de lana de vidrio y el vacío, a una temperatura inicial de trabajo de 10 °C

<i>Liner</i>	2CPA	4C3MPA	24DCPA	246TCPA
Lana de vidrio	5520	3688	5837	1521
Vacío en zigzag	9005	11161	8452	2347

Una vez seleccionado el *liner* y la temperatura de atrapamiento, se procedió a la optimización de otra serie de variables, para obtener las condiciones óptimas de la inyección *solvent-vent*. Estas variables fueron: tiempo durante el cual el disolvente es eliminado (tiempo de purga), y el flujo de purga, o flujo de gas portador que pasa a través del inyector mientras éste es eliminado.

La primera variable se estudió en el intervalo de 1.55 a 2 min. Las señales máximas se obtuvieron para un valor de 1.65 min. Para valores mayores, se observó una disminución en la señal analítica, como consecuencia de que parte de los analitos eran eliminados con el disolvente. Para valores inferiores, la señal también disminuía ya que no se alcanzaba la completa eliminación del disolvente.

Respecto al flujo de gas de purga, se estudiaron los valores de 30, 50 y 70 mL/min. La máxima señal se obtuvo para 50 mL/min, con una disminución de la misma para valores superiores e inferiores.

Finalmente, se estudió el tiempo de inyección. La desorción de los analitos se producía al aplicar una rampa de calentamiento en el PTV (descrito en la sección 3.3.2., 12 °C/s). De esta forma, la temperatura aumentaba de 10 °C a 250 °C en 0.33 min. El tiempo de inyección se estudió en el intervalo de 0.5 a 2 min, con valores máximos de señal para 1 min, tiempo suficiente para que los analitos pasaran a la columna cromatográfica. Para tiempos menores, la inyección era parcial.

4.3.2. Optimización de la separación cromatográfica

Las rampas de temperatura seleccionadas fueron las máximas permitidas por la configuración instrumental utilizada. La única variable que se optimizó fue la temperatura inicial de columna. Se estudiaron varios valores, 45, 60, 75 y 90 °C. Como podía esperarse, a medida que aumentaba la temperatura se producía un ensanchamiento de los picos cromatográficos. Entre 45 °C y 60 °C no existían diferencias, por lo que se seleccionó éste último valor, ya que el tiempo necesario para que se alcanzaran las condiciones iniciales era menor.

Con las condiciones anteriormente descritas, fue posible separar los cuatro clorofenoles derivatizados en un tiempo inferior a 4.8 min. La anchura de pico a media altura era 0.9 s para el 2CPA, 0.72 s para el 4C3MPA, 0.66 s para el 24DCPA y 0.66 s para el 246TCPA. Estos valores se ajustan a lo que se conoce como cromatografía de gases rápida.

4.3.3. Modos de adquisición de datos

En todos los casos, los estudios de optimización se han llevado a cabo en el modo de adquisición de datos *scan*, registrándose las relaciones m/z entre 25 y 350 uma. Con la información obtenida en los cromatogramas, se seleccionaron 3 grupos para trabajar en el modo de adquisición de datos

SIM, cada uno de ellos con las relaciones m/z características de los compuestos en cuestión.

Las ventanas seleccionadas en el modo SIM se han detallado previamente en la sección 3.3.4. En este modo, se observó una disminución del ruido en los cromatogramas. Esto se traduce en una mejora en las relaciones S/N , y, por lo tanto, en una mejora de la sensibilidad. Por ello, éste fue el modo de trabajo para obtener las rectas de calibrado y los parámetros analíticos del método.

4.4. Evaluación del método HS-PTV-GC rápida-MS

Se obtuvieron rectas de calibración para cada uno de los compuestos, utilizando siete niveles de concentración, entre 0.1 y 5.0 $\mu\text{g/L}$. Cada nivel se analizó por triplicado.

Como señal analítica se utilizó el área de pico obtenida al extraer, en cada caso, la relación m/z más abundante para cada compuesto; m/z 128 para el acetato del 2-clorofenilo; m/z 142 para el acetato del 4-cloro-3-metilfenilo; m/z 162 para el acetato del 2,4-diclorofenilo, y m/z 196 para el acetato del 2,4,6-triclorofenilo. Las características analíticas del método se resumen en la tabla 4.

Tabla 4: Características analíticas del método

	Compuesto			
	2CPA	4C3MPA	24DCPA	246TCPA
Ordenada en el origen	$(3 \pm 3) \times 10^2$	$(3 \pm 4) \times 10^2$	$(0.7 \pm 3) \times 10^2$	$(2 \pm 2) \times 10^2$
Pendiente	$(22 \pm 1) \times 10^2$	$(75 \pm 2) \times 10^2$	$(59 \pm 1) \times 10^2$	$(397 \pm 7) \times 10$
R^2	0.9975	0.9997	0.9994	0.9999
RSD (%), n=10	16.0	5.26	4.41	4.91
LD (ng/L)	5	8	6	5
LQ (ng/L)	15	25	19	16

Todas las rectas de calibrado mostraban comportamiento lineal, con coeficientes de correlación (R^2) superiores a 0.99. La validez del modelo se comprobó mediante un análisis de varianza (ANOVA), y ninguno de los modelos generados mostraba fallo de ajuste.

Se analizó la repetibilidad del proceso para una concentración de analito de 1.0 $\mu\text{g/L}$, con valores de desviación estándar relativa (RSD, %) satisfactorios, no superiores al 6 %, excepto para el acetato del 2-clorofenilo. Éste es el compuesto más volátil de los analitos estudiados, por lo que será el que esté más afectado por las fluctuaciones del sistema.

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-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 resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.

En la tabla 5 se comparan los límites de detección obtenidos con el método propuesto, con los obtenidos utilizando otras metodologías encontradas en bibliografía, que también utilizan reacciones de derivatización previas al análisis cromatográfico. La comparación es favorable en todos los casos; únicamente con el método que utiliza HS-SPME se obtienen límites de detección inferiores, aunque la metodología

HS-PTV-GC-MS presenta la ventaja de que todo el proceso, desde la mezcla de reactivos y la colocación del vial en el muestreador, tiene lugar de forma continua.

Tabla 5: Comparación de los límites de detección obtenidos con el método propuesto (en *negrita y cursiva*), con los obtenidos con otros métodos encontrados en bibliografía

Técnica	Reactivo de derivatización	LD (ng/L) en muestras acuosas				Ref.
		<i>2CP</i>	<i>4C3MP</i>	<i>24DCP</i>	<i>246TCP</i>	
LLE-GC-MS	Diazometano	15	---	10	10	12
LLE-PTV-GC-MS				<10		24
DLLME-GC-ECD	Ac ₂ O	1000	---	500	15	25
SPE-GC-AED		43	60	37	17	26
SPE-GC-MS-MS	Ac ₂ O	47	37	30 ^a	37	13
SPE-GC-MS	MTBSTFA	10	15	10	5	9
HS-SPME-GC-MS	Ac ₂ O	4	1	1	1	14
SPME-GC-ECD	PFBCI	500	800	50	10	27
SBSE-PTV-GC-MS	MTBSTFA	---	23	65	6	28
SBSE-PTV-GC-MS	Ac ₂ O	200	200	100	100	15
MIMS	Ac ₂ O	---	1000	---	1000	29
HS-PTV-GC-MS	<i>Ac₂O</i>	<i>5</i>	<i>8</i>	<i>6</i>	<i>5</i>	

^a 24DCP + 25DCP

LLE, extracción líquido-líquido; DLLME, extracción líquido-líquido dispersiva; SPE, extracción en fase sólida; SPME, microextracción en fase sólida; SBSE, extracción por adsorción en barra agitadora; MIMS, espectrometría de masas asistida por membranas; ECD, detector de captura electrónica; AED, detector de emisión atómica

Finalmente, se comprobó la capacidad predictiva del modelo, para lo cual se analizaron tres tipos de aguas: agua de grifo, agua de río y agua de mar. Las muestras no se sometieron a ningún tipo de manipulación previa.

Se observó que, sin dopar las muestras, las señales eran análogas a las obtenidas en los blancos. Como consecuencia, se decidió dopar las mismas a dos niveles de concentración: 0.5 y 1.0 µg/L. En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 6: *Concentraciones predichas por el modelo*

Muestra	Nivel de concentración	2CP	4C3MP	24DCP	246TCP
Agua de grifo	1 µg/L	0.7 ± 0.3	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.01 ± 0.09
Agua de río		0.7 ± 0.3	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.97 ± 0.09
Agua de mar		1.3 ± 0.3	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.03 ± 0.08
Agua de grifo	0.5 µg/L	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.51 ± 0.08
Agua de río		0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.50 ± 0.08
Agua de mar		0.7 ± 0.3	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.44 ± 0.08

Con los resultados obtenidos se puede concluir que el modelo es adecuado para la determinación de clorofenoles en muestras acuosas a estos niveles de concentración, con peores resultados para el analito más volátil del conjunto (2-clorofenol), cuya irreproducibilidad, como se observó anteriormente, también es mayor que para el resto de compuestos.

5. CONCLUSIONES

En el trabajo propuesto se ha conseguido un aumento de la sensibilidad en el acoplamiento HS-GC para el análisis de compuestos semi-volátiles en muestras acuosas, con la utilización combinada de una reacción de derivatización *in situ* y un inyector de temperatura programada para la transferencia de la fase gaseosa al cromatógrafo de gases. El modo de inyección utilizado, *solvent-vent*, permite la focalización térmica de los analitos en el *liner*, lo que se traduce en un estrechamiento de los picos cromatográficos, típicos de la cromatografía de gases rápida/muy rápida.

La configuración instrumental utilizada en este estudio presenta la ventaja de que, tanto la extracción-preconcentración como el análisis instrumental de los analitos tiene lugar de forma continua, sin la necesidad de pasos intermedios, lo que ocurre cuando se trabaja con técnicas tales como SPME o SBSE.

La elección del *liner* adecuado en el PTV es muy importante. En el caso de utilizar *liners* rellenos de Tenax-TA, la reproducibilidad del método disminuye considerablemente, como consecuencia de la degradación de los compuestos derivatizados en la superficie del adsorbente.

El método propuesto es altamente sensible, con límites de detección entre 5 y 8 ng/L. La linealidad, reproducibilidad y exactitud del método se analizaron, y resultaron ser satisfactorias.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] B. Kolb, J. Chromatogr. A 842 (1999) 163.
- [2] D.A. Lambropoulou, I.K. Konstantinou, T.A. Albanis, J. Chromatogr. A 1152 (2007) 70.
- [3] J.L. Perez Pavon, M. del Nogal Sanchez, M.E. Fernandez Laespada, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1175 (2007) 106.
- [4] J.L. Perez Pavon, M. del Nogal Sanchez, M.E. Fernandez Laespada, C. Garcia Pinto, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1141 (2007) 123.
- [5] B. Kolb, L.S. Ettre, Static Headspace-Gas Chromatography, Wiley Interscience, Hoboken, NJ, 2006.
- [6] J.L. Perez Pavon, M. del Nogal Sanchez, M.E. Fernandez Laespada, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1202 (2008) 196.
- [7] J.L. Perez Pavon, S. Herrero Martin, C. Garcia Pinto, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1194 (2008) 103.
- [8] D. Štajnbaher, L. Zupančič-Kralj, J. Chromatogr. A 1190 (2008) 316.
- [9] T. Heberer, H.J. Stan, Anal. Chim. Acta 341 (1997) 21.
- [10] M. Saraji, M. Bakhshi, J. Chromatogr. A 1098 (2005) 30.
- [11] M. Amijee, J. Cheung, R.J. Wells, J. Chromatogr. A 738 (1996) 43.
- [12] A. Geibler, H.F. Schöler, Water Res. 28 (1994) 2047.
- [13] I. Turnes, I. Rodriguez, C.M. Garcia, R. Cela, J. Chromatogr. A 743 (1996) 283.
- [14] M. Llompart, M. Lourido, P. Landín, C. García-Jares, R. Cela, J. Chromatogr. A 963 (2002) 137.
- [15] L. Montero, S. Conradi, H. Weiss, P. Popp, J. Chromatogr. A 1071 (2005) 163.
- [16] L.H. Keith (Ed.), Compilation of Sampling Analysis Methods, US Environmental Protection Agency, Boca Raton, FL, 1991.
- [17] Guidelines for Drinking Water Quality, 2nd ed., vol. 2, Health Criteria and Other Supporting Information, 1996, p. 940 and Addendum to vol. 2, 1998, p. 281, World Health Organization, Geneva.

-
- [18] Enhanced ChemStation, G1701CA, Version C00.00, Agilent Technologies, 1999, CA, United States.
- [19] F.A. Carey, R.J. Sundberg, *Advanced Organic Chemistry. Part A. Structure and Mechanisms*, 4th ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2000.
- [20] K. Dettmer, W. Engewald, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 490.
- [21] C. Coeur, V. Jacob, I. Denis, P. Foster, *J. Chromatogr. A* 786 (1997) 185.
- [22] D. Drechsel, K. Dettmer, W. Engewald, Th. Bittner, J. Efer, *Chromatographia* 54 (2001) 151.
- [23] A. Vermeulen, K. Welvaert, J. Vercammen, *J. Chromatogr. A* 1071 (2005) 41.
- [24] N. Fattahi, Y. Assadi, M.R.M. Hosseini, E.Z. Jahromi, *J. Chromatogr. A* 1157 (2007) 23.
- [25] I. Rodriguez, M.I. Turnes, M.C. Mejuto, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 721 (1996) 297.
- [26] F. Bianchi, M. Careri, C. Mucchino, M. Musci, *Chromatographia* 55 (2002) 595.
- [27] J.B. Quintana, R. Rodil, S. Muniategui-Lorenzo, P. Lopez-Mahia, D. Prada-Rodriguez, *J. Chromatogr. A* 1174 (2007) 27.
- [28] M. Ojala, R.A. Ketola, V. Virkki, H. Sorsa, T. Kotiaho, *Talanta* 44 (1997) 1253.

TRABAJO PUBLICADO
PUBLISHED ARTICLE

IV



Use of a programmed temperature vaporizer and an *in situ* derivatization reaction to improve sensitivity in headspace-gas chromatography. Application to the analysis of chlorophenols in water

José Luis Pérez Pavón*, Ana María Casas Ferreira, María Esther Fernández Laespada, 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 24 October 2008
Received in revised form 9 December 2008
Accepted 17 December 2008
Available online 25 December 2008

Keywords:

Headspace analysis
Programmed temperature vaporizers
Derivatization
Low-volatility compounds

ABSTRACT

In the present work we propose the combined use of a derivatization reaction within the vial of a headspace sampler with a programmed temperature vaporizer (PTV) inlet in the solvent vent mode as a new methodology for obtaining an increase in sensitivity in headspace-gas chromatography (HS-GC) for the analysis of sparingly volatile compounds. As test analytes the following chlorophenols were used: 2-chlorophenol (2CP), 2,4-dichlorophenol (24DCP), 4-chloro-3-methylphenol (4C3MP) and 2,4,6-trichlorophenol (246TCP). The derivatization reaction was carried out with acetic anhydride because it can be carried out *in situ* in aqueous medium. In the programmed temperature vaporizer inlet, three different liners, one of them empty and the others with materials of different trapping strengths (glass wool and Tenax-TA), were compared. The best results were obtained when an empty liner was used, with better repeatability and S/N ratios. In the case of the liner filled with Tenax-TA, a considerable lack of repeatability was observed, this being attributed to interactions between the derivatized compounds and the adsorbent. The proposed methodology affords very low limits of detection, in the range of a few ng/L for all the compounds, with good precision and accuracy values.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The use of headspace sampling (HS) solves many analytical problems by minimizing sample treatment. However, in many cases the limits of detection achieved are insufficient for the detection or quantification of the analytes of interest [1]. This means that in many applications it is necessary to employ an additional pre-concentration stage, generally before introducing the sample into the chromatographic system. Among the techniques used for this are solid-phase microextraction (SPME) and headspace single-drop microextraction (HS-SDME). Both methodologies involve transfer of the extraction medium (microfibre or microdrop) from the vial of the headspace sampler to the injector of the chromatograph [2].

The use of a programmed temperature vaporizer (PTV) inlet offers an alternative for increasing sensitivity in methods in which headspace sampling is used [3,4]. When the gas phase generated in the headspace is introduced, the analytes (in a volume of 3–5 mL) are focused cryogenically in the liner of the injector.

Later application of a rapid temperature ramp allows these analytes to be introduced into the GC column, with the advantage that a considerable narrowing of the chromatographic peaks occurs [5]. Additionally, it is possible to perform the injection in solvent vent mode, in which by means of a suitable choice of the temperature of the PTV and of the flow rate and the venting time it is possible to eliminate major compounds that are more volatile than the species of interest, which would produce saturation of the detector or an overloading of the chromatographic column [6].

The PTV inlet, as well as other injectors, has the possibility of using different types of liners, empty or packed with different materials, which implies an additional factor for modifying the selectivity of the process [7,8].

Additionally, the formation of more volatile derivatives is a widely used practice in gas chromatography and can also be used as a step prior to headspace sampling [5]. It is possible to use the HS vial to carry out reactions involving methylation, esterification, transesterification, acetylation, etc.

The use of a derivatization reaction that generates compounds more volatile than the analytes has an additional advantage in that it enables the use of the HS sampling technique for compounds to which, owing to their low volatility, in principle it would not be applicable.

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

In the present work we propose using this advantage to expand the number of compounds that can be analyzed with HS sampling together with the increase in sensitivity provided by programmed temperature vaporizers. As model analytes for this approach we chose 2-chlorophenol (2CP), 2,4-dichlorophenol (24DCP), 4-chloro-3-methylphenol (4C3MP) and 2,4,6-trichlorophenol (246TCP). These are semi-volatile compounds, and hence are not very suitable for direct analysis with HS. Also, they are polar, which hinders their separation by GC since if they are not derivatized previously they tend to give broad and tailed peaks, largely compromising chromatographic separation, peak integration and method reliability. We propose a rapid and sensitive analytical method for water samples, using *in situ* acetylation with acetic anhydride. We chose this reaction over silylation [9,10] or methylation [11,12] because it can be carried out in aqueous medium [13–15]. These chlorophenols are found among priority pollutants in water according to the Environmental Protection Agency (EPA) [16] and the World Health Organization (WHO) [17], who propose a guideline value of 200 µg/L for 2,4,6-trichlorophenol in drinking water. Directive 80/778/EC of the European Union establishes a maximum content of total phenols in drinking water of 0.5 µg/L. The concentration of each of them should not exceed 0.1 µg/L.

2. Experimental

2.1. Standard solutions and samples

The chlorophenols employed here (2-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol, 4-chloro-3-methylphenol, and 2,4,6-trichlorophenol) were supplied by Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Methanol was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and acetic anhydride and sodium chloride were from Scharlau (Barcelona, Spain). Stock solutions (500 mg/L in methanol) of each chlorophenol were prepared and stored at 4 °C in a refrigerator. These solutions were used to spike the water samples with the different concentrations analyzed. Method optimization was performed with deionized water.

The proposed procedure was used to determine the analytes in spiked samples of tap water from the drinking water system of the City of Salamanca, water from the River Tormes on its passage through the city, and sea water (taken at Santander, N. Spain).

2.2. Derivatization reaction

2.5 g of NaCl was weighed in a 20.0-mL HS sampler vial. Reagents (total liquid volume: 5.0 mL) were added to the vial in the following order: first an aqueous solution of 0.4 M potassium hydrogen-carbonate, then 50 µL of a solution of methanol containing the analytes, and finally 100 µL of acetic anhydride as the derivatization reagent. The vial was sealed with a Teflon covered silicone septum and the mixture was shaken for 1 min with a vortex device. Following this, the vial was opened to remove the CO₂ generated during the reaction. It was then sealed again and placed in the HS sampler.

2.3. HS-PTV-fast GC–MS measurements

2.3.1. Headspace

HS sampling was performed with a model 7694 headspace sampler from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). The sampling system consisted of a stainless steel needle, a 316-SS six-port valve with a nickel loop (heated to 120 °C) and two solenoid valves (for pressurization and venting). The experimental conditions for the HS were oven temperature: 90 °C; equilibration time: 30 min; time between samples: 12 min; high speed agitation; vial pressurization: 0.30 min; vial pressure: 12.5 psi; loop fill time: 0.15 min; loop equilibration time: 0.02 min; injection time: 1 min.

The headspace sampler was coupled to a PTV injector through a thermostatted transfer line heated to 125 °C. The carrier gas was helium N50 (99.995% pure; Air Liquide).

2.3.2. Programmed temperature vaporization

All experiments were carried out with a PTV inlet (CIS-4; Gerstel, Baltimore, MD, USA). Three liners for Gerstel CIS-4 (71 mm × 2 mm) were used: an empty baffled liner and two liners packed with glass wool or with a chemical sorbent (Tenax-TA). In the optimized method, solvent vent injection with the liner packed with the empty baffled liner was used. Cooling was accomplished with liquid CO₂.

In the solvent vent mode, the headspace is introduced into the cold injector (10 °C). Here, the purge time was set at 1.65 min. The initial temperature of the liner was maintained for 1.70 min as a safety mechanism to guarantee that the heating of the liner starts once the split valve is closed. The flow of carrier gas circulating through the split valve during the purging time was set at 50 mL/min. With this purge flow, the pressure at the head of the column was 5 psi.

Once purging had been completed, the split valve was closed and the liner of the PTV was flash-heated (12 °C/s) up to 250 °C, such that the analytes were transferred by thermal desorption to the chromatographic column. After a time, sufficient for all the analytes to be transferred to the column (1 min), the split valve was opened again and the liner temperature was held at 250 °C for 8.00 min, with a 20-mL/min carrier gas flow. Fig. 1 shows a scheme of the steps used in the solvent vent injection.

2.3.3. Fast gas chromatography

To perform the gas chromatographic measurements, an Agilent 6890 GC equipped with a low polarity DB-VRX capillary column (20 m × 0.18 mm × 1 µm, working range –10–260 °C) from J&W Scientific (Folsom, CA, USA) was used. The carrier gas was helium N50 (99.995% pure; Air Liquide). The dimensions of the column, together

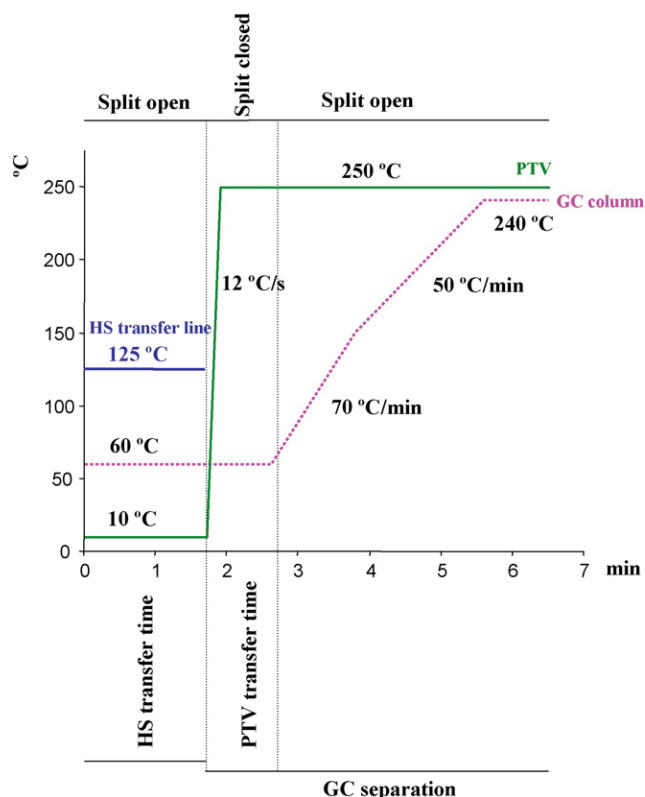


Fig. 1. Sequence of events for solvent vent injection.

Table 1

Analytical characteristics of the method.

Compounds	<i>m/z</i>		Slope ^a	Intercept ^a	<i>R</i> ²	RSD (%) (<i>n</i> = 10)	DL (ng/L)	QL (ng/L)
	Quantitation ion	Qualifier ions						
2CPA	128	43, 130	(22 ± 1) × 10 ²	(3 ± 3) × 10 ²	0.9975	16.0	5	15
4C3MPA	142	43, 107	(75 ± 2) × 10 ²	(3 ± 4) × 10 ²	0.9997	5.26	8	25
24DCPA	162	43, 164	(59 ± 1) × 10 ²	(0.7 ± 3) × 10 ²	0.9994	4.41	6	19
246TCPA	196	43, 198	(397 ± 7) × 10	(2 ± 2) × 10 ²	0.9999	4.91	5	16

2CPA: 2-chlorophenyl acetate; 4C3MPA: 4-chloro-3-methylphenyl acetate; 24DCPA: 2,4-dichlorophenyl acetate; 246TCPA: 2,4,6-trichlorophenyl acetate. Concentration range: 0.1–5.0 μg/L.

^a 95% confidence interval.

with control of the carrier gas flow and that of the temperature ramps in the oven allowed fast chromatography separation modes to be used.

The column oven temperature program (starting simultaneously with the PTV injection into the chromatographic column) involved an initial temperature of 60 °C for 0.80 min; an increase at 70 °C/min to 150 °C; then an increase at 50 °C/min to 240 °C, then holding for 0.91 min. These temperature ramps are the maximum ones permitted by the instrumental configuration employed. The total chromatographic run time was 4.80 min.

2.3.4. Mass spectrometry

The detector was a quadrupole mass spectrometer (HP 5973 N). The MS was operated with electron impact ionisation (70 eV, ion source temperature 230 °C, quadrupole temperature 150 °C). A solvent delay of 1.8 min was established, during which the filament was turned off to protect it from the arrival of the solvent. The *m/z* range in the scan mode was 25–350 amu, the scan rate was 4.32 cycles/s, and the abundance threshold value was set to 0. This was the acquisition mode used for the different optimization studies. 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). Three groups were used in selected ion monitoring mode (SIM). The first (1.80–3.90 min) contained the most abundant ions of 2-dichlorophenyl acetate (43, 128, 130). The second group (2.90–4.30 min) contained the characteristic ions of 4-chloro-3-methylphenyl acetate and 2,4-dichlorophenyl acetate (43, 107, 142, 162, 164). In the third group (4.30–4.80 min), the *m/z* characteristic of 2,4,6-trichlorophenyl acetate were recorded (43, 196, 198). In all groups, a dwell time of 10 ms was selected. Data points per second were 57 for groups 1 and 3, and 67 for group 2. Table 1 shows the *m/z* values for the quantitation and qualifier ions of each particular compound.

2.3.5. Data analysis

Data collection was performed with Enhanced ChemStation, G1701CA Ver. C 00.00 software [18] from Agilent Technologies.

3. Results and discussion

3.1. Variables affecting HS sampling

Preliminary experiments were performed in order to study different parameters that might affect the generation of volatiles in the headspace.

The analyte concentration in the gas phase is given by the following equation:

$$C_g = \frac{C_0}{K + \beta}$$

where C_g is the concentration of analyte in the gas phase; C_0 is the initial concentration in the sample, K is the equilibrium constant

or partition coefficient, and β is the ratio of the volume of the two phases—the gas phase and the sample (or condensed) phase—[5]. C_g can be modified by varying the value of K and of β .

The value of β can be modified readily by varying the sample volume or the size of the vial. In this work, 20-mL vials were used to facilitate the shaking and mixing of the reagents for the derivatization reaction with a vortex device. Thus, care was taken to prevent splashing of the septum and contamination of the needle of the headspace sampler. To increase C_g , the value of β should be reduced and hence the volume of the condensed phase should be increased. However, volumes greater than 10 mL ($\beta = 1$) showed the above problem of possible contamination. In the end, a sample volume of 5 mL was selected; that is, a β ratio of 3. The decrease in the analytical signal for the four compounds with respect to $\beta = 1$ ranged between 42% for the 2-chlorophenyl acetate and 25% for the 2,4,6-trichlorophenyl acetate, an acceptable drawback in preventing contamination of the system.

Regarding the value of K , corresponding to the ratio of the analyte concentrations in equilibrium in the sample phase and the gas phase, this is proportional to the following term [5]:

$$K \propto \frac{1}{p_i^0 \times \gamma_i}$$

where p_i^0 is the partial pressure of the analyte, and γ_i is its activity coefficient. This parameter can be modified by varying the equilibration temperature or the ionic strength of the medium.

As the equilibration temperature we chose 90 °C, an adequate value since we were using an aqueous system, which provides a low value of K with respect to this parameter and hence high concentrations in the gas phase of the headspace.

The variation in the activity coefficient (γ_i), which describes the intermolecular interactions between the solute and the solvent, was studied by modifying the sample matrix. It is of interest to reduce the value of K by increasing that of the activity coefficient. A low K value indicates a reduction in the solubility of the analyte in the matrix, with an increase in concentration in the headspace. In the case of aqueous samples, and with polar compounds, this effect can be achieved by the addition of an electrolyte to the medium; that is, with the salting-out technique. For this to be effective, high electrolyte concentrations are necessary.

The signals obtained when no electrolyte was added to the vial and those observed after the addition of NaCl in supersaturation conditions (2.5 g in 5 mL) were compared. Increases in the analytical signal of between 4.4 times for the 2,4,6-trichlorophenyl acetate and 5.7 times for the 4-chloro-3-methylphenyl acetate were observed and hence we chose to work under NaCl supersaturation conditions.

Finally, the influence of shaking the vials in the headspace oven during the equilibration period with a view to facilitating the passage of volatile species to the gas phase was checked. The signals obtained with and without shaking were compared and an increase was observed in the analytical signal. This ranged from 27% for the case of 2,4,6-trichlorophenyl acetate to 58% for 2,4-dichlorophenyl

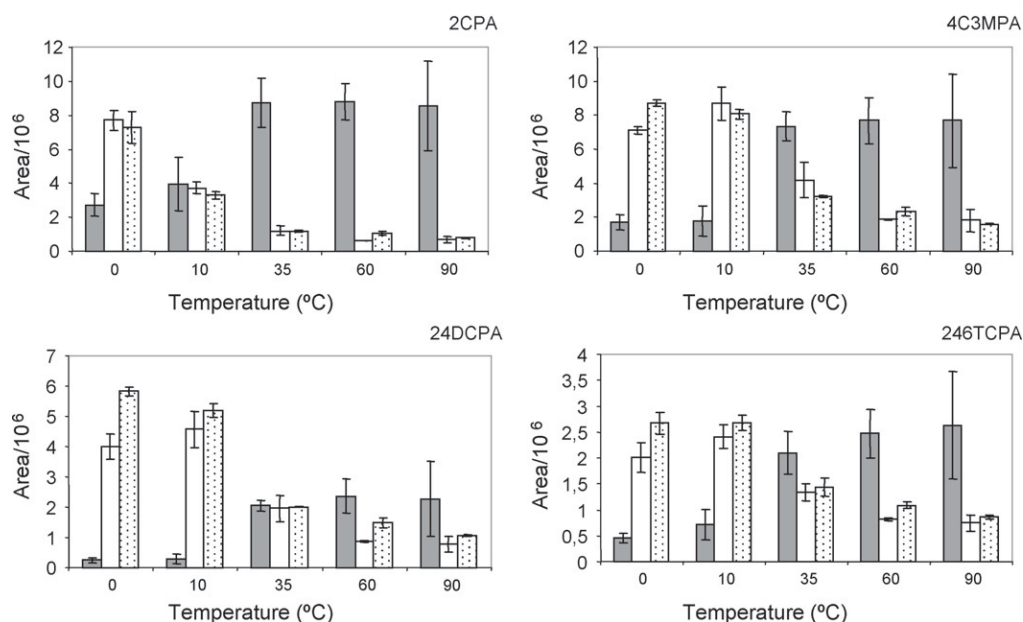


Fig. 2. Signals obtained for each compound for different initial working temperatures and for different liners. Bars represent mean values ($n=3$), error bars denote standard deviations. Solid bars: Tenax-TA liner; empty bars: glass wool liner; dotted bars: empty baffled liner.

acetate when the vials were shaken. Accordingly, this was chosen as the working mode.

3.2. Derivatization reaction

The acetylation of chlorophenols has been used previously for their determination [13–15]. The variables studied for the optimization of this step in this particular system were the basic medium used, the amount of derivatizing reagent and the amount of methanol. Here we worked with two different basic media—a 0.1-M $K_2CO_3/KHCO_3$ buffer and a 0.4-M solution of $KHCO_3$ —observing similar signals. This indicates that a pH above 8.4 is sufficient for the proportion of phenoxide ions to be high and for the reaction to take place. It was observed that upon increasing the concentration of the buffer (up to 0.4 M) the signals decreased; this can be attributed to the fact that in this case the final pH of the medium was too basic to ensure the stability of the derivatized compounds, since they are hydrolyzed [19]. We thus decided to work with the basic solution of 0.4 M $KHCO_3$.

Acetic anhydride at amounts between 20 and 100 μ L was added to 5 mL of sample. The best results were obtained with 100 μ L of reagent, such that this volume was used. Finally, a study was made of the volume of methanol added to the HS vial, since this was the solvent in which the stock solutions of the analytes were made up and it is volatile. Maintaining the volume of sample constant, amounts of methanol ranging between 10 and 50 μ L were added and it was observed that no significant changes occurred in the analytical signal. We decided to work with 50 μ L.

3.3. PTV-GC-MS

3.3.1. Optimization of the programmed temperature vaporizer

The above two optimization studies were carried out using a glass wool liner in the programmed temperature vaporizer. However, in the optimization of variables affecting the PTV, in solvent vent injection mode, a study was initially performed in which the signals generated by the analytes of interest with three different types of liners were compared. The liners used were an empty baffled liner and two liners packed with the above mentioned glass wool and with a chemical sorbent (Tenax-TA), respectively. This

study was combined with the optimization of the initial temperature (or trapping temperature) in the PTV. The values studied were 0, 10, 35, 60 and 90 °C.

As shown in Fig. 2, in the case of the empty baffled liner, as the temperature increased the signal declined, indicating that the retention of the analytes in the liner was lower, part of them being removed with the solvent during the purge step. Regarding the glass wool liner, the trend was similar for 2-chlorophenyl acetate, and slightly different for the other three compounds, that were retained in the liner during the purge step at 0 and 10 °C, but were partially removed at higher temperatures. In the case of the Tenax-TA liner, the behaviour was different: as the temperature increased so did the signal up to a given value, after which it remained almost constant. A possible explanation for this could be that this liner retains the compounds to an excessive extent at low temperatures, which hinders their later desorption at the maximum working temperature selected (250 °C).

In light of these results, the optimum initial temperature values chosen were 10 °C for the glass wool and empty liners, and 90 °C for the case of the Tenax-TA liner.

Even though the results would improve for 2-chlorophenyl acetate (when using the glass wool or the empty liners) at the lowest initial temperature: 0 and 10 °C was preferred in order to avoid an excessive expense of the CO_2 used for cooling the PTV inlet, and to reduce the interval between samples, because the time required to stabilize the temperature in the PTV increases considerably at very low temperatures.

A study was also made of the repeatability of the signals of the four compounds at the optimum temperatures. To accomplish this, we calculated the relative standard deviation of three measurements for each temperature and type of liner (Table 2). It was seen

Table 2
Relative standard deviation (RSD, %) for each liner at the optimum working temperature.

T (°C)	Liner	2CPA	4C3MPA	24DCPA	246TCPA
10	Glass wool	8.8	11.2	11.4	9.6
10	Empty baffled	6.3	4.2	3.7	5.5
90	Tenax-TA	33.1	46.9	33.7	30.0

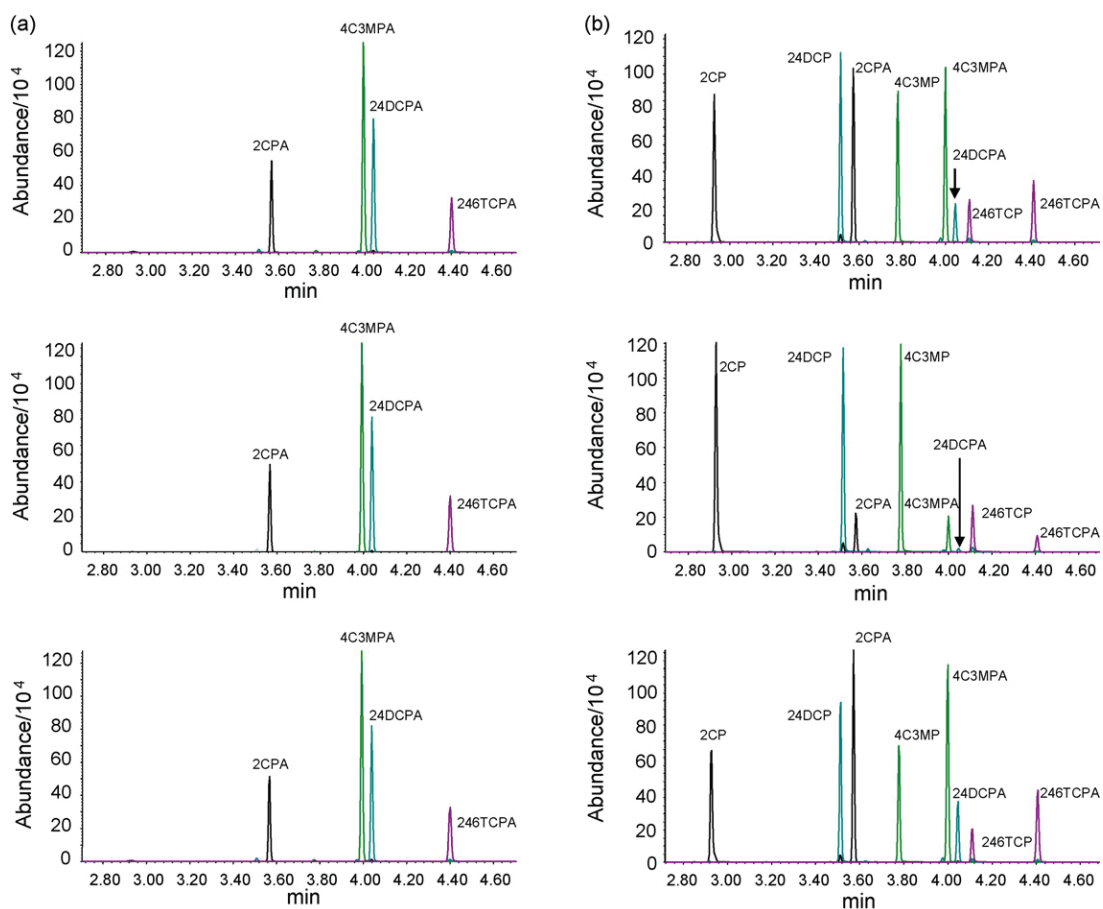


Fig. 3. Comparison of the signals obtained with the empty liner (a) and the Tenax-TA liner (b) at their optimum initial working temperature, 10 and 90 °C respectively (three replicates). 2CP: 2-chlorophenol; 2CPA: 2-chlorophenyl acetate; 24DCP: 2,4-dichlorophenol; 24DCPA: 2,4-dichlorophenyl acetate; 4C3MP: 4-chloro-3-methylphenol; 4C3MPA: 4-chloro-3-methylphenyl acetate; 246TCP: 2,4,6-trichlorophenol; 246TCPA: 2,4,6-trichlorophenyl acetate.

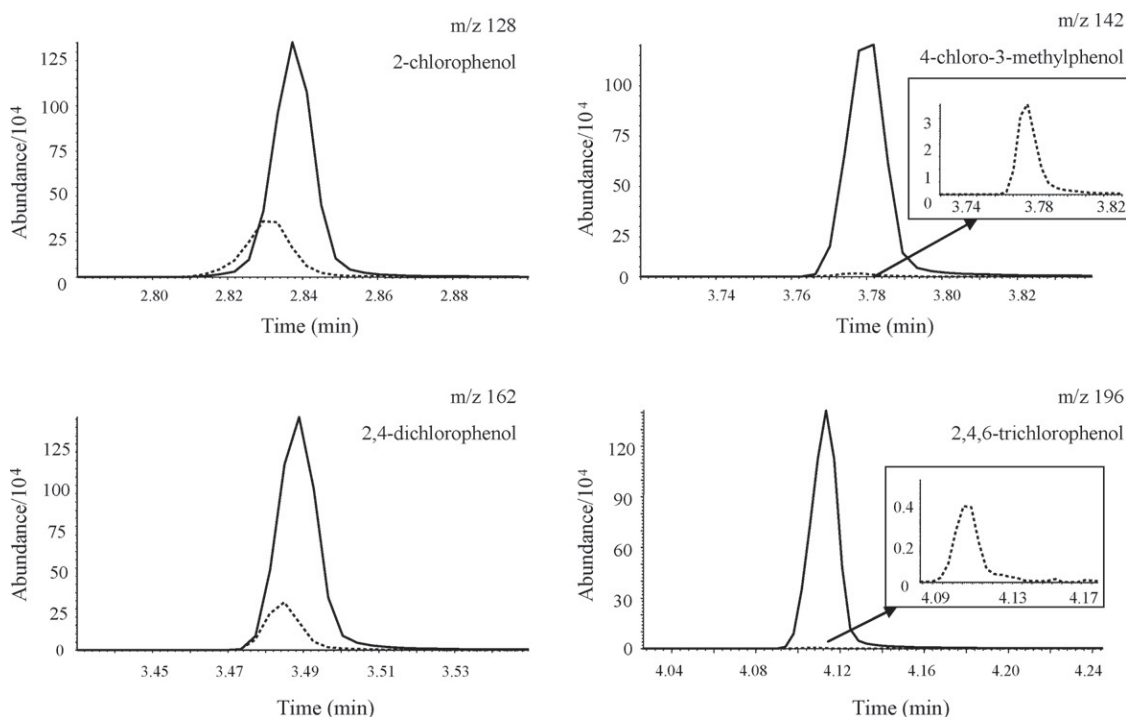


Fig. 4. Comparison of signals of the compounds obtained without derivatization on preparing a sample in acid medium, pH adjusted to 3.0 with phosphoric acid (dotted line) and when the proposed derivatization reaction was used (solid line).

Table 3

S/N ratios for the glass wool liner and the empty liner, both at an initial working temperature of 10 °C.

Liner	2CPA	4C3MPA	24DCPA	246TCPA
Glass wool	5520	3688	5837	1521
Empty baffled	9005	11161	8452	2347

that in the case of the Tenax-TA liner irrepeatability was exceptionally high.

It was also observed that on performing successive injections with the same Tenax-TA liner, apart from the signals of the derivatized compounds the chromatograms also exhibited signals corresponding to the non-derivatized compounds, with varying intensities. This could be accounted for if the derivatized compounds, on reaching the injector, interacted with the adsorbent of the liner, thereby leading to breakage of ester bonds. In Fig. 3, a comparison is made of the chromatograms obtained with the Tenax-TA liner (three replicates), and the empty liner (three replicates) respectively. In the chromatograms obtained with the empty liner, no signals of the non-derivatized compounds are observed, and there is good repeatability.

To rule out the possibility that the non-derivatized compounds being detected might be those extracted directly into the headspace, two series of measurements were carried out. Fig. 4 compares the signals generated by the chlorophenols not subjected to a previous reaction and under optimum conditions of transfer to the headspace—that is, in acid medium (pH adjusted to 3.0 with phosphoric acid)—with those corresponding to the non-derivatized chlorophenols detected in the chromatograms when the proposed procedure was applied.

It may be seen that the signals were much higher when the derivatization reaction was performed, especially in the case of 4-chloro-3-methylphenol and 2,3,6-trichlorophenol, confirming that *in situ* acetylation in the HS vials had taken place and hence that what had been extracted from the sample were the derivatized compounds. Later, through interaction with the Tenax-TA liner the ester bonds are broken, such that the non-derivatized compounds are detected in the chromatograms corresponding to successive injections.

To our knowledge, there are no references in the literature to this kind of breakage when Tenax-TA is used as a packing material for liners in gas chromatography. Despite this, it has been reported that this polymer can lead to reactions of reactive species with compounds adsorbed on the surface of the adsorbent [20] when in-air analysis by adsorptive enrichment and thermal desorption is used, and that decomposition processes of adsorbed compounds can take place on the surface of the sorbent [21]. Additionally, a method for the determination of trichloroacetic acid in water has been reported [22]; it uses thermal decarboxylation to chloroform in the Tenax-TA packed liner of a PTV injector. In this case, despite obtaining signals of the non-derivatized compounds that are higher or similar to those of the derivatized compounds when the empty liner is used, the observed irrepeatability does not allow this mode to be used.

Accordingly, selection of the most suitable liner focused on the glass wool and the empty liners. We decided to work with the empty liner since this provided the best S/N ratios (Table 3). The optimization of the variables affecting the derivatization step was repeated for this liner, with similar results.

Having selected the best liner and the initial working temperature, we then performed a study of the other variables in order to fix the optimum PTV conditions. The variables affecting the elimination of the solvent are the time during which it is eliminated, called the purge time, and the purge flow, or flow of carrier gas that passes through the injector while the solvent is being elimi-

nated. The first variable was studied within a range between 1.55 and 2 min. Maximum signals for all the compounds were obtained for a value of 1.65 min. For higher values a decrease in the signals occurred since part of the analytes were eliminated with the solvent. For lower values, the signals also decreased since it was not possible to achieve complete elimination of the solvent. Regarding the flow of the purge gas, values of 30, 50 and 70 mL/min were studied. The maximum signals were obtained for 50 mL/min, a decrease being seen for higher and lower values for the above-described reason.

Finally, a study was made of the injection time. Thermal desorption of the compounds was achieved by use of the temperature ramp described in Section 2 (12 °C/s). In this, the temperature of the liner was raised from 10 to 250 °C in 0.33 min. Values between 0.5 and 2 min were studied, the maximum signals being obtained for 1 min. This time was sufficient for complete injection of the sample. For shorter times, sample injection was partial.

3.3.2. Optimization of the chromatographic separation

The temperature ramps chosen for the chromatographic separation were the maximum ones permitted by the oven of the chromatograph. Under these conditions, the only variable optimized was the initial column temperature. The values studied were 45, 60, 75 and 90 °C. As could be expected, a broadening of the peaks occurred as the initial column temperature increased. For 45 and 60 °C, hardly any differences were seen, but the working temperature of 60 °C was selected in order to reduce the chromatographic runtime.

With these experimental conditions, it was possible to separate the four derivatized chlorophenols in less than 4.8 min. The half-height peak widths were 0.9 s for the 2-chlorophenyl acetate, 0.72 s for that 4-chloro-3-methylphenyl acetate, 0.66 s for the 2,4-dichlorophenyl acetate and 0.66 s for the 2,4,6-trichlorophenyl acetate. These values correspond to fast/very-fast chromatography.

3.3.3. Data acquisition modes

In all cases, the above results corresponded to the analysis of the chromatograms of the extracted ion obtained in scan mode for an *m/z* range between 25 and 350 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.

The windows selected for the SIM data acquisition mode are reported in Section 2. In this acquisition mode, it may be seen that for all compounds a decrease in noise occurred for each extracted ion. This decrease in noise generated an approximately threefold improvement in the S/N ratios, allowing a decrease in the limits of detection of the method, such that this mode was chosen to collect the calibration curves and the analytical parameters of the method.

3.4. Evaluation of the HS-PTV-fast-GC-MS method

Calibration straight lines were obtained with seven concentration levels ranging from 0.1 to 5 µg/L. Each level was analyzed in triplicate.

As the analytical signal, the area of the peaks obtained upon extracting, in each case, the most abundant *m/z* ratio of each of the compounds of interest was used: *m/z* 128 for 2-chlorophenyl acetate; *m/z* 142 for 4-chloro-3-methylphenyl acetate; *m/z* 162 for 2,4-dichlorophenyl acetate; 196 for 2,4,6-trichlorophenyl acetate. The analytical characteristics of the method are shown in Table 1. All the calibration models displayed linear behaviour, with values of the correlation coefficient (R^2) higher than 0.99. The validity of the model generated was checked using ANOVA analysis, and none of the models generated showed a lack of fit. Repeatability, for a concentration of 1.0 µg/L, was satisfactory, with relative standard

Table 4

Comparison of the detection limits of other methods found in the literature with those obtained in the present.

Technique	Reagent	DL (ng/L)				Ref.
		2CP	4C3MP	24DCP	246TCP	
LLE-GC-MS	Diazomethane	15	–	10	10	[12]
LLE-PTV-GC-MS				<10		[23]
DLLME-GC-ECD	Ac ₂ O	1000	–	500	15	[24]
SPE-GC-AED		43	60	37	17	[25]
SPE-GC-MS-MS	Ac ₂ O	47	37	30 ^a	37	[13]
SPE-GC-MS	MTBSTFA	10	15	10	5	[9]
HS-SPME-GC-MS	Ac ₂ O	4	1	1	1	[14]
SPME-GC-ECD	PFBCI	500	800	50	10	[26]
SBSE-PTV-GC-MS	MTBSTFA	–	23	65	6	[27]
SBSE-PTV-GC-MS	Ac ₂ O	200	200	100	100	[15]
MIMS	Ac ₂ O	–	1000	–	1000	[28]
HS-PTV-GC-MS	Ac₂O	5	8	6	5	^b

LLE: liquid–liquid extraction; DLLME: dispersive liquid–liquid microextraction; SPE: solid-phase extraction; SPME: solid-phase microextraction; SBSE: stir-bar sorptive extraction; MIMS: membrane inlet mass spectrometry; ECD: electron capture detection; AED: atomic emission detection.

^a 24DCP + 25DCP.

^b Method proposed in this work.

deviation values lower than 6% for three of the four compounds. The highest value was obtained for 2-chlorophenyl acetate (16%). This was the most volatile compound, such that it was the one most affected by fluctuations in the system.

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

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

where σ is the standard deviation obtained upon measuring 10 replicates of a sample with an S/N ratio of approximately 3; S is the slope of the calibration curve, and 3.3 is Student's t ($n - 1, 0.99$).

The quantification limits (QLs) were estimated with the equation:

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

where σ and S are the same as in the previous expression. The quantification limits obtained are shown in Table 1.

Table 4 compares the detection limits with those obtained using other methods for the determination of chlorophenols in aqueous samples that also use derivatization reactions prior to gas chromatography. The proposed method can be compared favourably with all of them; only in the case of the use of HS-SPME were lower limits obtained, although the HS-PTV-GC-MS method has the advantage of being performed continuously as from the moment when the vial is introduced in the headspace sampler.

Finally, to check the prediction capacity of the model, three different types of water sample were analyzed: tap water, river water and sea water. The samples were not subjected to any kind of previous manipulation.

It was seen that without spiking the samples, the signals of the compounds were similar to those of the blanks. Accordingly, it was decided to spike the samples at two concentration levels: 0.5 and 1.0 $\mu\text{g/L}$. Table 5 shows the results, which indicate that the method is suitable for the determination of chlorophenols in water sam-

ples at these concentration levels, with poorer results for the most volatile analyte—2-chlorophenol—whose irrepeatability was also higher than that of the other three compounds.

4. Conclusions

In the present work it was possible to increase sensitivity in the coupling of a headspace sampler with a gas chromatograph for the analysis of semi-volatile compounds such as chlorophenols through use of a derivatization reaction in the HS vial and of a programmed temperature vaporizer inlet for transfer of the headspace to the chromatographic column. Injection in solvent vent mode allows the compounds to be focused in the liner and affords narrow peaks that are typical of fast/very-fast chromatography.

The instrumental configuration used in this study has the advantage that extraction-preconcentration and the instrumental measurement of the analytes are carried out on-line, with no need for intermediate steps, as occurs when working with other modes of sample introduction such as SPME or SBSE.

The choice of a suitable liner for the PTV is important. In the case of using a liner packed with Tenax-TA, the repeatability of the method decreases considerably, owing to the degradation of the derivatized chlorophenols at the surface of the adsorbent.

The method proposed for the determination of chlorophenols is highly sensitive, with detection limits ranging from 5 to 8 ng/L. The linearity, repeatability and accuracy of the method were analyzed and proved to be satisfactory.

Acknowledgements

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 (Project SA112A08) for this research.

Casas Ferreira A.M. acknowledges an FPU grant from the Spanish Ministry of Education.

References

- [1] B. Kolb, J. Chromatogr. A 842 (1999) 163.
- [2] D.A. Lambropoulou, I.K. Konstantinou, T.A. Albanis, J. Chromatogr. A 1152 (2007) 70.
- [3] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1175 (2007) 106.
- [4] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández Laespada, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1141 (2007) 123.
- [5] B. Kolb, L.S. Ettre, Static Headspace-Gas Chromatography, Wiley Interscience, Hoboken, NJ, 2006.

Table 5

Concentrations predicted by the model.

Sample	Level	2CP	4C3MP	24DCP	246TCP
Tap water		0.7 ± 0.3	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.01 ± 0.09
River water	1 $\mu\text{g/L}$	0.7 ± 0.3	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.97 ± 0.09
Sea water		1.3 ± 0.3	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.03 ± 0.08
Tap water		0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.51 ± 0.08
River water	0.5 $\mu\text{g/L}$	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.50 ± 0.08
Sea water		0.7 ± 0.3	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.44 ± 0.08

- [6] J.L. Pérez Pavón, M. del Nosal Sánchez, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1202 (2008) 196.
- [7] J.L. Pérez Pavón, S. Herrero Martín, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1194 (2008) 103.
- [8] D. Štajnbaher, L. Zupančič-Kralj, J. Chromatogr. A 1190 (2008) 316.
- [9] T. Heberer, H.J. Stan, Anal. Chim. Acta 341 (1997) 21.
- [10] M. Saraji, M. Bakhsi, J. Chromatogr. A 1098 (2005) 30.
- [11] M. Amijee, J. Cheung, R.J. Wells, J. Chromatogr. A 738 (1996) 43.
- [12] A. Geibler, H.F. Schöler, Water Res. 28 (10) (1994) 2047.
- [13] I. Turnes, I. Rodríguez, C.M. García, R. Cela, J. Chromatogr. A 743 (1996) 283.
- [14] M. Llompарт, M. Lourido, P. Landín, C. García-Jares, R. Cela, J. Chromatogr. A 963 (2002) 137.
- [15] L. Montero, S. Conradi, H. Weiss, P. Popp, J. Chromatogr. A 1071 (2005) 163.
- [16] L.H. Keith (Ed.), Compilation of Sampling Analysis Methods, US Environmental Protection Agency, Boca Raton, FL, 1991.
- [17] Guidelines for Drinking Water Quality, 2nd ed., vol. 2, Health Criteria and Other Supporting Information, 1996, p. 940 and Addendum to vol. 2, 1998, p. 281, World Health Organization, Geneva.
- [18] Enhanced ChemStation, G1701CA, Version C00.00, Agilent Technologies, 1999, CA, United States.
- [19] F.A. Carey, R.J. Sundberg, Advanced Organic Chemistry, Part A. Structure and Mechanisms, 4th ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2000.
- [20] K. Dettmer, W. Engewald, Anal. Bioanal. Chem. 373 (2002) 490.
- [21] C. Coeur, V. Jacob, I. Denis, P. Foster, J. Chromatogr. A 786 (1997) 185.
- [22] D. Drechsel, K. Dettmer, W. Engewald, Th. Bittner, J. Efer, Chromatographia 54 (2001) 151.
- [23] A. Vermeulen, K. Welvaert, J. Vercammen, J. Chromatogr. A 1071 (2005) 41.
- [24] N. Fattahi, Y. Assadi, M. Hosseini, E. Jahromi, J. Chromatogr. A 1157 (2007) 23.
- [25] I. Rodríguez, M.I. Turnes, M.C. Mejuto, R. Cela, J. Chromatogr. A 721 (1996) 297.
- [26] F. Bianchi, M. Careri, C. Mucchino, M. Musci, Chromatographia 55 (2002) 595.
- [27] J. Quintana, R. Rodil, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, J. Chromatogr. A 1174 (2007) 27.
- [28] M. Ojala, R. Ketola, V. Virkki, H. Sorsa, T. Kotiaho, Talanta 44 (1997) 1253.



V

**UTILIZACIÓN DE UNA REACCIÓN DE
DERIVATIZACIÓN *IN SITU* PARA LA
DETERMINACIÓN DE IBUPROFENO EN
MUESTRAS ACUOSAS MEDIANTE EL
ANÁLISIS POR HS-PTV-GC-MS**

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha generado una gran preocupación acerca de la presencia de compuestos farmacéuticos en el agua. Estos compuestos están incluidos en lo que se conoce actualmente como contaminantes emergentes. Su presencia puede explicarse como consecuencia de su amplio uso médico y de la ineficacia de las plantas de tratamiento de agua residual para eliminarlos [1]. En algunos casos, cerca del 95 % de la dosis suministrada a un paciente puede ser excretada sin metabolizar, con lo que llega al medio ambiente a través de las aguas residuales domésticas [2]. A ello se añaden los fármacos caducados que los usuarios tiran al inodoro. Estos compuestos son bioacumulativos y ejercen efectos sobre los ecosistemas acuáticos y terrestres. Esto es debido a que han sido específicamente diseñados para atravesar las membranas biológicas y para ser persistentes, con el fin de poder ejercer su efecto curativo antes de ser degradados en el organismo [2].

Los antiinflamatorios no esteroideos (*non-steroid anti-inflammatory drugs*, NSAIDs) forman un grupo de fármacos ampliamente utilizados como agentes analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios. Una de las clases de NSAIDs más importantes son los derivados del ácido 2-arilpropiónico, o profenos, que incluyen, entre otros, al ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, fenoprofeno y ketorolac. De todos ellos, el ibuprofeno se encuentra entre los fármacos más consumidos en el mundo [3], encontrándose residuos del mismo en ríos, lagos y arroyos. Se ha observado que el ibuprofeno es antibactericida [2] y se han detectado alteraciones inducidas por este fármaco en organismos acuáticos, tales como retardo en el crecimiento o alteraciones cardíacas [4]. En los seres humanos, se ha ligado el ibuprofeno a problemas gástricos [5] o dermatológicos [6].

Se han propuesto varios métodos analíticos para la cuantificación de NSAIDs en matrices medioambientales, utilizando tanto cromatografía de gases (GC) y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) como

electroforesis capilar, utilizando detectores convencionales [7-9] o espectrometría de masas [10,11]. Como consecuencia de la polaridad y poca volatilidad de estos analitos, es necesario utilizar una reacción de derivatización previa cuando el análisis se lleva a cabo por cromatografía de gases. Por ello, la cromatografía de líquidos se ha utilizado con mayor frecuencia.

En la literatura pueden encontrarse varios trabajos de revisión que tratan sobre los diferentes métodos analíticos utilizados para la determinación de compuestos farmacéuticos, incluyendo los NSAIDs, en muestras acuosas [12,13]. De forma más específica, se han llevado a cabo varias comparaciones entre las técnicas analíticas utilizadas para la determinación de NSAIDs en muestras acuosas [14,15].

Como consecuencia de los niveles tan bajos de concentración que se encuentran normalmente en las muestras medioambientales, es necesario recurrir a una etapa de preconcentración previa al análisis instrumental. La técnica de preconcentración que más se ha utilizado ha sido la extracción en fase sólida (SPE) [16-18]. Aunque esta técnica reduce los volúmenes de disolventes orgánicos en comparación con la extracción líquido-líquido tradicional, requiere un elevado tiempo de trabajo. En los últimos años se ha hecho un mayor uso de aquellas técnicas que minimizan el volumen de disolventes orgánicos, tales como la microextracción en fase sólida (SPME) [19], la microextracción con disolventes [20], la extracción por adsorción en barra agitadora (SBSE) [21] y la extracción asistida por membranas [10].

Cuando la determinación se lleva a cabo por cromatografía de gases, las reacciones de derivatización que más se han utilizado han sido las de sililación, utilizando N-metil-N-(tert-butildimetilsilil)trifluoroacetamida (MTBSTFA) o N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) como agentes derivatizantes [18,22,23], y las de alquilación, utilizando diazometano [24]. En este último caso, es necesario plantear nuevas

alternativas ya que se ha demostrado que el diazometano es altamente tóxico, cancerígeno y explosivo. Dentro de estas nuevas propuestas se encuentran haluros de pentafluorobencilo, en presencia de un catalizador básico [25,26], clorometanoato de metilo [3] o metanol en presencia de trifluoruro de boro [16]. Se ha propuesto la utilización de hidróxidos de tetrametilamonio (TMAH) y trimetilsulfonio (TMSH) y sales de tetrabutilamonio (TBA) para llevar a cabo el proceso de derivatización en el propio puerto de inyección [27]. En todos los casos, es necesario extraer los compuestos de interés de la matriz acuosa a un medio orgánico o hidro-orgánico, donde tiene lugar la reacción. Una vez que ésta ha tenido lugar, son necesarias varias etapas de extracción y limpieza del extracto antes de su introducción en el sistema cromatográfico.

Otra reacción de derivatización propuesta es la formación de amidas mediante la reacción del ácido carboxílico con una carbodiimida y con una amina (2,2,2-trifluoroetilamina), directamente en medio acuoso [7]. Sin embargo, los límites de detección obtenidos cuando se utiliza esta reacción son bastante altos, del orden de los mg/L.

2. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo se encuentra dentro de la línea planteada en el capítulo IV de la memoria, en el que se propuso la utilización de la generación de espacio de cabeza con una reacción de derivatización *in situ* en el propio vial para la determinación de clorofenoles en muestras acuosas. Como sistema de inyección en el sistema cromatográfico se propuso un inyector de temperatura programada. Nuestro grupo de investigación ha adquirido experiencia en la utilización de este tipo de inyectores para la determinación de compuestos orgánicos en diferentes matrices [29-31].

El objetivo del presente trabajo es proponer un método simple basado en la generación de espacio de cabeza para la determinación de ibuprofeno en muestras acuosas. Se ha seleccionado este compuesto como representativo de la presencia de compuestos farmacéuticos en muestras medioambientales. Para conseguir dicho objetivo, se propone una reacción de derivatización *in situ* con metanol en medio ácido. La manipulación de muestra es mínima, ya que no es necesario extraer los analitos de interés ni antes ni después de la reacción.

Esta es la primera vez que se propone esta metodología para la determinación de este tipo de compuestos. Las medidas instrumentales se llevan a cabo utilizando el acoplamiento de un generador de espacio de cabeza (HS) con un inyector de temperatura programada (PTV), con un cromatógrafo de gases (GC) y con un espectrómetro de masas (MS).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos y disoluciones estándar

El patrón de ibuprofeno utilizado en este trabajo fue suministrado por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). En la tabla 1 se resumen algunas propiedades del analito estudiado. El metanol y el ácido sulfúrico fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania) y el cloruro sódico por Scharlau (Barcelona, España). Se preparó una disolución de ibuprofeno de 1000 mg/L en metanol, la cual se mantuvo a una temperatura de 4 °C en una nevera. Esta disolución se utilizó para dopar las muestras acuosas a los diferentes niveles de concentración requeridos. La optimización del método se llevó a cabo con muestras de agua ultrapura dopadas a una concentración de ibuprofeno de 100 µg/L.

Tabla 1: *Propiedades del ibuprofeno*

	Analito
	Ibuprofeno
Función	Analgésico, antirreumático
Solubilidad en agua (µg/L)	21
Log K _{o/w}	3.97

3.2. Procedimiento analítico

En la figura 1 se resume el procedimiento analítico propuesto, incluyendo el paso de derivatización en el vial del generador de espacio de cabeza, la inyección utilizando un inyector de temperatura programada, la separación del derivado metilado del ibuprofeno mediante GC y la detección por espectrometría de masas.

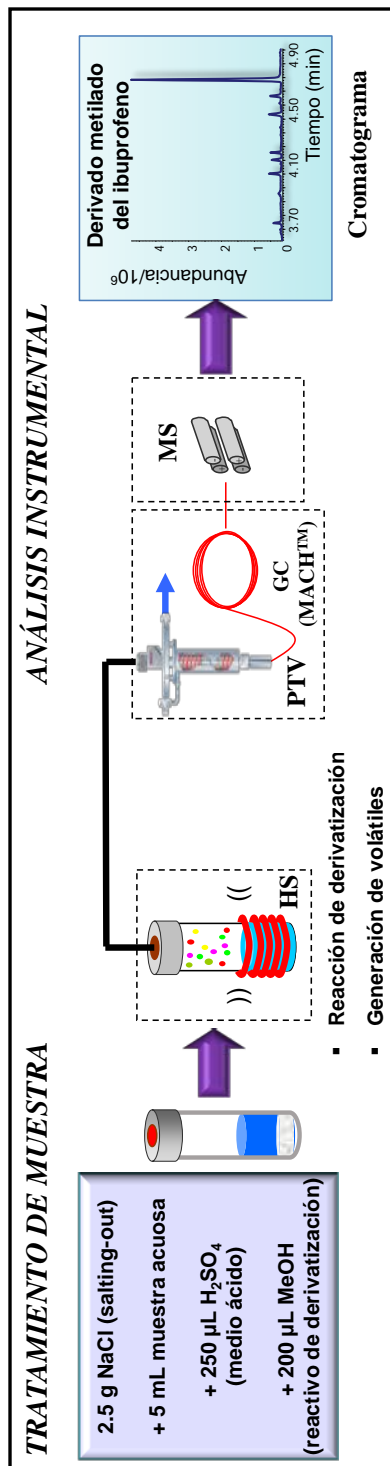


Figura 1: Diagrama del proceso analítico propuesto

3.2.1. Reacción de derivatización

En un vial de 20 mL se añaden 2.5 g de NaCl. A continuación se añaden 5 mL de una disolución acuosa dopada con ibuprofeno a una concentración determinada, 250 μ L de ácido sulfúrico, para fijar un medio fuertemente ácido, y 200 μ L de metanol, como reactivo de derivatización. El vial se cierra herméticamente y se coloca en el generador de espacio de cabeza.

3.2.2. Generación de espacio de cabeza

El muestreo mediante generación de espacio de cabeza se llevó a cabo con el mismo muestreador que en el capítulo anterior (modelo A 7694, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). El sistema de muestreo consta de los siguientes elementos: una aguja de acero inoxidable, una válvula de seis vías modelo 316-SS con un bucle de níquel (mantenida a una temperatura de 120 °C) y dos válvulas solenoides (de presurización y de purga). Las condiciones experimentales del HS fueron las siguientes: temperatura del horno, 90 °C; tiempo de equilibrado, 60 min; tiempo entre muestras, 10.5 min; agitación de la muestra a la velocidad máxima permitida por el sistema; tiempo de presurización del vial, 0.30 min; presión del vial, 12.5 psi; tiempo de llenado del bucle, 0.15 min; tiempo de equilibrado del bucle, 0.02 min; tiempo de inyección, 1 min. El HS se acopló con un PTV a través de una línea de transferencia termostataada, que se mantuvo a una temperatura de 125 °C. Como gas portador se utilizó helio N50 (grado de pureza del 99.995 %; Air Liquide).

3.2.3. Inyector de temperatura programada

Todos los experimentos se llevaron a cabo con un inyector de temperatura programada, PTV (CIS-4, Gerstel, Baltimore, MD, USA). Se utilizaron tres tipos de *liners*: uno vacío en zigzag y dos empaquetados con

diferentes tipos de rellenos, lana de vidrio y Tenax-TA. En el método optimizado, el modo de inyección utilizado fue *solvent-vent* con un *liner* de lana de vidrio. El enfriamiento del inyector se consigue utilizando CO₂ líquido.

La temperatura inicial del inyector se mantuvo a 70 °C. El flujo de venteo se fijó en 100 mL/min y la presión de venteo en 5.00 psi. Como tiempo de purga, se selecciono 1.45 min. La temperatura inicial del *liner* se mantuvo durante 1.50 min como mecanismo de seguridad para que la rampa de calentamiento del mismo no empezará antes de que la válvula de *split* estuviera cerrada. Una vez que la etapa de venteo ha finalizado, la válvula de *split* se cierra y el *liner* se calienta rápidamente a una velocidad de 12 °C/s hasta 250 °C, produciéndose la transferencia de los analitos a la columna cromatográfica (0.5 min). Posteriormente, la válvula de *split* vuelve a abrirse y la temperatura del *liner* se mantiene a 250 °C durante 3 min. Las condiciones experimentales se resumen esquemáticamente en la figura 2.

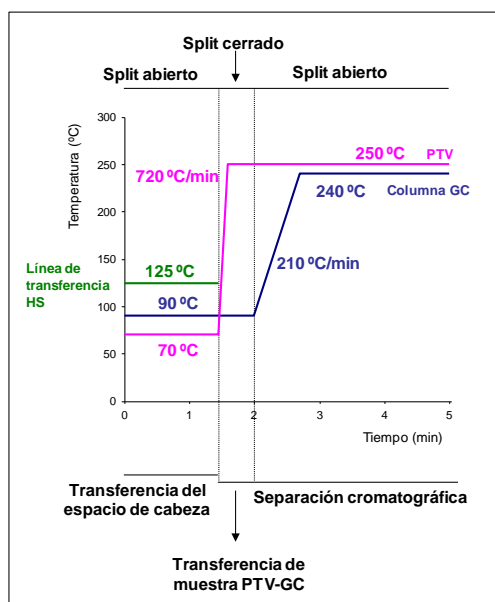


Figura 2: Secuencia de eventos implicada en la inyección solvent-vent

3.2.4. Cromatografía de gases rápida

El cromatógrafo de gases utilizado fue un Agilent 6890 equipado con un módulo de calentamiento acelerado de columna (MACH™, Gerstel). Este módulo se monta en la parte exterior de la puerta del cromatógrafo. Consiste en una carcasa en cuyo interior está enrollada la columna cromatográfica 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 [32]. Para llevar a cabo el análisis cromatográfico, se utilizó una columna capilar de baja polaridad DB-VRX (20 m x 0.18 mm x 1 µm, rango de trabajo -10 – 260 °C) de J&W Scientific (Folsom, CA, USA). Como gas portador se utilizó nitrógeno N50 (grado de pureza 99.999 %; Air Liquide). Las dimensiones de la columna, junto con el control del flujo y de las rampas de temperatura en el horno permite que la separación se produzca dentro de lo que se conoce como cromatografía de gases rápida.

El programa de temperaturas del horno (que comienza simultáneamente con la inyección en el PTV) implica una temperatura inicial de 90 °C durante 2 min, esta temperatura se incrementó hasta 240 °C a una velocidad de 210 °C/min y se mantuvo durante 2.29 min (Fig. 2). El cromatógrafo de gases convencional actúa como interfase y se programa una temperatura de 250 °C con el fin de mantener los capilares de conexión a alta temperatura y así evitar la formación de puntos fríos. El tiempo total del cromatograma fue de 5 min.

3.2.5. Espectrómetro de masas

El detector utilizado fue un espectrómetro de masas de tipo cuadrupolar (HP 5973). Se trabajó en la modalidad de impacto electrónico con un voltaje de ionización de 70 eV. La fuente de ionización se mantuvo a una temperatura de 230 °C, y el cuadrupolo a 150 °C. El filamento se mantuvo apagado hasta el minuto 2.50 min del análisis cromatográfico, para protegerlo de la llegada de disolvente. En el modo de adquisición de datos *scan* se registraron las relaciones m/z (masa/carga) entre 25 y 250 uma, la velocidad de registro se fijó en 5.98 ciclos/segundo y se seleccionó un valor umbral de abundancia de 0. Este modo de adquisición se utilizó para llevar a cabo los diferentes estudios de optimización. La identificación del compuesto se realizó por comparación del espectro experimental con el correspondiente 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 un único grupo SIM, que abarcaba todo el cromatograma y que contenía las relaciones m/z más abundantes del derivado metilado del ibuprofeno (161, 177, 220). La adquisición de señales para cada ion se realizó con un tiempo de permanencia de 10 ms.

3.2.6. Análisis de datos

La recogida de los datos cromatográficos se realizó con el software Enhanced ChemStation, G1701CA Ver. C 00.00 de Agilent Technologies [33].

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Variables que afectan a la generación de espacio de cabeza y a la reacción de derivatización

En un primer lugar se estudió si la agitación de los viales durante la reacción y el tiempo de equilibrado influía sobre la señal cromatográfica. Se compararon las señales cuando no había agitación y cuando se agitaban los viales, observándose un incremento de señal del 45 % en el segundo caso.

Se estudió la influencia de la variación del coeficiente de actividad de los analitos modificando la matriz. En el caso de muestras acuosas y analitos polares, esto se consigue añadiendo un electrolito al medio (*salting-out*). Se añadió NaCl a los viales a tres niveles de concentración: sin NaCl; 1.0 g y 2.5 g en 5 mL de muestra (sobresaturación). Los mejores resultados se obtuvieron en condiciones de sobresaturación, con un incremento de señal del 88 % respecto a la obtenida sin adición de sal, y del 49 % respecto a la situación intermedia.

Con relación a las variables que influían en la reacción de derivatización, las que se seleccionaron para su estudio fueron: concentración de ácido, concentración de reactivo de derivatización (MeOH), temperatura del horno del HS y tiempo durante el cual los viales permanecían en el horno. En este tiempo tenía lugar tanto la reacción de derivatización como la generación del espacio de cabeza. En la figura 3 se muestran los resultados de estos estudios.

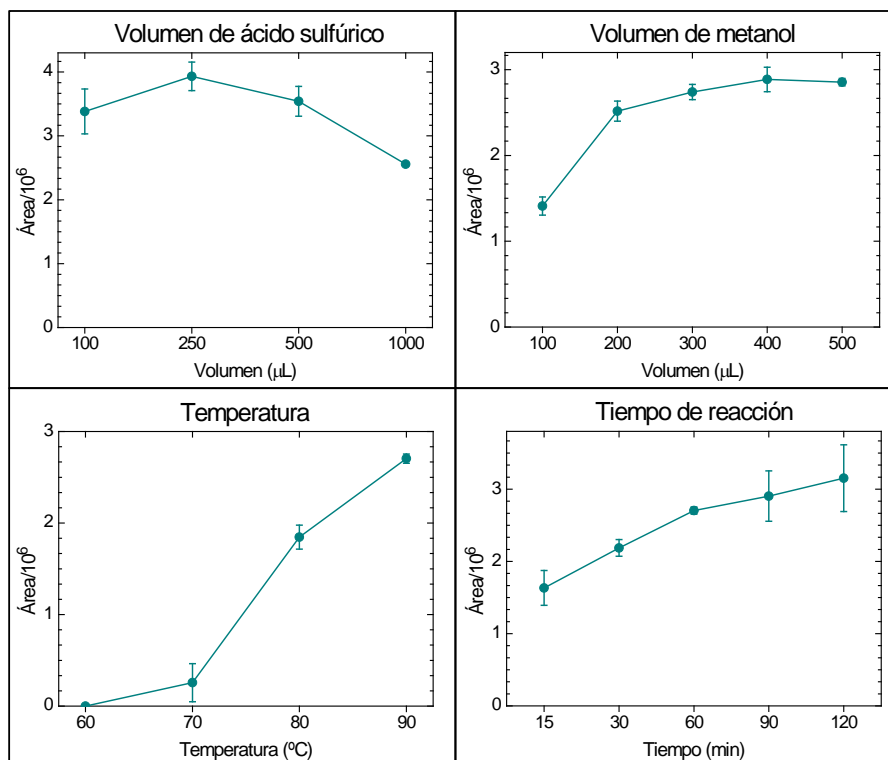


Figura 3: Influencia de las variables de la reacción de derivatización. Cada punto representa el valor medio de tres medidas. Las barras de error representan las desviaciones estándar

A la hora de seleccionar el tipo de ácido, se seleccionó uno que no fuera volátil, ya que se está trabajando con generación de espacio de cabeza. Aunque la determinación de ibuprofeno ya se ha llevado a cabo de forma previa [16] utilizando BF_3 disuelto en exceso de metanol (concentración aproximada, 12 %), en este caso no es posible utilizar este ácido como consecuencia de su volatilidad (punto de ebullición: $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$). Lo mismo ocurre en el caso de otras alternativas tales como BCl_3 (punto de ebullición: $12.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) o HCl , el cual es un gas. Como consecuencia, se seleccionó trabajar con H_2SO_4 , con un punto de ebullición de $340\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se estudió la influencia de la adición de diferentes volúmenes de ácido sulfúrico, en un intervalo de 100 a 1000 μL . Se observó que las señales eran significativamente iguales hasta un volumen de 500 μL , a partir del cual disminuían. Se seleccionó un volumen de trabajo de 250 μL .

Respecto al reactivo de derivatización, se estudiaron diferentes volúmenes de metanol, en el intervalo de 100 a 500 μL . Se seleccionó trabajar con 200 μL , ya que a partir de este volumen no se producía variación en la señal analítica.

Respecto a la temperatura del horno del HS, se estudiaron varios valores, con un máximo de 90 °C. Ésta fue la temperatura seleccionada, que es un valor adecuado cuando se trabaja con sistemas acuosos en el modo HS. Para valores inferiores, la señal disminuía.

Finalmente se estudió el tiempo durante el cual los viales eran calentados en el horno del HS, entre 15 y 120 min. Se seleccionó un tiempo de 60 min, suficiente para generar una señal constante y reproducible. A tiempos mayores el aumento de señal no era significativo, observándose un incremento de la irreproducibilidad. Aunque 60 min pueda parecer un tiempo relativamente alto, hay que considerar que el horno del generador de espacio de cabeza consta de seis posiciones, lo que permite el calentamiento simultáneo de varios viales a la vez. De este modo, es posible solapar los tiempos de generación de espacio de cabeza, de tal forma que, pasados los primeros 60 min, es posible analizar cada muestra cada 10.5 min, tras 5 min de análisis cromatográfico y 5.5 min de recuperación del sistema para alcanzar las condiciones iniciales.

4.2. PTV-GC-MS

4.2.1. Optimización del inyector de temperatura programada

4.2.1.1. Tipo de liner utilizado

En primer lugar se realizó un estudio comparativo de las señales obtenidas con tres tipos de *liners* en el PTV, en el modo de inyección *solvent-vent*. Los *liners* utilizados fueron uno vacío en zigzag y dos *liners* empaquetados con diferentes materiales, lana de vidrio y Tenax-TA. Para cada uno de ellos se estudiaron diferentes temperaturas iniciales o temperaturas de venteo. Estos valores fueron 0, 10, 35, 60 y 90 °C para el *liner* vacío y el *liner* relleno con lana de vidrio, y 0, 10, 35, 60, 90, 110 y 130 °C para el *liner* de Tenax-TA, como consecuencia de su mayor capacidad de retención. El tiempo de venteo y el tiempo de inyección se fijaron en 1.65 y 1 min, respectivamente, y el flujo de venteo se fijó en 50 mL/min. Como puede observarse en la figura 4, en todos los casos la relación señal/ruido (signal-to-noise, S/N) aumentaba al aumentar la temperatura, hasta un determinado valor, a partir del cual disminuía, como consecuencia de la pérdida de analito en la etapa de venteo. Para el caso del *liner* de Tenax-TA, la disminución no era muy acusada, ya que la retención del analito en este *liner* era mucho mayor que para los otros dos. Las mejores relaciones S/N se obtuvieron con los *liners* empaquetados.

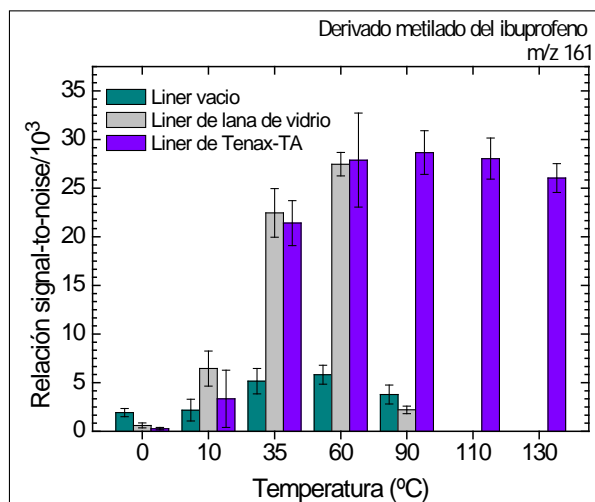


Figura 4: Valores de relación señal/ruido obtenidos para el derivado metilado del ibuprofeno para diferentes temperaturas de venteo y diferentes liners. Las columnas representan valores medios ($n=3$); las barras de error representan desviaciones estándar

Sin embargo, al analizar los cromatogramas obtenidos correspondientes a una muestra de ibuprofeno sometida al proceso de derivatización con el *liner* de lana de vidrio y el *liner* de Tenax-TA (figura 5), se observó que, junto con la señal del derivado metilado del ibuprofeno, aparecían señales de otros compuestos, identificados como ácidos carboxílicos alifáticos lineales. Aunque estas señales, también presentes en los blancos, no interferían con la señal del analito de interés, su magnitud era mayor cuando se trabajaba con el *liner* de Tenax-TA, por lo que se seleccionó trabajar con el *liner* de lana de vidrio.

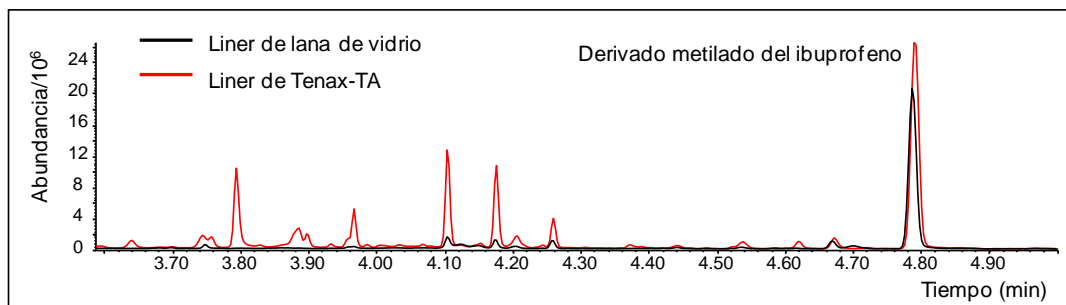


Figura 5: Comparación de los cromatogramas obtenidos con un liner de lana de vidrio y un liner de Tenax-TA

4.2.2. Optimización de la inyección *solvent-vent* en el inyector de temperatura programada

Para comprobar que el modo de inyección elegido era el más adecuado, se llevó a cabo un estudio comparativo entre las señales obtenidas con los modos de inyección *solvent-vent*, *split* caliente y *splitless* caliente (figura 6). En el modo de inyección *split* en caliente, la relación de división fue 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 2.65 min. En el modo de inyección *solvent-vent*, la temperatura del inyector se fijó en 60 °C durante 1.65 min, con un flujo de venteo de 50 mL/min, tras lo cual el *liner* se calienta hasta 250 °C a una velocidad de 12 °C/s. En todos los casos, el volumen de espacio de cabeza inyectado en el sistema fue de 3 mL (tamaño del bucle). Se observó que la máxima señal se obtenía cuando se utilizaba el modo de inyección *solvent-vent*.

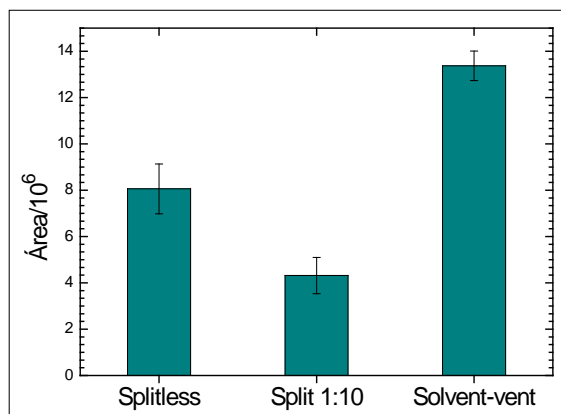


Figura 6: Comparación de las señales obtenidas con los modos de inyección *splitless* caliente, *split* caliente 1:10 y *solvent-vent*, utilizando un liner de lana de vidrio. Cada columna representa valores medios de tres medidas; las barras de error representan desviaciones estándar

Las variables optimizadas en el modo de inyección *solvent-vent* fueron: temperatura de venteo, flujo de venteo, tiempo de venteo y tiempo de inyección. Para estudiar la influencia de estas variables, así como las interacciones entre ellas, se realizó un diseño experimental Box-Behnken. Este diseño permite generar superficies de respuesta utilizando tres niveles de cada variable estudiada. En la tabla 2 se muestra la matriz de diseño generada. Ésta contiene 25 combinaciones de las variables consideradas. Cada uno de los experimentos se realizó por duplicado para poder estudiar si el modelo generado presentaba fallo de ajuste, utilizando muestras de agua ultrapura dopadas a un nivel de concentración de ibuprofeno de 100 µg/L. Como variable respuesta se seleccionó el área de pico obtenida el extraer en cada cromatograma la relación m/z 161, que corresponde al pico base del espectro del derivado metilado del ibuprofeno.

Tabla 2: Matriz del diseño experimental Box-Behnken. *A*, tiempo de inyección; *B*, tiempo de venteo; *C*, temperatura de venteo; *D*, flujo de venteo

Experimento	Variables			
	A (min)	B (min)	C (°C)	D (mL/min)
1	0.5	1.1	50	65
2	1.0	1.1	50	65
3	0.5	1.8	50	65
4	1.0	1.8	50	65
5	0.5	1.45	30	65
6	1.0	1.45	30	65
7	0.5	1.45	70	65
8	1.0	1.45	70	65
9	0.5	1.45	50	30
10	1.0	1.45	50	30
11	0.5	1.45	50	100
12	1.0	1.45	50	100
13	0.75	1.1	30	65
14	0.75	1.8	30	65
15	0.75	1.1	70	65
16	0.75	1.8	70	65
17	0.75	1.1	50	30
18	0.75	1.8	50	30
19	0.75	1.1	50	100
20	0.75	1.8	50	100
21	0.75	1.45	30	30
22	0.75	1.45	70	30
23	0.75	1.45	30	100
24	0.75	1.45	70	100
25	0.75	1.45	50	65

Utilizando los valores de respuesta y las variables indicadas, se probaron cuatro modelos de ajuste: lineal (incluyendo únicamente las variables); cuadrático (incluyendo las variables y sus cuadrados); cuadrático (incluyendo las variables y las interacciones entre ellas) y cuadrático (incluyendo las variables, sus cuadrados y las interacciones entre ellas). Todos los modelos presentaron fallo de ajuste excepto el que incluía las variables, sus cuadrados y las interacciones entre ellas.

Como puede observarse en la tabla 3, el modelo predice que las variables significativas son temperatura de venteo (C), flujo de venteo (D), la interacción entre temperatura y flujo de venteo (CD), y los cuadrados del tiempo de venteo (BB) y del flujo de venteo (DD).

Tabla 3: Resultados del diseño experimental

Correlación múltiple: 0.897 (cal)		
R ² : 0.804 (cal)		
Valor del máximo punto predicho: 5.258x10 ⁶		
	valor p	Coefficientes
Ordenada en el origen	0.0053*	2.159x10 ⁶
A	0.1376	6.375x10 ⁵
B	0.7522	-9.535x10 ⁴
C	0.0000*	5.364x10 ⁴
D	0.0226*	7.148x10 ³
AB	0.7247	-3.159x10 ⁴
AC	0.9325	-7.586x10 ³
AD	0.5287	-5.661x10 ⁴
BC	0.5346	5.580x10 ⁴
BD	0.9886	-1.283x10 ³
CD	0.0017*	3.029x10 ⁵
AA	0.2383	-1.271x10 ⁵
BB	0.0026*	-3.437x10 ⁵
CC	0.2408	-1.264x10 ⁵
DD	0.0029*	-3.394x10 ⁵
*Variables e interacciones más significativas (p<0.05)		

El efecto principal de aumentar la temperatura de venteo era el aumento de la señal analítica. En el caso del flujo de venteo, cuando este valor aumentaba, la señal también aumentaba, hasta un determinado valor, a partir del cual disminuía. Sin embargo, el estudio de estas variables por separado no era suficiente, ya que la interacción entre ellas era significativa.

Para visualizar el efecto de las interacciones, se utilizan superficies de respuesta. En la figura 7 se muestra la superficie de respuesta para la relación m/z 161, en función de la temperatura y el flujo de venteo. El tiempo de inyección y el tiempo de venteo se fijaron en 0.5 y 1.45 min, respectivamente. Se observó que al aumentar la temperatura de venteo también aumentaba la señal analítica. Este aumento no era muy acusado para flujos de venteo bajos, obteniéndose un comportamiento análogo al anteriormente observado en la figura 4. Las condiciones óptimas de trabajo se obtuvieron cuando la temperatura y el flujo de venteo se encontraban entre 65 – 70 °C y 80 – 100 mL/min, respectivamente.

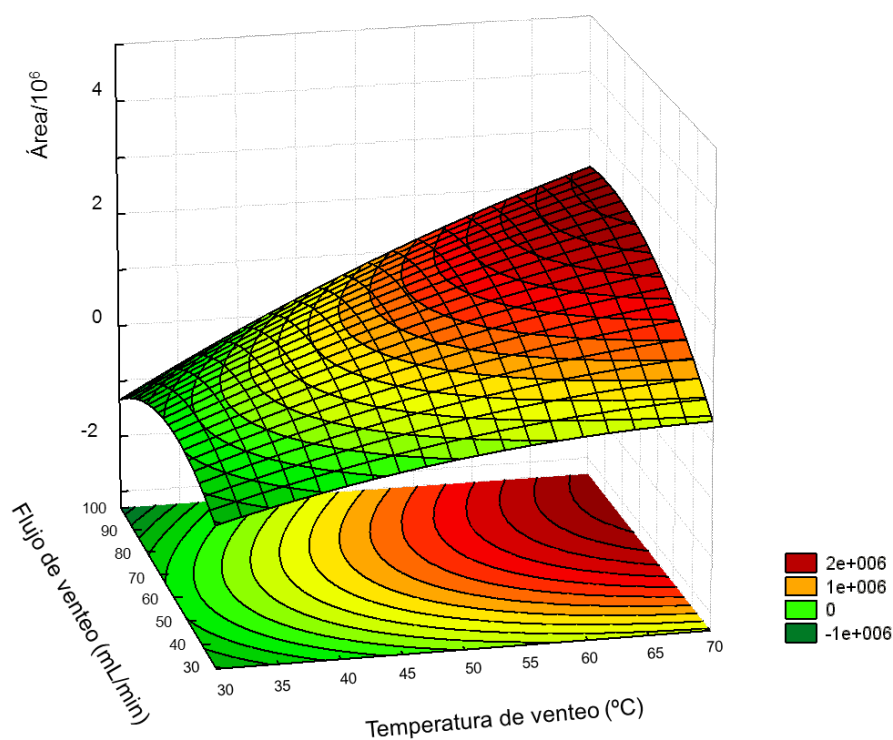


Figura 7: Superficie de respuesta del diseño experimental. El tiempo de venteo y el tiempo de inyección se fijaron en 1.45 y 0.5 min, respectivamente

En vista de los resultados obtenidos, los valores seleccionados fueron 0.5 min para el tiempo de inyección: 1.45 min para el tiempo de venteo, 70 °C para la temperatura de venteo y 100 mL/min para el flujo de venteo.

4.3. Evaluación del método HS- PTV-GC rápida-MS

En la tabla 4 se muestran las características analíticas del método propuesto. Se obtuvo una recta de calibración con ocho niveles de concentración (en el rango 0.5 - 10 µg/L). Cada muestra se analizó por duplicado en el modo de adquisición SIM. La señal analítica utilizada fue el área de pico correspondiente al extraer la relación m/z 161 de los cromatogramas. El modelo de calibración presentaba un comportamiento lineal. Se comprobó su validez mediante análisis de varianza y se observó que no presentaba fallo de ajuste. El valor del coeficiente de correlación (R^2) era superior a 0.99.

Tabla 4: Características analíticas y validación del método propuesto

	Analito
	Ibuprofeno
Iones SIM	161, 177, 220
LD (µg/L)	0.23
LQ (µg/L)	0.69
R^2	0.9922
Repetibilidad (%)	
4 µg/L	4.87
10 µg/L	6.32
Reproducibilidad (%)	
4 µg/L	6.53
10 µg/L	9.82

Para estudiar la repetibilidad y reproducibilidad del proceso, se doparon dos muestras de agua a dos niveles de concentración (4.0 y 10 µg/L) y se analizaron en el mismo día (5 réplicas) y en los dos días consecutivos. Los resultados, expresados como desviaciones estándar relativas (RSD,%) también se muestran en la tabla 4, con valores del 6.32 % en el caso de la repetibilidad, y del 9.82 % cuando las muestras se analizaban en días consecutivos (reproducibilidad).

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).

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 detección y cuantificación obtenidos fueron satisfactorios, con un bajo volumen de muestra (5 mL), sin necesidad de una etapa de preconcentración previa y con una mínima manipulación. En la bibliografía pueden encontrarse publicaciones donde se especifican límites más bajos, pero, en la mayoría de los casos, utilizan etapas de preconcentración en fase sólida previas, utilizando grandes volúmenes de muestra (en torno a 1000 mL) [16,24,27].

Para comprobar la capacidad predictiva del modelo, se doparon dos muestras de agua a dos niveles de concentración, 4.0 y 10 µg/L. Los

resultados obtenidos (dados con el 95 % del intervalo de confianza) fueron 3.5 ± 0.8 y 9.3 ± 0.9 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. Estos valores se consideran satisfactorios.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se propone un método rápido y sensible para la determinación de ibuprofeno en muestras acuosas mediante el acoplamiento de un generador de espacio de cabeza con un inyector de temperatura programada, un cromatógrafo de gases y un espectrómetro de masas, y la utilización de una reacción de derivatización *in situ* en el propio vial del HS. Este compuesto se incluye entre los que actualmente se conocen como contaminantes emergentes.

La utilización de esta configuración instrumental tiene la ventaja de que, desde la mezcla de los reactivos en el vial del HS, todo el proceso tiene lugar de forma continua, con la consecuente reducción de errores asociados a la manipulación de muestra.

El método es rápido: tras la primera hora de equilibrado del vial, es posible analizar las muestras cada 10.5 min. El método también es sensible, con buenos límites de detección y cuantificación, teniendo en cuenta que no hay ninguna etapa de preconcentración previa y que se está llevando a cabo una reacción de derivatización en medio acuoso.

Las características analíticas del método, con límites de detección de 0.23 $\mu\text{g/L}$, lo hacen apropiado para la determinación de ibuprofeno en aguas residuales urbanas, en las que se han encontrado concentraciones de ibuprofeno del orden de los $\mu\text{g/L}$.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. Petrovic, S. González, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 685.
- [2] B. Halling-Sorensen, S. Nors Nielsen, P.F. Lanzky, F. Ingerslev, H.C. Holten Lützhof, S.E. Jorgensen, *Chemosphere* 36 (1998) 357.
- [3] S. Weigel, U. Berger, E. Jensen, R. Kallenborn, H. Thoresen, H. Hühnerfuss, *Chemosphere* 56 (2004) 583.
- [4] A. David, K. Pancharatna, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 27 (2009) 390.
- [5] E.Z. Dajani, K. Islam, *J. Physiol. Pharmacol.* 59 (2008) 117.
- [6] M. Taghian, T.A. Tran, S. Bresson-Hadni, A. Menget, S. Felix, E. Jacquemin, *J. Pediatr.* 145 (2004) 273.
- [7] Q.L. Ford, J.M. Burns, J.L. Ferry, *J. Chromatogr. A* 1145 (2007) 241.
- [8] C. González-Barreiro, M. Lores, M.C. Casais, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 993 (2003) 29.
- [9] R. Hamuodova, M. Pospisilova, *J. Pharmaceut. Biomed.* 41 (2006) 1463.
- [10] S. Müller, M. Möder, S. Schrader, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 985 (2003) 99.
- [11] W. Ahrer, E. Scherwenk, W. Buchberger, *J. Chromatogr. A* 910 (2001) 69.
- [12] C. Hao, X. Zhao, P. Yang, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 569.
- [13] M. Kostopoulou, A. Nikolaou, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 1023.
- [14] M. Farré, M. Petrovic, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1203.
- [15] M. Farré, M. Petrovic, M. Gros, T. Kosjek, E. Martinez, E. Heath, P. Osvald, R. Loos, K. Le Menach, H. Budzinski, F. De Alencastro, J. Müller, T. Knepper, G. Fink, T.A. Ternes, E. Zuccato, P. Kormali, O. Gans, R. Rodil, J.B. Quintana, F. Pastori, A. Gentili, D. Barceló, *Talanta* 76 (2008) 580.
- [16] S.S. Verenitch, C.J. Lowe, A. Mazumder, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 193.
- [17] S. Zorita, B. Boyd, S. Jönsson, E. Yilmaz, C. Svensson, L. Mathiasson, S. Bergström, *Anal. Chim. Acta* 626 (2008) 147.

- [18] A. Sebók, A. Vasanits-Zsigrai, Gy. Palkó, Gy. Záray, I. Molnár-Perl, *Talanta* 76 (2008) 642.
- [19] M. Möeder, S. Schrader, M. Winkler, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 873 (2000) 95.
- [20] J. Wu, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A* 1092 (2005) 182.
- [21] A.R.M. Silva, F.C.M. Portugal, J.M.F. Nogueira, *J. Chromatogr. A* 1209 (2008) 10.
- [22] R. Gibson, E. Becerril-Bravo, V. Silva-Castro, B. Jiménez, *J. Chromatogr. A* 1169 (2007) 31.
- [23] A. Togola, H. Budzinski, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 627.
- [24] S. Öllers, H.P. Singer, P. Fässler, S.R. Müller, *J. Chromatogr. A* 911 (2001) 225.
- [25] V. Koutsouba, Th. Heberer, B. Fuhrmann, K. Schmidt-Baumler, D. Tsiipi, A. Hiskia, *Chemosphere* 51 (2003) 69.
- [26] J.T. Yu, E.J. Bouwer, M. Coelhan, *Agric. Water Manage.* 86 (2006) 72.
- [27] W.C. Lin, H.C. Chen, W.H. Ding, *J. Chromatogr. A* 1065 (2005) 279.
- [28] J.L. Pérez Pavón, A.M. Casas Ferreira, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1192.
- [29] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A* 1202 (2008) 196.
- [30] J.L. Pérez Pavón, S. Herrero Martín, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A* 1194 (2008) 103.
- [31] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández Laespada, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A* 1141 (2007) 123.
- [32] A. Hoffmann, B. Tienpont, F. David, P. Sandra, *Application Note* 6/2006, Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Germany.
- [33] Enhanced ChemStation, MSD ChemStation E.00.00.202, Agilent Technologies, CA, USA, 2007.

TRABAJO PUBLICADO
PUBLISHED ARTICLE

V



In situ derivatization reaction and determination of ibuprofen in water samples using headspace generation-programmed temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry

José Luis Pérez Pavón*, Ana María Casas Ferreira, María Esther Fernández Laespada, 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 1 June 2009
Received in revised form 30 July 2009
Accepted 7 August 2009
Available online 13 August 2009

Keywords:

Headspace analysis
Programmed temperature vaporizer
Derivatization
Ibuprofen

ABSTRACT

The aim of the present work is to propose a method for the determination of ibuprofen, as a typical representative of pharmaceutical compounds, in aqueous samples. To do so, an *in situ* derivatization reaction in aqueous medium was employed in the vial of a headspace sampler (HS), after which instrumental measurements were made with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). As the injection system we propose a programmed temperature vaporizer (PTV) where, in solvent vent mode, better results can be obtained than with the conventional split and splitless injection modes. Since the derivatization reaction takes place in the HS vial, after the mixing of reagents and the sealing of the vial, the whole process takes place on-line, with no need for intermediate steps. The simplicity and speed of the method – analysis throughput: 10.5 min – together with the limit of detection obtained (0.23 µg/L), bearing in mind that no preconcentration step or later clean-up step are required, make this a good method for the analysis of ibuprofen in aqueous samples of urban waste water.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years there has been increasing concern about the presence of pharmaceutical compounds in water. These compounds are included in what are currently known as emerging pollutants. Their presence can be explained in terms of both their use in medicine and the inefficiency of water purifying systems in removing them [1]. In some cases, almost 95% of the dose given to patients may be excreted unmetabolized and eliminated in domestic waste water [2]. To this must be added expired drugs that users sometimes flush into the sewer system. Such compounds have the necessary properties to become biocumulative and exert effects on aquatic or terrestrial ecosystems. This is because they are specifically designed to be able to cross biological membranes and to be persistent in order to prevent them from being inactivated before they have exerted their curative effect [2].

Non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs) form a group of drugs widely used as analgesic, antipyretic and anti-inflammatory agents. One of the reasons they are so widely used is because they do not produce sedation, respiratory depression, or addiction. One of the most important classes of the NSAID group is a set of 2-aryl propionic acid derivatives, or profens. This set includes ibuprofen,

ketoprofen, naproxen, phenoprofen and ketorolac. In particular, ibuprofen is among the most widely used pharmaceuticals in the world [3]. Despite efficient elimination in sewage treatment plants, residues of ibuprofen are frequently detected in rivers, lakes and streams. It has been shown that ibuprofen has antimicrobial properties [2] and anomalies induced by this drug have been observed in aquatic organisms, such as retarded development or cardiac abnormalities [4]. In humans, the consumption of ibuprofen has been linked to gastric [5] and dermatological problems [6].

Several analytical methods for the quantification of NSAIDs in environmental matrices have been proposed, using gas chromatography (GC), high-performance liquid chromatography (HPLC) or capillary electrophoresis, with conventional detectors [7–9] or mass spectrometry [10,11]. Since most of these compounds are polar and sparingly volatile, gas chromatography usually required a prior derivatization reaction, such that for their analysis HPLC has been used more frequently.

A number of reviews exist in literature dealing with analytical methods used for pharmaceuticals, including NSAIDs, in waters [12,13]. More specifically, comparison and evaluation of the main groups of analytical techniques devoted to NSAID analysis in water samples has been made [14,15].

The trace levels usually found in the environment make an enrichment step a must prior to instrumental analysis. The technique most frequently used is solid-phase extraction (SPE) [16–18]. Although this technique reduces the volumes of organic solvent

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

required in comparison with traditional liquid–liquid extraction, it is rather time-consuming. In recent years, increasing use has been made of applications that minimize the volume of toxic solvents required, such as solid-phase microextraction (SPME) [19], solvent microextraction [20], stir bar sorptive extraction (SBSE) [21], and membrane extraction [10].

When determination is carried out with gas chromatography, the derivatization reactions most frequently used involve silylation with MTBSTFA (N-methyl-N-(tert-butyldimethylsilyl)trifluoroacetamide) or MSTFA (N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) [18,22,23], and alkylation, using diazomethane [24]. In the case of diazomethane, the toxicity, carcinogenicity and explosiveness of this compound are such that alternative procedures must be considered. Other derivatization alternatives have been proposed, such as the use of pentafluorobenzyl halides, in the presence of a base catalyst [25,26], methyl chloromethanoate [3] or MeOH in the presence of BF_3 [16]. Tetramethylammonium (TMAH) and trimethylsulphonium (TMSH) hydroxides and tetrabutylammonium (TBA) salts have also been used to carry out derivatization in the injection port [27]. In all cases, a previous extraction of the analytes of interest must be performed from the aqueous matrix to an organic or hydro-organic medium, which is usually carried out simultaneously to the enrichment step, and – with the exception of derivatizations carried out at the injection port – several later steps of extraction to another organic medium and extract clean-up are required.

An alternative in which the reaction is carried out *in situ* in the aqueous sample is derivatization with a carbodiimide and 2,2,2-trifluoroethylamine to produce an amide derivative [7]. However, the limits of detection obtained are high: in the order of mg/L.

In a previous work [28], we reported the use of headspace generation with an *in situ* derivatization reaction in the vial of the headspace sampler for the determination of chlorophenols in aqueous samples, using a programmed temperature vaporizer to introduce the sample into the chromatographic system. Our research team has gained broad experience in the use of this type of injector for the analysis of compounds in different matrices [29–31]. Thus, the aim of the present work is to propose a simple method based on headspace generation for the determination of ibuprofen, as a typical representative of pharmaceutical compounds, in aqueous samples. To accomplish this, we propose an *in situ* derivatization reaction with MeOH in acid aqueous medium with minimum sample manipulation, since analyte extraction is not required either before or after the reaction. To the best of our knowledge, this is the first time that such an approach has been used for determining this kind of compounds. Measurements were collected by coupling the headspace sampler (HS) to a programmed temperature vaporizer (PTV), a gas chromatograph (GC) and a mass spectrometer (MS).

2. Experimental

2.1. Materials and standard solutions

The ibuprofen employed in this study was supplied by Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Methanol and sulfuric acid

were from Merck (Darmstadt, Germany) and sodium chloride was from Scharlau (Barcelona, Spain). A stock solution (1000 mg/L in methanol) of ibuprofen was prepared and stored at 4 °C in a refrigerator. This solution was used to spike the water samples at the different concentrations analyzed. Method optimization was performed with deionized water and an ibuprofen concentration of 100 µg/L.

2.2. Analytical procedure

The whole analytical procedure, including the derivatization step in the vial of the headspace, PTV-GC injection and separation of the volatile ibuprofen methyl derivative and MS detection is schematized in Fig. 1. Experimental conditions are detailed in the following paragraphs.

2.2.1. Derivatization reaction

NaCl (2.5 g) was added to a 20-mL vial. Then, 5 mL of an aqueous solution spiked at a given concentration of ibuprofen was added, followed by 250 µL of sulfuric acid, to establish a strongly acid solution, and 200 µL of methanol, as the derivatization reagent. The vial was sealed hermetically and placed in the headspace sampler.

2.2.2. Headspace

HS sampling was performed with a model 7694 headspace sampler from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). The sampling system consisted of a stainless steel needle, a 316-SS six-port valve with a nickel loop (heated to 120 °C), and two solenoid valves (for pressurization and venting). The experimental conditions for the HS were as follows: oven temperature: 90 °C; equilibration time: 60 min; time between samples: 10.5 min; high speed agitation; vial pressurization: 0.30 min; vial pressure: 12.5 psi; loop-fill time: 0.15 min; loop-equilibration time: 0.02 min; injection time: 1 min. The headspace sampler was coupled to a PTV injector through a thermostatted transfer line heated to 125 °C. The carrier gas was helium N50 (99.995% pure; Air Liquide).

2.2.3. Programmed temperature vaporization

All experiments were carried out with a PTV inlet (CIS-4, Gerstel, Baltimore, MD, USA). Three liners for Gerstel CIS-4 (71 mm × 2 mm) were used: an empty baffled liner and two liners packed with glass wool or with a chemical sorbent (Tenax-TA). In the optimized method, solvent vent injection with a liner packed with glass wool was used. Cooling was accomplished with liquid CO_2 .

The initial temperature of the injector was set at 70 °C. Vent flow was adjusted to 100 mL/min, and vent pressure to 5.00 psi. The purge time was set at 1.45 min. The initial temperature of the liner was maintained for 1.50 min as a safety mechanism so that the heating ramp would start when the split valve was closed. Once venting had finished, the split valve was closed and the liner of the PTV was flash-heated at 12 °C/s up to 250 °C. The analytes were then transferred from the liner to the capillary column (0.5 min). Then, the split valve was opened and the liner temperature was

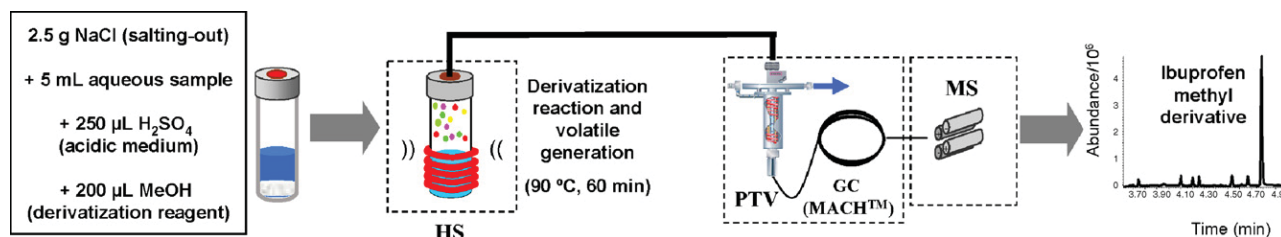


Fig. 1. Diagram of the whole analytical procedure.

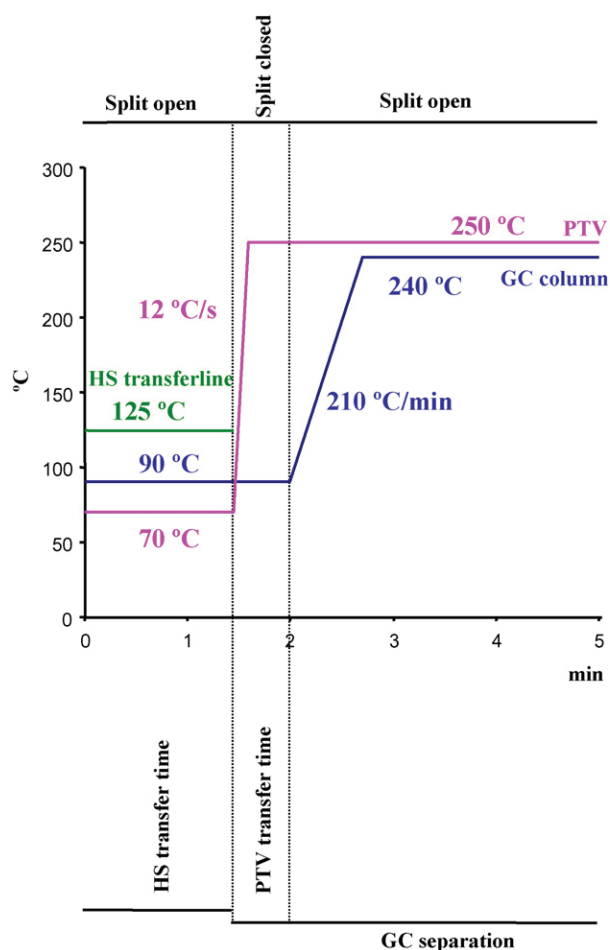


Fig. 2. Sequence of events for solvent vent injection.

held at 250 °C for 3 min. The experimental conditions are shown schematically in Fig. 2.

2.2.4. Fast gas chromatography

An Agilent 6890 GC device equipped with a modular accelerated column heater (MACH™) was used. The module is mounted outside the conventional GC oven. The column is coiled with an insulated heating wire and a temperature sensor wire along its entire length, mounted in a protective case. Column temperature can be programmed from 5 °C above room temperature to the maximum permitted by the column, at a maximum heating rate of 1800 °C/min. Fast cooling is performed by a set of ventilators mounted underneath each column module [32]. To perform the gas chromatography measurements, a low polarity DB-VRX capillary column (20 m × 0.18 mm × 1 μm, working range –10 to 260 °C) from J&W Scientific (Folsom, CA, USA) was used. The carrier gas was helium N50 (99.995% pure; Air Liquide). The dimensions of the column, together with control of the carrier gas flow and that of the temperature ramps in the oven allowed fast chromatography separation modes to be used.

The column oven temperature program (starting simultaneously with the PTV injection into the chromatograph column) involved an initial temperature of 90 °C for 2 min and an increase at 210 °C/min to 240 °C, then holding for 2.29 min (Fig. 2). The conventional GC oven served as a heated interface for the transfer lines and was set to a constant temperature of 250 °C. The total chromatographic run time was 5 min.

2.2.5. Mass spectrometry

The detector was a quadrupole mass spectrometer (HP 5973N). It was operated in the electron-impact mode using an ionization voltage of 70 eV. The ion source temperature was 230 °C, and the quadrupole was set to 150 °C. A solvent delay of 2.5 min was established, during which the filament was turned off to protect it from the arrival of the solvent. The m/z range in the scan mode was 25–250 amu; the scan rate was 5.98 cycles/s, and the abundance threshold value was set to 0. This was the acquisition mode used for the different optimization studies. Ibuprofen was identified by comparison of the experimental spectra with those of the NIST'98 database (NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library, version 1.6). In selected ion-monitoring mode (SIM), a single group of ions was used, containing the characteristic ions of the ibuprofen methyl derivative (161, 177, 220). The ions were acquired with a dwell-time of 10 ms.

2.2.6. Data analysis

Data acquisition was performed with Enhanced ChemStation, G1701EA Ver. E.00.00.202 software from Agilent Technologies [33].

3. Results and discussion

3.1. Variables affecting HS generation and the derivatization reaction

First we studied the effect of shaking the vials in the headspace sampler during the reaction and equilibration period. The signals obtained with and without shaking were compared, an increase in the analytical signal of 45% being observed when the vials were shaken.

The variation in the activity coefficient (γ_i) was studied by modifying the sample matrix. In the case of aqueous samples and polar analytes, this effect is achieved by adding an electrolyte to the medium (*salting-out*). A study was made of the effect of the addition of the electrolyte (NaCl) to the vials at three concentration levels: without NaCl; 1.0 g in 5 mL, and 2.5 g in 5 mL (supersaturation). The best results were obtained under supersaturation conditions, with an 88% increase in the signal with respect to the conditions without NaCl and a 49% increase with respect to the intermediate situation.

Regarding the variables affecting the derivatization reaction, these were the concentration of acid, the concentration of derivatization reagent (MeOH), the temperature and the time used in the headspace oven during which the chemical reaction took place, and the volatiles passed to the headspace. Fig. 3 shows the results obtained for these variables (except for temperature).

Upon choosing the acid to be used, it was decided to select one that was not volatile, since in this method headspace generation was used. Although the determination of ibuprofen has been carried out previously [16] with MeOH in the presence of BF₃, it is not possible to use this acid because it is volatile (bp: –100 °C). The same is the case of alternatives such as BCl₃ (bp: 12.5 °C) or HCl, which is a gas. Accordingly, it was decided to work with H₂SO₄, which is not volatile (bp: 340 °C).

Regarding the volume of sulfuric acid, the values studied were between 100 and 1000 μL. It was found that the signal showed similar values up to 500 μL, thereafter decreasing. A final working volume of 250 μL was selected.

As for the derivatization reagent, different amounts of methanol ranging between 100 and 500 μL were added. We decided to work with 200 μL, as it was observed that no significant changes occurred in the analytical signal from this value on.

Regarding the temperature, different values were studied, with a maximum of 90 °C, the selected one, which is an adequate value

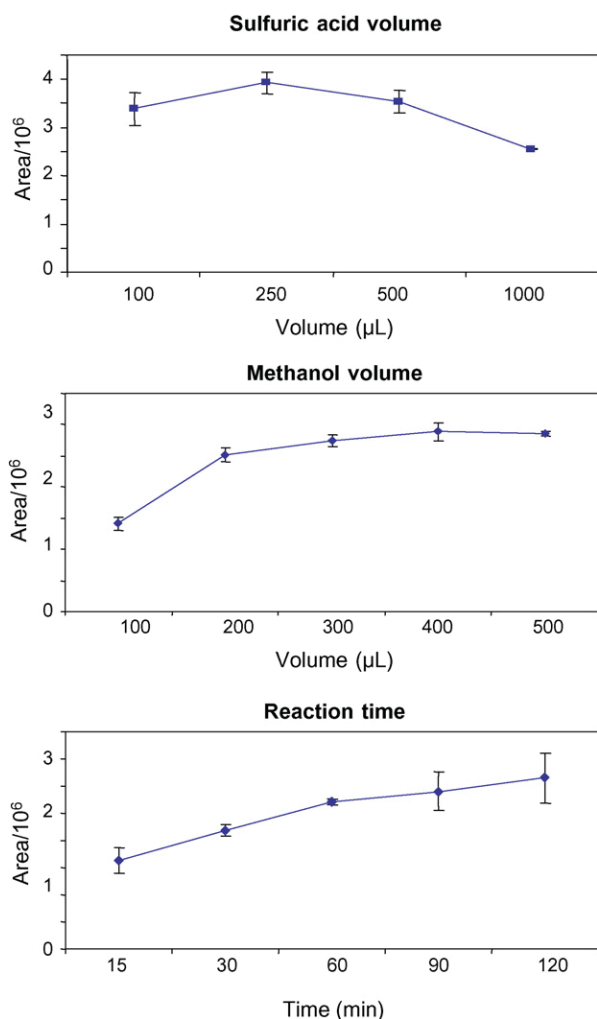


Fig. 3. Influence of derivatization reaction variables. Each point represents the mean value of three measurements. Error bars denote standard deviations.

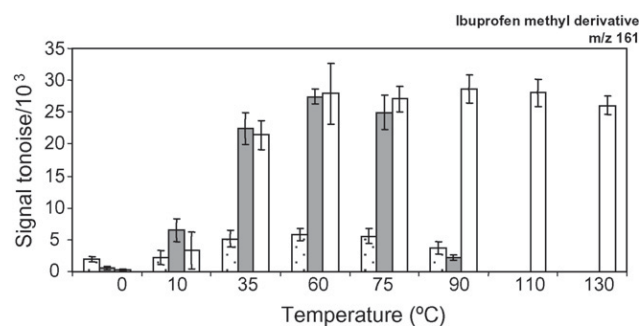


Fig. 4. Signal-to-noise ratio obtained for the ibuprofen methyl derivative for different initial venting temperatures and different liners. Columns represent mean values ($n=3$); error bars denote standard deviations. Dotted columns: empty baffled liner; solid columns: glass wool liner; empty columns: Tenax-TA liner.

for headspace generation in aqueous systems. For lower values, the signal decreased.

Finally, we studied the time during which the vials were heated in the oven in the 15–120 min range. A time of 60 min was chosen since this afforded a sufficient and reproducible signal. At longer times, the increase was not so marked, and reproducibility decreased to a considerable extent. Although this time (60 min) may seem somewhat long, it should be noted that we were using an oven with six positions, allowing the simultaneous heating of several different vials. In this way, it was possible to overlap headspace generation times, such that after the first 60 min it was possible to analyze each sample in 10.5 min, after 5 min of chromatographic analysis and 5.5 min of recovery of the initial conditions of the system.

3.2. PTV-GC-MS

3.2.1. Optimization of the programmed temperature vaporizer

3.2.1.1. Liner used. We first carried out a comparative study of the signals obtained with three types of liners in the PTV in the solvent vent mode. The liners employed were an empty baffled liner and two liners filled with different materials (glass wool, and Tenax-TA). Different initial or venting temperatures in the PTV were studied for each type of liner. These temperatures were 0, 10, 35, 60 and 90 °C for the empty and glass wool liners, and 0, 10, 35, 60, 90, 110 and 130 °C for the liner filled with Tenax-TA, as this polymer retains

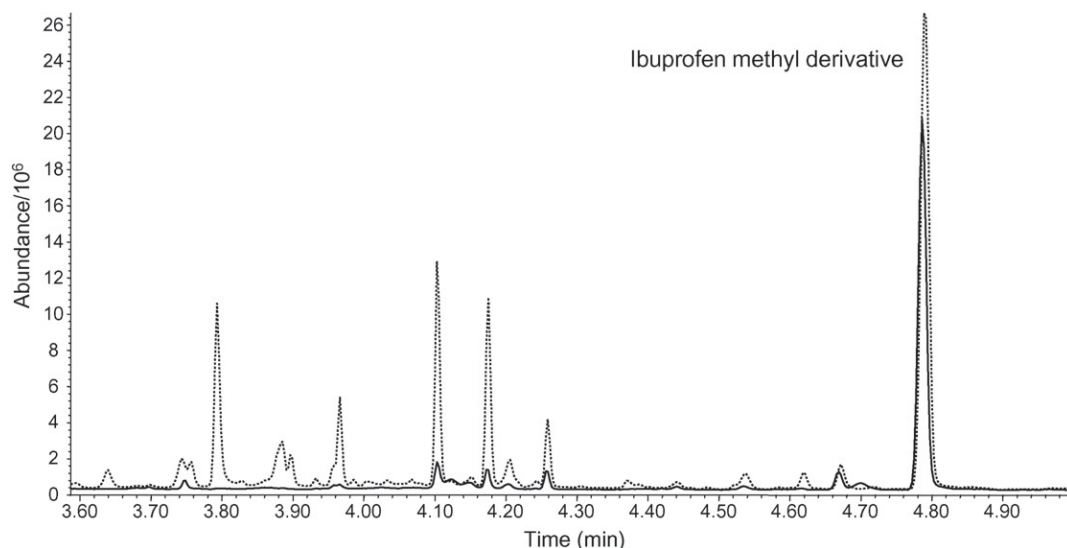


Fig. 5. Comparison of chromatograms obtained with a Tenax-TA liner (dotted line) and a glass wool liner (solid line).

the analyte more strongly. The venting and injection times were set at 1.65 and 1 min, respectively, and venting flow was fixed at 50 mL/min. As may be seen in Fig. 4, in all cases the signal-to-noise ratio increased with the rise in temperature up to a certain value, after which it decreased, because the analyte began to be eliminated in the venting step. In the case of the Tenax-TA liner, the decrease was not very pronounced, since analyte retention in this liner was greater than in the other two. The best signal-to-noise ratios were obtained with the packed liners.

However, on analyzing the chromatograms obtained for a derivatized sample of ibuprofen using both types of liners (Fig. 5), it may be seen that together with the signal of the ibuprofen methyl derivative those of another compounds also appeared, identified as linear acids. Although these signals (also detectable in blank samples) did not interfere in those of the analyte, their magnitude was greater in the case of the Tenax-TA liner, such that in the optimized method we decided to use the glass wool-packed liner.

3.2.2. Optimization of solvent vent injection in the programmed temperature vaporizer

To check that the injection method chosen was the optimum one, a comparative study was made of the signals obtained with the solvent vent, split, and splitless injection modes (Fig. 6). In the split injection mode, the split ratio was from 1:10 and the temperature of the injector was kept at 250 °C. This same temperature was used in the splitless injection mode, with a splitless time of 2.65 min. In the solvent vent injection mode, the injector temperature was kept at 60 °C for 1.65 min, with a venting flow of 50 mL/min, after which the liner was heated to 250 °C at a rate of 12 °C/s. It was observed that the maximum signal was obtained with the solvent vent injection mode, such that this was accepted the optimum one.

The variables that can be optimized in the solvent vent injection process are venting temperature, venting flow, venting time and injection time. To study the effect of these variables and of their interactions on the analytical signal, a Box–Behnken experimental design was used. This allows the generation of response surfaces by using three levels for each of the factors studied. Table 1 shows the design matrix. It comprises 25 combinations of the levels considered. In all cases, a water sample spiked at the laboratory with a concentration of 100 µg/L of ibuprofen was used. Each of the experiments was performed in duplicate so as to be able to detect lack of fit of the data in the model generated. The response chosen was the peak area for the *m/z* 161 ratio corresponding to the base peak of the spectrum of the ibuprofen methyl derivative.

Using the response values and factors, we tested four data-fitting models: linear (including only the variables); quadratic (including the variables and their squares), quadratic (including

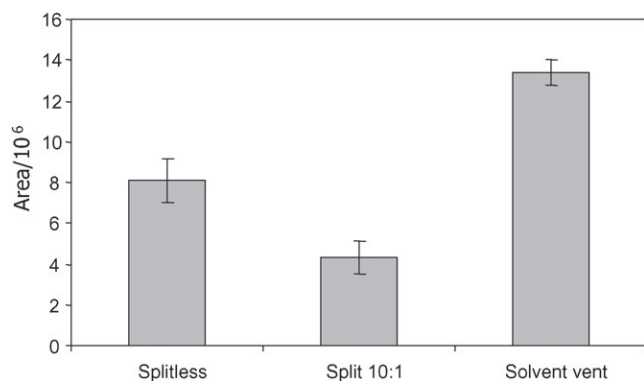


Fig. 6. Comparison of the splitless, split (1:10), and solvent vent injection modes using the glass wool liner. Each column represents the mean value of three measurements; error bars denote standard deviations.

Table 1

Box–Behnken experimental design matrix.

Experiment	Factors			
	A (min)	B (min)	C (°C)	D (mL/min)
1	0.5	1.1	50	65
2	1.0	1.1	50	65
3	0.5	1.8	50	65
4	1.0	1.8	50	65
5	0.5	1.45	30	65
6	1.0	1.45	30	65
7	0.5	1.45	70	65
8	1.0	1.45	70	65
9	0.5	1.45	50	30
10	1.0	1.45	50	30
11	0.5	1.45	50	100
12	1.0	1.45	50	100
13	0.75	1.1	30	65
14	0.75	1.8	30	65
15	0.75	1.1	70	65
16	0.75	1.8	70	65
17	0.75	1.1	50	30
18	0.75	1.8	50	30
19	0.75	1.1	50	100
20	0.75	1.8	50	100
21	0.75	1.45	30	30
22	0.75	1.45	70	30
23	0.75	1.45	30	100
24	0.75	1.45	70	100
25	0.75	1.45	50	65

A: Injection time.

B: Venting time.

C: Venting temperature.

D: Venting flow.

the variables and the interactions among them) and quadratic (including the variables, their squares and the interactions among variables). Only the model including the variables, their squares and the interactions among them failed to show a lack of fit.

As may be seen in Table 2, the significant variables for that model are the venting time, the venting flow, the interaction between temperature and the venting flow, and the squares of the venting time and the venting flow. The main effect of increasing the venting temperature was an increase in the analytical signal. In the case of venting flow, when this was increased the signal also increased up to a certain value, thereafter decreasing. However, these effects are not sufficient to account for the way in which these variables affect the response since, owing to the interactions, the effect of the factors depends on the value taken by the other variable.

Table 2

Results of the experimental design.

Multiple correlation: 0.897 (cal)		
R-Square: 0.804 (cal)		
Predicted max point value: 5.258×10^6		
	p-Value	Coefficients
Intercept	0.0053 [*]	2.159×10^6
A	0.1376	6.375×10^5
B	0.7522	-9.535×10^4
C	0.0000 [*]	5.364×10^4
D	0.0226 [*]	7.148×10^3
AB	0.7247	-3.159×10^4
AC	0.9325	-7.586×10^3
AD	0.5287	-5.661×10^4
BC	0.5346	5.580×10^4
BD	0.9886	-1.283×10^3
CD	0.0017 [*]	3.029×10^5
AA	0.2383	-1.271×10^5
BB	0.0026 [*]	-3.437×10^5
CC	0.2408	-1.264×10^5
DD	0.0029 [*]	-3.394×10^5

^{*} Most significant variables and interaction effects ($p < 0.05$).

Table 3
Properties of ibuprofen, and analytical characteristics and validation of the proposed method.

Analyte	Range of application/effective as	Water solubility ($\mu\text{g/L}$)	$\text{Log } K_{ow}$	SIM target ions	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	R^2 (0–10 $\mu\text{g/L}$)	RSD (%)	
								Intra-day	Inter-day
Ibuprofen	Analgesic, antirheumatic	21	3.97	161, 177, 220	0.23	0.69	0.9922	4 $\mu\text{g/L}$ 10 $\mu\text{g/L}$	4 $\mu\text{g/L}$ 10 $\mu\text{g/L}$
								4.87 6.32	6.53 9.82

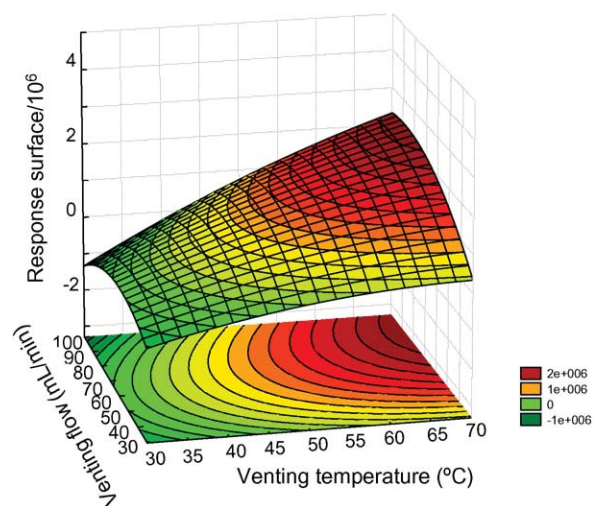


Fig. 7. Experimental design surface. The venting time and injection time values were fixed at 1.45 and 0.5 min, respectively.

To visualize the effect of the interactions, response surfaces were used. Fig. 7 shows the response surface for the m/z 161 ratio as a function of temperature and venting flow. The injection time and the venting time were set at 0.5 and 1.45 min, respectively. It may be seen that on increasing the temperature, the analytical signal also rose for all venting flows assayed. This increase was not very pronounced in the case of low venting flows, showing a similar trend to that previously observed in Fig. 4. The optimum conditions were obtained when the temperature and venting flow lay in the 65–70 °C and 80–100 mL/min ranges, respectively.

In light of the results obtained with the experimental design, the values selected were 0.5 min for the injection time; 1.45 min for the venting time; 70 °C for the venting temperature, and 100 mL/min for the venting flow.

3.3. PTV-fast-GC-MS method evaluation

Table 3 shows some of the properties of ibuprofen, together with the analytical characteristics of the proposed method. A calibration curve was obtained with eight concentration levels, ranging from 0 to 10 $\mu\text{g/L}$. Each level was analyzed in duplicate in SIM mode. The peak area obtained on extracting the m/z 161 ratio was used as the analytical signal. The calibration model displayed linear behavior. The validity of the model generated was checked using ANOVA analysis, and it was observed that the model generated did not exhibit any lack of fit. The value of the correlation coefficient (R^2) was higher than 0.99.

In order to study the reproducibility of the process, two water samples spiked at two levels (4.0 and 10 $\mu\text{g/L}$) were analyzed on the same day (5 replicates) and on the following 2 consecutive days. The results, as relative standard deviation (RSD, %) are showed in Table 3. RSD values (%) were found to be not higher than 6.32, in the case of intra-day reproducibility, and 9.82, in the case of inter-day reproducibility.

The limits of detection (LODs) were estimated using the following formula:

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

where σ is the standard deviation obtained upon measuring replicates of a sample with an S/N ratio of approximately 3, and S is the slope of the calibration curve.

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

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

where σ and S are the same parameters as in the previous equation.

The limits of detection and quantification obtained were satisfactory, with a low sample requirement (5 mL). No preconcentration step was necessary, sample manipulation being minimum. Lower detection limits have been reported in literature, but in most such cases a prior preconcentration step in solid-phase was performed, using a large volume of sample (about 1000 mL) [16,24,27].

The predictive capacity of the model was checked by spiking two water samples with 4.0 and 10 $\mu\text{g/L}$ of ibuprofen. The results obtained (given as 95% confidence intervals) were satisfactory, 3.5 ± 0.8 and 9.3 ± 0.9 $\mu\text{g/L}$, respectively.

4. Conclusions

Here we propose a rapid and sensitive method for the determination of the emerging pollutant ibuprofen in aqueous samples by coupling a headspace sampler to a programmed temperature vaporizer injector with a gas chromatograph and a mass spectrometer, using an *in situ* derivatization reaction in aqueous medium in the HS vial. This instrumental configuration has the advantage that, as from the mixing of the reagents in the HS vial, the whole process takes place on-line, with the consequent reduction in errors associated with sample manipulation.

The method is fast: after the first hour of equilibration of the vials it is possible to analyze a sample every 10.5 min. The method is also sensitive, the limits of detection and quantification achieved are good, taking into account that an *in situ* derivatization method in aqueous medium with no previous preconcentration step is proposed.

The analytical characteristics of the method, with LODs of 0.23 $\mu\text{g/L}$, would make it appropriate for the analysis of ibuprofen in urban waste water, in which concentrations of the drug of the order of $\mu\text{g/L}$ have previously been found.

Acknowledgements

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 (Project SA112A08) for this research.

Casas Ferreira A.M. acknowledges an FPU grant from the Spanish Ministry of Education.

References

- [1] M. Petrovic, S. Gonzalez, D. Barcelo, Trends Anal. Chem. 22 (2003) 685.
- [2] B. Halling-Sorensen, S. Nors Nielsen, P.F. Lanzky, F. Ingerslev, H.C. Holten Lützhof, S.E. Jorgensen, Chemosphere 36 (1998) 357.
- [3] S. Weigel, U. Berger, E. Jensen, R. Kallenborn, H. Thoresen, H. Hühnerfuss, Chemosphere 56 (2004) 583.
- [4] A. David, K. Pancharatna, Environ. Toxicol. Ecol. 27 (2009) 390.
- [5] E.Z. Dajani, K. Islam, J. Physiol. Pharmacol. 59 (2008) 117.
- [6] M. Taghian, T.A. Tran, S. Bresson-Hadni, A. Menget, S. Felix, E. Jacquemin, J. Pediatr. 145 (2004) 273.
- [7] Q.L. Ford, J.M. Burns, J.L. Ferry, J. Chromatogr. A 1145 (2007) 241.
- [8] C.G. Barreiro, M. Lores, M.C. Casais, R. Cela, J. Chromatogr. A 993 (2003) 29.
- [9] R. Hamuodova, M. Pospisilova, J. Pharmaceut. Biomed. 41 (2006) 1463.
- [10] S. Müller, M. Möder, S. Schrader, P. Popp, J. Chromatogr. A 985 (2003) 99.
- [11] W. Ahrer, E. Scherwenk, W. Buchberger, J. Chromatogr. A 910 (2001) 69.
- [12] C. Hao, X. Zhao, P. Yang, Trends Anal. Chem. 26 (2007) 569.
- [13] M. Kostopoulou, A. Nikolaou, Trends Anal. Chem. 27 (2008) 1023.
- [14] M. Farré, M. Petrovic, D. Barceló, Anal. Bioanal. Chem. 387 (2007) 1203.
- [15] M. Farré, M. Petrovic, M. Gros, T. Kosjek, E. Martinez, E. Heath, P. Osvald, R. Loos, K. Le Menach, H. Budzinski, F. De Alencastro, J. Müller, T. Knepper, G. Fink, T.A. Tenes, E. Zucatto, P. Kormali, O. Gans, R. Rodil, J.B. Quintana, F. Pastori, A. Gentili, D. Barceló, Talanta 76 (2008) 580.
- [16] S.S. Verenitch, C.J. Lowe, A. Mazumder, J. Chromatogr. A 1116 (2006) 193.
- [17] S. Zorita, B. Boyd, S. Jönsson, E. Yilmaz, C. Svensson, L. Mathiasson, S. Bergström, Anal. Chim. Acta 626 (2008) 147.
- [18] A. Sebök, A. Vasánits-Zsigrai, Gy. Palkó, Gy. Záray, I. Molnár-Perl, Talanta 76 (2008) 642.
- [19] Möder, S. Schrader, M. Winkler, P. Popp, J. Chromatogr. A 873 (2000) 95.
- [20] J. Wu, H.K. Lee, J. Chromatogr. A 1092 (2005) 182.
- [21] A.R.M. Silva, F.C.M. Portugal, J.M.F. Nogueira, J. Chromatogr. A 1209 (2008) 10.
- [22] R. Gibson, E. Becerril-Bravo, V. Silva-Castro, B. Jiménez, J. Chromatogr. A 1169 (2007) 31.
- [23] A. Togola, H. Budzinski, Anal. Bioanal. Chem. 388 (2007) 627.
- [24] S. Öllers, H.P. Singer, P. Fässler, S.R. Müller, J. Chromatogr. A 911 (2001) 225.
- [25] V. Koutsouba, Th. Heberer, B. Fuhrmann, K. Schmidt-Baumler, D. Tsiipi, A. Hiskia, Chemosphere 51 (2003) 69.
- [26] J.T. Yu, E.J. Bouwer, M. Coelhan, Agric. Water Manage. 86 (2006) 72.
- [27] W.C. Lin, H.C. Chen, W.H. Ding, J. Chromatogr. A 1065 (2005) 279.
- [28] J.L. Pérez Pavón, A.M. Casas Ferreira, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 1192.
- [29] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1202 (2008) 196.
- [30] J.L. Pérez Pavón, S. Herrero Martín, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1194 (2008) 103.
- [31] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández Laespada, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1141 (2007) 123.
- [32] A. Hoffmann, B. Tienpont, F. David, P. Sandra, Application Note 6/2006, Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Germany.
- [33] Enhanced ChemStation, MSD ChemStation E.00.00.202, Agilent Technologies, CA, USA, 2007.



VI

**GENERACIÓN DE ESPACIO DE CABEZA CON
UNA REACCIÓN *IN SITU* UTILIZANDO
CARBODIIMIDAS PARA LA
DETERMINACIÓN DE IBUPROFENO EN
MUESTRAS ACUOSAS**

1. INTRODUCCIÓN

La etapa de preparación de muestra es la más contaminante y la que requiere un mayor tiempo de trabajo de todo el proceso analítico, así como la fuente del mayor número de errores. La utilización de la generación de espacio de cabeza (HS) resuelve muchos de estos problemas, minimizando esta etapa. Sin embargo, en muchos casos, los límites de detección alcanzados son insuficientes para la detección de los analitos de interés [1]. Cuando esto ocurre, una posibilidad implica la utilización de inyectoros de temperatura programada (PTV), los cuales, mediante el modo de inyección *solvent-vent*, permiten la eliminación del disolvente y de los analitos más volátiles que los compuestos de interés. Otra posibilidad radica en la formación de derivados más volátiles, mediante la utilización de reacciones de derivatización [2], que permiten la utilización de esta técnica para aquellos compuestos que, en principio, no podrían ser analizados como consecuencia de su baja volatilidad.

Se han utilizado varios tipos de reacciones de derivatización en muestras acuosas cuando se trabaja con generación de espacio de cabeza en sus diferentes modalidades, incluyendo generación de espacio de cabeza estática (SHS) o combinada con la microextracción en fase sólida (SPME) o la microextracción en una gota (SDME). Las reacciones de acetilación con anhídrido acético en medio básico se han utilizado de forma habitual para compuestos fenólicos [3,4]. Otros tipos de reactivos propuestos, en función del grupo funcional con el que se esté trabajando, han sido: pentafluoro benzaldehído para aminas [5], 2,4-dinitrofenilhidrazina para carbonilos [6], tetraetilborato de sodio para compuestos organoestánicos [7] y tetrafenilborato sódico para compuestos organomercurícos [8]. Para ácidos carboxílicos, se ha propuesto metanol en medio ácido [9-11], dimetilsulfato [12] o bromuro de bencilo [13].

Hasta este momento, no se ha encontrado en bibliografía ninguna aplicación en la que se utilice de forma combinada la generación de espacio de cabeza estática con una reacción muy común para ácidos carboxílicos, formación de amidas con la utilización de carbodiimidas como agentes de condensación.

Las carbodiimidas se han utilizado ampliamente como reactivos para promover las reacciones de condensación, particularmente para la síntesis de péptidos [14]. Dentro del campo de la Química Analítica y Bioanalítica, se han utilizado para la inmovilización covalente de proteínas en diferentes tipos de electrodos [15,16] y nanopartículas [17].

Como reactivos de derivatización, en un principio, se utilizaron carbodiimidas insolubles en agua [18-20], lo que establecía la necesidad de una etapa de extracción previa a la reacción. La utilización de carbodiimidas solubles en agua permite llevar a cabo la reacción *in situ*, sin un paso de extracción previo. En este sentido, se han publicado varios trabajos en los que utilizan una carbodiimida soluble en agua, 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDC). El posterior análisis instrumental de los analitos derivatizados se lleva a cabo mediante cromatografía de líquidos [21,22], cromatografía iónica de alta presión [23] o cromatografía de gases [24]. En el último caso, es necesaria la extracción líquido-líquido de las amidas formadas con un disolvente orgánico, antes de su análisis cromatográfico.

2. OBJETIVO

En el capítulo anterior se propuso una reacción de metilación *in situ* en el vial de HS para la determinación de ibuprofeno (ácido 2-(p-isobutilfenil) propiónico) en muestras acuosas. Como sistema de inyección del espacio de cabeza en el sistema cromatográfico, se utilizó un inyector de temperatura programada (PTV).

En el presente trabajo se propone un enfoque similar, con la formación de una amida como derivado, utilizando una carbodiimida soluble en agua, 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDC) y una amina, 2,2,2-trifluoroetilamina (TFEA). Se volvió a seleccionar como analito el ibuprofeno entre todos los NSAIDs, como consecuencia de su frecuente detección en aguas naturales y de los elevados niveles de concentración encontrados [25,26]. Su presencia puede explicarse debido a su habitual prescripción por parte de los medios sanitarios, así como a su amplio uso. El ibuprofeno se ha incluido en estudios destinados a una primera evaluación de la contaminación por compuestos farmacéuticos [27,28].

Con la metodología propuesta, no es necesario llevar a cabo ninguna etapa de extracción (de un medio acuoso a un medio orgánico o hidro-orgánico) antes del análisis cromatográfico, como ocurre cuando se utilizan otro tipo de reacciones frecuentes para NSAIDs, tales como sililaciones [29-32] o alquilaciones [33-35]. Además, la utilización de generación de espacio de cabeza hace que la extracción líquido-líquido de los derivados sea innecesaria, simplificando el proceso analítico.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiales, disoluciones estándar y muestras

El ácido 2-(p-isobutilfenil)propiónico (ibuprofeno), el clorhidrato de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDC) y la 2,2,2-trifluoroetilamina (TFEA) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El cloruro sódico, el hidrogenofosfato disódico dihidrato y el ácido ortofosfórico fueron suministrados por Scharlau (Barcelona, España). El acetonitrilo era de Merck (Darmstadt, Alemania).

Se preparó una disolución patrón de ibuprofeno (2000 mg/L, en acetonitrilo), y se almacenó a 4 °C en una nevera. Esta disolución se utilizó para dopar las muestras de agua a las diferentes concentraciones analizadas. La optimización del método se llevó a cabo con agua ultrapura (UHQ), obtenida con un sistema de purificación de agua Wasserlab Ultramatic (Noáin, España).

El medio tampón utilizado en los estudios de pH fue el descrito por McIlvaine y Whiting [36]. Los diferentes valores de pH se obtuvieron mezclando diferentes proporciones de dos disoluciones acuosas, una de ácido cítrico (0.25 M) y otra de Na₂HPO₄ (0.50 M). Una vez elegido el valor óptimo de pH = 6, se preparó un medio tampón a este valor pesando Na₂HPO₄ y disolviéndolo en agua, hasta una concentración 0.5 M, ajustando posteriormente al pH deseado con H₃PO₄.

El procedimiento propuesto se utilizó para la determinación de ibuprofeno en muestras de agua de mar (La Coruña, España) y agua residual, tanto a la entrada como a la salida de la misma planta de tratamiento de agua residual (EDAR) de Salamanca, que abastece a una población de 260 000 habitantes.

3.2. Reacción de derivatización

En un vial de HS de 10 mL se añaden 2.5 g de NaCl. A continuación se añade 0.40 mL de una disolución acuosa de EDC 0.4 M, seguido de 0.40 mL de una disolución acuosa de TFEA 0.4 M y 0.40 mL de una disolución tampón (pH = 6) 0.5 M. Finalmente, se añaden 4.0 mL de una disolución acuosa dopada con ibuprofeno a un nivel de concentración determinado. El vial se cierra herméticamente y se coloca en la bandeja del automuestreador CombiPAL.

3.3. Generación de espacio de cabeza

El muestreo mediante generación de espacio de cabeza se llevó a cabo con el muestreador PAL (CTC Analytics AG, Zwinger, Suiza). El sistema de muestreo consta de una bandeja para el análisis de 32 muestras consecutivas y un horno con seis posiciones. La temperatura del horno se mantuvo a 95 °C y el tiempo de equilibrado (durante el cual también tiene lugar la reacción de derivatización) se fijó en 15 min. Durante este tiempo se agitó la muestra a una velocidad de 750 rpm. Para la inyección del espacio de cabeza se utilizó una jeringa de 2.5 mL, mantenida a una temperatura de 130 °C, fijando un volumen de inyección de 2.40 mL. Las velocidades de llenado y de inyección se fijaron en 100 µL/s y 200 µL/s, respectivamente. Una vez transcurrida la inyección, la jeringa se limpió con un flujo de helio durante 2 min. El tiempo entre muestras se fijó en 16 min.

3.4. Inyector de temperatura programada

Todos los experimentos se llevaron a cabo con un inyector de temperatura programada, PTV (CIS-4, Gerstel, Baltimore, MD, USA). Se utilizó un *liner* relleno de un adsorbente químico (Tenax-TA) (71 mm x 2

mm). En el método optimizado, se seleccionó el modo de inyección *solvent-vent*. El enfriamiento del inyector se llevó a cabo utilizando CO₂ líquido.

La temperatura inicial del inyector se fijó en 142 °C. El flujo de venteo se ajustó a 30 mL/min, y la presión de venteo a 34.5 kPa. El tiempo de purga se fijó en 1.20 min. La temperatura inicial del inyector se mantuvo durante 1.25 min, como mecanismo de seguridad para que la rampa de calentamiento del *liner* comenzara una vez que la válvula de *split* estuviera cerrada. Una vez que ha finalizado la etapa de venteo, la válvula de *split* se cierra y el *liner* se calienta a 12 °C/s hasta 300 °C, transfiriéndose los analitos desde el inyector a la columna (1.5 min). A continuación, la válvula de *split* se vuelve a abrir, y el *liner* se calienta hasta 320 °C (12 °C/s), manteniéndose esta temperatura durante 2 min.

3.5. Cromatografía de gases

El cromatógrafo de gases utilizado fue un Agilent 6890 equipado con una columna capilar de baja polaridad DB-VRX (20 m x 0.18 mm x 1 µm, rango de trabajo -10 – 260 °C) de J&W Scientific (Folsom, CA, USA). Como gas portador se utilizó helio N50 (99.999 % pureza; Air Liquide).

El programa de temperaturas del horno (que comienza simultáneamente con la inyección en el PTV) implica una temperatura inicial de 50 °C durante 2.70 min, esta temperatura se incrementó hasta 70 °C a una velocidad de 120 °C/min, incrementándose posteriormente hasta 200 °C a una velocidad de 70 °C/min, y, finalmente, incrementándose hasta 250 °C a una velocidad de 45 °C/min, manteniéndose esta temperatura durante 1.4 min. Las rampas de temperatura seleccionadas son las máximas permitidas por la configuración instrumental utilizada. El tiempo total del cromatograma era 7.20 min.

3.6. Espectrometría de masas

El detector utilizado fue un espectrómetro de masas de tipo cuadrupolar (HP 5973). Se trabajó en la modalidad de impacto electrónico, utilizando un voltaje de ionización de 70 eV. La temperatura de la fuente de ionización era 250 °C, y la del cuadrupolo 150 °C. El filamento se mantuvo apagado hasta el minuto 5.5 min del análisis cromatográfico (*solvent delay*). En el modo de adquisición de datos Scan se registraron las relaciones m/z entre 50 y 300 uma, la velocidad de registro se fijó en 5.46 ciclos/segundo y se seleccionó un valor umbral de abundancia de 0. Este modo de adquisición se utilizó para los diferentes estudios de optimización. El ibuprofeno se identificó por comparación del espectro con el obtenido al inyectar una disolución patrón del analito derivatizado. En el modo de adquisición SIM, se seleccionó un único grupo de iones, el cual contenía los característicos del derivado del ibuprofeno (161, 119, 91). La adquisición de señales para cada ion se realizó con un tiempo de permanencia de 30 ms. La recogida de los datos cromatográficos se realizó con el software Enhanced ChemStation, G1701EA Ver. E 00.00.202, de Agilent Technologies.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Variables que afectan a la generación de espacio de cabeza y a la reacción de derivatización

En la figura 1 se muestra el mecanismo descriptivo de la reacción de derivatización propuesta [37].

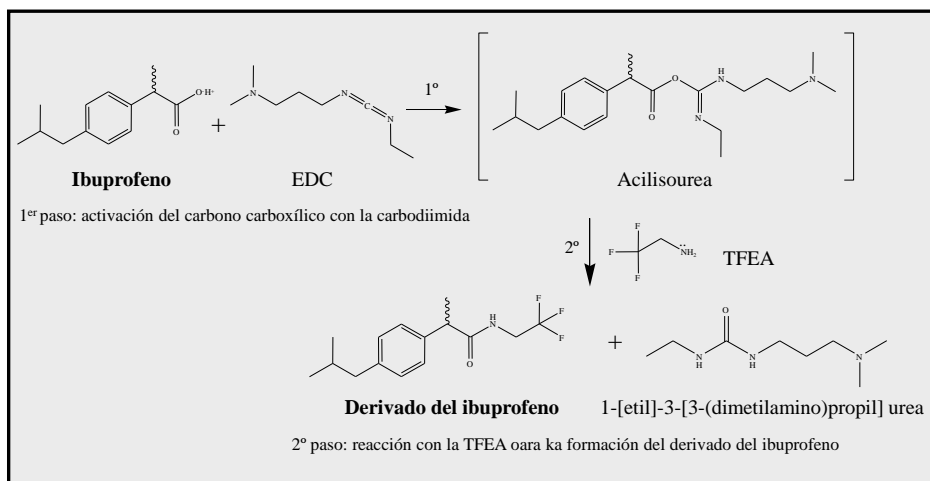


Figura 1: Esquema de la reacción de derivatización del ibuprofeno con la EDC y TFEA

El papel de la carbodiimida es el de agente de condensación para favorecer la reacción entre el ácido carboxílico y la amina, con la formación de un producto intermedio más reactivo que el ácido carboxílico, y la formación final de una amida como derivado.

Se realizó una serie de experimentos preliminares con objeto de optimizar las variables que afectaban a la generación de espacio de cabeza, utilizando una muestra de agua dopada con una concentración de ibuprofeno de 500 µg/L. En la figura 2 se muestran los resultados obtenidos.

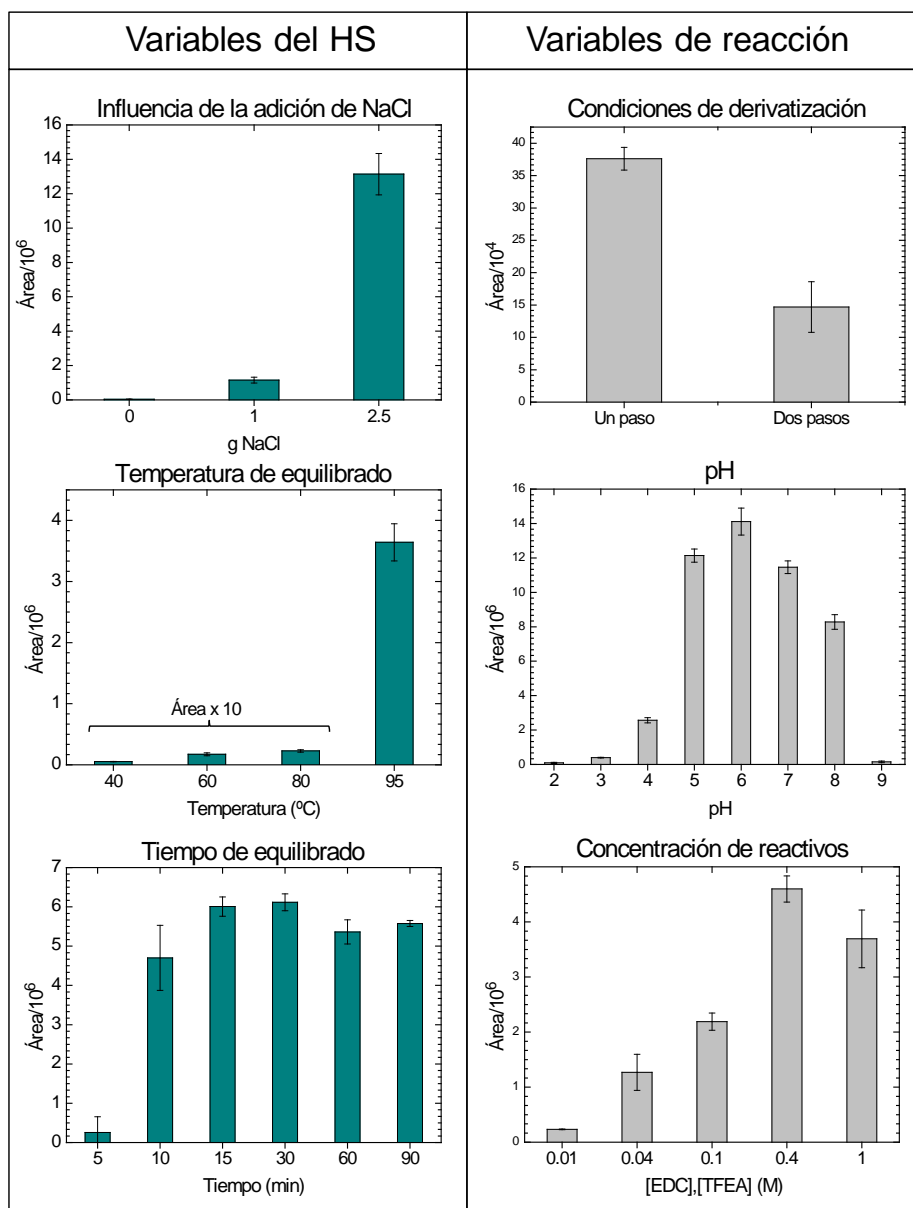


Figura 2: Estudio de las variables que afectan a la generación de volátiles en el espacio de cabeza y a la reacción de derivatización

En primer lugar, se estudió la variación del coeficiente de actividad (γ_i) modificando la matriz de la muestra. En el caso de muestras acuosas y analitos polares, esto se consigue añadiendo un electrolito al medio (*salting-out*). Se realizó un estudio añadiendo tres cantidades de NaCl a los viales: sin NaCl, 1.0 g en 5.2 mL y 2.5 g en 5.2 mL (sobresaturación). Los mejores resultados se obtuvieron bajo las condiciones de sobresaturación, con un aumento de señal de 372 veces frente a la no adición de NaCl, y de 11 veces frente a la situación intermedia.

Respecto a la temperatura del horno, se estudiaron diferentes valores: 40, 60, 80 y 95 °C. Se seleccionó este último, un valor adecuado cuando se trabaja con muestras acuosas. Para valores inferiores, la señal disminuía drásticamente.

Finalmente, se estudió el tiempo durante el cual los viales eran calentados en el horno. El intervalo estudiado fue de 5 a 90 min. Cabe señalar que, durante este tiempo, tiene lugar tanto la generación de volátiles como la reacción de derivatización. Se seleccionó un valor de 15 min, para el cual se obtenía la máxima señal, así como buenos valores de repetibilidad.

Para determinar las condiciones más favorables de la reacción, se optimizaron las siguientes variables: orden de adición de los reactivos, pH del medio, y concentración de reactivos de derivatización (EDC y TFEA). Todos los estudios se realizaron con una muestra acuosa dopada con una concentración de ibuprofeno de 500 $\mu\text{g/L}$. Los resultados se muestran también en la figura 2.

El mecanismo propuesto para la reacción implica dos etapas consecutivas, en primer lugar la activación del carbono que soporta el grupo OH por reacción con la carbodiimida y, a continuación, la reacción entre la acilisourea intermedia (más reactiva que el ácido carboxílico) con la 2,2,2-trifluoroetilamina. En consecuencia, en primer lugar se estudió si existían diferencias entre las señales obtenidas cuando la reacción se llevaba

a cabo en un solo paso experimental, mezclando los reactivos y el analito simultáneamente, o en dos pasos experimentales independientes, añadiendo los reactivos de forma separada. En el primer caso (un solo paso experimental, ver sección “Parte experimental”, 3.2.), se añadieron en un vial las disoluciones de EDC y TFEA, la disolución tampón pH=5, y la muestra acuosa dopada. El vial se cerró herméticamente, y se agitó durante 15 min antes de su análisis cromatográfico. En el segundo caso, se añadió únicamente la disolución acuosa dopada, la disolución amortiguadora y la carbodiimida. El vial se cerró y se agitó durante 5 min con un Vortex, permitiendo que tuviera lugar el primer paso de la reacción. El vial volvió a abrir para añadir la TFEA sobre el intermedio de reacción. Se observó que, cuando el proceso tenía lugar en dos pasos experimentales, se producía una disminución en la señal analítica del 65 %, por lo que se decidió trabajar mezclando los reactivos y el analito en un solo paso que, además, simplificaban el proceso.

Respecto al estudio de pH, éste se estudió en un intervalo de 2.2 a 9. Como puede observarse en la figura 2, la reacción dependía fuertemente del pH, obteniéndose la máxima señal para un valor de 6. El tampón fosfato (ver sección 3.1.) se ajustó a este valor.

Finalmente, se estudió la influencia de la concentración de reactivos. La estequiometría de la reacción es 1:1, por lo que se decidió variar la concentración de EDC y TFEA de forma simultánea, en un rango de 0.010 a 1.0 M. Los mejores resultados se obtuvieron para una concentración 0.40 M, la cual se seleccionó como concentración de trabajo. Se repitió el mismo experimento para una concentración de ibuprofeno de 10 µg/L, obteniéndose resultados análogos.

4.2. PTV-GC-MS

4.2.1. Optimización del inyector de temperatura programada

Las variables optimizadas en el modo de inyección *solvent-vent* fueron: temperatura (A), tiempo (B) y flujo de venteo (C). Para estudiar el efecto de estas variables, así como de sus posibles interacciones, se utilizó un diseño experimental de tipo Box-Behnken. Éste permite la generación de superficies de respuesta utilizando tres niveles de cada factor (o variable) estudiado. En la tabla 1 se muestra la matriz de diseño. En todos los casos, se utilizaron muestras de agua dopadas con una concentración de ibuprofeno de 50 µg/L. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado, para poder estudiar si el modelo generado presentaba fallo de ajuste. Como factor respuesta, se seleccionó el área de pico obtenido al extraer en los cromatogramas la relación m/z 161, correspondiente al pico base del espectro de masas del derivado del ibuprofeno. El único modelo que no presentaba fallo de ajuste era el que incluía las variables, sus cuadrados y las interacciones entre ellas.

Tabla 1: Matriz de diseño obtenida a partir del diseño experimental

Experimento	Factores		
	A	B	C
1	130.0	0.40	65.0
2	170.0	0.40	65.0
3	130.0	1.20	65.0
4	170.0	1.20	65.0
5	130.0	0.80	30.0
6	170.0	0.80	30.0
7	130.0	0.80	100.0
8	170.0	0.80	100.0
9	150.0	0.40	30.0
10	150.0	1.20	30.0
11	150.0	0.40	100.0
12	150.0	1.20	100.0
13	150.0	0.80	65.0

Como puede observarse en la tabla 2, todas las variables consideradas para el diseño experimental, así como sus cuadrados e interacciones, eran significativas, con la excepción del cuadrado del tiempo de venteo (BB), lo que indica que la respuesta era lineal respecto a esa variable.

Para el caso de la temperatura de venteo, a medida que aumentaba, también lo hacía la señal, hasta un determinado valor, a partir del cual disminuía. Esto se debe a que, a temperaturas elevadas, el analito era eliminado en la etapa de venteo. Para el caso del flujo de venteo, al aumentar su valor, la señal disminuía, mientras que para el tiempo de venteo, cuando se aumentaba su valor, aumentaba también la señal.

Tabla 2: Resultados del diseño experimental

Correlación múltiple: 0.955 (cal) R ² : 0.912 (cal)		
	valor de p	Coefficientes
Ordenada en el origen	<0.0001	5.911 x 10 ⁶
A	<0.0001	- 6.849 x 10 ⁴
B	0.0090	- 1.010 x 10 ⁶
C	<0.0001	- 4.532 x 10 ⁴
AB	0.0144	- 3.355 x 10 ⁵
AC	<0.0001	- 7.017 x 10 ⁵
BC	0.0010	- 4.696 x 10 ⁵
AA	0.0024	- 5.669 x 10 ⁵
BB	0.2968	- 1.811 x 10 ⁵
CC	0.0020	5.795 x 10 ⁵

Para visualizar el efecto de las interacciones, se utilizaron superficies de respuesta. En la figura 3 se muestra cada una de las superficies de las interacciones observadas, para la relación m/z 161.

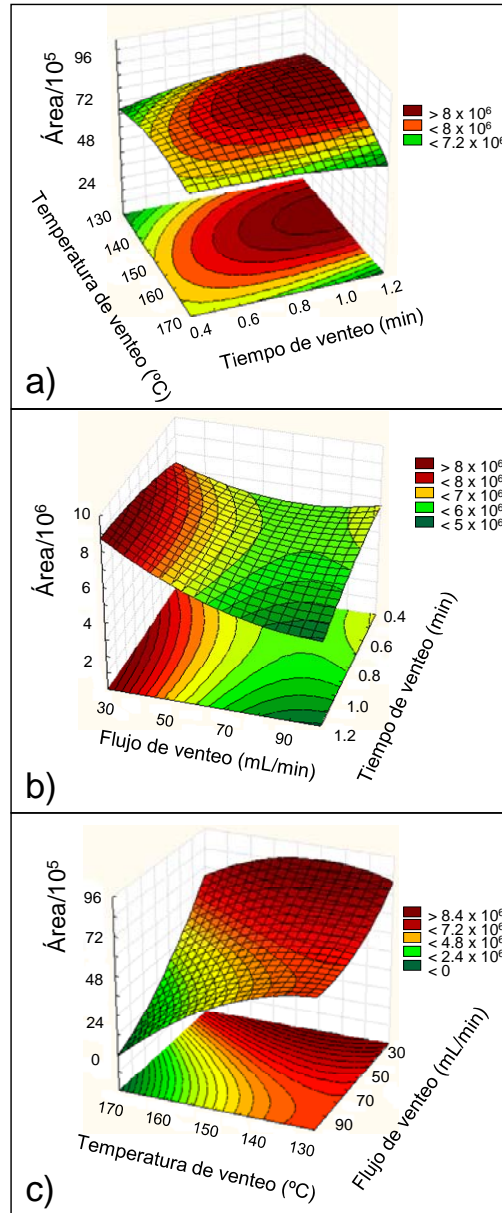


Figura 3: Superficies de respuesta para la temperatura de venteo y el tiempo de venteo (a), para el flujo de venteo y el tiempo de venteo (b) y para la temperatura de venteo y el flujo de venteo (c), para una concentración de ibuprofeno de 50 µg/L

Respecto a la superficie de respuesta de la temperatura de venteo-tiempo de venteo (AB, figura 3a), los mejores resultados se obtuvieron para tiempos de venteo altos y temperaturas entre 130 y 150 °C. Para la superficie de respuesta tiempo de venteo-flujo de venteo (BC, figura 3b), la máxima señal se obtuvo para tiempos altos y flujos bajos. Finalmente, para el caso de la superficie de respuesta de la temperatura de venteo-flujo de venteo (AC, figura 3c), fue donde se observó la mayor variación de señal, con valores óptimos para temperaturas entre 130 y 150 °C, y un flujo de venteo de 30 mL/min.

A la vista de los resultados obtenidos, los valores que generaban la máxima señal fueron 1.20 min para el tiempo de inyección, 142 °C para la temperatura de venteo y 30 mL/min para el flujo de venteo.

Para comprobar que el modo de inyección elegido era el más adecuado, se hizo un estudio comparativo de las señales obtenidas con el modo de inyección *splitless* caliente, *split* caliente y *solvent-vent* (figura 4). En el modo de inyección *split* en caliente, la relación de división fue 1:5 y la temperatura del inyector se mantuvo a 300 °C durante todo el análisis. Esta misma temperatura se mantuvo en el modo de inyección *splitless* en caliente, con un tiempo de *splitless* de 2.00 min. En el modo de inyección *solvent-vent*, las condiciones seleccionadas fueron las óptimas obtenidas en el diseño experimental. Tanto en el modo de inyección *split* caliente como en el *solvent-vent*, el volumen de inyección fue 2.40 mL. En el modo de inyección *splitless* caliente, el volumen de inyección se fijó en 250 µL, como consecuencia del volumen interno de los *liners* utilizados, que no permiten la inyección de volúmenes mayores si se quiere controlar las condiciones de presión del cromatógrafo. La máxima señal se obtuvo con el modo de inyección *solvent-vent*, por lo que se confirmó como el óptimo.

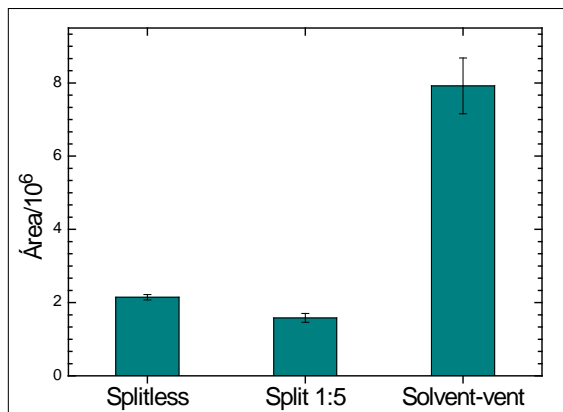


Figura 4: Comparación de las señales obtenidas para la relación m/z 161 con tres de los modos de inyección permitidos por el PTV: *splitless* caliente, *split* caliente (1:5) y *solvent-vent*

4.3. Evaluación del método HS-PTV-GC-MS

En la tabla 3 se muestran las características analíticas del método propuesto. Se obtuvo una recta de calibrado con doce niveles de concentración, entre 0.04 y 10 $\mu\text{g/L}$. Cada nivel se analizó por triplicado en el modo de adquisición de datos SIM (161, 119, 91). Como señal analítica se seleccionó el área de pico al extraer la relación m/z 161 de cada cromatograma.

Las relaciones m/z seleccionadas son características del derivado del ibuprofeno, así como lo son del ibuprofeno, indicando que la fragmentación de la molécula ocurre de una forma similar. En la figura 5 se muestran los espectros de masas tanto para el ibuprofeno (NIST) como para el derivado formado (espectro experimental).

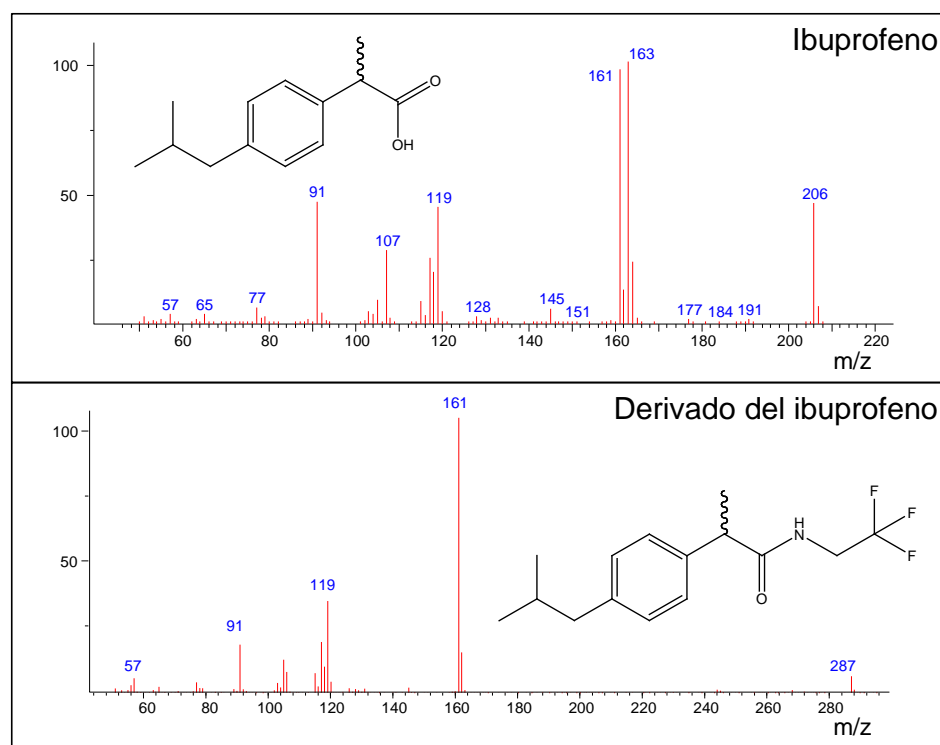


Figura 5: Espectros de masas del ibuprofeno y del derivado formado (amida)

En los cromatogramas registrados en el modo *Scan* para el derivado del ibuprofeno se encontró el pico molecular (m/z 287), confirmando la identidad del compuesto, aunque no se seleccionó en el modo SIM debido a su baja abundancia. Para el derivado, la relación m/z 161 corresponde a la pérdida del fragmento $O=C-NH-CH_2-CF_3$, mientras que para el ibuprofeno, esta relación corresponde a la pérdida del grupo $O=C-OH$. Las m/z 119 y 91, encontradas en los espectros de ambos compuestos, son características de compuestos bencílicos con cadenas alquílicas.

El modelo de calibración mostraba comportamiento lineal. La validez del modelo se comprobó mediante análisis de varianza (ANOVA), observándose que no presentaba fallo de ajuste. El valor del coeficiente de correlación (R^2) era superior a 0.99.

Tabla 3: Características analíticas del método propuesto

Análito	Iones SIM	Ordenada en el origen	Pendiente	LD (ng/L)	LQ (ng/L)	RSD (%)		Predicción, µg/L
						µg/L	µg/L	
Ibuprofeno	161, 119, 91	$(9 \pm 8) \times 10^4$	$(65 \pm 2) \times 10^4$	9.6	32	6.7	9.2	0.48 ± 0.08 2.3 ± 0.3 5.2 ± 0.3
						0.50	5.0	0.50 2.25 5.0

Se estudió la repetibilidad del proceso a dos niveles de concentración, 0.5 y 5 µg/L, calculándose la desviación estándar relativa (RSD, %) de 10 réplicas. Los valores obtenidos fueron 6.7 % y 9.2 %, respectivamente.

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) se estimaron utilizando las siguientes fórmulas:

$$LD = \frac{3.3\sigma}{S}; LQ = \frac{10\sigma}{S}$$

donde σ es la desviación estándar (número de réplicas, $n = 10$) de una señal correspondiente a una relación señal/ruido de aproximadamente 3, y S es la pendiente de la curva de calibrado.

El límite de detección obtenido fue de 9.6 ng/L, y el de cuantificación, 32 ng/L. Estos valores se encuentran entre los más bajos encontrados en bibliografía, y son apropiados para la determinación de ibuprofeno en aguas superficiales [33,38].

Si se comparan los resultados obtenidos en el presente trabajo con el de Ford y colaboradores [24], en el cual los autores utilizan la misma reacción de derivatización, pero con una extracción líquido-líquido de los derivados formados, previamente a su inyección en el sistema cromatográfico, la mejora obtenida es muy significativa, pasando de LD de 74.8 µM (15.4 mg/L) a los anteriormente mencionados. Esta mejora puede estar relacionada con la utilización del modo de inyección *solvent-vent*, así como a la utilización del modo de adquisición de datos SIM en el espectrómetro de masas.

Además, los valores de LD y LQ también mejoran respecto al trabajo descrito en el capítulo anterior (Capítulo V, LD 0.23 µg/L), en el cual la reacción tenía lugar con metanol en medio ácido, utilizando también la generación de espacio de cabeza estática. Adicionalmente, el tiempo

requerido para generar el espacio de cabeza y para que tenga lugar la reacción también disminuye, pasando de 60 min a 15 min.

Los límites de detección obtenidos cuando se utiliza dimetilsulfato como reactivo de derivatización [12], utilizando como técnica de extracción la microextracción en fase sólida en la modalidad espacio de cabeza, son de aproximadamente 0.3 ng/L. Sin embargo, esta reacción presenta la desventaja de que el reactivo es altamente tóxico y carcinogénico [39,40].

Cuando la reacción de derivatización tiene lugar en medio orgánico, los límites de detección obtenidos son del orden de los ng/L en algunos casos [33,35]; sin embargo, es necesario una etapa de extracción en fase sólida previa.

Para comprobar la exactitud del método, se dopó agua ultrapura a tres niveles de concentración: 0.50, 2.25 y 5.0 µg/L. En todos los casos, las concentraciones predichas por el modelo fueron significativamente iguales a las utilizadas para dopar las muestras de agua (tabla 3). Los valores de recuperaciones aparentes, calculados como el cociente entre la concentración predicha y la concentración añadida (expresado como porcentaje), fueron desde el 96 % hasta el 104 %.

4.4. Tiempo de análisis

La metodología propuesta en el presente trabajo requiere un tiempo total de 31 min para el análisis de la primera muestra (15 min de reacción y generación de volátiles; 7.2 min de análisis cromatográfico, y en torno a 8 min para que el GC y el PTV se enfríen desde la temperatura final alcanzada (250 °C y 320 °C, respectivamente) hasta las condiciones iniciales, 50 °C y 142 °C, respectivamente). Sin embargo, una vez transcurrida esta primera inyección, es posible analizar el resto de las muestras de una misma

secuencia cada 16 min, ya que el horno multiposición del HS permite el solapamiento de estos tiempos.

4.5. Muestras reales

Se analizaron diferentes tipos de aguas: agua de mar y agua residual (tomada tanto a la entrada como a la salida de la misma planta de tratamiento de aguas residuales). No se encontraron niveles de ibuprofeno por encima del límite de detección del método para el agua de mar y el agua residual tratada; sin embargo, sí se detectó en el agua residual de entrada (sin tratar). En la figura 6 se muestran los cromatogramas del agua UHQ, agua de mar y agua residual tratada, dopadas a un nivel de concentración de 0.50 µg/L, junto con el cromatograma correspondiente al agua residual de entrada (sin dopar), tanto sin diluir como diluida en una proporción 1:1 con agua UHQ. Esta dilución se llevó a cabo tras observarse que la repetibilidad de la inyección para el agua bruta era bastante mala, y que al añadir concentraciones crecientes de ibuprofeno no se producía variación en la señal analítica. Estos efectos pueden atribuirse a la complejidad de la muestra, que altera las condiciones en las que tienen lugar tanto la reacción como la generación de volátiles. Estos efectos pueden reducirse diluyendo la muestra con agua ultrapura.

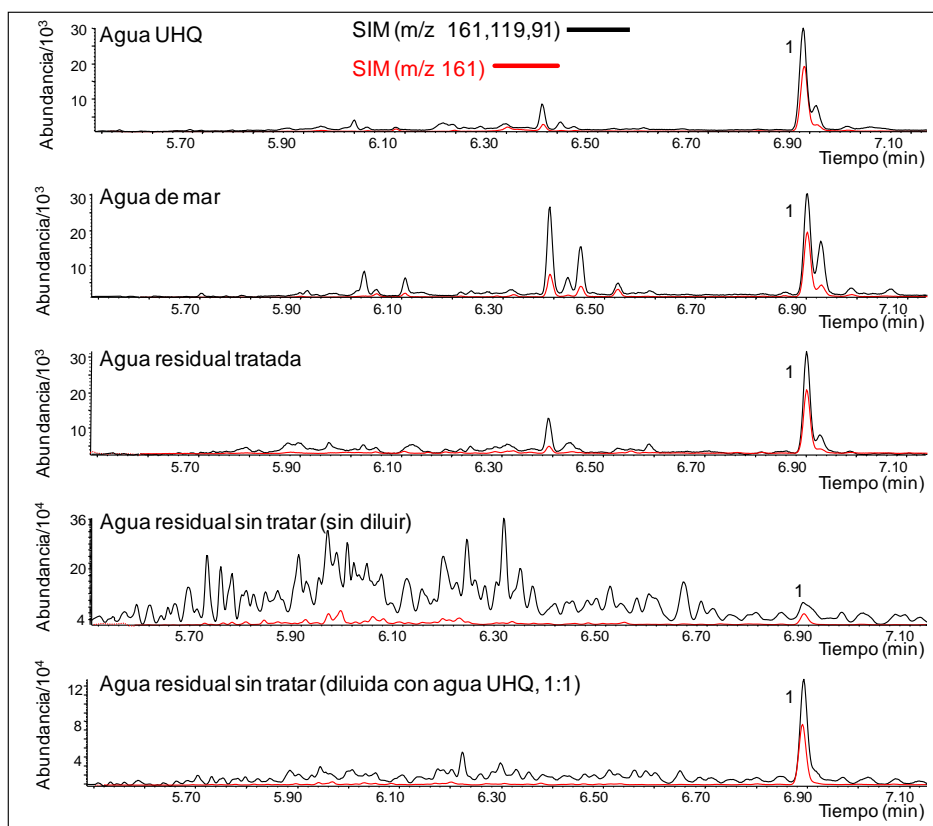


Figura 6: Cromatogramas de las diferentes matrices estudiadas. Las muestras de agua UHQ, agua de mar y agua residual tratada fueron dopadas con una concentración de ibuprofeno de 0.50 $\mu\text{g/L}$. (1) Derivado del ibuprofeno

Se estudió la posible existencia de efecto matriz comparando la pendiente de la curva de calibración en agua ultrapura, con las obtenidas en los tres tipos de agua analizados, dopados a tres niveles de concentración: 0.50, 2.25 y 5.0 $\mu\text{g/L}$ para el agua de mar y el agua residual tratada, y 5.0, 10 y 15 $\mu\text{g/L}$ para el agua residual sin tratar diluida (tabla 4).

Tabla 4: Valores de las pendientes obtenidas para cada tipo de agua estudiada

Muestra	Pendiente
Agua UHQ	$(67 \pm 9) \times 10^4$
Agua de mar	$(60 \pm 7) \times 10^4$
Agua residual tratada	$(64 \pm 7) \times 10^4$
Agua residual sin tratar (diluida con agua UHQ, 1:1)	$(34 \pm 5) \times 10^4$

En cada caso, se restó a la señal del derivado del ibuprofeno de las muestras de agua dopadas, la correspondiente a los blancos sin dopar, presente de forma natural. Para el agua de mar y el agua residual tratada, no se observó la existencia de efecto de matriz. Sin embargo, para el agua residual sin tratar, se observó una disminución en la pendiente de la recta obtenida. Como consecuencia, para la cuantificación de ibuprofeno con el método propuesto, se utilizó calibración externa para el agua de mar y el agua residual tratada, y un protocolo de adición estándar para el agua residual sin tratar. Cada muestra se analizó por triplicado.

Para el caso del agua de mar y el agua residual tratada, se predijeron las muestras dopadas a una concentración de $0.50 \mu\text{g/L}$, obteniéndose en la predicción valores de 0.48 ± 0.08 y $0.47 \pm 0.09 \mu\text{g/L}$, respectivamente.

En el caso del agua residual sin tratar (diluida en proporción 1:1 con agua ultrapura), se cuantificó una concentración de $14 \pm 4 \mu\text{g/L}$. Este resultado no es sorprendente, ya que el ibuprofeno se utiliza muy frecuentemente y en algunos casos, cerca del 95 % de la dosis suministrada a los pacientes se excreta sin metabolizar, eliminándose a través de las aguas residuales domésticas [41].

Los resultados obtenidos sugieren que la eficacia de eliminación del ibuprofeno en la planta de tratamiento de agua residual es muy elevada, próxima al 100 %, ya que no se han detectado niveles de ibuprofeno en el agua residual tratada.

5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se propone la utilización de una reacción de derivatización *in situ* para el análisis de ibuprofeno en muestras acuosas, en la modalidad de generación de espacio de cabeza estático. Como reactivos de derivatización se han utilizado una carbodiimida soluble en agua, 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDC) y la 2,2,2-trifluoroetilamina (TFEA).

La configuración instrumental utilizada (HS-PTV-GC-MS) tiene la ventaja de que, desde la mezcla de reactivos en el vial de HS, todo el proceso tiene lugar de forma continua, con la consiguiente reducción de los errores asociados a la manipulación de muestra. La mayor limitación de ampliar esta metodología a otros ácidos carboxílicos presentes en las aguas radica en que los derivados formados tienen que ser suficientemente volátiles.

Se optimizaron las variables relacionadas con la generación de volátiles, la reacción de derivatización y la inyección en el PTV. El método propuesto es altamente sensible, obteniéndose un límite de cuantificación para el analito en cuestión de 32 ng/L, con buenos valores de repetibilidad (RSD por debajo del 10 %) y exactitud (recuperaciones aparentes entre el 96 % y el 104 %). Con estas características, el método es adecuado para la determinación de ibuprofeno en aguas superficiales y residuales. En el caso de muestras complejas, es necesario adoptar un protocolo de adición estándar para la cuantificación del analito.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] B. Kolb, *J. Chromatogr. A* 842 (1999) 163.
- [2] D.A. Lambropoulou, I.K. Konstantinou, T.A. Albanis, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 70.
- [3] J. Regueiro, E. Becerril, C. García-Jares, M. Llompart, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4693.
- [4] J.L. Pérez Pavón, A.M. Casas Ferreira, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1192.
- [5] A. Llop, E. Pocurull, F. Borrull, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 575.
- [6] A.K.K.V. Pillai, K. Gautam, A. Jain, K. K. Verma, *Anal. Chim. Acta* 632 (2009) 208.
- [7] L. Segovia-Martinez, A. Bouzas-Blanco, P. Campíns-Falcó, A. Seco-Torrecillas, *Talanta* 80 (2010) 1888.
- [8] A.M. Carro, I. Neira, R. Rodil, R.A. Lorenzo, *Chromatographia* 56 (2002) 733.
- [9] Y.H. Wang, P.K. Wong, *Water Res.* 39 (2005) 1844.
- [10] P. Varanusupakul, N. Vora-adisak, B. Pulpoka, *Anal. Chim. Acta* 598 (2007) 82.
- [11] J.L. Pérez Pavón, A.M. Casas Ferreira, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6728.
- [12] L. Araujo, J. Wild, N. Villa, N. Camargo, D. Cubillan, A. Prieto, *Talanta* 75 (2008) 111.
- [13] Gy. Wittmann, H. Van Langenhove, J. Dewulf, *J. Chromatogr. A* 874 (2000) 225.
- [14] S.Y. Han, Y.A. Kim, *Tetrahedron* 60 (2004) 2447.
- [15] K. De Wael, H. Buschop, L. De Smet, A. Adriaens, *Talanta* 76 (2008) 309.
- [16] J. Shen, C.C. Liu, *Sens. Actuators B.* 120 (2007) 417.
- [17] B. Teste, J. Vial, S. Descroix, T. Georgelin, J.M. Siaugue, J. Petr, A. Varenne, M.C. Hennion, *Talanta* 81 (2010) 1703.

- [18] M. Kibler, K. Bächmann, J. Chromatogr. A 836 (1999) 325.
- [19] H. Ozawa, T. Tsukioka, Analyst 115 (1990) 1343.
- [20] H. Ozawa, J. Chromatogr. 644 (1993) 375.
- [21] R. Peters, J. Hellenbrand, Y. Mengerink, S.J. Van der Wal, J. Chromatogr. 1031 (2004) 35.
- [22] H. Miwa, J. Chromatogr. A 881 (2000) 365.
- [23] F. Robert-Peillard, E. Palacio-Barco, Y. Dudal, B. Coulomb, J.L. Boudenne, Anal. Chem. 81 (2009) 3063.
- [24] Q.L. Ford, J.M. Burns, J.L. Ferry, J. Chromatogr. A 1145 (2007) 241.
- [25] M.J. Gómez, M.J. Martínez Bueno, S. Lacorte, A.R. Fernández-Alba, A. Agüera, Chemosphere 66 (2007) 993.
- [26] L.H.M.L.M. Santos, A.N. Araújo, A. Fachini, A. Pena, C. Delerue-Matos, M.C.B.S.M. Montenegro, Journal of Hazard. Mater. 175 (2010) 45.
- [27] S. Weigel, U. Berger, E. Jensen, R. Kallenborn, H. Thoresen, H. Hühnerfuss, Chemosphere 56 (2004) 583.
- [28] Z. Moldovan, Chemosphere 64 (2006) 1808.
- [29] A. Sebók, A. Vasánits-Zsigrai, Gy. Palkó, Gy. Zárny, I. Molnár-Perl, Talanta 76 (2008) 642.
- [30] R. Gibson, E. Becerril-Bravo, V. Silva-Castro, B. Jiménez, J. Chromatogr. A 1169 (2007) 31.
- [31] A. Togola, H. Budzinski, Anal. Bioanal. Chem. 388 (2007) 627.
- [32] I. Rodríguez, J. Carpinteiro, J.B. Quintana, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, J. Chromatogr. A 1024 (2004) 1.
- [33] S. Öllers, H.P. Singer, P. Fässler, S.R. Müller, J. Chromatogr. A 911 (2001) 225.
- [34] S.S. Verenitch, C.J. Lowe, A. Mazumder, J. Chromatogr. A 1116 (2006) 193.
- [35] N. Migowska, P. Stepnowski, M. Paszkiewicz, M. Gołębiowski, J. Kumirska, Anal. Bioanal. Chem. 397 (2010) 3029.

-
- [36] D.D. Perrin, B. Dempsey, *Buffers for pH and Metal Ion Control*, Chapman and Hall, New York, 1987.
- [37] F.A. Carey, R.J. Sundberg, *Advanced Organic Chemistry, Part A: Structure and Mechanism*, Fifth Edition, Springer, New York, 2007.
- [38] P.H. Roberts, K.V. Thomas, *Sci. Total Environ.* 356 (2006) 143.
- [39] G.R. Hoffmann, *Mutat. Res.* 75 (1980) 63.
- [40] T. Düblin, H.J. Thöne, *J. Chromatogr.* 456 (1986) 233.
- [41] B. Halling-Sorensen, S. Nors Nielsen, P.F. Lanzky, F. Ingerslev, H.C. Holten Lützhof, S.E. Jorgensen, *Chemosphere* 36 (1998) 357.

TRABAJO PUBLICADO
PUBLISHED ARTICLE

VI



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

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



Headspace sampling with *in situ* carbodiimide-mediated derivatization for the determination of ibuprofen in water samples

Ana María Casas Ferreira, María Esther Fernández Laespada,
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:
Available online xxx

Keywords:
In situ derivatization
Headspace generation
Ibuprofen
Carbodiimide promoted derivatization
2,2,2-Trifluoroethylamine

ABSTRACT

A method using headspace generation and *in situ* derivatization with water soluble EDC (1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide) and TFEA (2,2,2-trifluoroethylamine) has been optimized for the determination of ibuprofen (2-(p-isobutylphenyl)propionic acid), one of the most common non-steroid anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in surface and wastewater samples. Derivatization was carried out in the vial of the headspace sampler (HS) in only 15 min, after which instrumental measurements were made with gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). As the injection system, a programmed temperature vaporizer (PTV) in the solvent-vent injection mode is proposed in order to increase the sensitivity of the measurements. The effects of the variables affecting HS generation, the derivatization reaction, and the instrumental PTV conditions were studied. A limit of quantification as low as 32 ng/L was achieved, and repeatability values were below 10%. Accuracy of the method was evaluated using spiked ultrapure water at three concentration levels, obtaining apparent recoveries between 96% and 104%. The proposed method was applied to the quantification of ibuprofen in sea water and urban wastewater samples.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Sample preparation has been considered the most polluting and time-consuming step of analytical procedures, as well as one of the most frequent sources of errors. The use of headspace sampling solves many of these problems by minimizing sample treatment. However, in many cases the limits of detection achieved are insufficient for the detection of the analytes of interest [1]. When this occurs, one possibility involves the use of programmed temperature vaporizers (PTV), which, by injection in the solvent-vent mode, to a large extent allows the solvent and compounds more volatile than the analytes of interest to be removed. Additionally, the formation of more volatile derivatives by derivatization reactions can also be used as a step prior to headspace sampling [2], allowing the use of this technique for compounds for which, owing to their low volatility, it would not be applicable.

Several derivatization reactions in water samples have been proposed using headspace sampling in its different modes, including static headspace (HS), headspace-solid phase microextraction or headspace-single drop microextraction. Acetylation with acetic anhydride in basic medium is commonly used for phe-

nolic compounds [3,4]. Pentafluorobenzaldehyde for the case of amines [5], 2,4-dinitrophenylhydrazine for carbonyl compounds [6], sodium tetraethylborate for organotin compounds [7] and sodium tetraphenylborate for organomercury compounds [8] have also been proposed. For carboxylic acids, reactions with MeOH in acidic medium [9–11], dimethyl sulfate [12] or benzyl bromide [13] have been reported.

To the best of our knowledge, headspace sampling has not yet been used in combination with another common derivatization reaction for carboxylic acids: carbodiimide-mediated amide formation. Carbodiimides have been widely used as reagents to promote condensation, particularly in peptide synthesis [14]. Within the fields of analytical chemistry and bioanalysis, they have been used in the covalent immobilization of proteins on different types of electrodes [15,16] or nanoparticles [17].

As derivatization agents of carboxylic acids, water-insoluble carbodiimides have been used [18–20], pointing to the need to use a phase-transfer step prior to the derivatization reaction. In contrast, the use of water-soluble carbodiimides allows the derivatization reaction to be accomplished without the need for a prior extraction step. In this sense, several works using a water-soluble carbodiimide, 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide (EDC), have been published, in which later analysis of the derivatized compounds was carried out with liquid chromatography [21,22], high-pressure ionic chromatography (HPIC) [23], or gas chromatog-

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

raphy [24]. In the latter case, a subsequent liquid–liquid extraction of the amides with an organic solvent was needed prior to the chromatographic analysis.

In a previous work developed at our laboratory [11], we reported the use of an *in situ* methylation reaction in the vial of a headspace sampler for the determination of ibuprofen (2-(*p*-isobutylphenyl)propionic acid) in aqueous samples. A programmed temperature vaporizer was used to introduce the sample into the gas chromatographic system.

In the present work we propose a similar approach, using carbodiimide-mediated amide formation with water-soluble EDC and 2,2,2-trifluoroethylamine (TFEA). Ibuprofen was again selected among the NSAIDs due to its frequent detection in environmental waters and the higher concentrations habitually found [25,26], probably as a result of its high prescription extent and wide usage. It has been included in studies aimed to obtain a first overview of contamination with pharmaceuticals [27,28]. With the proposed set-up, it is not necessary to implement previous extraction of the analyte from the aqueous matrix to an organic or hydro-organic medium, this step being mandatory in the types of derivatization most frequently used for NSAIDs prior to their GC analysis, such as silylation [29–32], or alkylation [33–35]. Moreover, headspace sampling makes the liquid–liquid extraction step of the ibuprofen derivative unnecessary to perform the analysis by gas chromatography, thereby simplifying the analytical process.

2. Experimental

2.1. Materials, standard solutions and samples

2-(*p*-isobutylphenyl)propionic acid (ibuprofen), 1-[3-(dimethylamino) propyl]-3-ethylcarbodiimide hydrochloride salt (EDC) and 2,2,2-trifluoroethylamine (TFEA) were supplied by Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Sodium chloride, di-sodium hydrogen phosphate dihydrate and ortho-phosphoric acid were from Scharlau (Barcelona, Spain). Acetonitrile was from Merck (Darmstadt, Germany).

A stock solution (2000 mg/L in acetonitrile) of ibuprofen was prepared and stored at 4 °C in a refrigerator. This solution was used to spike the water samples at the different concentrations analyzed. Optimization of the method was performed with ultra-high quality water (UHQ), obtained with a Wasserlab Ultramatic water purification system (Noain, Spain).

The buffer medium used in the pH studies has been described by McIlvaine and Whiting [36]. The different pH values were obtained by mixing different proportions of two aqueous solutions, one of citric acid (0.25 M) and the other of Na₂HPO₄ (0.50 M). Once the optimum values of pH 6.0 had been selected, a buffer with that pH value was prepared by weighing Na₂HPO₄ and dissolving in water to a concentration of 0.50 M, adjusting to the desired pH with H₃PO₄.

The proposed procedure was used for the determination of ibuprofen in samples of sea water (from A Coruña, N. Spain) and influent and effluent waters from the main wastewater treatment plant (WWTP) of Salamanca, with a population of 260,000 inhabitants.

2.2. Derivatization reaction

NaCl (2.5 g) was added to a 10-mL headspace vial. Then, 0.40 mL of an aqueous solution of EDC 0.40 M was added, followed by 0.40 mL of an aqueous solution of TFEA 0.40 M and 0.40 mL of a buffer solution at a pH 6.0 at a concentration of 0.50 M. Finally, 4.0 mL of an aqueous solution spiked at a given concentration of

ibuprofen was added. The vial was sealed hermetically and placed in the headspace sampler.

2.3. Headspace

HS sampling was performed with a PAL autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland). This sampler is equipped with a tray for 32 consecutive samples and an oven with positions for six sample vials. Oven temperature was kept at 95 °C and the equilibration time (coincident with the time given to perform the derivatization reaction) was set at 15 min. During this time, agitation of the sample was performed at 750 rpm. A 2.5-mL syringe at 130 °C was used, fixing an injection volume of 2.40 mL. The fill speed and injection speed were fixed to 100 μL/s and 200 μL/s, respectively. After injection, the syringe was cleaned with a flow of He for 2 min. The time between samples was set at 16 min.

2.4. Programmed temperature vaporization

All experiments were carried out with a PTV inlet (CIS-4, Gerstel, Baltimore, MD, USA). A Gerstel CIS-4 liner (71 mm × 2 mm) was used, packed with a chemical sorbent (Tenax-TA). In the optimized method, solvent-vent injection mode was used. Cooling was accomplished with liquid CO₂.

The initial injector temperature was set at 142 °C. Vent flow was adjusted to 30 mL/min, and vent pressure to 34.5 kPa. The purge time was set at 1.20 min. The initial temperature of the liner was maintained for 1.25 min as a safety mechanism so that the heating ramp would start when the split valve was closed. Once venting had finished, the split valve was closed and the liner of the PTV was flash-heated at 12 °C/s up to 300 °C. The analytes were then transferred from the liner to the capillary column (1.5 min). Then, the split valve was opened and the liner temperature was increased at 12 °C/s to 320 °C, and held for 2 min.

2.5. Gas chromatography

To perform the gas chromatography measurements, an Agilent 6890 GC device equipped with a low polarity DB-VRX capillary column (20 m × 0.18 mm × 1 μm, working range –10 °C to 260 °C) from J&W Scientific (Folsom, CA, USA) was used. The carrier gas was helium N50 (99.995% pure; Air Liquide).

The column oven temperature program (starting simultaneously with the PTV injection into the chromatographic column) used an initial temperature of 50 °C for 2.70 min; an increase at 120 °C/min to 70 °C; then an increase at 70 °C/min to 200 °C, and finally an increase at 45 °C/min to 250 °C, then holding for 1.4 min. These temperature ramps are the maximum ones permitted by the instrumental configuration employed. The total chromatographic run time was 7.20 min.

2.6. Mass spectrometry

The detector was a quadrupole mass spectrometer (HP 5973 N). It was operated in the electron-ionization mode using an ionization voltage of 70 eV. The ion source temperature was 250 °C, and the quadrupole was set to 150 °C. A solvent delay of 5.5 min was established, during which the filament was turned off. The *m/z* range in the scan mode was 50–300 amu; the scan rate was 5.46 cycles/s, and the abundance threshold value was set at 0. This acquisition mode was used for the different optimization studies. Ibuprofen was identified by comparison with the mass spectrum generated by a standard solution of the derivatized compound. In selected ion-monitoring mode (SIM), a single group of ions was used, containing the characteristic ions of the ibuprofen trifluoroethylamide derivative (161, 119, 91). The ions were acquired with a dwell-time

of 30 ms. Data acquisition was performed with Enhanced ChemStation, G1701EA Ver. E.00.00.202 software from Agilent Technologies.

3. Results and discussion

3.1. Variables affecting HS generation and the derivatization reaction

Fig. 1 shows a descriptive mechanism for the carbodiimide-mediated derivatization reaction [37]. The role of the carbodiimide is that of an active coupling agent for the reaction between the carboxylic acid and the amine, with the formation of an intermediate acylisourea and a final ibuprofen amide derivative.

Preliminary experiments were performed in order to study different parameters that might affect the generation of volatiles in the headspace sampler, at an ibuprofen concentration of 500 $\mu\text{g/L}$. Fig. 2 (upper part) shows the results obtained for the optimization of headspace generation.

First, the variation in the activity coefficient (γ_i) was studied by modifying the sample matrix. In the case of aqueous samples and polar analytes, this effect can be achieved by adding an electrolyte to the medium (*salting-out*). A study was made of the effect of the addition of the electrolyte (NaCl) to the vials at three concentration levels: without NaCl; 1.0 g in 5.2 mL, and 2.5 g in 5.2 mL (supersaturation). The best results were obtained under supersaturation conditions, with a 372-fold increase with respect to the conditions without NaCl, and 11-fold with respect to the intermediate situation.

Regarding the autosampler oven temperature, different values were studied: 40, 60, 80 and 95 °C. The one selected was 95 °C, which is an adequate value for headspace generation in aqueous systems. For lower values, the signal decreased dramatically.

Finally, the time during which the vials were heated in the oven was studied in the 5–90 min range. As well as being the time taken for headspace generation it is also the reaction time. A value of 15 min was chosen, for which the maximum signal observed had been obtained together with good measurement repeatability.

In order to determine the optimum reaction conditions for preparing the amide derivative of ibuprofen, the variables studied were as follows: the addition of reagents, the pH of the medium, and the concentrations of the derivatization reagents (EDC and TFEA). These studies were carried out with an aqueous sample spiked at a concentration of 500 $\mu\text{g/L}$ of ibuprofen. The results are shown in the lower part of Fig. 2.

The mechanism proposed for the reaction involves two consecutive steps, first the activation by the carbodiimide of the carbon bearing the –OH group and then the reaction between the intermediate acylisourea (more reactive than the carboxylic acid) with 2,2,2-trifluoroethylamine. Accordingly, a study was first made of whether there were any differences between the signals generated upon performing the derivatization in one experimental step, mixing the reagents and analyte simultaneously or in two separated steps, adding them separately. In the former case (1 experimental step) (see Section 2.2), the EDC and TFEA reagents, buffer adjusted to pH 5.0, and the aqueous solution of ibuprofen were added and the vial was shaken for 15 min before injection into the chromatographic system. In the second case, only the aqueous solution of ibuprofen, buffer adjusted to pH 5.0, and EDC were added. The vial was hermetically closed and shaken for 5 min with a Vortex device, allowing the first step in the reaction to occur. The vial was then reopened and TFEA was added to the reaction intermediate. We observed that when the process was carried out in two experimental steps, a decrease of about 65% occurred in the signal, such that it was decided to work in the first conditions, which were also simpler to implement.

With respect to the study of pH, this was performed in the pH 2.2–9.0 range. As may be seen in Fig. 2, the reaction was strongly pH-dependent, and the optimum signal was obtained for a pH value of 6.0. Phosphate buffer (see Section 2.1) was chosen to fix this value.

With regard to reagent concentrations, since the reaction stoichiometry is 1:1 it was decided to vary the concentrations of both EDC and TFEA simultaneously, after which we studied values of 0.010, 0.040, 0.10, 0.40 and 1.0 M. The best results were obtained for a concentration of 0.40 M, which was selected as the working concentration. The same experiment was performed for a lower ibuprofen concentration – 10 $\mu\text{g/L}$ – with the same results.

3.2. PTV–GC–MS

3.2.1. Optimization of the programmed temperature vaporizer

The variables optimized in the solvent-vent injection process were venting temperature, venting time, and venting flow. To study the effect of these variables and of their interactions on the analytical signal, a Box–Behnken experimental design was used. This allows the generation of response surfaces by using three levels for each of the factors studied. In all cases, a water sample spiked at the laboratory with a concentration of 50 $\mu\text{g/L}$ of ibuprofen was used. Each of the experiments was performed in triplicate so as to be able to detect any lack of fit of the data in the model generated. The response chosen was the peak area for the m/z 161 ratio corresponding to the base peak of the spectrum of the ibuprofen derivative. Only the model including the variables, their squares and the interactions among them did not show a lack of fit.

As may be seen in Table 1, all the variables of the experimental design, together with their squares and interactions, are significant, with the exception of the square of the venting time variable (BB), indicating that the response was linear with respect to that variable. In the case of the venting temperature, as this increased so did the signal, up to a certain value after which it decreased. This was probably because at high temperatures the analyte is also removed in the venting step. In the case of venting flow, on increasing its value the signal decreased, whereas for venting time, when this value increased an increase in signal was observed. To visualize the effect of the interactions, response surfaces were used. Fig. 3 shows the response surfaces for the m/z 161 ratio as a function of the different interactions observed. Regarding the response surface of the venting temperature–venting time interaction (AB) the best results were obtained at high venting times and temperatures in the 130–150 °C range. In the venting time–venting flow interaction (BC), the maximum signal was obtained for high venting times and low venting flows.

Regarding the venting temperature–venting flow interaction (AC), this is where the greatest variation in the signal was observed, with optimum values for the venting temperature between 130 and 150 °C and a venting flow of 30 mL/min.

Table 1
Results of the experimental design.

Multiple correlation: 0.955 (cal) R^2 : 0.912 (cal)		
	<i>p</i> -Value	Coefficients
Intercept	<0.0001	5.911×10^6
A	<0.0001	-6.849×10^4
B	0.0090	-1.010×10^6
C	<0.0001	-4.532×10^4
AB	0.0144	-3.355×10^5
AC	<0.0001	-7.017×10^5
BC	0.0010	-4.696×10^5
AA	0.0024	-5.669×10^5
BB	0.2968	-1.811×10^5
CC	0.0020	5.795×10^5

A: venting temperature (°C); B: venting time (min); C: vent flow (mL/min).

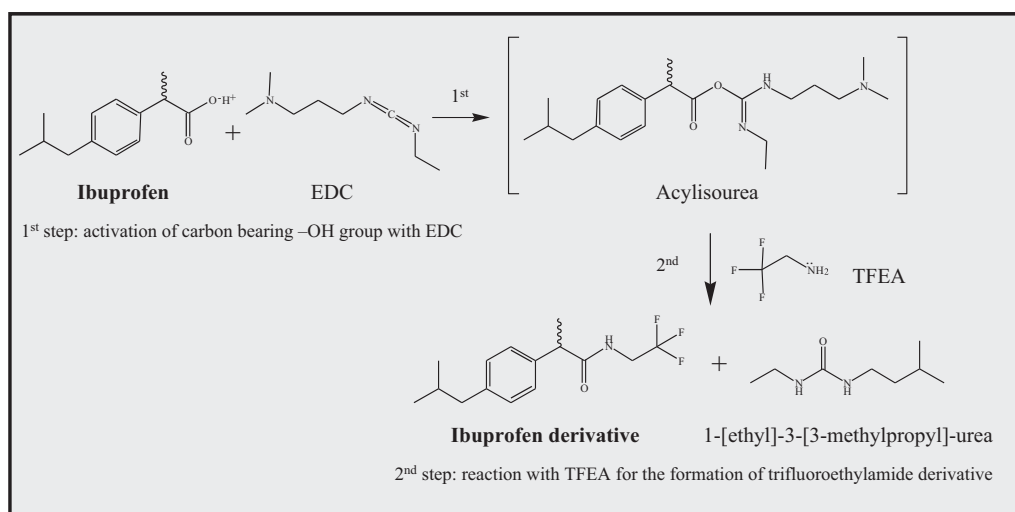


Fig. 1. Scheme of the ibuprofen derivatization reaction with EDC and TFEA.

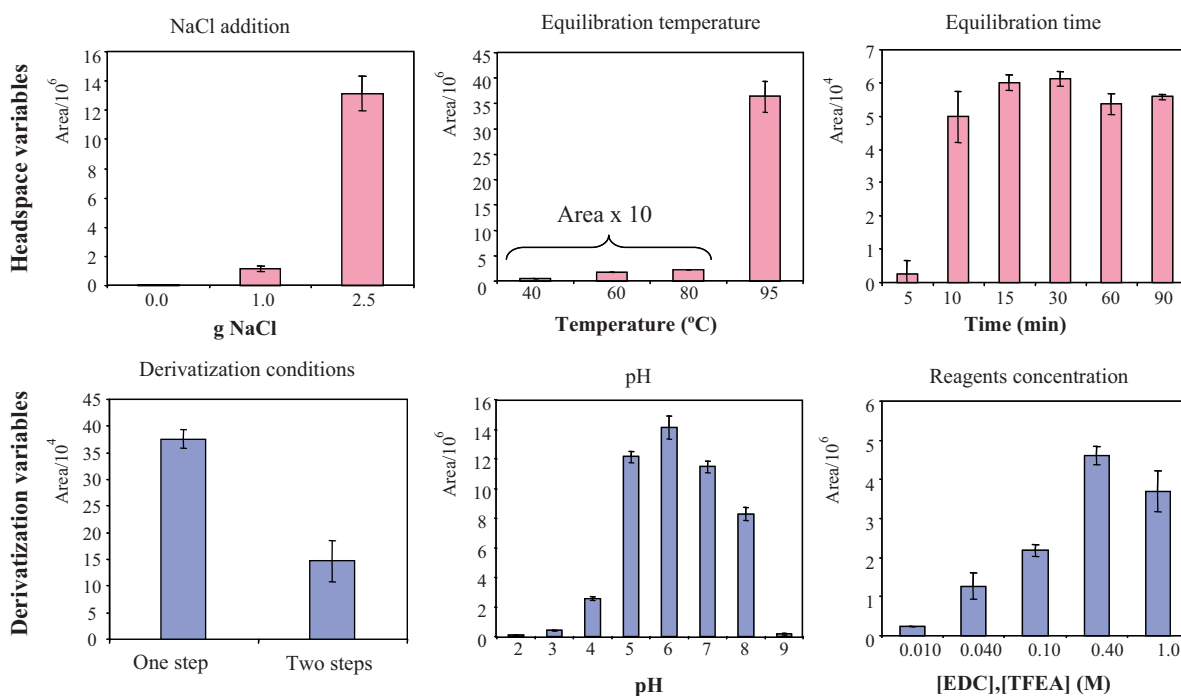


Fig. 2. Study of the headspace variables and those of the derivatization reaction.

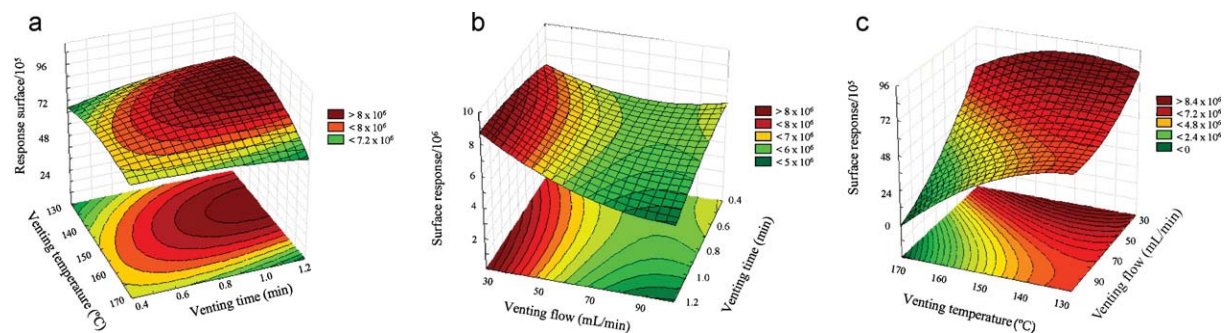


Fig. 3. Experimental design surfaces showing the interactions between venting temperature and venting time (a), venting flow and venting time (b) and venting temperature and venting flow (c) for the ibuprofen derivative at a concentration of 50 µg/L.

Table 2

Analytical characteristics of the proposed method.

Analyte	SIM target ions	Intercept	Slope	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	R^2	RSD (%)		Prediction		
							0.50 $\mu\text{g/L}$	5.0 $\mu\text{g/L}$	0.50 $\mu\text{g/L}$	2.25 $\mu\text{g/L}$	5.0 $\mu\text{g/L}$
Ibuprofen	161, 119, 91	$(7 \pm 6) \times 10^4$	$(65 \pm 2) \times 10^4$	9.6	32	0.9958	6.7	9.2	0.48 ± 0.08	2.3 ± 0.3	5.2 ± 0.3

In light of the results obtained with the experimental design, the values that provided the maximum signal were 1.20 min for the venting time; 142 °C for the venting temperature, and 30 mL/min for the venting flow.

To check that the solvent-vent injection mode was the optimum one, a comparative study was made of the signals obtained with the solvent-vent, split, and splitless injection modes. In the split injection mode, the split ratio was 1:5 and the temperature of the injector was kept at 300 °C. This same temperature was used in the splitless injection mode, with a splitless time of 2.00 min. In the solvent-vent injection mode, the injector conditions were the optimum ones obtained in the experimental design. In both the split injection mode and the solvent-vent mode the injection volume was kept at 2.40 mL. In the case of splitless injection, the injection volume was reduced to 250 μL as a result of the size of the liner used, which does not allow greater injection volumes with appropriate control of the system. It was observed that the maximum signal (about four times higher than the other two) was obtained with the solvent-vent injection mode, such that this was accepted as the optimum one.

3.3. Evaluation of the PTV–GC–MS method

Table 2 shows the analytical characteristics of the proposed method. A calibration curve was obtained with twelve concentration levels, ranging from 0.04 to 10 $\mu\text{g/L}$. Each level was analyzed in triplicate in SIM mode (161, 119, 91). These fragment ions are characteristic to the ibuprofen trifluoroethylamide derivative, as well as they are to ibuprofen, indicating that molecule fragmentation occurs in a similar way. The molecular peak of the derivative (m/z 287) was also present in its spectrum and it was detected in the scan mode, confirming the identity of the compound, but it was not chosen due to its low abundance. For the ibuprofen trifluoroethylamide derivative the ion 161 corresponds to loss of the fragment $\text{O}=\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CF}_3$, whereas for ibuprofen the same ion corresponds to the $\text{O}=\text{C}-\text{OH}$ fragment loss. The m/z ratios 119 and 91, found in both spectra, are characteristic of benzyl compounds with alkyl chains. The peak area obtained on extracting the m/z 161 ratio was used as the analytical signal. The calibration model displayed linear behavior. The validity of the model generated was checked using ANOVA, and it was observed that the model generated did not exhibit any lack of fit. The value of the correlation coefficient (R^2) was higher than 0.99. The repeatability of the method was studied at two levels – 0.5 and 5 $\mu\text{g/L}$ – by calculating the relative standard deviation (RSD, %) for 10 replicates. It was found to be 6.7% and 9.2%, respectively.

The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were estimated using the following formulas:

$$\text{LOD} = \frac{3.3\sigma}{S}; \quad \text{LOQ} = \frac{10\sigma}{S}$$

where σ is the standard deviation obtained upon measuring replicates of a sample with an S/N ratio of approximately 3, and S is the slope of the calibration curve.

The LOD obtained was 9.6 ng/L and the LOQ was 32 ng/L. These values are among the lowest published in the literature and are appropriate for the determination of ibuprofen at the concentrations found in surface waters [33,38]. In comparison with the work of Ford et al. [24], in which the authors used the same derivatization

reaction but with liquid–liquid extraction and direct injection, the improvement is very significant, passing from 74.8 μM (15.4 mg/L) to the values obtained with the proposed method. Such an improvement can be attributed to the use of solvent-vent in the PTV and to the SIM detection mode in the mass spectrometer detector. Thus, the limit of detection is improved with respect to that obtained in a work previously published by our research group [11], (LOD 0.23 $\mu\text{g/L}$), in which derivatization was carried out with methanol in a strongly acid medium, also in the static headspace mode. Additionally, the reaction time and headspace generation were reduced from 60 to 15 min. The values obtained when dimethyl sulfate is used as the derivatization reagent [12] in the headspace mode, with the use of a microextraction fibre in the solid phase, is around 0.3 ng/L. However, this derivatization reaction has the disadvantage that that dimethyl sulfate is known to be highly toxic and carcinogenic [39,40].

When the derivatization reaction is carried out in organic medium, in some cases limits of the order of ng/L are reached [33,35], but the process involves a prior solid-phase extraction step.

To check the accuracy of the model, ultrapure water samples were spiked at three concentration levels: 0.50, 2.25 and 5.0 $\mu\text{g/L}$. In each case, the model predicted concentration values that were significantly equal to those used to spike the water samples (Table 2). Apparent recoveries, calculated as the ratio of the measured concentration to the spiked concentration (expressed as percentage), were between 96% and 104%.

3.4. Time of analysis

The methodology proposed in the present work required a time of 31 min for the analysis of the first sample 15 min for reaction and the generation of volatiles; 7.2 min for chromatography, and about 8 min to measure the next sample since the column and the PTV had to be cooled down from the final temperature attained (250 °C and 320 °C, respectively, to the initial conditions of 50 °C and 142 °C). However, as from the first injection, it was possible to analyze each sample from the same sequence every 16 min, since the multiposition headspace autosampler oven allows an overlapping of these times.

3.5. Environmental samples

Different types of water samples were analyzed: sea water and wastewater (taken at the influent and effluent streams of the same wastewater treatment plant). No ibuprofen was detected at concentrations above the limit of detection of the method either in the sea water or effluent wastewater, although by contrast it was found in the influent wastewater. Fig. 4 shows the chromatograms obtained for ultrapure water and for the two samples not containing ibuprofen, spiked at a level of 0.50 $\mu\text{g/L}$, together with the chromatograms corresponding to the influent wastewater without dilution and when diluted at a proportion of 1:1 (wastewater/ultrapure water). This dilution was carried out after observing that for this sample the repeatability in injection decreased considerably and that upon spiking the sample with the analyte no proportional increase in the analytical signal occurred. These effects can be attributed to the complexity of the influent wastewater, which may alter both the conditions under which the derivatiza-

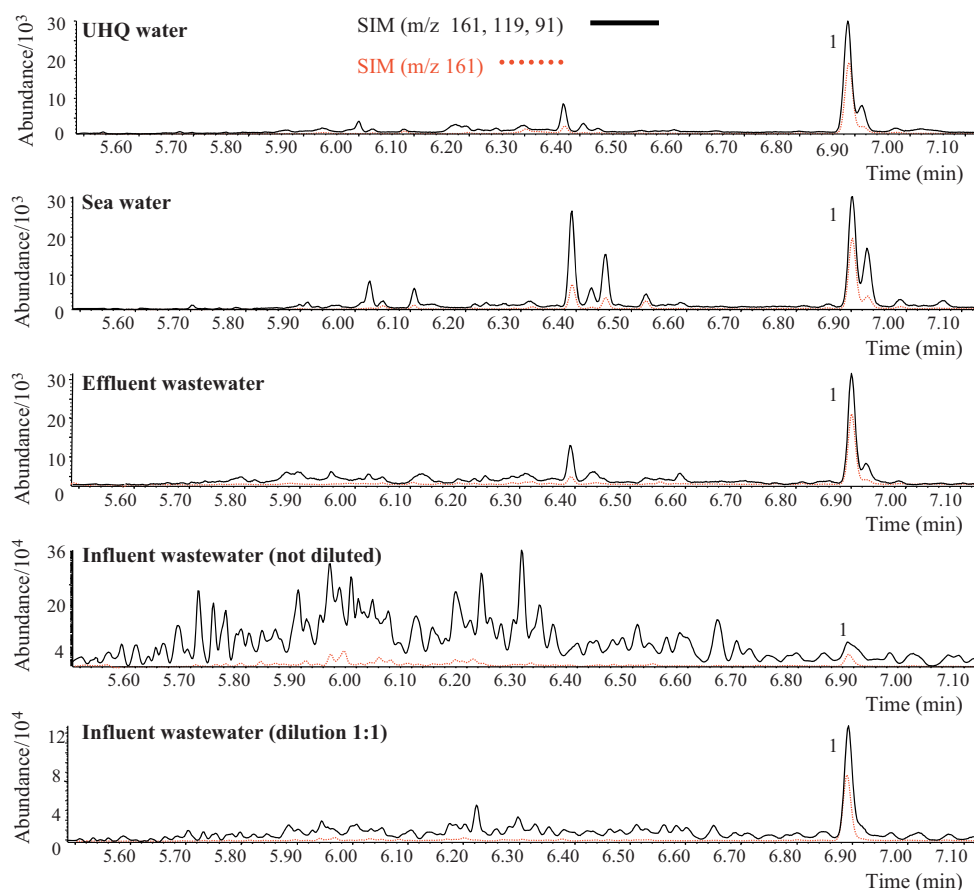


Fig. 4. Chromatograms obtained in the different types of aqueous matrices studied. The samples of ultrapure water, sea water and effluent wastewater were spiked with $0.50 \mu\text{g/L}$ of ibuprofen. (1) Ibuprofen derivative.

tion reaction occurs and those of the headspace generation. These effects were reduced when the wastewater was diluted with ultrapure water.

Matrix effects were investigated by comparing the slopes of the regression curves obtained in ultrapure water with those provided by the three water samples spiked with the compounds at three concentration levels: 0.50 , 2.25 and $5.0 \mu\text{g/L}$ for sea water and effluent wastewater samples, and 5.0 , 10 and $15 \mu\text{g/L}$ for the diluted influent wastewater sample.

Table 3 shows the slope values obtained for each type of water studied. In each case, the signal corresponding to the blank was subtracted from the signals of the spiked water samples. For sea water and effluent wastewater samples, no matrix effect was observed. However, in diluted influent wastewater samples a significant decrease in the slope of the calibration straight line obtained was noted. Therefore, for quantification of ibuprofen with the proposed method, external calibration was used for the sea water and effluent wastewater samples, and a standard additions protocol was adopted for the diluted influent wastewater sample. Each sample was analyzed in triplicate. The samples of sea water and effluent wastewater were spiked with $0.50 \mu\text{g/L}$ and the concentration val-

ues obtained in their analysis were 0.48 ± 0.08 and $0.47 \pm 0.09 \mu\text{g/L}$, respectively.

For the sample of influent wastewater (diluted at 1:1 (wastewater/ultrapure water)) the quantification of ibuprofen with the standard additions protocol afforded a concentration of $14 \pm 4 \mu\text{g/L}$. This result is not surprising since ibuprofen is widely used and, in some cases, almost 95% of the dose given to patients may be excreted unmetabolized and eliminated in domestic wastewater [41]. The results obtained suggest that the percentage of elimination of ibuprofen in the wastewater treatment plant is very high, close to 100%, taking into account that ibuprofen was not detected in the effluent sample.

4. Conclusions

Here we optimized an *in situ* derivatization method in aqueous medium for the analysis of ibuprofen in static headspace mode. 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide (EDC) and 2,2,2-trifluoroethylamine (TFEA) were used as derivatization reagents. The instrumental configuration used (HS-PTV-GC-MS) has the advantage that, as from the mixing of the reagents in the HS vial, the whole process takes place on-line, with the consequent reduction in errors associated with sample manipulation. The main limitation to extend this approach to other carboxylic acids present in waters is that their derivatives have to be volatile enough.

The effects of variables affecting HS generation, the derivatization reaction and the PTV instrumental conditions were studied. The proposed method is highly sensitive, with a limit of quantification of 32 ng/L , allowing the determination of this analyte in

Table 3

Slope values obtained for the different types of water studied.

Water sample	Slope
UHQ water	$(67 \pm 9) \times 10^4$
Sea water	$(60 \pm 7) \times 10^4$
Effluent wastewater	$(64 \pm 7) \times 10^4$
Influent wastewater (dilution 1:1)	$(34 \pm 5) \times 10^4$

both surface and wastewater samples with good repeatability (RSD below 10%) and accuracy values (apparent recoveries between 96% and 104%). In complex aqueous matrices, it may be necessary to perform quantification using the standard additions method.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of the DGI (CTQ2007-63157/BQU and CTQ2010-17514/BQU) and the Consejería de Educación y Cultura of the Junta de Castilla y León (Project SA112A08) for this research.

Casas Ferreira A.M. acknowledges an FPU grant from the Spanish Ministry of Education.

References

- [1] B. Kolb, J. Chromatogr. A 842 (1999) 163.
- [2] D.A. Lambropoulou, I.K. Konstantinou, T.A. Albanis, J. Chromatogr. A 1152 (2007) 70.
- [3] J. Regueiro, E. Becerril, C. García-Jares, M. Llompart, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 4693.
- [4] J.L. Pérez Pavón, A.M. Casas Ferreira, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 1192.
- [5] A. Llop, E. Pocurull, F. Borrull, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 575.
- [6] A.K.K.V. Pillai, K. Gautam, A. Jain, K.K. Verma, Anal. Chim. Acta 632 (2009) 208.
- [7] L. Segovia-Martínez, A. Bouzas-Blanco, P. Campíns-Falcó, A. Seco-Torrecillas, Talanta 80 (2010) 1888.
- [8] A.M. Carro, I. Neira, R. Rodil, R.A. Lorenzo, Chromatographia 56 (2002) 733.
- [9] Y.H. Wang, P.K. Wong, Water Res. 39 (2005) 1844.
- [10] P. Varanusupakul, N. Vora-adisak, B. Pulpoka, Anal. Chim. Acta 598 (2007) 82.
- [11] J.L. Pérez Pavón, A.M. Casas Ferreira, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 6728.
- [12] L. Araujo, J. Wild, N. Villa, N. Camargo, D. Cubillan, A. Prieto, Talanta 75 (2008) 111.
- [13] G. Wittmann, H. Van Langenhove, J. Dewulf, J. Chromatogr. A 874 (2000) 225.
- [14] S.Y. Han, Y.A. Kim, Tetrahedron 60 (2004) 2447.
- [15] K. De Wael, H. Buschop, L. De Smet, A. Adriaens, Talanta 76 (2008) 309.
- [16] J. Shen, C.C. Lu, Sens. Actuators B 120 (2007) 417.
- [17] B. Teste, J. Vial, S. Descroix, T. Georgelin, J.M. Siaugue, J. Petr, A. Varenne, M.C. Hennion, Talanta 81 (2010) 1703.
- [18] M. Kibler, K. Bächmann, J. Chromatogr. A 836 (1999) 325.
- [19] H. Ozawa, T. Tsukioka, Analyst 115 (1990) 1343.
- [20] H. Ozawa, J. Chromatogr. 644 (1993) 375.
- [21] R. Peters, J. Hellenbrand, Y. Mengerink, S.J. Van der Wal, J. Chromatogr. A 1031 (2004) 35.
- [22] H. Miwa, J. Chromatogr. A 881 (2000) 365.
- [23] F. Robert-Peillard, E. Palacio-Barco, Y. Dudal, B. Coulomb, J.L. Boudenne, Anal. Chem. 81 (2009) 3063.
- [24] Q.L. Ford, J.M. Burns, J.L. Ferry, J. Chromatogr. A 1145 (2007) 241.
- [25] M.J. Gómez, M.J. Martínez Bueno, S. Lacorte, A.R. Fernández-Alba, A. Agüera, Chemosphere 66 (2007) 993.
- [26] L.H.M.L.M. Santos, A.N. Araújo, A. Fachini, A. Pena, C. Delerue-Matos, M.C.B.S.M. Montenegro, J. Hazard. Mater. 175 (2010) 45.
- [27] S. Weigel, U. Berger, E. Jensen, R. Kallenborn, H. Thoresen, H. Hühnerfuss, Chemosphere 64 (2006) 1808.
- [28] Z. Moldovan, Chemosphere 64 (2006) 1808.
- [29] A. Sebók, A. Vasánits-Zsigrai, Gy. Palkó, Gy. Záray, I. Molnár-Perl, Talanta 76 (2008) 642.
- [30] R. Gibson, E. Becerril-Bravo, V. Silva-Castro, B. Jiménez, J. Chromatogr. A 1169 (2007) 31.
- [31] A. Togola, H. Budzinski, Anal. Bioanal. Chem. 388 (2007) 627.
- [32] I. Rodríguez, J. Carpinteiro, J.B. Quintana, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, J. Chromatogr. A 1024 (2004) 1.
- [33] S. Öllers, H.P. Singer, P. Fässler, S.R. Müller, J. Chromatogr. A 911 (2001) 225.
- [34] S.S. Verenitch, C.J. Lowe, A. Mazumder, J. Chromatogr. A 1116 (2006) 193.
- [35] S. Weigel, U. Berger, E. Jensen, R. Kallenborn, H. Thoresen, H. Hühnerfuss, Chemosphere 56 (2004) 583.
- [36] D.D. Perrin, B. Dempsey, Buffers for pH and Metal Ion Control, Chapman and Hall, New York, 1987.
- [37] F.A. Carey, R.J. Sundberg, Advanced Organic Chemistry, Part A: Structure and Mechanism, Fifth ed., Springer, New York, 2007.
- [38] P.H. Roberts, K.V. Thomas, Sci. Total Environ. 356 (2006) 143.
- [39] G.R. Hoffmann, Mutat. Res. 75 (1980) 63.
- [40] T. Dublin, H.J. Thöne, J. Chromatogr. 456 (1988) 233.
- [41] B. Halling-Sorensen, S. Nors Nielsen, P.F. Lanzky, F. Ingerslev, H.C. Holten Lützhof, S.E. Jorgensen, Chemosphere 36 (1998) 357.

VII

**DETERMINACIÓN DE PARABENOS, TRICLOSÁN
Y METIL TRICLOSÁN EN AGUAS UTILIZANDO
UNA REACCIÓN *IN SITU* Y EXTRACCIÓN POR
ADSORCIÓN EN BARRA AGITADORA CON
POSTERIOR ANÁLISIS GC-MS**

1. INTRODUCCIÓN

Los ésteres del ácido *p*-hidroxibenzoico (parabenos) y el 2-(2,4-diclorofenoxi)-5-clorofenol (triclosán) son compuestos con propiedades bactericidas y antimicrobianas, que se utilizan fundamentalmente en la formulación de productos de cuidado personal [1]. Adicionalmente, los parabenos se añaden como conservantes a los alimentos envasados y a las bebidas. El triclosán también se incorpora como biocida en ropa deportiva, alfombras, juguetes de plástico y baterías de cocina [2]. Todos estos usos contribuyen a que este conjunto de compuestos estén presentes de forma habitual en el medio ambiente.

Varios estudios han demostrado la capacidad de los parabenos de alterar funciones fisiológicas importantes, tanto en estudios sobre cultivos celulares [3] como en modelos animales *in vivo* [4-6]. Por otra parte, el interés por la presencia de triclosán en el medio ambiente se debe a su potencial tóxico para algunos organismos acuáticos [7] y a su transformación en otros compuestos más tóxicos, tales como clorofenoles [8], dioxinas [9], fenoxifenoles tetra- y pentaclorados [10] y metil triclosán [11].

Son varias las matrices que se han analizado en busca de estos compuestos: lodos y suelos [12-14], aguas [15-17], polvo [18], alimentos [19], productos cosméticos [20-22] y muestras biológicas [23,24]. En el caso de muestras acuosas, se han propuesto varios métodos utilizando cromatografía de gases (GC) [15], cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [25] y electroforesis capilar [26], utilizando detectores convencionales [25,26] o espectrometría de masas [15]. Cuando el análisis se lleva a cabo por cromatografía de gases, es necesario llevar a cabo una etapa de derivatización previa, como consecuencia de la elevada polaridad de estos compuestos.

Como consecuencia de los bajos niveles de concentración detectados habitualmente en el medio ambiente, se requiere una etapa de

enriquecimiento previa al análisis instrumental. La técnica de extracción más utilizada es la extracción en fase sólida (SPE) [27-29]. Se han propuesto nuevas alternativas basadas en técnicas de microextracción, tales como microextracción en fase sólida (SPME) [15,30], microextracción en fase líquida con la utilización de fibras huecas (HF-LPME) [31], microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) [32,33], extracción líquido-líquido asistida por membranas (MALLE) [34] y microextracción en una gota (SDME) [20].

En el año 1999, el grupo de Baltussen y colaboradores [35] desarrolló una nueva técnica de extracción, conocida como extracción por adsorción en barra agitadora (SBSE). Los analitos son extraídos por una barra recubierta con polidimetilsiloxano (PDMS), también conocida como *twister*, la cual se pone en contacto con la muestra acuosa que se agita durante un tiempo prefijado. Los analitos extraídos son recuperados, bien por desorción líquida (LD) o por desorción térmica (TD) [36-40].

La determinación por cromatografía de gases de compuestos con hidrógenos activos implica, normalmente, una etapa de derivatización. Se han utilizado varios tipos de reactivos, tales como N-metil-N-(tert-butildimetilsilil)trifluoroacetamida (MTBSTFA) [30,41], bis(trimetilsilil)acetamida (BSA) [20], anhídrido pentafluoropropiónico [42] o diazometano [43].

La reacción de acetilación *in situ* con anhídrido acético en medio básico es las más utilizadas para compuestos fenólicos [15,44-48]. Esta reacción puede llevarse a cabo en medio acuoso, en pocos minutos, y con una elevada eficacia.

2. OBJETIVO

Dentro de las líneas propuestas en esta tesis, el objeto del presente trabajo es combinar las ventajas de la extracción por SBSE y las de la reacción de acetilación *in situ*, para el análisis de parabenos y triclosán en muestras acuosas. En este estudio también se incluye el metil triclosán, como posible producto de degradación del triclosán. Esta es la primera vez se aplica esta metodología para la determinación de estos compuestos en matrices acuosas. Hasta este momento, la utilización de SBSE para la determinación de parabenos en muestras acuosas se limita a la publicación de Ochiai y colaboradores [19], en la que se determinan estos conservantes en diferentes tipos de bebidas y salsas, sin llevar a cabo reacciones de derivatización. Para el caso del triclosán, la extracción por SBSE se ha utilizado previamente, pero, igualmente, sin la utilización de una reacción de derivatización [16,22].

Los analitos enriquecidos en la barra agitadora son desorbidos térmicamente utilizando un sistema de termodesorción acoplado a un cromatógrafo de gases (GC) y a un espectrómetro de masas (MS). El objetivo final es desarrollar un método altamente sensible, rápido y robusto para la determinación de estos compuestos en matrices complejas, tales como aguas superficiales o aguas residuales.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos, disoluciones estándar y muestras

El isopropilparabeno (iPrP) fue suministrado por TCI Europe (Zwijndrecht, Bélgica). El resto de los parabenos (metilparabeno (MeP), n-propilparabeno (nPrP), n-butilparabeno (BuP), bencilparabeno (BzP)), el triclosán (TCS) y el metil triclosán (MeTCS) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Con la letra A se asignará a los derivados acetilados de los compuestos. El metanol, cloruro sódico, acetato de etilo, así como las sales que proporcionan el medio básico K_2CO_3 y $NaHCO_3$ fueron proporcionadas por Merck (Darmstadt, Alemania). El anhídrido acético (ReagentPlus®) fue suministrado por Sigma Aldrich (Munich, Alemania) y la piridina por Fluka (Darmstadt, Alemania).

Se prepararon disoluciones patrón de todos los compuestos (500 mg/L en metanol), las cuales se mantuvieron a 4 °C en una nevera. Estas disoluciones se utilizaron para dopar las muestras de agua a las diferentes concentraciones estudiadas. Los estudios de optimización se llevaron a cabo utilizando 5 mL de muestra acuosa dopada con los analitos a una concentración de 10 µg/L. Para calcular el rendimiento del proceso, se sintetizaron estándares de los compuestos derivatizados, ya que no están disponibles comercialmente. El proceso de derivatización tuvo lugar de la siguiente manera: sobre 1 mL de una disolución estándar en acetato de etilo, que contenía los analitos a un nivel de concentración de 500 mg/L, se añadieron 200 µL de anhídrido acético y 5 µL de piridina. La mezcla se agitó manualmente durante 10 min a temperatura ambiente. A partir de esta muestra se prepararon diluciones, también en acetato de etilo. Para comprobar que la transformación de los analitos a sus correspondientes derivatizados tenía lugar de forma cuantitativa, estas disoluciones se

inyectaron en un equipo GC-MS. No se detectaron señales de los compuestos no derivatizados.

El procedimiento propuesto se utilizó para la determinación de los analitos en muestras de agua de grifo (Leipzig, Alemania) y en muestras de agua residual, tanto a la entrada como a la salida de la misma planta de tratamiento de aguas residuales (EDAR) de Leipzig, una ciudad con medio millón de habitantes.

Los *twisters* para la extracción fueron suministrados por Gerstel (Mülheim an der Ruhr, Alemania). Estos consisten en una barra magnética con un recubrimiento de vidrio, de 10 mm de longitud, cubierto con 22 μg de PDMS. Esta capa, de 0.5 mm de espesor, corresponde a un volumen de 24 μL de PDMS. Antes de su primer uso, los *twisters* fueron acondicionados durante 16 horas, calentándolos a 250 °C bajo un flujo de nitrógeno. Se analizaron blancos de los *twisters* de forma regular, para comprobar si existía efecto memoria.

3.2. Proceso de derivatización y de extracción

En un vial de 10 mL se añaden 42 mg de NaHCO_3 , seguidos de 5 mL de muestra acuosa dopada a una concentración determinada. A continuación se añade el *twister* y por último 20 μL de anhídrido acético. El vial se cierra herméticamente y la mezcla se agita durante 60 min a una velocidad de 1000 rpm (Variomag Multipoint 6/15, H+PLabortechnik, Oberschleissheim, München, Alemania) a temperatura ambiente. Una vez que tiene lugar la extracción, el *twister* se retira de la mezcla con ayuda de unas pinzas, se seca con papel libre de celulosa y se coloca en el interior de un tubo de termodesorción (Gerstel, Alemania). Este tubo se coloca en el interior del sistema de termodesorción, donde los analitos son desorbidos y sometidos al análisis cromatográfico.

3.3. Instrumentación

El análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas, se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo Agilent 6890 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Para llevar a cabo el análisis TD-GC-MS, se acopló al cromatógrafo un sistema de termodesorción (TDS A). Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando un inyector de temperatura programada (PTV, CIS-4), con un *liner* vacío, para focalizar criogénicamente los analitos de forma previa a su introducción en la columna cromatográfica. El enfriamiento se llevó a cabo utilizando nitrógeno líquido.

Para la confirmación de la transformación cuantitativa de los compuestos en sus derivados, se utilizó un cromatógrafo de gases con un sistema de inyección de líquidos automático (Agilent 7683), con un inyector *split/splitless* convencional.

En ambos casos, se utilizó un espectrómetro de masas de tipo cuadrupolo (HP 5973N).

3.4. Condiciones de análisis TD-GC-MS

Las condiciones óptimas del proceso de termodesorción fueron las siguientes: temperatura de desorción, 275 °C; tiempo de desorción, 6 min, y flujo de desorción, 70 mL/min. Durante el tiempo que tiene lugar el proceso de desorción, la temperatura del PTV se mantuvo a -10 °C (en el modo de inyección *solvent-vent*, válvula de *split* abierta). Una vez que éste hubo finalizado, la temperatura del PTV aumentó desde -10 °C hasta 280 °C, a una velocidad de 720 °C/min. Esta temperatura se mantuvo durante 5 min. En este momento, los analitos fueron transferidos al sistema cromatográfico, en el modo de inyección *splitless* caliente, fijando un tiempo de inyección de 2 min.

Para llevar a cabo el análisis cromatográfico, se utilizó una columna capilar HP-5MS (30 m x 250 μm diámetro interno, 0.25 μm espesor de película, Agilent J&W column, Waldbronn, Alemania). Como gas portador se utilizó helio, con un flujo de 1.2 mL/min.

El programa de temperaturas del horno empezaba con una temperatura inicial de 60 °C durante 2 min; esta temperatura se incrementó hasta 175 °C a una velocidad de 65 °C/min, incrementándose de nuevo hasta 200 °C a una velocidad de 45 °C/min (manteniendo esta temperatura durante 2 min) y alcanzando finalmente una temperatura de 280 °C a una velocidad de 40 °C/min, manteniéndola durante 1 min. El espectrómetro de masas se utilizó en el modo de adquisición de datos *scan* para los estudios de optimización, registrándose las relaciones m/z (masa/carga) entre 50 y 350 u.m.a. , y en el modo de monitorización de iones, SIM, para la calibración y el análisis de muestras reales. Los iones característicos de cada compuesto se muestran en la tabla 1. Se trabajó en la modalidad de impacto electrónico con un voltaje de ionización de 70 eV. El filamento se mantuvo apagado hasta el minuto 4.50 min del análisis cromatográfico.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Reacción de derivatización

Inicialmente se compararon las señales obtenidas cuando se realizaba el proceso de extracción sobre los analitos sin derivatizar, y cuando sí tenía lugar la reacción de derivatización, para comprobar la conveniencia de derivatizar los compuestos. Como puede observarse en la figura 1, la utilización de una reacción de derivatización implicaba una mejora en la señal analítica para todos los compuestos, excepto para el metil triclosán, el cual no sufre ninguna alteración en el proceso.

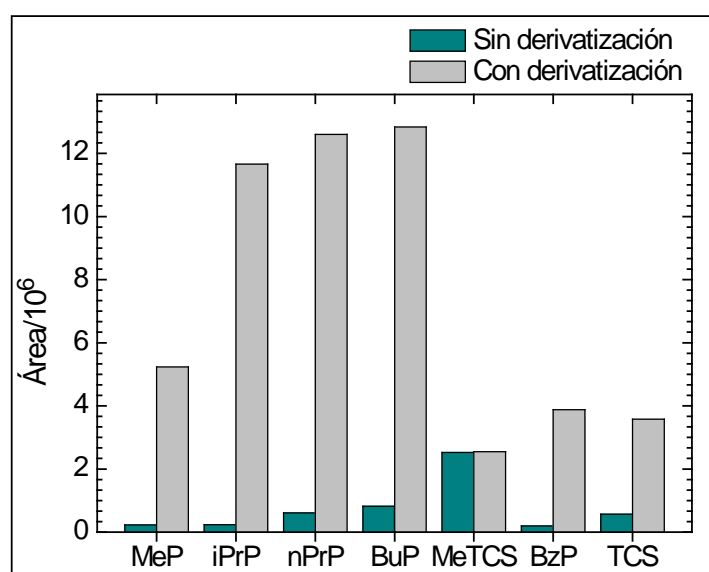


Figura 1: Comparación de las señales obtenidas cuando se realizaba el proceso de extracción sobre los analitos sin derivatización y con derivatización

Las variables estudiadas en la optimización de la reacción de derivatización fueron el tipo de medio básico utilizado, y la relación entre la concentración de base y el volumen de anhídrido acético.

Se probaron dos medios básicos, dos disoluciones de concentración 0.4 M de carbonato e hidrogeno carbonato potásico, cuya diferencia radicaba en el pH inicial del medio, pH 12.0 y 8.4, respectivamente. Se obtuvieron respuestas similares para todos los compuestos en ambos casos, aunque se observó una mayor irreproducibilidad cuando se utilizaba la disolución de carbonato potásico. En consecuencia, se seleccionó utilizar NaHCO_3 para fijar el medio básico.

Una vez seleccionado el medio básico, se estudió el efecto sobre la señal analítica de la relación entre la concentración de base (0.1, 0.25 y 0.4 M), y el volumen de anhídrido acético (20, 50 y 100 μL). Los mejores resultados se obtuvieron utilizando 20 μL de anhídrido acético, independientemente de la concentración de base utilizada. Al aumentar el volumen de anhídrido acético se producía una disminución en la señal analítica, como consecuencia de que el pH del medio tras la reacción era demasiado bajo, situación en la que los ésteres formados no eran estables y se hidrolizaban. Las condiciones óptimas seleccionadas fueron concentración de base 0.1 M y 20 μL de anhídrido acético.

4.2. Optimización del proceso de extracción por SBSE

Se estudiaron tres parámetros que afectaban al proceso de extracción: fuerza iónica del medio, volumen de muestra (valor de β) y tiempo de extracción.

Se estudió el efecto de la fuerza iónica del medio añadiendo NaCl a tres niveles de concentración: 0.0, 1.0 y 2.5 g en 5.0 mL de muestra (sobresaturación). Se observó que la adición de NaCl al medio aumentaba

ligeramente la señal del MePA, mientras que se producía una disminución de la señal analítica para el MeTCS, BzPA y TCSA. Como consecuencia, se decidió no añadir ningún electrolito al medio.

Como ya se señaló en la Introducción de la presente memoria, apartado 1.4.1. "Fundamento teórico de la extracción por barra agitadora", el rendimiento del proceso de extracción viene definido por la siguiente ecuación:

$$R = \frac{m_{PDMS}}{m_0} = \frac{K_{PDMS/W}}{K_{PDMS/W} + \beta}$$

El parámetro β se define como el cociente entre el volumen de fase condensada y el volumen de polidimetilsiloxano.

A lo largo de la experimentación, los parámetros que permanecieron constantes fueron $K_{PDMS/W}$ y el volumen de polidimetilsiloxano. Respecto al volumen de muestra, se estudiaron dos valores, 5 y 10 mL. De acuerdo con la ecuación anterior, cuanto mayor sea el volumen de muestra, peor será el rendimiento de la extracción. Sin embargo, la respuesta cromatográfica puede aumentar como consecuencia del aumento de la masa de analito en el medio. Para cada uno de los dos volúmenes se obtuvieron las curvas de tiempo de extracción (representación del área de pico frente al tiempo de extracción, para poder estudiar cuándo se alcanza el equilibrio). Se mantuvieron en ambos casos los valores de concentración previamente optimizados para el medio básico y el reactivo de derivatización, utilizando una concentración de los analitos en estudio de 10 $\mu\text{g/L}$ (masa absoluta, 50 y 100 ng, respectivamente). Se estudiaron diferentes tiempos de extracción: entre 0 y 180 min para 5 mL de muestra, y entre 0 y 320 min para 10 mL de muestra. Los resultados se muestran en la figura 2.

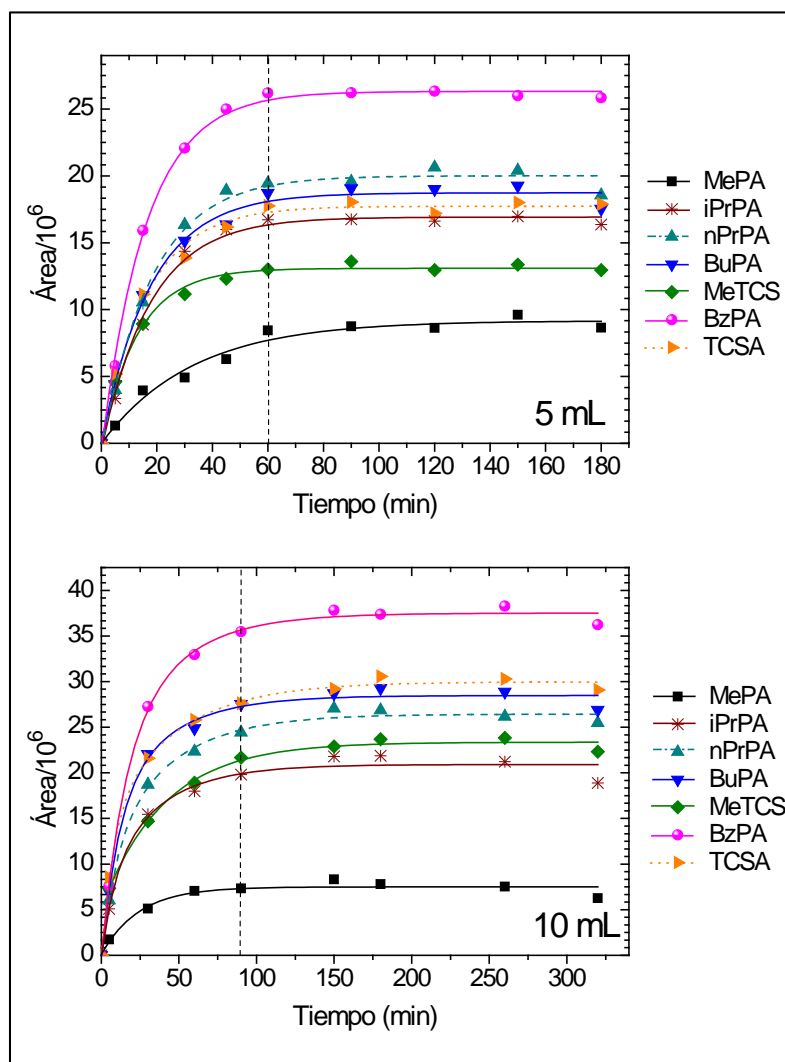


Figura 2: Curvas del tiempo de extracción para cada analito, para 5 y 10 mL de muestra. La concentración de los analitos de interés en ambos casos es de 10 $\mu\text{g/L}$

Para 5 mL de muestra, eran necesarios 60 min para alcanzar el equilibrio de extracción para todos los compuestos. Sin embargo, cuando se trabajaba con 10 mL, este tiempo aumentaba hasta 90 min para los compuestos más apolares. Comparando las señales analíticas obtenidas con 10 mL de muestra frente a 5 mL, se producía un aumento de señal para la mayoría de

los compuestos (entre 1.34 veces para el iPrPA y 1.76 veces para el MeTCS, para el caso del MePA la señal permanecía constante), aunque no llegaba a ser el doble. Por ello, se seleccionó 5 mL como volumen de muestra, con el objetivo de trabajar con el mínimo tiempo de extracción en condiciones de equilibrio, situación en la que se obtiene la máxima reproducibilidad.

Respecto a la velocidad de agitación, es conocido que aumentar la velocidad de agitación de las muestras acorta los tiempos de extracción, por lo que se escogió la máxima velocidad permitida por la geometría del vial (1000 rpm). Velocidades mayores provocaban la ruptura de los *twisters*.

4.3. Optimización de los parámetros de desorción

Las variables optimizadas en el proceso de desorción fueron: temperatura de criofocalización (intervalo de valores estudiados, entre -50 y 0 °C), flujo de desorción (entre 20 y 100 mL/min), tiempo de desorción (entre 3 y 10 min) y temperatura de desorción (entre 250 y 300 °C). Para estudiar el efecto de estas variables y si existía alguna interacción entre ellas, se realizó un diseño experimental de tipo Box-Behnken. Cada uno de los experimentos se realizó por duplicado, para poder evaluar si los modelos generados presentaban fallo de ajuste. Como variable respuesta se seleccionó el área correspondiente al pico cromatográfico obtenido al extraer la relación m/z del pico base de los espectros del metil triclosán y de los derivados acetilados de los parabenos y del triclosán. Únicamente el modelo que incluía las variables, sus cuadrados y las interacciones entre ellas no mostraba fallo de ajuste.

Con dicho modelo, la temperatura de focalización (A) y el flujo de desorción (B) o sus cuadrados eran significativos para la mayoría de los compuestos. El efecto en la señal era diferente en función del analito considerado. Para los analitos más volátiles (MePA y iPrPA), al aumentar la temperatura o el flujo de desorción, se producía una disminución en la señal

analítica. Sin embargo, para el resto de los compuestos, al aumentar los valores de estas variables se producía un aumento de la misma.

La interacción entre la temperatura de focalización y el flujo de desorción (AB) ejercía un efecto significativo sobre todos los compuestos, excepto para el iPrPA y el nPrPA (figura 3a). Para el caso del MePA, el máximo de señal se observaba para un flujo de desorción bajo (20 mL/min) y temperaturas de criofocalización en el rango -20 a -40 °C, mientras que para el resto de los compuestos, cuanto mayor era la temperatura y el flujo, mayor era la intensidad de la señal analítica.

El tiempo de desorción (C) era significativo para el MePA y el nPrPA. Al aumentar el tiempo de desorción disminuía la señal para ambos compuestos. La temperatura de desorción (D) únicamente ejercía un efecto significativo sobre la señal del MePA, pero su interacción con el flujo de desorción (BC, figura 3b) ejercía un efecto significativo para todos los compuestos. Tanto el MePA como el iPrPA mostraban el mismo comportamiento, con máximos de señal a 300 °C y flujos de desorción de 20 mL/min. El resto de los compuestos mostraban otra tendencia, como puede observarse en la superficie de respuesta del BzPA, obteniéndose los mejores resultados a temperaturas de desorción bajas y flujos de desorción altos. Cuanto menor era la volatilidad del compuesto, más acusado era este comportamiento.

Como resultado de los diferentes comportamientos observados, se escogieron valores de compromiso para las variables estudiadas. Estos fueron: temperatura de focalización, - 10 °C; flujo de desorción, 70 mL/min; tiempo de desorción, 6 min; temperatura de desorción, 275 °C.

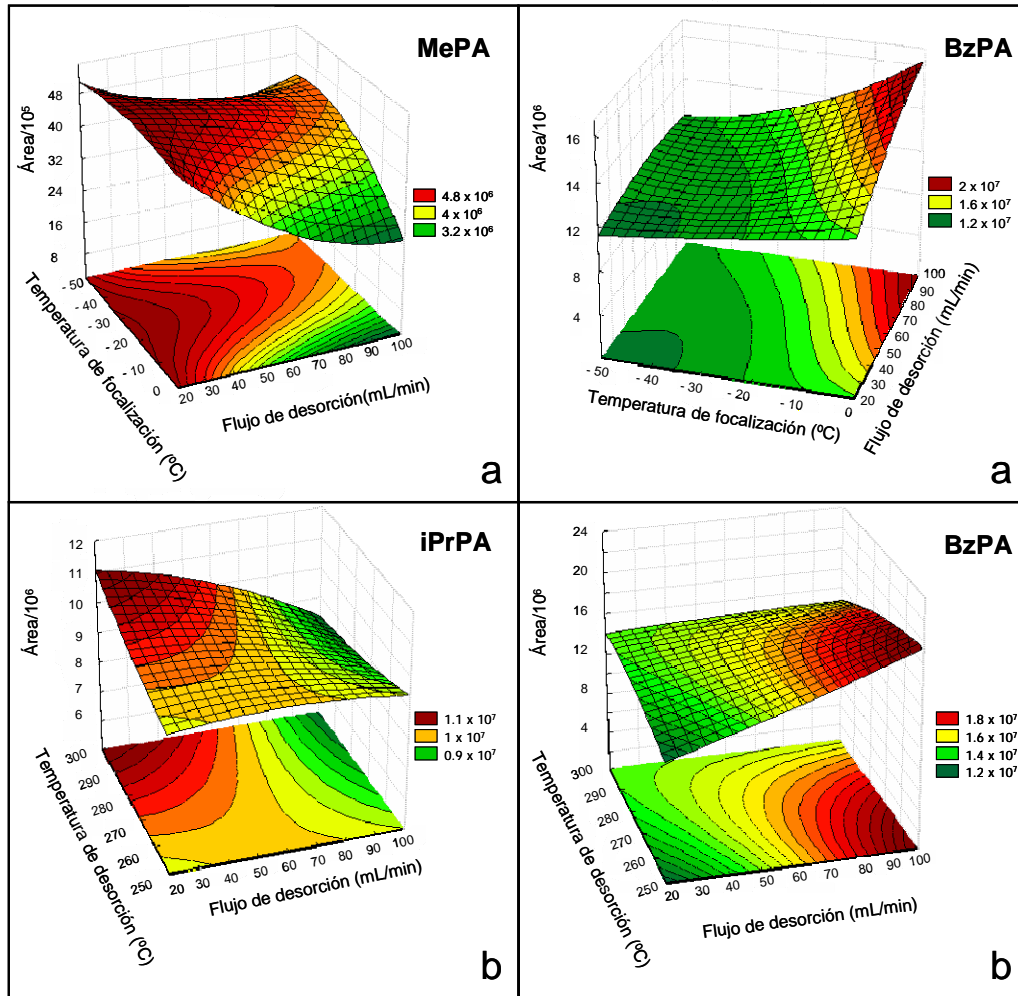


Figura 3: Superficies de respuesta para el MePA y el BzPA, que muestran la interacción entre la temperatura de focalización y el flujo de desorción. El tiempo y la temperatura de desorción se fijaron en 6 min y 275°C , respectivamente (a). Superficies de respuesta para el iPrPA y el BzPA, que muestran la interacción entre la temperatura y el flujo de desorción. La temperatura de focalización y el tiempo de desorción se fijaron en -10°C y 6 min (b)

Una vez optimizada la desorción térmica, se comprobó la ausencia de efecto memoria, sometiendo al mismo *twister* a dos procesos de desorción

consecutivos. Los analitos presentes en una muestra dopada eran extraídos y sometidos al proceso de desorción bajo las condiciones optimizadas anteriormente descritas. No se detectaron picos de los analitos en la segunda etapa, por lo que se puede concluir que los analitos son completamente desorbidos en un único proceso de desorción.

4.4. Eficacia de la extracción

Se calculó la eficacia de la extracción comparando los picos obtenidos al extraer los analitos de una muestra acuosa sometida al proceso descrito, con los obtenidos al inyectar un patrón de los compuestos derivatizados (proceso de derivatización previamente descrito en la sección 3.1, “Reactivos, disoluciones estándar y muestras”), colocado en el interior de un tubo de desorción térmica empaquetado previamente con lana de vidrio.

Los valores de recuperación se encuentran entre el 78 y el 95 %, excepto para el derivado acetilado del metilparabeno, con un rendimiento de extracción del 22%. Dicho compuesto es el más polar del conjunto estudiado. Sin embargo, otro tipo de características tanto físicas como químicas afectan también a la extracción, lo que puede explicar la baja recuperación obtenida.

4.5. Evaluación del método SBSE-TD-GC-MS

Se obtuvieron rectas de calibrado para todos los compuestos, utilizando siete niveles de concentración, entre 10 y 1000 ng/L. Cada nivel se analizó por triplicado. Los iones de cuantificación y confirmación, así como las características analíticas del método, se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: Características analíticas del método propuesto

Compuesto	m/z		Ordenada en el origen	Pendiente	R ²	RSD (%)		LD (ng/L)	LO (ng/L)	Predicción	
	Ion de cuantificación	Iones de confirmación				Intra-día n=10	Inter-día n=3			50 ng/L	100 ng/L
MeP	121	152, 194	(4±3)×10 ⁴	(196±8)×10	0.9999	6.69	5.90	1.86	6.17	48 ± 6	103 ± 6
iPrP	121	138, 180	(1±4)×10 ⁴	(350±9)×10	0.9976	5.89	4.06	0.64	2.14	51 ± 5	101 ± 7
nPrP	138	121, 180	(11±5)×10 ⁴	(46±1)×10 ²	0.9988	9.42	8.55	4.12	13.74	45 ± 5	105 ± 11
BuP	138	121, 194	(2±5)×10 ⁴	(62±1)×10 ²	0.9998	5.91	8.10	1.06	3.55	46 ± 5	95 ± 6
MeTCS	302	302, 252	(9±4)×10 ³	1450±9	0.9997	4.84	4.36	0.54	1.80	47 ± 3	100 ± 3
BzP	121	91, 65	(0±1)×10 ⁵	(50±2)×10 ²	0.9998	6.89	8.49	2.80	9.35	49 ± 8	103 ± 11
TCS	288	218, 63	(1±1)×10 ⁴	(264±2)×10	0.9999	5.37	4.78	1.39	4.65	48 ± 3	99 ± 3

Los modelos de calibración presentaban un comportamiento lineal. La validez de los mismos se comprobó mediante análisis de varianza (ANOVA), observándose que ninguno de ellos presentaba fallo de ajuste. El valor del coeficiente de correlación (R^2) era superior a 0.99 en todos los casos.

Para evaluar la reproducibilidad del proceso, se analizó una muestra de agua dopada a un nivel de concentración de 50 ng/L el mismo día (10 réplicas) y en dos días consecutivos (3 réplicas). Los valores obtenidos, dados como desviaciones estándar relativas (RSD, %), se muestran en la tabla 1, con valores inferiores al 10 % para el caso de la reproducibilidad intra-día, e inferiores al 9 % en el caso de la reproducibilidad inter-día. Estos valores se consideraron altamente satisfactorios, teniendo en cuenta que tanto el proceso de extracción como la reacción de derivatización tienen lugar de forma simultánea.

Los valores de los límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LQ), calculados como 3.3 y 10 veces, respectivamente, la desviación estándar de una muestra con una relación señal-ruido de 3, se muestran también en la tabla 1. Los límites de detección obtenidos se encuentran entre 0.54 y 4.12 ng/L, y los límites de cuantificación entre 1.80 y 13.7 ng/L.

La exactitud del modelo se evaluó dopando muestras de agua ultrapura a dos niveles de concentración, 50 y 100 ng/L. En cada caso, el modelo generado predecía concentraciones significativamente iguales a las utilizadas para dopar las muestras de agua (tabla 1).

4.6. Comparación con otros métodos propuestos en bibliografía

En la tabla 2 se muestran otras metodologías ya propuestas para la determinación de los analitos de interés, principalmente en muestras acuosas.

Tabla 2: Comparación de los resultados obtenidos con el método propuesto en este trabajo (en negrita y cursiva) con otros encontrados en bibliografía

Método*	Reacción de derivatización	Volumen de muestra (mL)	LD (ng/L) en muestras acuosas						Ref.
			MeP	IPrP	nPrP	BUP	MeTCS	BzP	
SBSE-TD-GC-MS	<i>Ac₂O/NaHCO₃</i>	5 mL	1.86	0.64	4.12	1.06	0.54	2.80	1.39
SBSE-TD-GC-MS	---	10 mL	---	---	---	---	---	---	5
SBSE-ID-LC-DAD	---	10 mL	---	20 x 10 ³	17 x 10 ³	17 x 10 ³	---	---	---
SPME-GC-MS/MS	MTBSTFA	25 mL	---	---	---	---	---	---	100
SPME-GC-MS	MSBSTFA	10 mL	8.33	---	0.67	0.33	---	1.67	---
SDME-GC-MS	Ac ₂ O/Na ₂ HPO ₄	22 mL	---	---	---	---	0.67	---	0.67
	BSA	10 mL	17	---	4.0	5.7	---	---	6.5
	PfPA	3 mL	15	2	4	1	---	---	---
	MTBSTFA/TBDMSCI	1000 mL	100	---	100	100	---	---	100
SPE-LVSS-NACE-DAD	---	500 mL	30	---	25	25	---	31	---
SPE-UHPLC-MS/MS	---	100/250/500 mL	1	---	1	---	---	1	3
DLLME-GC-MS/MS	MTBSTFA	10 mL	---	---	---	---	1.67	---	0.67
DLLME-UHPLC-TUV	---	5 mL	---	---	---	---	---	---	134
USAEME-GC-MS/MS	Ac ₂ O/Na ₂ HPO ₄	10 mL	16.4	---	7.70	3.90	---	---	5.84
MALLE-GC-MS/MS	Ac ₂ O/Na ₂ HPO ₄	18 mL	0.3	0.1	0.7	0.6	---	0.6	1.1

*SBSE, extracción por adsorción en barra agitadora; TD, desorción térmica; LD, desorción líquida; SPME, microextracción en fase sólida; SDME, microextracción en una gota; SPE, extracción en fase sólida; LVSS, focalización de grandes volúmenes de muestra; DLLME, microextracción líquido-líquido dispersiva; USAEME, microextracción en fase líquida mediante emulsión asistida por ultrasonido; MALLE, extracción líquido-líquido asistida por membranas; GC, cromatografía de gases; LC, cromatografía de líquidos; NACE, electroforesis capilar no acuosa; UHPLC, cromatografía líquida de ultra alta resolución; MS, espectrometría de masas; DAD, detector de diodos; TUV, detector ultravioleta sintonizable

Los límites de detección obtenidos en el trabajo propuesto se encuentran entre los más bajos y la utilización de una reacción de derivatización no complica el proceso, ya que tiene lugar de forma simultánea con el proceso de extracción. En el único trabajo encontrado en bibliografía en el que se determinan parabenos utilizando la extracción por SBSE y posterior análisis por TD-GC-MS en muestras líquidas [19], se obtenían límites de detección en aguas entre 15 y 20 $\mu\text{g/L}$. Además, los tiempos requeridos para alcanzar el equilibrio eran superiores, 120 min frente a 60 min necesarios en el presente trabajo. Si se comparan los resultados obtenidos para el triclosán con otros trabajos que también utilizan SBSE [16,22], los límites de detección son igualmente mejores en el trabajo propuesto.

La limitación más importante de la extracción por adsorción en barra agitadora radica en el recubrimiento de los *twisters*. El único polímero comercialmente disponible es el PDMS, con el cual se obtienen rendimientos de extracción bajos para el caso de analitos polares. Este problema puede ser atenuado sometiendo a los analitos a un proceso de derivatización, pero, en este sentido, la extracción por SPME es más versátil, ya que existen varios tipos de recubrimientos con diferentes propiedades. Por ejemplo, los trabajos que utilizan SPME para extraer los analitos en estudio, utilizan fibras de poliacrilamida [30,49] y divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano [15].

Ninguna de estas dos técnicas de extracción utiliza disolventes, y son fáciles de usar. Una ventaja que presenta SBSE frente a SPME es la cantidad de fase adsorbente, que es en torno a 50-250 veces mayor. Esto se traduce en una capacidad de extracción superior. De forma específica, los límites de detección obtenidos para el MeP son mejores cuando se usa SBSE.

Respecto a las técnicas de extracción en fase sólida, las ventajas que presenta la extracción con SBSE son la reducción del volumen de muestra, 5

mL frente a 100-1000 mL, del volumen de disolventes orgánicos y del tiempo de trabajo.

Respecto a los métodos de separación y detección, en la aplicación que utilizó UHPLC-MS/MS [50], se describieron problemas de supresión iónica cuando se utilizaba ionización por electrospray, y cuando se trabajó con LVSS-NACE-DAD [26], los compuestos nPrP, BuP y BzP no pudieron ser cuantificados como consecuencia de la presencia en el electroferograma de señales interferentes de compuestos co-extraídos.

Se han propuesto otros métodos basados en técnicas de extracción líquido-líquido a pequeña escala y técnicas de extracción asistida por membranas, tales como SDME [20], DLLME [17,33], microextracción en fase líquida mediante emulsión asistida por ultrasonido (USAEME) [48] y MALLE [34]. Todas estas técnicas tienen en común el pequeño volumen de disolvente utilizado para la extracción, así como los bajos volúmenes de muestra utilizados y los tiempos cortos de preparación de muestra. En general los límites de detección son similares a los obtenidos con la metodología propuesta en este trabajo. Estos métodos no requieren instrumentación específica, pero en la mayoría de los casos, se utilizan dispositivos manuales, los cuales no son robustos, y la repetibilidad depende, en gran medida, del operario.

4.7. Muestras reales

Se analizaron diferentes tipos de aguas: agua de grifo y agua residual urbana (muestras tomadas tanto a la entrada como a la salida de la misma planta de tratamiento). Las muestras no se sometieron a ningún tipo de manipulación previa. Se comprobó la existencia de efecto matriz comparando las señales obtenidas en agua ultrapura con las correspondientes a los otros tres tipos de aguas, todas ellas dopadas a un nivel de concentración de 50 ng/L (figura 4).

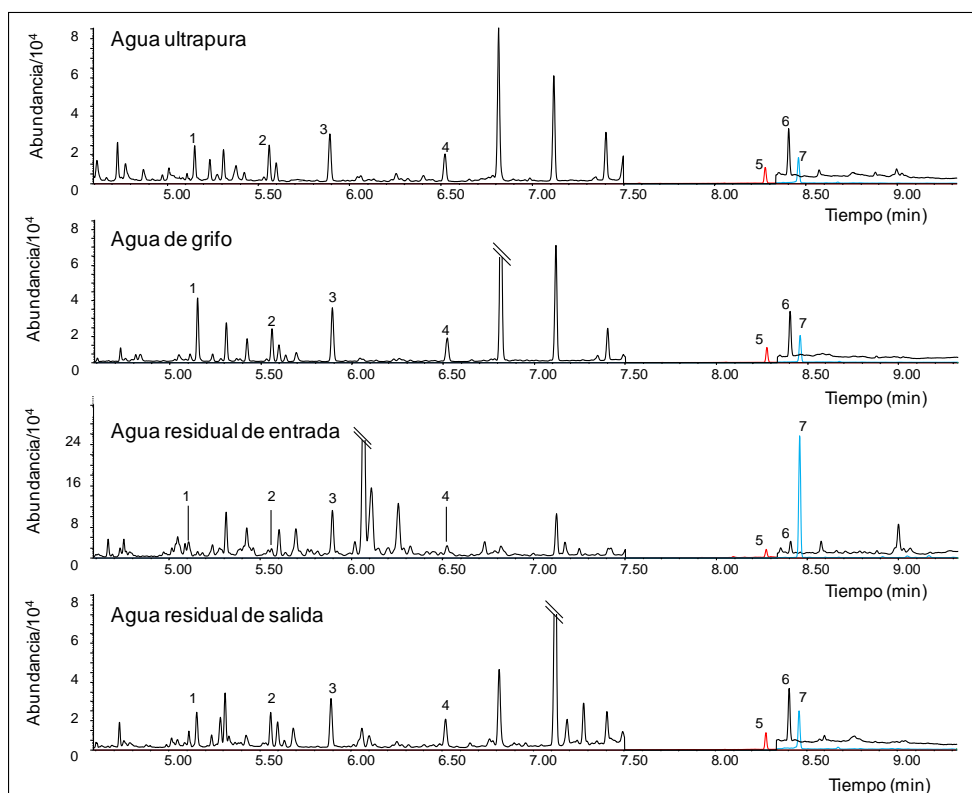


Figura 4: Cromatogramas de las muestras de agua estudiadas, dopadas a un nivel de concentración de 50 ng/L, en el modo de adquisición SIM. 1, MePA; 2, iPrPA; 3, nPrPA; 4, BzPA; 5, MeTCS; 6, BzPA; 7, TCSA

En todas las muestras analizadas, se restó al área de pico de los analitos de interés la correspondiente a la señal del blanco sin dopar. Para el caso del agua de grifo y el agua residual tratada (de salida), no se observó la existencia de efecto de matriz, con recuperaciones entre el 96 y el 106 % con respecto al agua ultrapura. Sin embargo, para el caso del agua residual sin tratar (entrada), se observó una disminución en la señal. Como consecuencia, para la cuantificación de los analitos en estudio, se utilizó calibración externa para el agua de grifo y el agua residual tratada, y calibración mediante protocolo de adición estándar para el caso del agua residual sin tratar.

En la tabla 3 se muestran los valores predichos. El MeP se detectó en el agua de grifo, a un nivel de concentración en torno a 15 ng/L. Se encontraron concentraciones elevadas de nPrP y TCS (502 ± 63 y 1099 ± 88 ng/L, respectivamente) y niveles traza de MeTCS (1.5 ± 0.2 ng/L) en el agua residual sin tratar. La misma agua, tomada a la salida de la planta de tratamiento, presentaba una concentración de 5 ± 3 ng/L de TCS, lo que indica la alta eficacia de la planta de tratamiento en la eliminación de compuestos lipofílicos.

Tabla 3: Concentraciones (ng/L) encontradas en agua de grifo y agua residual, tanto a la entrada como a la salida de la planta de tratamiento

Compuesto	Agua de grifo	Agua residual de entrada	Agua residual de salida
MeP	17 ± 4	<LQ	<LQ
iPrP	<LQ	<LQ	<LQ
nPrP	<LQ	502 ± 63	<LQ
BuP	<LQ	<LQ	<LQ
MeTCS	<LQ	1.5 ± 0.2	<LQ
BzP	<LQ	<LQ	<LQ
TCS	<LQ	1099 ± 88	5 ± 3

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se propone un método para la determinación de parabenos, triclosán y metil triclosán en muestras acuosas. Para ello se utiliza de una reacción de derivatización *in situ* de forma simultánea al proceso de extracción por adsorción en barra agitadora (SBSE), y posterior desorción térmica y análisis por GC-MS. Esta es la primera vez que se utiliza esta metodología para la determinación de este conjunto de analitos en muestras acuosas.

La reacción de derivatización tenía como objetivo reducir la polaridad de los compuestos, con el consiguiente aumento del rendimiento de la extracción. Las variables estudiadas para su optimización fueron tipo de medio básico y volumen de anhídrido acético. Las variables relacionadas con el proceso de extracción incluidas en este estudio fueron volumen de muestra, tiempo de extracción y adición de NaCl. Finalmente, las variables estudiadas en el proceso de desorción térmica (temperatura de criofocalización, flujo de desorción, tiempo de desorción y temperatura de desorción) fueron optimizadas utilizando un diseño experimental de tipo Box-Behnken.

Se comprobó que el método optimizado era eficaz, sencillo, muy sensible y con recuperaciones superiores al 80 % en la mayoría de los casos. Se observó buena linealidad, coeficientes de correlación elevados y ausencia de fallo de ajuste para las rectas de calibrado. Los límites de detección obtenidos fueron del orden de los ng/L, igualando o mejorando los resultados obtenidos en otros trabajos encontrados en bibliografía.

El método propuesto se aplicó de forma satisfactoria para la determinación de los analitos en estudio en muestras reales. Se encontraron niveles de n-propilparabeno y triclosán del orden de los µg/L en el agua residual de entrada de la principal planta de tratamiento de aguas residuales (EDAR) de Leipzig.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] C.G. Daughton, T.L. Jones-Lepp, *Pharmaceuticals and personal care products in the environment*, American Chemical Society, 2001, Washington.
- [2] H. Singer, S. Müller, C. Tixier, L. Pillonel, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 4998.
- [3] J.A. van Meeuwen, O. van Son, A.H. Piersma, P.C. de Jong, M. van den Berg, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 230 (2008) 372.
- [4] J.R. Byford, L.E. Shaw, M.G.B. Drew, G.S. Pope, M.J. Sauer, P.D. Darbre, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 80 (2002) 49.
- [5] J. Boberg, C. Taxvig, S. Christiansen, U. Hass, *Reprod. Toxicol.* 30 (2010) 301.
- [6] M.G. Soni, I.G. Carabin, G.A. Burdock, *Food Chem. Toxicol.* 43 (2005) 985.
- [7] D.R. Orvos, D.J. Versteeg, J. Inauen, M. Capdevielle, A. Rothenstein, V. Cunningham, *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (2002) 1338.
- [8] P. Canosa, S. Morales, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, M. Gómez, *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (2005) 1119.
- [9] M. Mezcua, M.J. Gómez, I. Ferrer, A. Agüera, M.D. Hernando, A.R. Fernández-Alba, *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 241.
- [10] E.M. Fiss, K.L. Rule, P.J. Vikesland, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 2387.
- [11] A.S. Allard, M. Remberger, A.H. Neilson, *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (1987) 839.
- [12] A. Nieto, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5619.
- [13] L. Nuñez, E. Turiel, A. Martín-Esteban, J.L. Tadeo, *Talanta* 80 (2010) 1782.
- [14] A. Agüera, A.R. Fernández-Alba, L. Piedra, M. Mézcua, M.J. Gómez, *Anal. Chim. Acta* 480 (2003) 193.

-
- [15] J. Regueiro, E. Becerril, C. García-Jares, M. Llompart, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 4693.
- [16] M. Kawaguchi, R. Ito, H. Honda, N. Endo, N. Okanouchi, K. Saito, Y. Seto, H. Nakazawa, J. Chromatogr. A 1206 (2008) 196.
- [17] J.H. Guo, X.H. Li, X.L. Cao, Y. Li, X.Z. Wang, X.B. Xu, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 3038.
- [18] P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, Anal. Chem. 79 (2007) 1675.
- [19] N. Ochiai, K. Sasamoto, M. Takino, S. Yamashita, S. Daishima, A.C. Heiden, A. Hoffmann, Anal. Bioanal. Chem. 373 (2002) 56.
- [20] M. Saraji, S. Mirmahdieh, J. Sep. Sci. 32 (2009) 988.
- [21] I. Márquez-Sillero, E. Aguilera-Herrador, S. Cárdenas, M. Valcárcel, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 1.
- [22] A.R.M. Silva, J.M.F. Nogueira, Talanta 74 (2008) 1498.
- [23] M. Kawaguchi, R. Ito, H. Honda, N. Endo, N. Okanouchi, K. Saito, Y. Seto, H. Nakazawa, J. Chromatogr. B 875 (2008) 577.
- [24] A. Zotou, I. Sakla, P.D. Tzanavaras, J. Pharm. Biomed. Anal. 53 (2010) 785.
- [25] A. Beltran, R.M. Marcé, P.A.G. Cormack, F. Borrull, Anal. Chim. Acta 677 (2010) 72.
- [26] E. Blanco, M. Casais, M. Mejuto, R. Cela, Anal. Chim. Acta 647 (2009) 104.
- [27] T. Benijts, W. Lambert, A. De Leenheer, Anal. Chem. 76 (2004) 704.
- [28] T. Benijts, R. Dams, W. Lambert, A. De Leenheer, J. Chromatogr. A 1029 (2004) 153.
- [29] B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy, Anal. Bioanal. Chem. 391 (2008) 1293.
- [30] P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, M.H. Bollaín, R. Cela, J. Chromatogr. A 1124 (2006) 3.
- [31] R.S. Zhao, J.P. Yuan, H.F. Li, X. Wang, T. Jiang, J.M. Lin, Anal. Bioanal. Chem. 387 (2007) 2911.

- [32] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 2342.
- [33] R. Montes, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 205.
- [34] E. Villaverde-de-Sáa, I. González-Mariño, J. Benito-Quintana, R. Rodil, I. Rodriguez, R. Cela, Anal. Bioanal. Chem. 397 (2010) 2559.
- [35] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, J. Microcolumn Sep. 11 (1999) 737.
- [36] C. Bicchi, C. Cordero, P. Rubiolo, P. Sandra, J. Sep. Sci. 26 (2003) 1650.
- [37] E. Coelho, M.A. Coimbra, J.M.F. Nogueira, S.M. Rocha, Anal. Chim. Acta 635 (2009) 214.
- [38] R. Rodil, M. Moeder, J. Chromatogr. A 1179 (2008) 81.
- [39] M. Kawaguchi, R. Ito, H. Honda, N. Endo, N. Okanouchi, K. Saito, Y. Seto, H. Nakazawa, J. Chromatogr. A 1200 (2008) 260.
- [40] A. Prieto, O. Zuloaga, A. Usobiaga, N. Etxebarria, L.A. Fernández, J. Chromatogr. A 1174 (2007) 40.
- [41] C. Schummer, O. Delhomme, B.M.R. Appenzeller, R. Wennig, M. Millet, Talanta 77 (2009) 1473.
- [42] H.B. Lee, T.E. Peart, M.L. Svoboda, J. Chromatogr. A 1094 (2005) 122.
- [43] T. Okumura, Y. Nishikawa, Anal. Chim. Acta 325 (1996) 175.
- [44] J.L. Pérez-Pavón, A.M. Casas-Ferreira, M.E. Fernández-Laespada, B. Moreno-Cordero, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 1192.
- [45] T.J. Boyd, J. Chromatogr. A 662 (1994) 281.
- [46] J.W. Blythe, A. Heitz, C.A. Joll, R.I. Kagi, J. Chromatogr. A 1102 (2006) 73.
- [47] S. Nakamura, S. Daishima, J. Chromatogr. A 1038 (2004) 291.
- [48] J. Regueiro, M. Llompart, E. Psillakis, J.C. Garcia-Montegudo, C. García-Jares, Talanta 79 (2009) 1387.
- [49] P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, J. Chromatogr. A 1072 (2005) 107.

- [50] M. Pedrouzo, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 6994.

TRABAJO PUBLICADO
PUBLISHED ARTICLE

VII

GC-MS determination of parabens, triclosan and methyl triclosan in water by in situ derivatisation and stir-bar sorptive extraction

Ana María Casas Ferreira · Monika Möder ·
María Esther Fernández Laespada

Received: 30 July 2010 / Revised: 8 October 2010 / Accepted: 12 October 2010 / Published online: 28 October 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Stir-bar sorptive extraction in combination with an in situ derivatisation reaction and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry was successfully applied to determine parabens (methylparaben, isopropylparaben, *n*-propylparaben, butylparaben and benzylparaben), triclosan and methyltriclosan in water samples. This approach improves both the extraction efficiency and the sensitivity in the GC in a simple way since the derivatisation reaction occurs at the same time as the extraction procedure. The in situ derivatisation reaction was carried out with acetic anhydride under alkaline conditions. Thermal desorption parameters (cryofocusing temperature, desorption flow, desorption time, desorption temperature) were optimised using a Box–Behnken experimental design. All the analytes gave recoveries higher than 79%, except methylparaben (22%). The method afforded detection limits between 0.64 and 4.12 ng/L, with good reproducibility and accuracy values. The feasibility of the method for the determination of analytes in water samples was checked in tap water and untreated and treated wastewater.

Keywords Stir-bar sorptive extraction · In situ derivatisation · Parabens · Water · Wastewater

Introduction

Esters of *p*-hydroxybenzoic acid (parabens) and 2-(2,4-dichlorophenoxy)-5-chlorophenol (triclosan) are compounds with bactericide and antimicrobial properties that are mainly employed in the formulation of personal care products [1]. In addition, parabens are added to canned foods and beverages as preservatives. Triclosan is also incorporated as a biocide in sports clothes, footwear, carpets, plastic toys and kitchenware [2]. All these applications contribute to the dispersion of these compounds in the environment.

Several studies have demonstrated the ability of parabens to disrupt physiologically important functions in both in vitro cell culture systems [3] and in vivo animal models [4–6]. Furthermore, increasing concern regarding the presence of triclosan in the environment is due to both its potential toxicity for certain aquatic organisms [7] and its transformation into more toxic products such as chlorophenols [8], dioxins [9], tetra- and pentachlorinated phenoxyphe- nols [10], and methyltriclosan [11].

Several matrices have been analysed in search of these compounds: sludges and soil samples [12–14], water samples [15–17], dust [18], food [19], cosmetic products [20–22] and biological samples [23, 24]. For water samples, several methods have been reported using gas chromatography (GC) [15], high-performance liquid chromatography (HPLC) [25] and capillary electrophoresis [26], with conventional detectors [25, 26] or mass spectrometry [15]. Since most of these compounds are polar, gas chromatography usually requires a prior derivatisation step.

The trace levels of these target compounds usually found in the environment require an enrichment step before instrumental analysis. Solid phase extraction (SPE) is the most common extraction technique used [27–29]. New

A. M. Casas Ferreira · M. E. Fernández Laespada (✉)
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología,
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Salamanca,
37008 Salamanca, Spain
e-mail: efl@usal.es

M. Möder
Helmholtz Centre for Environmental Research–UFZ,
Permoserstrasse 15,
04318 Leipzig, Germany

approaches based on microextraction techniques have recently been reported, such as solid phase microextraction (SPME) [15, 30], hollow-fibre liquid phase microextraction (HF-LPME) [31], dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) [32, 33], membrane-assisted liquid–liquid extraction (MALLE) [34] and single-drop microextraction (SDME) [20].

In 1999, a new extraction technique, known as stir-bar sorptive extraction (SBSE), was developed by Baltussen et al. [35]. In SBSE, the analytes are extracted by a polydimethylsiloxane (PDMS) stir-bar exposed in the aqueous sample under stirring for a fixed time. The enriched analytes are recovered by liquid desorption (LD) or thermal desorption (TD) [36–40].

The determination of H-acidic compounds by gas chromatography most frequently includes derivatisation. Different reagents have been used: *N-tert*-butyldimethylsilyl-*N*-methyltrifluoroacetamide (MTBSTFA) [30, 41], *N*, *O*-bis(trimethylsilyl)acetamide (BSA) [20], pentafluoropropionic acid anhydride (PFPA) [42] or diazomethane [43].

In situ acetylation with acetic anhydride in basic medium is one of the most common derivatisation procedures for phenolic compounds [15, 44–48]. This reaction can be performed in aqueous samples in a few minutes, with high efficiency.

In the present work, our aim was to combine the advantages of SBSE and an in situ acetylation reaction for the analysis of parabens and triclosan in water samples. Methyltriclosan was also included as a possible product of the degradation of triclosan in water samples. This is the first time that this methodology has been applied for the determination of these compounds in such matrices. To date, the use of SBSE for the determination of parabens in aqueous samples is limited to the work by Ochiai et al. [19] in which the authors determined preservatives in different types of beverages and sauces with no derivatisation. In the case of triclosan, SBSE has also been used without any type of derivatisation [16, 22]. The enriched target analytes were desorbed thermally using a thermodesorption system coupled to a GC and a mass spectrometer (MS). The aim of the method development was to establish a highly sensitive, fast and robust method for the determination of these compounds in complex water samples such as surface water or wastewater.

Experimental

Materials, standard solutions and samples

Isopropylparaben (iPrP) was supplied by TCI Europe (Zwijndrecht, Belgium). The other parabens (methylparaben (MeP), *n*-propylparaben (nPrP), *n*-butylparaben (BuP), benzylparaben (BzP)), triclosan (TCS) and methyltriclosan (MeTCS)

were supplied by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Methanol, sodium chloride, ethyl acetate, as well as the buffer salts K_2CO_3 and $NaHCO_3$ were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Acetic anhydride (ReagentPlus®) was provided by Sigma Aldrich (Munich, Germany). Pyridine was supplied by Fluka (Darmstadt, Germany).

Stock solutions of all the analytes (500 mg/L in methanol) were prepared and stored at 4 °C in the refrigerator. These solutions were used to spike the water samples at the different concentrations analysed. Optimisation experiments were performed using 5 mL aliquots of water sample spiked with the analytes at a concentration of 10 µg/L. To calculate the values of extraction efficiency, standards of the derivatized compounds, unavailable commercially, were prepared. The target substances were derivatized by adding 200 µL acetic anhydride and 5 µL pyridine to 1 mL of a 500-mg/L standard solution containing all the compounds of interest in ethyl acetate. The mixture was shaken manually for 10 min at ambient temperature. Further dilutions were prepared in ethyl acetate. These solutions were injected in a GC-MS system and quantitative transformation into the derivatives was confirmed. No signals for the non-derivatisated precursors were detected.

The proposed procedure was used for the determination of the analytes in samples of tap water (Leipzig, Germany) and the influent and effluent waters from the main wastewater treatment plant (WWTP) of Leipzig, a town with about 500,000 inhabitants.

Commercial stir bars (twisters) for sorptive extraction were obtained from Gerstel (Mülheim an der Ruhr, Germany). They consist of glass-encapsulated magnetic stir bars, 10 mm in length, coated with 22 µg of PDMS. This layer is 0.5 mm thick, which corresponds to a volume of 24 µL of PDMS. Prior to their first use, the stir bars were conditioned for 16 h at 250 °C under a nitrogen stream. Blanks of the stir bars were analysed regularly to check for memory effects.

Derivatisation and the SBSE procedure

Forty-two milligrams of $NaHCO_3$ was placed in a 10-mL headspace vial, and 5 mL of an aqueous solution spiked at a given concentration of analytes was added. Then, the twister was inserted into the mixture, followed by the addition of 20 µL of acetic acid anhydride. The vial was sealed with a Teflon-covered silicone septum and the mixture stirred for 60 min at 1,000 rpm (Variomag Multi-point 6/15, H+PLabortechnik, Oberschleissheim, München, Germany) at room temperature. After the extraction, the twister was removed with tweezers, dried with lint-free tissue and placed inside a glass TD tube (Gerstel, Germany). The tube was placed inside the thermal desorption system where the analytes were desorbed thermally and subjected to GC-MS analysis.

Instrumentation

GC-MS analyses were performed using an Agilent 6890 gas chromatograph (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). For TD-GC-MS analysis, the chromatograph was coupled to a Gerstel thermodesorption system (TDS A). All experiments were carried out with a programmable temperature vaporising (PTV) inlet (CIS-4), with an empty liner for cryofocusing of the analytes prior to introduction into the capillary column. Cooling was accomplished with liquid nitrogen. For the confirmation of the complete transformation of the standards in their acetylated derivatives, a GC with an automated liquid injection system (Agilent 7683) and a split/splitless injector was used. In both cases, a quadrupole mass spectrometer (HP 5973N) was applied for the analysis.

TD-GC-MS conditions

The optimised conditions used for the thermodesorption system were as follows: desorption temperature, 275 °C; desorption time, 6 min; and helium flow rate (desorption flow), 70 mL/min. During the desorption step, the PTV temperature was set at -10 °C (solvent-vent mode). After the desorption, the PTV temperature was programmed to increase from -10 to 280 °C at 720 °C/min (held for 5 min) to transfer the analytes to the chromatographic system. Injection was performed in hot-splitless mode at 280 °C, with a splitless time of 2 min.

To perform the gas chromatographic measurements, an HP-5MS capillary column (30 m × 250 μm i.d., 0.25-μm film thickness, Agilent J&W column, Waldbronn, Germany) was used. The carrier gas used was helium at a flow rate of 1.2 mL/min. The column oven temperature programme involved an initial temperature of 60 °C for 2 min, an increase at 65 °C/min to 175 °C, then an increase at 45 °C/min to 200 °C (held 2 min) and an increase at 40 °C/min to 280 °C, holding for 1 min. The mass spectrometer was operated in scan mode for the optimisation studies and at selected ion monitoring (SIM) mode for calibration and analyte quantification in real samples. Electron ionisation at 70 eV was used. A solvent delay of 4.5 min was established. The *m/z* range in the scan mode was 50–350 amu. The characteristic ions for each studied compound are shown in Table 1.

Results and discussion

Derivatisation reaction

Initially, the signals generated by the non-derivatised and derivatised compounds extracted by the twister were compared in order to confirm the suitability of performing

Table 1 Analytical characteristics of the proposed method

Compound	<i>m/z</i>	Quantification ion		Intercept	Slope	R^2	RSD (%)		LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Prediction	
		Quantitation ion	Qualifier ions				Intraday (<i>n</i> =10, 50 ng/L)	Inter-day (<i>n</i> =3, 50 ng/L)			50 ng/L	100 ng/L
MeP	121	152, 194	(4±3) × 10 ⁴	(196±8) × 10	0.9999	6.69	5.90	1.86	6.17	48±6	103±6	
iPrP	121	138, 180	(1±4) × 10 ⁴	(350±9) × 10	0.9976	5.89	4.06	0.64	2.14	51±5	101±7	
nPrP	138	121, 180	(11±5) × 10 ⁴	(46±1) × 10 ²	0.9988	9.42	8.55	4.12	13.74	45±5	105±11	
BuP	138	121, 194	(2±5) × 10 ⁴	(62±1) × 10 ²	0.9998	5.91	8.10	1.06	3.55	46±5	95±6	
MeTCS	302	304, 252	(9±4) × 10 ³	1410±9	0.9997	4.84	4.36	0.54	1.80	47±3	100±3	
BzP	121	91, 65	(0±1) × 10 ⁵	(50±2) × 10 ²	0.9998	6.89	8.49	2.80	9.35	49±8	103±11	
TCS	288	218, 63	(1±1) × 10 ⁴	(264±2) × 10	0.9999	5.37	4.78	1.39	4.65	48±3	99±3	

the acetylation reaction. As shown in Fig. 1, the derivatisation reaction allowed a significant improvement of the extraction process

The variables studied for the optimisation of the derivatisation reaction were the basic medium used and the relationship between the base concentration and the volume of acetic anhydride.

Two basic media were tested—0.4 M solutions of K_2CO_3 and $NaHCO_3$ —where the difference was the initial pH (12.0 and 8.4, respectively) of the medium. Similar responses were obtained for all the analytes. Greater irreproducibility was observed with the first solution, and hence, the 0.4 M solution of $NaHCO_3$ was selected for ensuing experiments.

Once the basic medium had been chosen, the effect of the relationship between the base concentration (0.1, 0.25 and 0.4 M) and the volume of acetic anhydride (20, 50 and 100 μ L) was studied. The best results were obtained when 20 μ L of acetic anhydride was added, regardless of the $NaHCO_3$ concentration. A 100- μ L acetic anhydride volume led to a decrease in the signals, due to the lower final pH, at which the esters are not stable. A working relationship of 0.1 M $NaHCO_3$ /20 μ L acetic anhydride was selected as optimum for derivatisation.

Optimisation of SBSE conditions

Three parameters affecting the extraction conditions were studied: the ionic strength of the sample, the sample volume (β ratio) and the extraction time.

A study was made of the effect of the addition of an electrolyte to the medium at three concentration levels: 0.0, 1.0 and 2.5 g NaCl in 5.0 mL (supersaturation). It was observed that NaCl addition only produced a slightly higher signal for methylparaben acetate. In the cases of methyl-

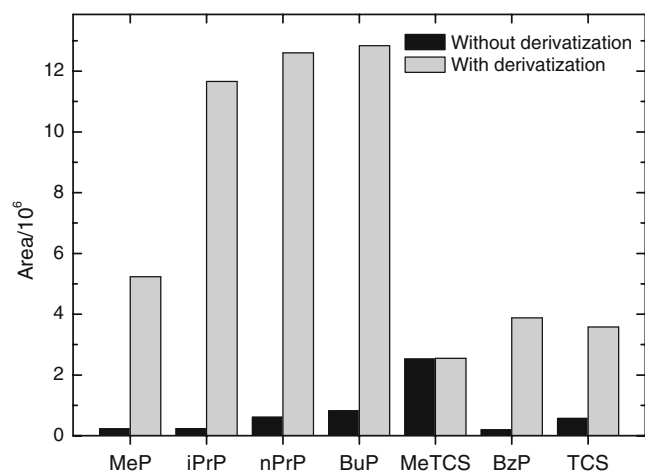


Fig. 1 Comparison of the signals obtained when the derivatization reaction took place and when no derivatization reaction was performed during the extraction procedure

triclosan, benzylparaben acetate and triclosan acetate, a decrease in the signal was observed. Therefore, no addition of NaCl was chosen in the optimised conditions.

Two sample volumes, 5 and 10 mL, were studied. Higher sample volumes decrease extraction efficiency, but the chromatographic response can increase due to an increase in the mass of analyte. Extraction time curves were obtained for each of them, maintaining the same analyte, base and derivatizing reagent concentrations. An initial solute concentration of 10 μ g/L was used (50 and 100 ng, respectively). Different extraction times were studied: in the 0- to 180-min range for the 5-mL samples and in the 0- to 320-min range for the 10-mL samples. The results obtained are shown in Fig. 2. For 5 mL of water sample, 60 min was sufficient for the partition equilibrium to be reached by all the compounds (Fig. 2a). However, for 10 mL of water sample, at least 90 min was needed for equilibrium to be reached by the more lipophilic compounds (Fig. 2b). Although the signals provided by 10-mL samples were higher for nearly all the compounds, a 5-mL sample volume was preferred with a view to reducing the extraction time whilst working under equilibrium conditions, which provides better precision.

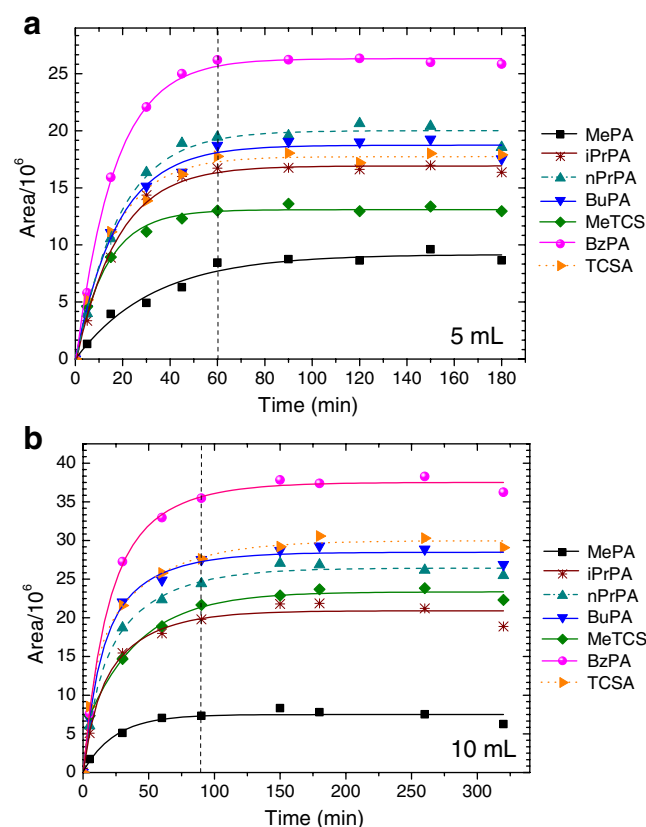


Fig. 2 Extraction time profiles for the analytes for 5 mL (a) and 10 mL (b) of sample volume. The concentrations of the analytes was 10 μ g/L in both cases

Regarding the stirring speed, very vigorous stirring is known to shorten the extraction time, so the maximum stirring speed allowed by the flask geometry was chosen (1,000 rpm). Higher speeds broke the twister coating.

Optimisation of the desorption parameters

The variables optimised in the desorption step were the cryofocusing temperature (between -50 and 0 °C), the desorption flow (between 20 and 100 mL/min), the desorption time (between 3 and 10 min) and the desorption temperature (between 250 and 300 °C). To study the effect of these variables and of their interactions on the analytical signal, a Box–Behnken experimental design was used. Each of the experiments was performed in duplicate in order to detect any lack of fit of the data in the model generated. The responses chosen were the peak areas for the m/z ratio corresponding to the base peak of the spectra of methyltriclosan and of each acetate derivative. Only the model including the variables, their squares and the interactions among them did not show a lack of fit.

The cryofocusing temperature (A) and desorption flow (B) or their quadratic effects were significant for most of the compounds. These factors had different effects on the signals depending on the analyte considered. For the most volatile ones (MePA and i-PrPA), on increasing the temperature or the desorption flow, a decrease in signal was observed. In contrast, for the rest of the compounds, increasing these variables produced an increase in the analytical signal.

The interaction between the cryofocusing temperature and the desorption flow (AB) influenced all the analyte signals, except iPrPA and nPrPA (Fig. 3a). MePA exhibited maximum signals for minimum desorption flows (20 mL/min) and cryofocusing temperatures between -20 and -40 °C, whereas for the less volatile compounds, increasing the temperature and increasing the flow provided better signals.

The desorption time (C) was significant for MePA and nPrPA. Increasing the desorption time produced a signal decrease. The desorption temperature (D) only had a significant influence on the signal of MePA, but it interacted with the desorption flow for all the analytes (BD, Fig. 3b). MePA and iPrPA showed the same behaviour, with maximum signals at 300 °C and a desorption flow of 20 mL/min. The other compounds showed a different trend, as can be seen in the BzPA response surface, better results being obtained at lower desorption temperatures and higher desorption flows. The less volatile the compound, the more pronounced is this trend.

As a result of the different type of behaviour observed, compromise values were chosen for the variables studied. These values were: cryofocusing temperature, -10 °C;

desorption flow, 70 mL/min; desorption time, 6 min; desorption temperature, 275 °C.

Once the thermal desorption step had been optimised, the absence of a carryover effect was checked by performing two consecutive desorption steps. A spiked water sample was extracted and the enriched stir bar was desorbed twice under the optimum conditions. No peaks were detected in the second desorption. Therefore, the analytes were completely desorbed in one step and no carryover took place.

Extraction efficiency

Extraction efficiency was calculated by comparing the GC-MS peak areas of the extracted compounds in water samples with those of a standard solution of the completely acetylated compounds (see “Materials, standard solutions and samples”) placed on glass wool packed in a thermo-desorption tube.

Recoveries ranging from 78% to 95% were obtained for all the compounds, except methylparaben acetate, with an extraction efficiency of 22%. Methylparaben acetate is the most polar compound within the set of target analytes. However, other physical and/or chemical characteristics must also affect the extraction behaviour of PDMS, which could explain this low extraction yield.

Evaluation of the SBSE-TD-GC-MS method

Calibration straight lines were obtained with seven concentration levels ranging from 0 to 1,000 ng/L. Each level was analysed in triplicate. The quantitation and qualifier ions, as well as the analytical characteristics of the method, are shown in Table 1. The calibration models displayed linear behaviour. Their validity was checked using ANOVA, and it was observed that they did not exhibit any lack of fit. The value of the correlation coefficient (R^2) was higher than 0.99.

In order to study the reproducibility of the process, water samples spiked at 50 ng/L were analysed on the same day (ten replicates) and on the following two consecutive days (three replicates). The results, as relative standard deviations (RSD, %), are shown in Table 1, with values not higher than 10% in the case of intraday reproducibility and 9% in the case of inter-day reproducibility. These values can be considered highly satisfactory taking into account that they include the simultaneous derivatisation and extraction procedures.

The limits of detection (LODs) and the limits of quantification (LOQs), calculated as 3.3 and 10 times, respectively, the standard deviation of a sample with an S/N ratio of 3, are also shown in Table 1. The LODs obtained ranged between 0.54 and 4.12 ng/L and the LOQs between 1.80 and 13.7 ng/L

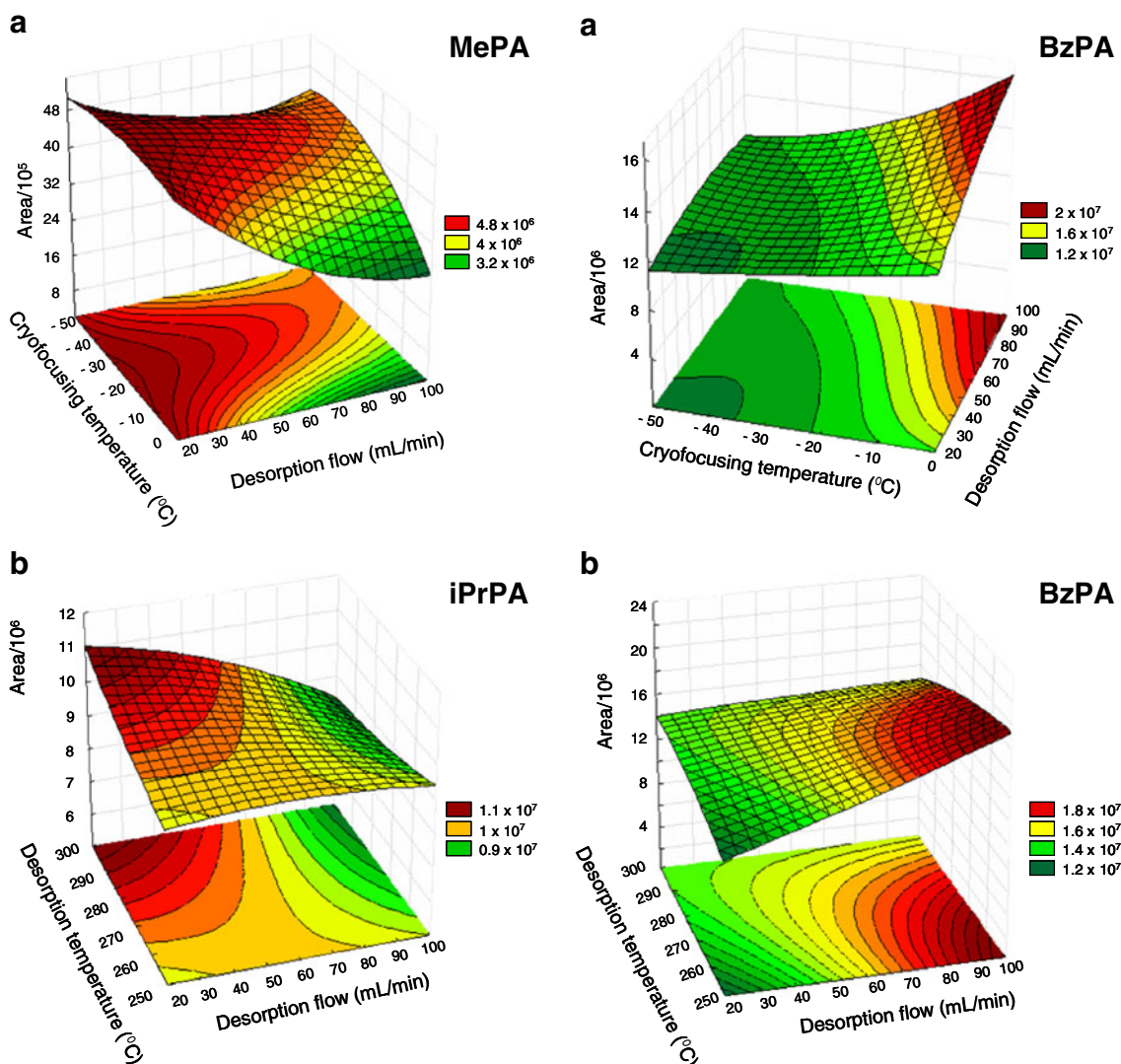


Fig. 3 Experimental design surfaces showing the interaction between the cryofocusing temperature and the desorption flow for methylparaben acetate and benzylparaben acetate. The desorption time and desorption temperature were fixed at 6 min and 275 °C, respectively

(a). Experimental design surfaces showing the interaction between the desorption temperature and the desorption flow for isopropylparaben acetate and benzylparaben acetate. The cryofocusing temperature and desorption time were fixed at -10 °C and 6 min (b)

To check the accuracy of the model, ultrapure water samples were spiked at two concentration levels: 50 and 100 ng/L. In each case, the model predicted concentration values equal to those used to spike the water samples (Table 1).

Comparison with other proposed methods

Table 2 summarises the methodologies already proposed for the determination of the analytes (mainly in water samples). The LODs of the approach proposed in this work are among the lowest, and the use of a derivatisation reaction does not complicate the procedure since it takes place at the same time as extraction from the aqueous matrix. The only

other work that to the best of our knowledge has determined parabens using SBSE and TD-GC-MS in liquid samples [19] reported detection limits in water between 15 and 20 $\mu\text{g/L}$. Additionally, the times required for equilibrium to be reached are reduced from 120 to 60 min. In the case of triclosan, on comparing the results obtained with those reported in other works also using SBSE [16, 22], the LODs are equally improved.

The most important limitations of SBSE are related to the coating of the stir bars. The non-polar PDMS is currently the only polymer commercially available, thus providing poor recoveries for polar analytes. In situ derivatisation can be applied to improve the extraction yields, as proposed in this work, but in this sense, SPME is more versatile because

Table 2 Comparison of the results obtained with the method proposed in this work (in bold) and those reported in literature

Method	Derivatization reaction	Sample volume (mL)	LOD (ng/L) water samples							Reference
			MeP	iPrP	nPrP	BuP	MeTCS	BzP	TCS	
SBSE-TD-GC-MS	Ac ₂ O/NaHCO ₃	5	1.86	0.64	4.12	1.06	0.54	2.80	1.39	
SBSE-TD-GC-MS	–	10	–	–	–	–	–	–	5	[16]
SBSE-TD-GC-MS	–	10	–	20×10 ³	17×10 ³	17×10 ³	–	–	–	[19]
SBSE-LD-LC-DAD	–	25	–	–	–	–	–	–	100	[22]
SPME-GC-MS/MS	MTBSTFA	10	8.33	–	0.67	0.33	–	1.67	–	[30]
SPME-GC-MS	MSBSTFA	22	–	–	–	–	0.67	–	0.67	[49]
SPME-GC-MS	Ac ₂ O/Na ₂ HPO ₄	10	17	–	4.0	5.7	–	–	6.5	[15]
SDME-GC-MS	BSA	3	15	2	4	1	–	–	–	[20]
SPE-GC-MS	PFPA	1,000	100	–	100	100	–	–	100	[42]
SPE-GC-MS	MTBSTFA/ TBDMSCI									
SPE-LVSS-NACE-DAD	–	500	30	–	25	25	–	31	–	[26]
SPE-UHPLC-MS/MS	–	100/250/500	1	–	1	–	–	1	3	[50]
DLLME-GC-MS/MS	MTBSTFA	10	–	–	–	–	1.67	–	0.67	[33]
DLLME-UHPLC-TUV	–	5	–	–	–	–	236	–	134	[17]
USAEME-GC-MS/MS	Ac ₂ O/Na ₂ HPO ₄	10	16.4	–	7.70	3.90	–	–	5.84	[48]
MALLE-GC-MS/MS	Ac ₂ O/Na ₂ HPO ₄	18	0.3	0.1	0.7	0.6	–	0.6	1.1	[34]

SBSE stir-bar sorptive extraction, TD thermal desorption, LD liquid desorption, SPME solid phase microextraction, SDME single-drop microextraction, SPE solid phase extraction, LVSS large-volume sample stacking, DLLME dispersive liquid–liquid microextraction, USAEME ultrasound-assisted emulsification–microextraction, MALLE membrane-assisted liquid–liquid extraction, GC gas chromatography, LC liquid chromatography, NACE non-aqueous capillary electrophoresis, UHPLC ultra-high-performance liquid chromatography, MS mass spectrometry, DAD diode array detector, TUV tunable ultraviolet detection

different fibre coatings can be assayed, in addition to the possibility of resorting to derivatisation reactions. For instance, the optimised SPME approaches for the analytes of interest used polyacrylate fibres [30, 49] and divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane [15].

Both techniques are solvent-free and easy to use. An advantage of SBSE with regard to SPME is the 50- to 250-fold higher amount of the sorbent phase, which provides a higher extraction capacity. Specifically, the LOD achieved for methylparaben was lower using SBSE.

With respect to SPE methods, advantages of the SBSE proposed method include reduction of the sample volumes required, 5 mL versus 100–1,000 mL, of solvent consumption and labour effort. Regarding the separation and detection modes, when UHPLC-MS/MS is used [50], problems from ion suppression due to the ESI are reported, and with the LVSS-NACE-DAD method [26], signals for nPrP, BuP and BzP in wastewater could not be quantified due to the presence in the electropherograms of co-extracted interferences.

Other proposed methods are based on microscale liquid–liquid extraction and membrane-assisted extraction procedures. They have in common the small amount of solvent required for extraction, as well as the low volumes of

sample required and the short sample preparation time. This set includes SDME [20], DLLME [17, 33], ultrasound-assisted emulsification–microextraction (USAEME) [48] and MALLE [34]. In general, the limits of detection are similar to those obtained with the proposed method. These techniques do not require any special instrumentation, but in most cases, they use homemade devices, they are not particularly rugged, and the repeatability is very much dependent on the user.

Real samples

Different types of water samples were analysed: tap water and wastewater (taken at the influent and effluent streams of the same wastewater treatment plant). The samples were not subjected to any kind of previous manipulation. Matrix effects were investigated by comparing the signals obtained in ultrapure water with those provided by the three water samples spiked with the compounds at 50 ng/L (Fig. 4). In all cases, non-spiked samples were also analysed and the obtained peak areas were subtracted from those corresponding to the spiked samples. For tap water and treated wastewater (effluent), no matrix effect was observed, with recoveries between 96% and 106% with respect to ultrapure water in all cases. However, in

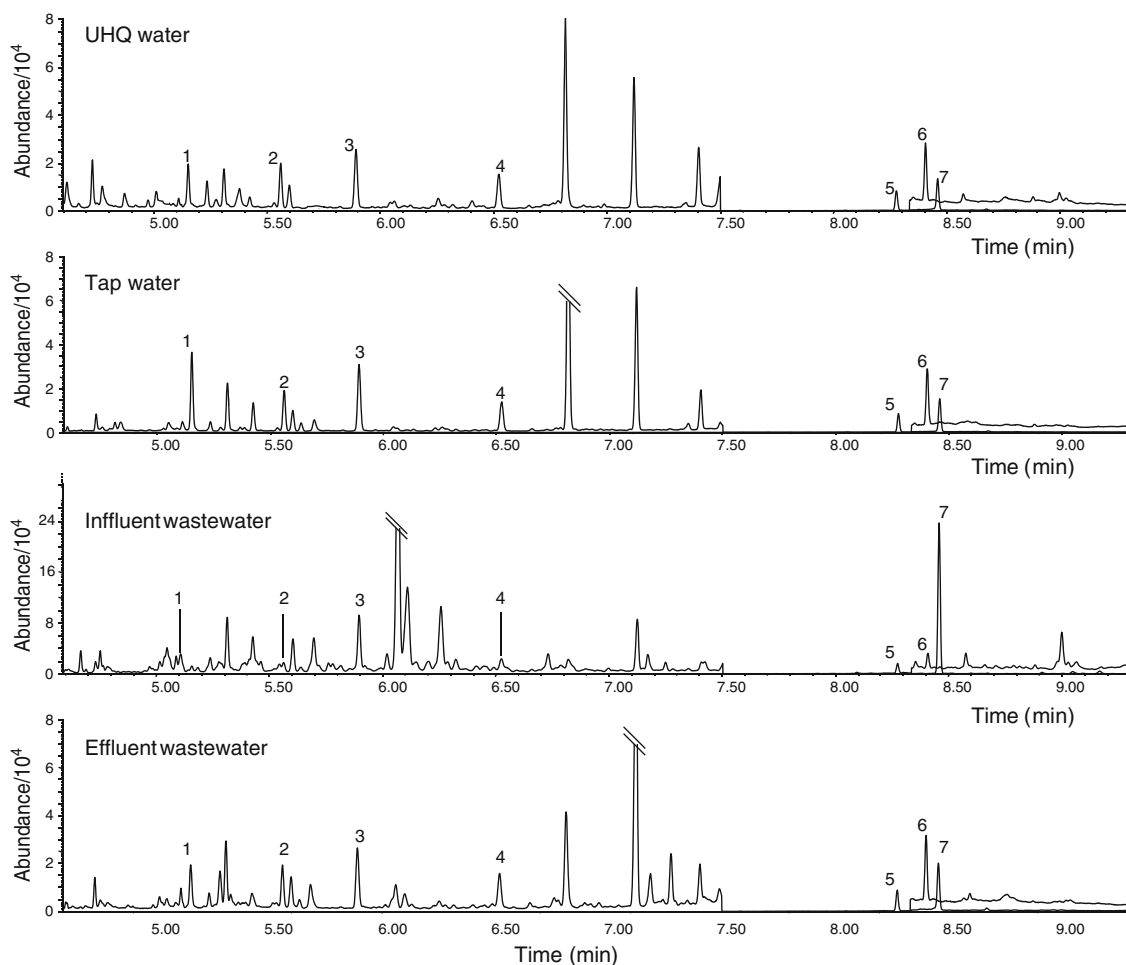


Fig. 4 SIM chromatograms of water samples spiked at 50 ng/L. 1 methylparaben acetate, 2 isopropylparaben acetate, 3 *n*-propylparaben acetate, 4 butylparaben acetate, 5 methyltriclosan, 6 benzylparaben acetate, 7 triclosan acetate

non-treated wastewater (influent), a significant decrease in the signal was observed for all the compounds. Accordingly, for quantification of the compounds studied, external calibration was used for tap water and treated wastewater, and the standard additions procedure was adopted for non-treated wastewater.

Table 3 shows the prediction values obtained. Methylparaben was detected in tap water at concentrations around 15 ng/L. High levels of *n*-propylparaben and triclosan (502 ± 63 and $1,099 \pm 88$ ng/L, respectively) and trace levels of methyltriclosan (1.5 ± 0.2 ng/L) were detected in non-treated wastewater. This same water, taken from the effluent stream, showed only 5 ± 3 ng/L of triclosan, which indicates a high removal of lipophilic compounds in the wastewater treatment plant.

Conclusions

An in situ derivatisation SBSE-TD-GC-MS method has been developed for the analysis of parabens, triclosan and

methyltriclosan in water samples. This is the first time that this methodology has been employed for the determination of these compounds in aqueous samples. The variables affecting the simultaneous acetylation reaction performed to decrease analyte polarity were basic medium and volume of acetic anhydride. The variables related to the sorptive extraction step included sample volume, extraction time and the addition of NaCl. Thermal desorption parameters

Table 3 Concentrations (ng/L) detected in tap water, non-treated wastewater (influent) and treated wastewater (effluent)

Compound	Tap water	Influent water	Effluent water
MeP	17±4	<LOQ	<LOQ
iPrP	<LOQ	<LOQ	<LOQ
nPrP	<LOQ	502±63	<LOQ
BuP	<LOQ	<LOQ	<LOQ
MeTCS	<LOQ	1.5±0.2	<LOQ
BzP	<LOQ	<LOQ	<LOQ
TCS	<LOQ	1099±88	5±3

(cryofocusing temperature, desorption flow, desorption time, desorption temperature) were optimised using a Box–Behnken experimental design.

The optimised method proved to be efficient, easy-to-use and highly sensitive, with recoveries higher than 80% in most cases. It showed good linearity, high correlation coefficients and no lack of fit. The detection limits were of low nanograms per litre, equaling or improving the results obtained with other proposed techniques.

The method was successfully applied in real water samples. Triclosan and *n*-propylparaben were detected in the micrograms per litre range in influent water from the main WWTP of Leipzig.

Acknowledgements The authors acknowledge the financial support of the Consejería de Educación y Cultura of the Junta de Castilla y León (Project GR87). Casas Ferreira A.M. acknowledges a FPU grant from the Spanish Ministry of Education. The authors are grateful to Iria Gonzalez and Dr. J. B. Quintana of the University of Santiago de Compostela for their kind offer of reference compounds from their collection for our research.

References

- Daughton CG, Jones-Lepp TL (2001) Pharmaceuticals and personal care products in the environment. American Chemical Society, Washington
- Singer H, Müller S, Tixier C, Pillonel L (2002) *Environ Sci Technol* 36:4998–5004
- van Meeuwen JA, van Son O, Piersma AH, de Jong PC, van den Berg M (2008) *Toxicol Appl Pharmacol* 230:372–382
- Byford JR, Shaw LE, Drew MGB, Pope GS, Sauer MJ, Darbre PD (2002) *J Steroid Biochem Mol Biol* 80:49–60
- Boberg J, Taxvig C, Christiansen S, Hass U (2010) Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. *Reprod Toxicol* 30:301–312. doi:10.1016/j.reprotox.2010.03.011
- Soni MG, Carabin IG, Burdock GA (2005) *Food Chem Toxicol* 43:985–1015
- Orvos DR, Versteeg DJ, Inauen J, Capdevielle M, Rothenstein A, Cunningham V (2002) *Environ Toxicol Chem* 21:1338–1349
- Canosa P, Morales S, Rodríguez I, Rubí E, Cela R, Gómez M (2005) *Anal Bioanal Chem* 383:1119–1126
- Mezcua M, Gómez MJ, Ferrer I, Agüera A, Hernando MD, Fernández-Alba AR (2004) *Anal Chim Acta* 524:241–247
- Fiss EM, Rule KL, Vikesland PJ (2007) *Environ Sci Technol* 41:2387–2394
- Allard AS, Remberger M, Neilson AH (1987) *Appl Environ Microbiol* 53:839–845
- Nieto A, Borrull F, Marcé RM, Pocurull E (2009) *J Chromatogr A* 1216:5619–5625
- Núñez L, Turiel E, Martín-Esteban A, Tadeo JL (2010) *Talanta* 80:1782–1788
- Agüera A, Fernández-Alba AR, Piedra L, Mézcua M, Gómez MJ (2003) *Anal Chim Acta* 480:193–205
- Regueiro J, Becerril E, García-Jares C, Llompart M (2009) *J Chromatogr A* 1216:4693–4702
- Kawaguchi M, Ito R, Honda H, Endo N, Okanouchi N, Saito K, Seto Y, Nakazawa H (2008) *J Chromatogr A* 1206:196–199
- Guo JH, Li XH, Cao XL, Li Y, Wang XZ, Xu XB (2009) *J Chromatogr A* 1216:3038–3043
- Canosa P, Rodríguez I, Rubí E, Cela R (2007) *Anal Chem* 79:1675–1681
- Ochiai N, Sasamoto K, Takino M, Yamashita S, Daishima S, Heiden AC, Hoffmann A (2002) *Anal Bioanal Chem* 373:56–63
- Saraji M, Mirmahdiah S (2009) *J Sep Sci* 32:988–995
- Márquez-Sillero I, Aguilera-Herrador E, Cárdenas S, Valcárcel M (2010) *J Chromatogr A* 1217:1–6
- Rita A, Silva M, Nogueira JMF (2008) *Talanta* 74:1498–1504
- Kawaguchi M, Ito R, Honda H, Endo N, Okanouchi N, Saito K, Seto Y, Nakazawa H (2008) *J Chromatogr B* 875:577–580
- Zotou A, Sakla I, Tzanavaras PD (2010) *J Pharm Biomed Anal* 53:785–789
- Beltran A, Marcé RM, Cormack PAG, Borrull F (2010) Synthetic approaches to parabens molecularly imprinted polymers and their applications to the solid-phase extraction of river water samples. *Anal Chim Acta* 677:72–78. doi:10.1016/j.aca.2010.07.021
- Blanco E, Casais M, Mejuto M, Cela R (2009) *Anal Chim Acta* 647:104–111
- Benijts T, Lambert W, De Leenheer A (2004) *Anal Chem* 76:704–711
- Benijts T, Dams R, Lambert W, De Leenheer A (2004) *J Chromatogr A* 1029:153–159
- Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ (2008) *Anal Bioanal Chem* 391:1293–1308
- Canosa P, Rodríguez I, Rubí E, Bollain MH, Cela R (2006) *J Chromatogr A* 1124:3–10
- Zhao RS, Yuan JP, Li HF, Wang X, Jiang T, Lin JM (2007) *Anal Bioanal Chem* 387:2911–2915
- Rezaee M, Yamini Y, Faraji M (2010) *J Chromatogr A* 1217:2342–2357
- Montes R, Rodríguez I, Rubí E, Cela R (2009) *J Chromatogr A* 1216:205–210
- Villaverde-de-Sáa E, González-Mariño I, Benito-Quintana J, Rodil R, Rodríguez I, Cela R (2010) *Anal Bioanal Chem* 397:2559–2568
- Baltussen E, Sandra P, David F, Cramers CA (1999) *J Microcolumn Sep* 11:737–747
- Bicchi C, Cordero C, Rubiolo P, Sandra P (2003) *J Sep Sci* 26:1650–1656
- Coelho E, Coimbra MA, Nogueira JMF, Rocha SM (2009) *Anal Chim Acta* 635:214–221
- Rodil R, Moeder M (2008) *J Chromatogr A* 1179:81–88
- Kawaguchi M, Ito R, Honda H, Endo N, Okanouchi N, Saito K, Seto Y, Nakazawa H (2008) *J Chromatogr A* 1200:260–263
- Prieto A, Zuloaga O, Usobiaga A, Etxebarria N, Fernández LA (2007) *J Chromatogr A* 1174:40–49
- Schummer C, Delhomme O, Appenzeller BMR, Wennig R, Millet M (2009) *Talanta* 77:1473–1482
- Lee HB, Peart TE, Svoboda ML (2005) *J Chromatogr A* 1094:122–129
- Okumura T, Nishikawa Y (1996) *Anal Chim Acta* 325:175–184
- Pérez-Pavón JL, Casas-Ferreira AM, Fernández-Laespada ME, Moreno-Cordero B (2009) *J Chromatogr A* 1216:1192–1199
- Boyd T (1994) *J Chromatogr A* 662:281–292
- Blythe JW, Heitz A, Joll CA, Kagi RI (2006) *J Chromatogr A* 1102:73–83
- Nakamura S, Daishima S (2004) *J Chromatogr A* 1038:291–294
- Regueiro J, Llompart M, Psillakis E, García-Monteagudo JC, García Jares C (2009) *Talanta* 79:1387–1397
- Canosa P, Rodríguez I, Rubí E, Cela R (2005) *J Chromatogr A* 1072:107–115
- Pedrouzo M, Borrull F, Marcé RM, Pocurull E (2009) *J Chromatogr A* 1216:6994–7000

VIII

**EXTRACCIÓN POR ADSORCIÓN EN BARRA
AGITADORA DE PARABENOS, TRICLOSÁN Y
METIL TRICLOSÁN EN SUELOS, SEDIMENTOS
Y LODOS CON LA UTILIZACIÓN DE UNA
REACCIÓN *IN SITU* Y DETERMINACIÓN POR
CROMATOGRAFÍA DE GASES-
ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

1. INTRODUCCIÓN

La técnica de tratamiento de muestra denominada extracción por adsorción en barra agitadora (SBSE) fue introducida por Baltussen y colaboradores [1] para la extracción de compuestos orgánicos presentes en muestras medioambientales, mediante la adsorción de los analitos sobre barras agitadoras (también llamadas *twisters*[®]). Estas barras consisten en un cuerpo magnético encapsulado en una funda de vidrio, en cuya superficie se coloca una capa de polidimetilsiloxano (PDMS) [2]. Los analitos son extraídos mediante agitación del *twister* en la muestra durante un tiempo determinado. Una vez que ha tenido lugar la extracción, el *twister* se retira de la muestra y se introduce en un tubo de termodesorción de vidrio, el cual se coloca en una unidad de desorción térmica (TDS), donde los analitos son recuperados térmicamente y transferidos al sistema cromatográfico (GC) [3]. Adicionalmente, la desorción líquida puede combinarse con GC y cromatografía de líquidos (LC) [4]. En el primero de los casos, la inyección de grandes volúmenes de muestra es una práctica habitual para conseguir la máxima sensibilidad posible [4]. Para asegurar la completa transferencia de la fracción adsorbida al sistema, es preferible la utilización de la desorción térmica.

La SBSE se ha utilizado principalmente para el análisis de diferentes tipos de contaminantes en matrices acuosas, pudiéndose encontrar cientos de aplicaciones en bibliografía [5-10]. También pueden encontrarse aplicaciones para la determinación de compuestos orgánicos en fluidos biológicos [11-15] o en matrices alimentarias [16-19].

Para el caso del análisis de suelos por SBSE, la mayoría de las aplicaciones requieren una etapa de extracción previa de los analitos del suelo, con técnicas tales como extracción con disolventes asistida por ultrasonidos (USE) [20,21], extracción líquida a presión (PLE) [22] o extracción con agua subcrítica presurizada (PSWE) [23]. Es el extracto,

previamente diluido en agua, el que se somete al proceso de extracción por SBSE. Apenas pueden encontrarse referencias respecto a la extracción de contaminantes añadiendo directamente el *twister* en la matriz de suelo. Únicamente el grupo de Tan y colaboradores [24] ha analizado un conjunto de compuestos disruptores endocrinos (*endocrine disruptor compounds, EDCs*) en muestras de biosólidos y lodos, colocando el *twister* directamente en la muestra sólida.

Los ésteres del ácido *p*-hidroxibenzoico (parabenos) y el 2-(2,4-diclorofenoxi)-5-clorofenol (triclosán) son compuestos con propiedades bactericidas y antimicrobianas, que se utilizan fundamentalmente en la formulación de productos de cuidado personal (*personal care products, PCPs*), tales como pastas de dientes, desodorantes, cremas, filtros solares y geles de baño [25]. Adicionalmente, los parabenos se añaden como conservantes a los alimentos envasados y a las bebidas. El triclosán también se incorpora como biocida en ropa deportiva, alfombras, juguetes de plástico y baterías de cocina [26]. El metil triclosán se crea como subproducto de degradación del triclosán en las plantas de tratamiento de aguas residuales [27]. Este tipo de compuestos se encuentran dentro de los *EDCs*, y varios estudios han informado de su actividad estrogénica [28-31].

Se han publicado pocos trabajos en los que se determinen estos compuestos en muestras medioambientales. Su presencia ha sido confirmada en matrices acuosas [32-34], aunque también pueden encontrarse aplicaciones en muestras de aire [35] o polvo [36]. Teniendo en cuenta que las aguas residuales se están reutilizando de forma creciente para la irrigación de suelos, es necesario el desarrollo de métodos fiables para la determinación de estos compuestos en dichas matrices. El grupo de L. Nuñez y colaboradores ha propuesto el análisis de parabenos en suelos utilizando la extracción asistida por ultrasonidos [37] o la extracción en fase sólida utilizando polímeros de impresión molecular [38]. Nieto y colaboradores [39] han utilizado la extracción con líquido presurizado para

el análisis de parabenos en lodos residuales. Respecto al triclosán en matrices de suelos, las técnicas utilizadas para su análisis han sido la extracción con disolventes asistida por microondas (MASE) [40], la extracción con disolvente asistida por ultrasonidos (USE) [41] y la extracción líquida a presión (PLE) [42-44], técnicas que requieren la utilización de disolventes orgánicos y de un elevado tiempo de trabajo. C. Sanchez-Brunete y colaboradores e I. Gonzalez-Mariño y colaboradores han propuesto la determinación de triclosán y metil triclosán en suelos y lodos utilizando dispersión en matriz de fase sólida (MSPD) [45,46].

2. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo se encuentra dentro de la línea general planteada en la memoria, en la que se busca proponer y desarrollar nuevas estrategias de tratamiento de muestra para la determinación de contaminantes orgánicos en matrices medioambientales, dentro de la nueva tendencia conocida como Química Analítica Verde. Lo que se busca es restringir el uso de disolventes orgánicos, así como generar la mínima cantidad de residuos, que, en muchos casos, son más tóxicos que los propios analitos que se quieren determinar.

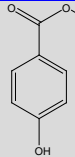
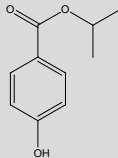
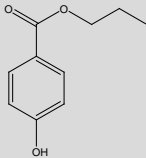
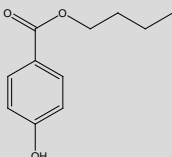
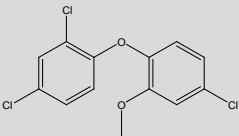
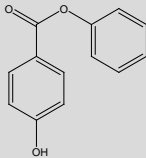
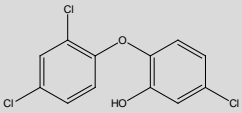
Hasta este punto de la memoria, los estudios se han centrado en matrices acuosas. Tomando como referencia el capítulo anterior, en el cual se pone a punto una nueva metodología para la determinación de parabenos, triclosán y metil triclosán en matrices acuosas utilizando la extracción por adsorción con barra agitadora (SBSE) y una reacción de derivatización *in situ*, el objetivo del presente trabajo consiste en evaluar si la utilización de la técnica SBSE con una reacción *in situ* puede aplicarse de forma satisfactoria en suelos, para la extracción directa de estos compuestos sin la necesidad de utilizar disolventes orgánicos. Esta metodología tiene la ventaja de reducir de forma considerable el tiempo de extracción y análisis cuando se compara con las técnicas más tradicionales, tales como las extracciones sólido-líquido combinadas con la extracción en fase sólida (SPE) o la extracción líquido-líquido (LLE). Como reacción de derivatización se propone la acetilación con anhídrido acético en medio básico, al ser una de las más utilizadas para compuestos fenólicos [34,47,48]. Se llevó a cabo la optimización de la reacción de derivatización y del paso de extracción, para la obtención de las condiciones más favorables. Los analitos enriquecidos fueron desorbidos térmicamente utilizando un sistema de termodesorción acoplado a un cromatógrafo de gases (GC) y a un espectrómetro de masas (MS).

3. EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos

El isopropilparabeno (iPrP) fue suministrado por TCI Europe (Zwijndrecht, Bélgica). El resto de los parabenos (metilparabeno (MeP), n-propilparabeno (nPrP), n-butilparabeno (BuP), bencilparabeno (BzP)), el triclosán (TCS) y el metil triclosán (MeTCS) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Con la letra A se asignará a los derivados acetilados de los compuestos. El metanol grado analítico, acetonitrilo, cloruro sódico, acetato de etilo, así como la sal que proporciona el medio básico NaHCO_3 fueron proporcionadas por Merck (Darmstadt, Alemania). El anhídrido acético (ReagentPlus[®]) fue suministrado por Sigma Aldrich (Munich, Alemania). La estructura química, así como los coeficientes octanol/agua de los compuestos y los tiempos de retención correspondientes al método cromatográfico propuesto se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Estructura, coeficientes octanolagua y tiempos de retención de los compuestos estudiados. Los tiempos de retención corresponden a los analitos derivatizados

Compuesto	Estructura	LogK _{o/w}	t _R (min)
Metilparabeno		1.96	5.155
Isopropilparabeno		3.04	5.559
n-Propilparabeno		3.04	5.899
Butilparabeno		3.81	6.521
Metil triclosán		5.15	8.279
Benzilparabeno		3.59	8.40
Triclosán		4.76	8.461

3.2. Disoluciones estándar y suelos

3.2.1. Disoluciones estándar

Se prepararon disoluciones patrón de todos los compuestos (500 mg/L en metanol), las cuales se mantuvieron a 4 °C en una nevera. Se prepararon disoluciones de trabajo (conteniendo todos los analitos) por dilución con acetona a la concentración adecuada para dopar las muestras de suelos. Los estudios de optimización se llevaron a cabo utilizando 0.5 g de suelo dopado a un nivel de concentración de 100 µg/kg.

3.2.2. Muestras de suelos

Se utilizaron muestras de suelos para optimizar la derivatización y las condiciones de extracción, así como para determinar las características analíticas del método. Se seleccionaron tres tipos de suelos con propiedades muy diferentes respecto a su capacidad de sorción: un sedimento de río (Leipzig, Alemania), un suelo de jardín (Noruega) y un suelo arenoso (Leipzig, Alemania). También se incluyó un lodo en el estudio, recogido en una planta de tratamiento de agua residual de Leipzig, una ciudad que abarca unos 500 000 habitantes. El lodo se secó y tamizó, recogándose la fracción por debajo de 1 mm, la cual se almacenó en un frasco ámbar a una temperatura de 4 °C hasta que tuvo lugar el análisis. Las características de los suelos se midieron utilizando un analizador “HighTOC II” (Hanau, Alemania). Los valores de contenido de carbono orgánico (TOC) e inorgánico (TIC), así como contenido total de carbono (TC) se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Características de los suelos utilizados en el estudio

Suelo	TOC (%)	TIC (%)	TC (%)
Sedimento de río	5.51	0.21	5.73
Suelo de jardín	1.55	0.03	1.58
Suelo arenoso	7.11	0.03	7.14
Lodo	24.2	0.28	24.5

Las muestras de suelo dopadas se prepararon añadiendo sobre 50 g de suelo 75 mL de una disolución en acetona que contenía los analitos en estudio. Posteriormente, se dejó que el disolvente se evaporara de forma lenta a temperatura ambiente, homogeneizando la muestra de forma frecuente. Las muestras dopadas se almacenaron a 4 °C en condiciones de oscuridad para evitar la degradación de los compuestos. En todos los casos, la concentración de los analitos en el suelo se refiere a peso seco de muestra.

La optimización y evaluación del método se llevó a cabo utilizando fracciones de 0.5 g de sedimento de río dopado a los niveles de concentración requeridos en cada caso. Se confirmó la ausencia de analitos en este suelo sometiendo a una porción del mismo al proceso de extracción y al correspondiente análisis instrumental.

3.3. Reacción de derivatización y extracción

En un vial de generación de espacio de cabeza de 10 mL se añadieron 0.5 g de suelo dopado. A continuación, se añadieron 5.0 mL de una disolución acuosa de NaHCO₃ 0.4 M. Sobre la mezcla se introdujo la barra agitadora (*Twister*; Gerstel, Müllheim a/d Ruhr; Alemania) conteniendo la capa de polidimetilsiloxano (PDMS) y se añadieron 400 µL de anhídrido acético. El vial se cerró herméticamente con ayuda de un septum de teflón recubierto de silicona, y la mezcla se agitó durante 60 min a una velocidad de 1000 rpm (Variomag Multipoint 6/15, H+PLabortechnik, Oberschleissheim, Munich,

Alemania) a temperatura ambiente. Una vez que la extracción hubo tenido lugar, el *twister* se retiró, se lavó con agua bidestilada y se secó con un papel libre de celulosa. Finalmente el *twister* se colocó en un tubo de termodesorción y los analitos se desorbieron en el sistema de desorción térmica y fueron transferidos al sistema cromatográfico para su análisis.

3.4. Instrumental

Para llevar a cabo el análisis TD-GC-MS, se utilizó un cromatógrafo Agilent 6890 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) acoplado a un sistema de termodesorción de Gerstel (TDS A). Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando un inyector de temperatura programada (PTV, CIS-4), con un *liner* vacío, para focalizar criogénicamente los analitos de forma previa a su introducción en la columna cromatográfica. El enfriamiento se llevó a cabo utilizando nitrógeno líquido. Como detector se utilizó un espectrómetro de masas de tipo cuadrupolar (HP 5973 N).

3.5. Condiciones instrumentales

Las condiciones seleccionadas para el sistema de termodesorción fueron las obtenidas en el capítulo anterior (parabenos, triclosán y metil triclosán en aguas). De forma resumida, estas fueron: temperatura de desorción, 275 °C; tiempo de desorción, 6 min y flujo de helio (flujo de desorción), 100 mL/min. Durante el proceso de desorción, la temperatura del PTV se mantuvo a – 10 °C (modo *solvent-vent*). Una vez finalizado el proceso de desorción, la temperatura del PTV se aumentó desde – 10 °C hasta 280 °C, a una velocidad de 720 °C/min (manteniéndose 5 min), para transferir los analitos al sistema cromatográfico. La inyección se llevó a cabo en el modo de inyección *hot splitless* a una temperatura de 280 °C, fijando un tiempo de *splitless* de 2 min.

Para llevar a cabo el análisis cromatográfico, se utilizó una columna capilar HP-5MS (30 m x 250 μm diámetro interno, 0.25 μm espesor de película, Agilent J&W column, Waldbronn, Alemania). Como gas portador se utilizó helio, con un flujo de 1.2 mL/min. El programa de temperaturas del horno implica una temperatura inicial de 60 °C durante 2 min; esta temperatura se incrementó hasta 175 °C a una velocidad de 65 °C/min, incrementándose de nuevo hasta 200 °C a una velocidad de 45 °C/min (manteniendo esta temperatura durante 2 min) y alcanzando finalmente una temperatura de 280 °C a una velocidad de 40 °C/min, manteniéndola durante 1 min. El espectrómetro de masas se utilizó en el modo de adquisición de datos *Scan* para los estudios de optimización, registrándose las relaciones m/z entre 50 y 350 uma, y en el modo de monitorización de iones, SIM, para la calibración y el análisis de muestras reales. Los iones característicos de cada compuesto se muestran en la tabla 3. Se trabajó en la modalidad de impacto electrónico con un voltaje de ionización de 70 eV. El filamento se mantuvo apagado hasta el minuto 4.50 min del análisis cromatográfico.

4. RESULTADOS

4.1. Reacción de derivatización

La acetilación es una reacción utilizada de forma habitual para la derivatización de compuestos fenólicos en matrices acuosas. En la figura 1 se comparan las señales obtenidas sin derivatización y con derivatización. Se observa un notable incremento en las señales de los compuestos cuando la derivatización sí tiene lugar. Para el caso del metil triclosán la señal permanece constante, lo cual indica que el compuesto es estable en las condiciones de derivatización.

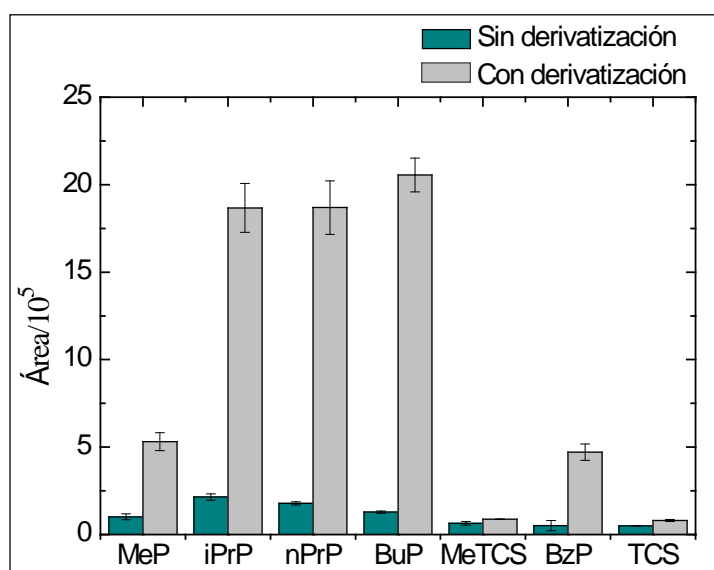


Figura 1: Comparación de las señales sin derivatización y con derivatización

A la hora de optimizar la reacción de derivatización, se decidió estudiar la relación entre la concentración de base y el volumen de ácido añadido. Los intervalos estudiados fueron entre 0.1 M y 0.4 M para la concentración

de NaHCO_3 , que proporcionaba el medio básico, y entre 50 μL y 400 μL para el volumen de anhídrido acético. En la figura 2 se muestran los resultados obtenidos para tres de los compuestos estudiados (MePA, BuPA y TCSA), representativos del comportamiento observado.

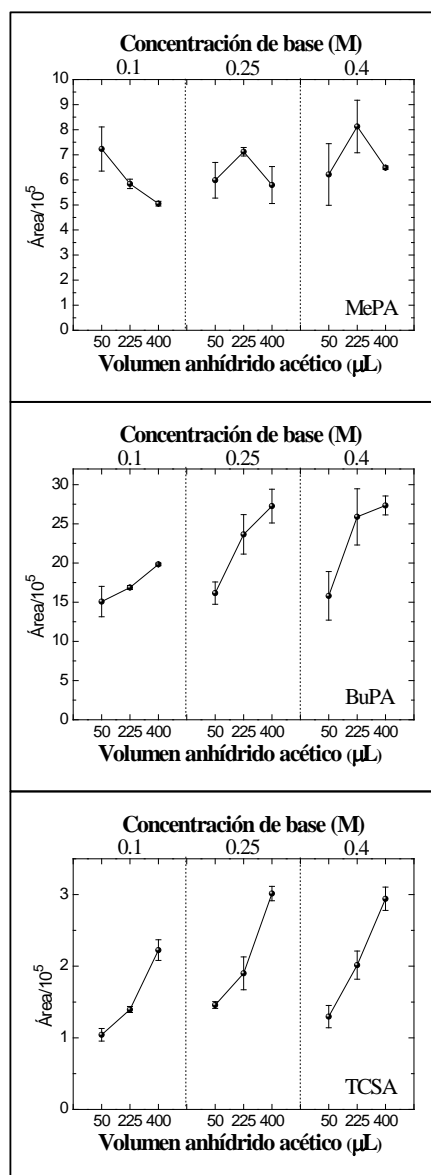


Figura 2: Variación de la señal analítica para cada compuesto al añadir diferentes cantidades de anhídrido acético y utilizar diferentes concentraciones de base

A medida que aumenta el volumen de anhídrido acético, aumenta la señal analítica para la mayoría de los compuestos, excepto para los más polares, representados por el MePA. Por tanto, en general, los mejores resultados se obtuvieron cuando se añadía 400 μL de anhídrido acético, para concentraciones de NaHCO_3 de 0.25 o 0.4 M. Como condiciones de trabajo se seleccionó dicha cantidad de anhídrido acético, con una concentración de NaHCO_3 0.4 M, para asegurar el mantenimiento del pH básico del medio.

4.2. Optimización de la extracción por SBSE

En el procedimiento que se propone, donde existen varias fases (suelo, disolución acuosa y fase del *twister*), los compuestos exógenos presentes en la matriz sólida se van a distribuir en diferentes proporciones entre las diferentes fases del sistema, como se representa en el siguiente equilibrio.



donde C_{iSP} es la concentración de analito i en la fase sólida, C_{iLP} en la fase líquida y C_{iPDMS} en la fase de PDMS [49].

La distribución de un analito i entre las fases presentes depende de su hidrofobicidad. Los equilibrios A y B están directamente relacionados, ya que el analito abstraído por la fase de PDMS de la fase acuosa (equilibrio B) es parcial o totalmente restablecido por su redistribución entre la matriz sólida y la fase líquida (equilibrio A).

Con objeto de modificar la naturaleza de la fase líquida, y, por tanto, su capacidad extractante, se estudió la influencia de la adición al medio acuoso de disolventes orgánicos y de un electrolito. Adicionalmente, se estudiaron otras variables que influyen en el procedimiento de SBSE, como son la cantidad de suelo y el tiempo y temperatura de extracción.

Para estudiar el efecto de la modificación de la polaridad de la fase líquida, se probaron dos modificadores orgánicos, metanol (MeOH, $\log K_{ow} = -0.63$) y acetonitrilo (MeCN, $\log K_{ow} = -0.15$). Se añadieron diferentes porcentajes de MeOH a la fase acuosa: 0, 10, 30 y 50 %. Respecto al acetonitrilo, se estudiaron los valores 10 y 30 %. Los resultados se muestran en la figura 3. El comportamiento es análogo para los dos disolventes (resultados mostrados solo para el MeOH), con una disminución de la señal para los parabenos a medida que aumenta el porcentaje de disolvente orgánico. Sin embargo, para el metil triclosán y el acetato de triclosán, las condiciones óptimas implicaban un contenido de disolvente orgánico del 30 %. Como situación de compromiso se seleccionó trabajar sin añadir modificadores orgánicos a la fase acuosa.

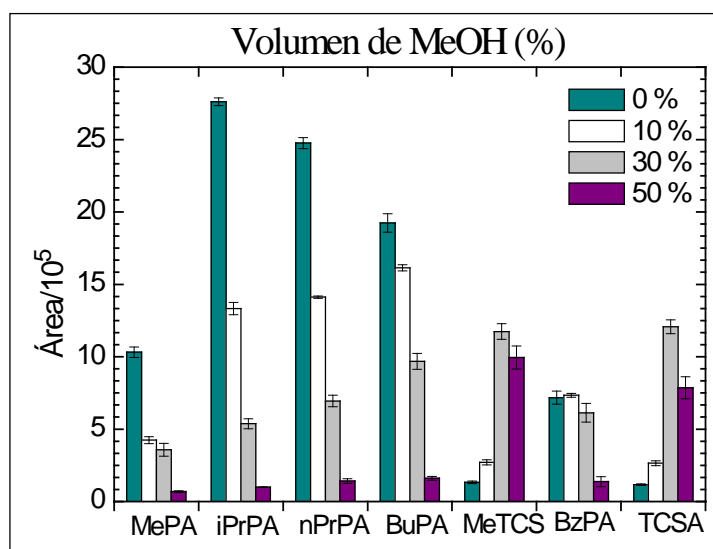


Figura 3: Influencia de la adición sobre la fase acuosa de diferentes porcentajes de disolvente orgánico

Se estudió la influencia de la fuerza iónica del medio, añadiendo una sal inerte (NaCl) durante el proceso de extracción. Se añadieron tres cantidades,

0, 1.0 y 2.5 g (sobresaturación), sobre la muestra (0.5 g de suelo + 5.0 mL de disolución acuosa, figura 4). Al aumentar la cantidad de electrolito en el medio, la señal analítica disminuía para todos los compuestos, excepto para el MePA. Se decidió trabajar sin añadir sales al medio.

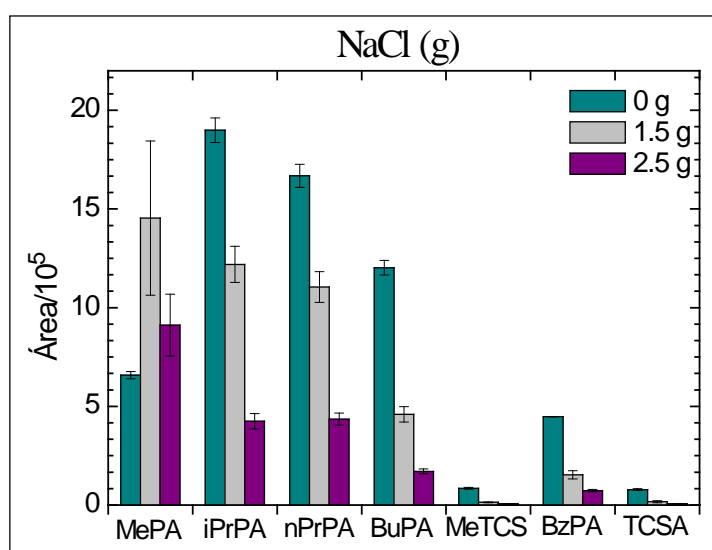


Figura 4: Influencia de la adición de un electrolito al medio

Se estudió la adición de diferentes cantidades de suelo. Los valores estudiados fueron: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 g de suelo. La cantidad de fase acuosa (5.0 mL) se mantuvo constante, si bien la cantidad de base y anhídrido acético para llevar a cabo la reacción se aumentó de forma proporcional a la cantidad de suelo para asegurar la derivatización de los compuestos. El tiempo de extracción se fijó en 240 min, para asegurar la completa extracción de todos los analitos. Los resultados se muestran en la figura 5. El aumento de muestra no implica un aumento de la señal analítica para la mayoría de los compuestos (excepto para el MeTCS y el TCSA). De la misma forma se observó, en general, un aumento de la irreproducibilidad

del proceso, asociada a la mayor dificultad para agitar la mezcla suelo-agua. Se seleccionó trabajar con 0.5 g de suelo.

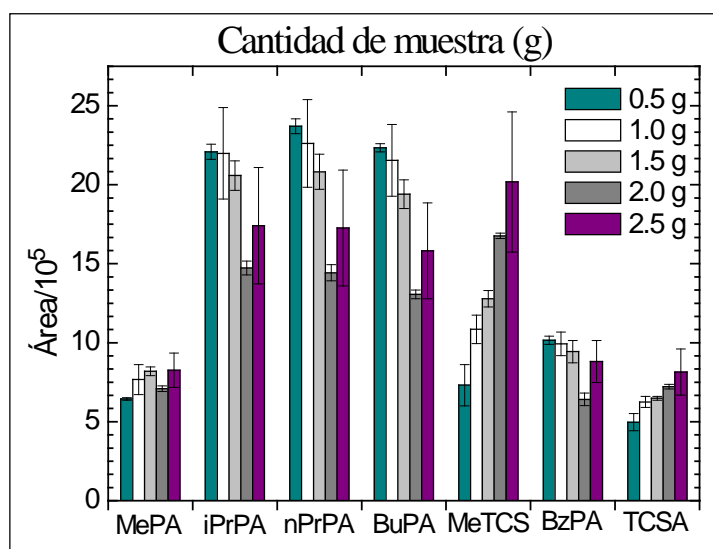


Figura 5: Influencia de la adición de diferentes cantidades de muestra

Se estudió el tiempo necesario para que la extracción por SBSE tuviera lugar. Este estudio se llevó a cabo a temperatura ambiente y a 50 °C (figura 6).

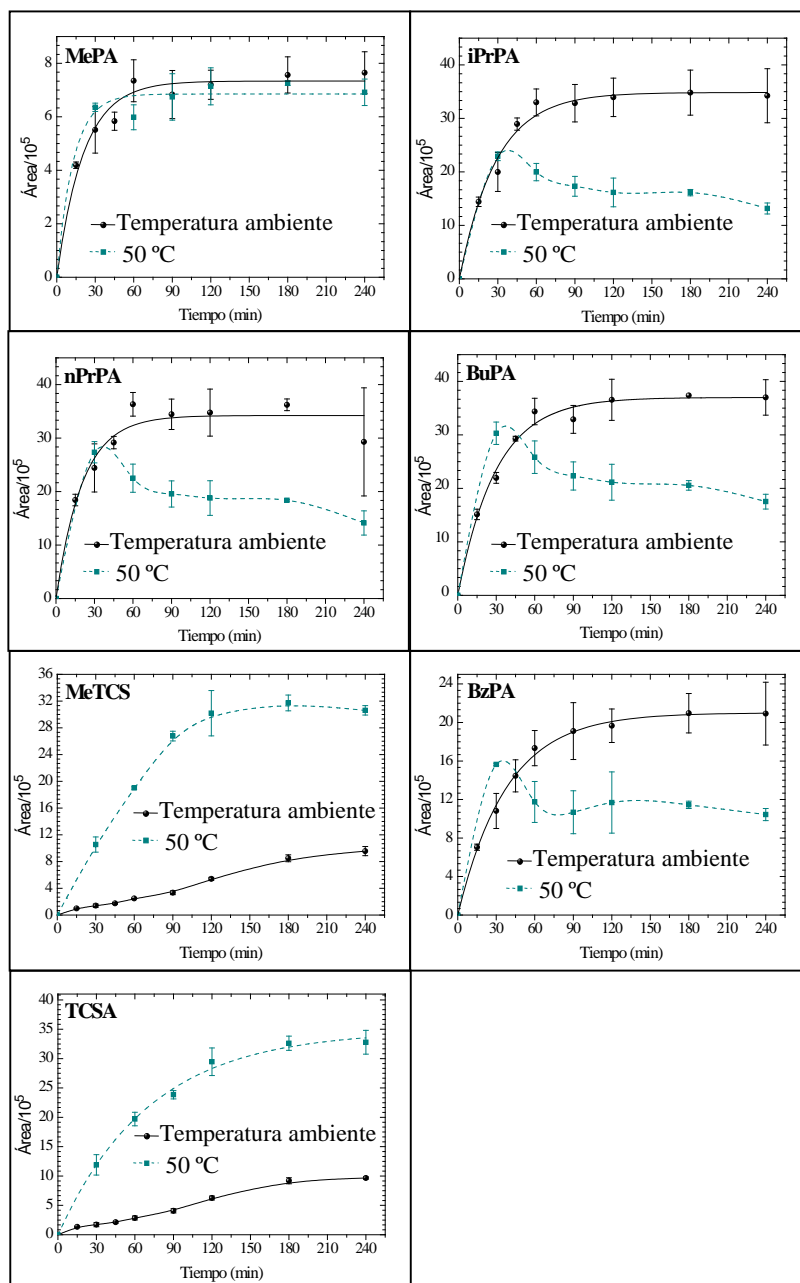


Figura 6: Curvas de extracción para cada uno de los analitos en función del tiempo (min) y de la temperatura (°C) de trabajo

Se observó que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio a temperatura ambiente oscilaba entre 60 y 120 min, excepto para el MeTCS y el TCSA, para los cuales habría que aumentar los tiempos de extracción hasta valores superiores a 240 min. A 50 °C, el equilibrio se alcanzaba más rápidamente (30 min), observándose a tiempos mayores una disminución de la señal. Para la mayoría de los compuestos los valores son inferiores a los obtenidos a temperatura ambiente en situación de equilibrio. El MeTCS y el TCSA presentan un comportamiento distinto, con un aumento muy significativo de la señal al calentar la muestra. Sin embargo, se observó que el tiempo de vida de los *twisters* se reducía drásticamente a esta temperatura. Como situación de compromiso se seleccionó trabajar a temperatura ambiente, fijando un tiempo de extracción de 60 min, ya que la disminución de señal respecto a la situación de equilibrio era muy poco acusada.

4.3. Evaluación del método SBSE-TD-GC-MS

Se obtuvieron rectas de calibrado para cada uno de los compuestos utilizando sedimento de río, con siete niveles de concentración en un intervalo entre 1 y 100 µg/kg (1.0, 5.0, 10, 25, 50, 75 y 100 µg/kg, peso seco). Cada nivel se analizó por triplicado. Como señal analítica se seleccionó el área de pico obtenida extrayendo, en cada caso, la relación m/z más abundante del espectro de masas del compuesto. Las características analíticas del método se resumen en la tabla 3.

Tabla 3: Características analíticas del método propuesto

Compuesto	m/z		Ordenada en el origen	Pendiente	R ²	RSD (%)		LD (µg/kg)	LO (µg/kg)	Recuperación (%)	
	ión de cuantificación	iones de confirmación				Intra-día n=6 50µg/kg	Inter-día n=3 50 µg/kg			10 µg/kg	50 µg/kg
MeP	121	152, 194	(17±3)×10 ⁴	(18±2)×10 ³	0.9968	7.12	8.3	1.06	3.22	102±3	100±4
iPrP	121	138, 180	(7±8)×10 ⁴	(38±2)×10 ³	0.9941	7.40	10.7	0.51	1.56	106±6	106±6
nPrP	138	121, 180	(24±9)×10 ⁴	(44±2)×10 ³	0.9987	7.50	10.8	0.74	2.26	110±5	96±5
BuP	138	121, 194	(2±6)×10 ⁴	(40±2)×10 ³	0.9986	6.80	12.3	0.08	0.24	104±5	102±4
MeTCS	302	302, 252	(3±10)×10 ³	(43±2)×10 ²	0.992	6.82	11.9	0.37	1.12	91±6	95±5
BzP	121	91, 65	(6±13)×10 ³	(206±4)×10 ²	0.9974	9.50	8.17	0.18	0.56	96±2	100±2
TCS	288	218, 63	(8±7)×10 ³	(55±2)×10 ²	0.9988	5.86	10.7	0.16	0.49	94±3	98±3

Los modelos de calibración mostraban comportamiento lineal. La validez de los mismos se comprobó mediante análisis de varianza (ANOVA), observándose que ninguno de ellos presentaba fallo de ajuste. El valor del coeficiente de correlación (R^2) era superior a 0.99 en todos los casos.

Con objeto de estudiar la repetibilidad y reproducibilidad del proceso, se analizaron muestras de suelo dopadas a un nivel de concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en el mismo día (6 réplicas) y en otros dos días diferentes (3 réplicas), respectivamente. Los resultados obtenidos, expresados como desviaciones estándar relativas (RSD, %) se muestran en la tabla 3, con valores inferiores al 13 %. Estos valores pueden considerarse altamente satisfactorios, teniendo en cuenta que tanto el proceso de extracción como el de derivatización tienen lugar de forma simultánea y directa en la muestra de suelo, así como que no se utiliza ningún patrón interno.

Los límites de detección (LD) y de cuantificación (LQ), calculados como 3.3 y 10 veces, respectivamente, la desviación estándar de una muestra con una relación S/N de 3 [50], se muestran también en la tabla 3. Los límites de detección se encuentran entre 0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para el butilparabeno, y 1.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para el metilparabeno. Hay pocos trabajos publicados con los que se puedan comparar los resultados obtenidos con la metodología propuesta. L. Nuñez y colaboradores, utilizado la extracción asistida por ultrasonidos [37] o la extracción en fase sólida utilizando polímeros de impresión molecular [38], obtuvieron límites de detección para los parabenos en el rango 0.04-0.14 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 0.16-0.27 $\mu\text{g}/\text{kg}$, utilizando 10 y 15 g de muestra, respectivamente. En ambos casos el análisis instrumental se llevó a cabo mediante LC-MS/MS.

Para el triclosán y el metil triclosán, los LD encontrados en la bibliografía se encuentran en el orden de los pocos $\mu\text{g}/\text{kg}$. En todos los casos, las metodologías propuestas implican varias etapas, que incluyen una extracción exhaustiva del suelo, con técnicas tales como PLE, USE o MSPD,

con la posterior limpieza del extracto mediante SPE, y una etapa posterior de derivatización de los analitos [41,44,45].

La metodología propuesta en el presente trabajo ofrece importantes ventajas respecto a estas técnicas de extracción, tales como la minimización de la manipulación de muestra, la eliminación total del uso de disolventes orgánicos, así como la simplificación del procedimiento analítico y una reducción del tiempo de trabajo. Además, la utilización de una reacción de derivatización no complica el proceso, ya que tiene lugar al mismo tiempo que la extracción.

La exactitud del método se evaluó en términos de recuperaciones aparentes. Se doparon dos muestras de sedimento de río a dos niveles de concentración, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Los valores obtenidos (tabla 3), calculados como el cociente entre la concentración predicha por el modelo y la concentración teórica (expresada como porcentaje), se encuentran entre el 91 y el 110 %.

Por último, se calcularon los valores de recuperación absoluta del proceso, comparando las señales generadas al extraer los analitos en estudio de las muestras sólidas, con las obtenidas al inyectar un patrón de los compuestos derivatizados (proceso de derivatización previamente descrito en el capítulo VII, Sección 3.1, “Reactivos, disoluciones estándar y muestras”), colocado en el interior de un tubo de desorción térmica empaquetado previamente con lana de vidrio. Los valores obtenidos (expresados en porcentajes) fueron 13 % para el metilparabeno, 12 % para el isopropilparabeno, 11 % para el n-propilparabeno, 6 % para el butilparabeno, 3 % para el metil triclosán, 4 % para el bencilparabeno y 3 % para el triclosán. Estos valores son bajos, lo cual indica que la extracción no es cuantitativa, al igual que ocurre en otras técnicas de extracción como, por ejemplo, SPME. Sin embargo, los valores permanecían constantes a lo largo

del rango lineal del calibrado y los límites de detección y cuantificación obtenidos fueron satisfactorios.

4.4. Muestras reales

El método propuesto se aplicó al análisis de parabenos, triclosán y metil triclosán en varias matrices medioambientales sólidas de diferentes áreas. Se analizaron dos tipos de suelos (suelo de jardín y suelo arenoso) y un lodo.

Se investigó la existencia de efecto de matriz comparando las señales correspondientes al sedimento de río con las obtenidas en las otras matrices sólidas estudiadas, dopadas a un nivel de concentración de 50 µg/kg (figura 7). En todos los casos se analizaron muestras de los suelos sin dopar. Se confirmó la presencia de nPrP en el suelo de jardín y, en el caso del lodo, se identificaron MeTCS y TCS. Las áreas de pico obtenidas se restaron a las correspondientes de los suelos dopados.

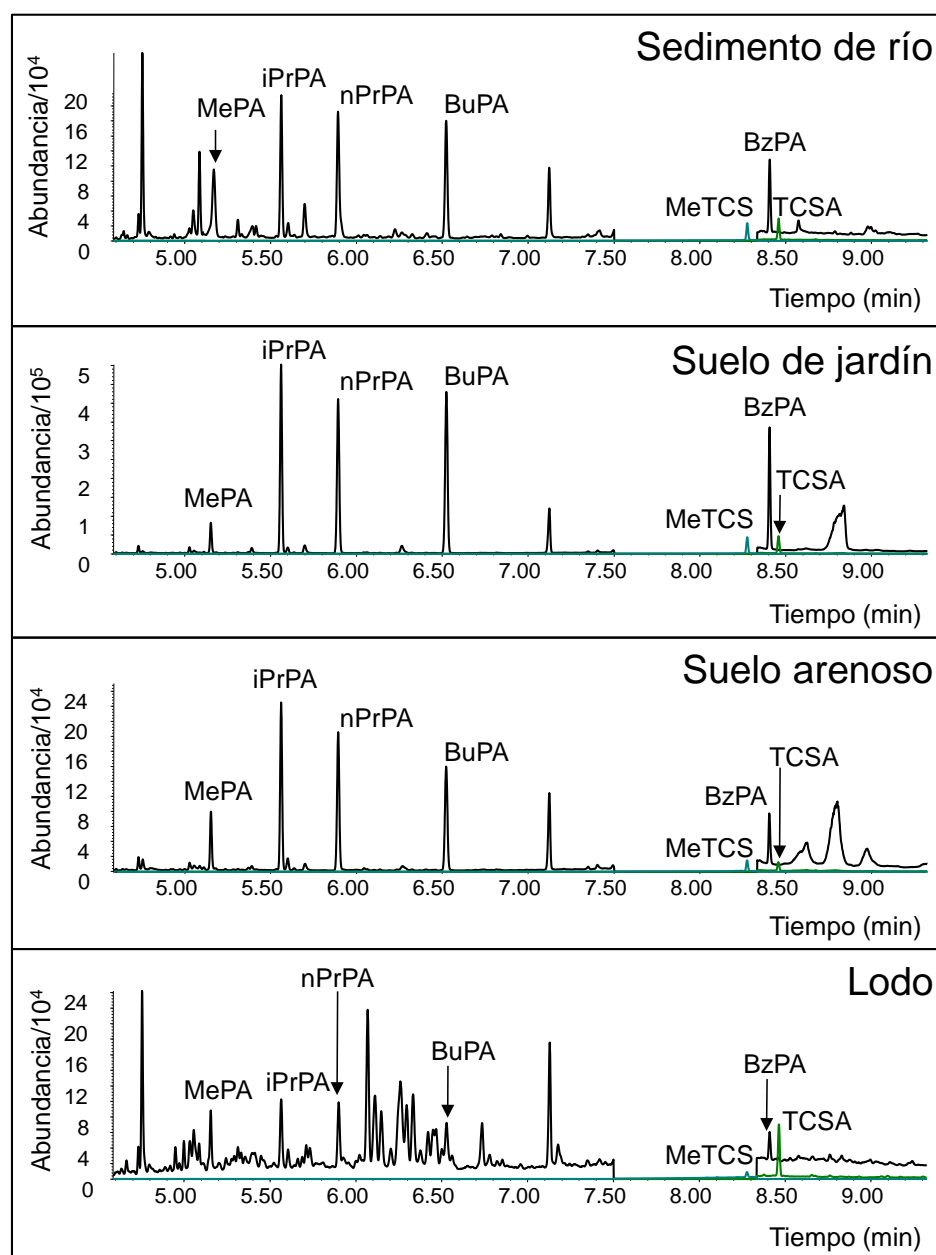


Figura 7: Cromatograma obtenidos en los diferentes suelos estudiados, dopados a un nivel de concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$

En la tabla 4 se muestran los cocientes entre las señales obtenidas para los analitos en estudio en las diferentes matrices estudiadas y las señales obtenidas en la muestra de río.

Tabla 4: *Cociente entre las señales obtenidas para los compuestos en estudio en los diferentes suelos estudiados y las señales obtenidas en el sedimento de río (referencia, en negrita y cursiva)*

Compuesto	<i>Sedimento de río</i>	Suelo de jardín	Suelo arenoso	Lodo
MeP	<i>1</i>	0.40	0.31	0.31
iPrP	<i>1</i>	2.48	0.93	0.43
nPrP	<i>1</i>	2.27	0.82	0.32
BuP	<i>1</i>	4.64	1.20	0.28
MeTCS	<i>1</i>	2.21	0.53	0.17
BzP	<i>1</i>	3.31	0.55	0.28
TCS	<i>1</i>	1.81	0.33	0.14

Como puede observarse, las señales obtenidas varían drásticamente, indicando que la composición de la matriz influye significativamente sobre el proceso de extracción. Estos resultados permiten concluir que, a la hora de cuantificar muestras reales utilizando la metodología propuesta, es necesario adoptar un protocolo de adición estándar. Este tipo de calibración es común cuando se trabaja con matrices complejas, como es el suelo, utilizando técnicas tales como generación de espacio de cabeza [51], QuEChERS [52] o microextracción en fase sólida [53]. Las mayores diferencias se obtienen para el lodo, comportamiento lógico ante su elevado contenido en materia orgánica, que provoca una mayor retención de los analitos por la fase sólida.

Se llevó a cabo la determinación por adición estándar de los niveles de concentración encontrados de los analitos en estudio en los diferentes suelos estudiados. Para el caso del suelo de jardín, se determinó nPrP a un nivel de concentración de 1.5 µg/kg y para el caso del lodo, se encontró MeTCS a un

nivel de concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y TCS a un nivel de concentración de 280 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se propone la utilización de la extracción por adsorción en barra agitadora con una reacción de derivatización *in situ* para el análisis de parabenos, triclosán y metil triclosán en suelos. En bibliografía apenas se encuentran aplicaciones de extracción por SBSE directamente en suelos.

Se estudiaron los efectos de las variables que influían en la derivatización y en la extracción, utilizando muestras de río dopadas. Se comprobó que el método optimizado era sencillo y sensible, con límites de detección entre 80 ng/kg y 1.06 µg/kg. Se observó buen comportamiento lineal, con coeficientes de correlación altos (superiores a 0.99 en todos los casos) y sin fallo de ajuste. Se comprobó la repetibilidad y reproducibilidad del método, con valores inferiores al 13 %. La exactitud del método fue evaluada en términos de recuperaciones aparentes, con valores entre el 91 % y el 110 %. Con estas características es posible la determinación de estos compuestos en muestras reales, para lo cual es necesario adoptar un protocolo de adición estándar.

Respecto a los analitos estudiados, pueden apreciarse diferencias en el comportamiento entre los parabenos y el triclosán y el metil triclosán. Las condiciones de trabajo seleccionadas han sido de compromiso entre ambas tendencias, pudiéndose adoptar otras si el objetivo fuera determinar exclusivamente estos dos últimos analitos. Sin embargo, los límites de detección obtenidos fueron altamente satisfactorios, teniendo en cuenta los niveles de concentración encontrados en muestras reales.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, J. Microcolumn Sep. 11 (1999) 737.
- [2] E. Baltussen, C. Cramers, P. Sandra, Anal. Bioanal. Chem. 373 (2002) 3.
- [3] F. Sánchez-Rojas, C. Bosch-Ojeda, J.M. Cano-Pavón, Chromatographia 69 (2009) S79.
- [4] E. Coelho, M.A. Coimbra, J.M.F. Nogueira, S.M. Rocha, Anal. Chim. Acta 635 (2009) 214.
- [5] F. David, P. Sandra, J. Chromatogr. A 1152 (2007) 54.
- [6] A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L.A. Fernández, N. Etxebarria, O. Zuloaga, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 2642.
- [7] P. Popp, C. Bauer, L. Wennrich, Anal. Chim. Acta 436 (2001) 1.
- [8] B. Tienpont, F. David, C. Bicchi, P. Sandra, J. Microcolumn Sep. 12 (2000) 577.
- [9] D. Benanou, F. Acobas, M.R. de Roubin, F. David, P. Sandra, Anal. Bioanal. Chem. 376 (2003) 69.
- [10] S. Nakamura, S. Daishima, Anal. Bioanal. Chem. 382 (2005) 99.
- [11] H. Wahl, C. Peterfi, R. Werner, H.M. Liebich, Clin. Chem. 48 (2002) A42.
- [12] M Kawaguchi, R. Ito, H. Honda, N. Endo, N. Okanouchi, K. Saito, Y. Seto, H. Nakazawa, J. Chromatogr. B 875 (2008) 577.
- [13] M. Kawaguchi, K. Inoue, M. Yoshimura, R. Ito, N. Sakuri, N. Okanouchi, H. Nakazawa, J. Chromatogr. B 805 (2004) 41.
- [14] T. Benijts, J. Vercammen, R. Dams, H.P. Tuan, W. Lambert, P. Sandra, J. Chromatogr. B 755 (2001) 137.
- [15] B.A. Rocha-Gutierrez, W.Y. Lee, Abstr. Pap. Am. Chem. S229 (2005) U76.
- [16] A.G.J. Tredoux, H.H. Lauer, T. Heideman, P. Sandra, J. High Resolut. Chromatogr. 23 (2000) 644.

-
- [17] N. Ochiai, K. Sasamoto, M. Takino, S. Yamashita, S. Daishima, A.C. Heiden, A. Hoffmann, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 56.
- [18] W. Liu, Y. Hu, J. Zhao, Y. Xu, Y. Guan, *J. Chromatogr. A* 1095 (2005) 1.
- [19] Y. Hayasaka, K. MacNamara, G.A. Baldock, R.L. Taylor, A.P. Pollnitz, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 948.
- [20] M. Martínez-Parreño, J. Llorca-Pórcel, I. Valor, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 3620.
- [21] J. Llorca-Pórcel, M. Martínez-Parreño, E. Martínez-Soriano, I. Valor, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5955.
- [22] X. Zhu, J. Cai, J. Yang, Q. Su, Y. Gao, *J. Chromatogr. A* 1131 (2006) 37.
- [23] R. Rodil, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1124 (2006) 82.
- [24] B.L.L. Tan, D.W. Hawker, J.F. Müller, L.A. Tremblay, H.F. Chapman, *Water Res.* 42 (2008) 404.
- [25] C.G. Daughton, T.L. Jones-Lepp (Eds.), *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment* (ACS Symposium Series, No. 791), American Chemical Society, Washington, DC, 2001.
- [26] H. Singer, S. Müller, C. Tixier, L. Pillonel, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 4998.
- [27] P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, M. Ramil, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1188 (2008) 132.
- [28] J.R. Byford, L.E. Shaw, M.G.B. Drew, G.S. Pope, M.J. Sauer, P.D. Darbre, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 80 (2002) 49.
- [29] E. Silva, N. Rajapakse, A. Kortenkamp, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 1751.
- [30] M. Farré, D. Asperger, L. Kantiani, S. González, M. Petrovic, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 1999.
- [31] J. Boberg, C. Taxvig, S. Christiansen, U. Hass, *Reprod. Toxicol.* 30 (2010) 301.
- [32] J. Regueiro, E. Becerril, C. García-Jares, M. Llompарт, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4693.

- [33] P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, M.H. Bollaín, R. Cela, J. Chromatogr. A 1124 (2006) 3.
- [34] A.M.C. Ferreira, M. Möder, M.E. F. Laespada, Anal. Bioanal. Chem. 399 (2011) 945.
- [35] R.A. Rudel, L.J. Perovich, Atmos. Environ. 43 (2009) 170.
- [36] P. Canosa, D. Pérez-Palacios, A. Garrido-López, M.T. Tena, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, J. Chromatogr. A 1161 (2007) 105.
- [37] L. Nuñez, J.L. Tadeo, A.I. Gacía-Valcárcel, E. Turiel, J. Chromatogr. A 1214 (2008) 178.
- [38] L. Nuñez, E. Turiel, A. Martín-Esteban, J.L. Tadeo, Talanta 80 (2010) 1782.
- [39] A. Nieto, F. Borrul, R.M. Marcé, E. Pocurull, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 5619.
- [40] S.L. Rice, S. Mitra, Anal Chim. Acta 589 (2007) 125.
- [41] J. Xu, L. Wu, W. Chen, A.C. Chang, J. Chromatogr. A 1202 (2008) 189.
- [42] S. Chu, C.D. Metcalfe, J. Chromatogr. A 1164 (2007) 212.
- [43] J.C. Durán-Alvarez, E. Becerril-Bravo, V. Silva Castro, B. Jiménez, R. Gibson, Talanta 78 (2009) 1159.
- [44] J. Cha, A. M. Cupples, Water Res. 43 (2009) 2522.
- [45] C. Sánchez-Brunete, E. Miguel, B. Alberó, J.L. Tadeo, J. Sep. Sci. 33 (2010) 2768.
- [46] I. González-Mariño, I. Rodríguez, J.B. Quintana, R. Cela, Anal. Bioanal. Chem. 398 (2010) 2289.
- [47] J. Regueiro, E. Becerril, C. García-Jares, M. Llompert, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 4693.
- [48] J.L. Pérez Pavón, A.M. Casas Ferreira, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 1192.
- [49] C. Bicchi, C. Cordero, P. Rubiolo, P. Sandra, Eur. Food Res. Technol. 216 (2003) 449.
- [50] Analytical Methods Committee, Analyst 112 (1987) 199.

- [51] J.L. Pérez Pavón, S. Herrero Martín, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, J. *Chromatogr. A* 1216 (2009) 6063.
- [52] S. Herrero Martín, C. García Pinto, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, J. *Chromatogr.* 1217 (2010) 4883.
- [53] E. Concha-Graña, V. Fernández-González, G. Grueiro-Noche, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, E. Fernández-Fernández, D. Prada-Rodríguez, *Chemosphere* 79 (2010) 698.

TRABAJO PUBLICADO
PUBLISHED ARTICLE

VIII



Stir bar sorptive extraction of parabens, triclosan and methyl triclosan from soil, sediment and sludge with *in situ* derivatization and determination by gas chromatography–mass spectrometry

Ana María Casas Ferreira^{a,*}, Monika Möder^b, M.E. Fernández Laespada^a

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

^b Helmholtz Centre for Environmental Research - UFZ, Permoserstrasse 15, D-04318 Leipzig, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 March 2011
Received in revised form 14 April 2011
Accepted 17 April 2011
Available online 28 April 2011

Keywords:

Stir bar sorptive extraction
In situ derivatization
Endocrine disruptor compounds
Soil samples

ABSTRACT

The aim of this research work was the evaluation of stir-bar sorptive extraction (SBSE) in combination with an *in situ* derivatization to determine parabens (methylparaben, isopropylparaben, n-propylparaben, butylparaben and benzylparaben), triclosan and methyltriclosan in soil samples. This is the first time that this approach has been applied to the determination of these compounds in soil samples, providing important advantages over conventional extraction techniques, such as minimization of sampling handling, complete elimination of the use of organic solvents and simplification of the analytical procedure with reduced time consumption. The enriched target analytes were desorbed thermally using a thermodesorption system coupled to a gas chromatograph and a mass spectrometer. The optimized derivatization and SBSE extraction conditions, as well as the analytical characteristics of the method were obtained using spiked soil samples. The proposed methodology proved to be easy to use and sensitive, with limits of detection between 80 ng/kg and 1.06 µg/kg, and reproducibility values below 13%. The accuracy of the method was evaluated at two concentration levels, obtaining apparent recoveries between 91% and 110%. The matrix composition significantly influenced the extraction procedure, and a need to adopt a standard additions protocol is apparent. The analytes assayed were determined successfully in different environmental soil samples.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Stir bar sorptive extraction (SBSE) is a solventless sampling technique introduced by Baltussen et al. [1] to extract organic analytes from environmental samples by sorption onto polydimethylsiloxane (PDMS) coated stir bars (so-called twistersTM) [2]. The analytes are recovered thermally and analyzed on-line by gas chromatography (GC) [3]. Additionally liquid desorption can be combined with classical GC and liquid chromatography (LC) [4]. Large volume injection is often applied in order to obtain the highest possible sensitivity [4]. For complete transfer of the sorbed fraction into the analytical system, thermal desorption is preferred.

SBSE has mainly been used for the analysis of different types of contaminants in aqueous samples, with hundreds of applications in the literature [5–10], and it is also possible to find applications for the determination of organic compounds in biological fluids [11–15] and in food matrices [16–19].

For the analysis of soil samples with SBSE, most applications reported require a previous extraction step with techniques such as ultrasonic solvent extraction (USE) [20,21], pressurized liquid extraction (PLE) [22], or pressurized subcritical water extraction (PSWE) [23]. The extract, previously diluted in water, is subjected to the SBSE extraction process. Few references are available concerning the extraction of pollutants by the twister directly in the soil sample. To the best of our knowledge, only Tan et al. [24] have analyzed a range of endocrine disrupting compounds (EDCs) in biosolids and sludge samples, using SBSE directly in solid samples.

Esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens) and 2-(2,4-dichlorophenoxy)-5-chlorophenol (triclosan) are compounds with bactericidal and antimicrobial properties and are mainly employed in the formulation of personal care products (PCPs) such as toothpaste, deodorants, beauty creams, solar filters, and bath gels [25]. In addition, parabens are added to canned foods and beverages as preservatives. Triclosan is also incorporated as a biocide in sports clothes, footwear, carpets, plastic toys and kitchenware [26]. Methyl triclosan is a transformation product of triclosan formed for instance during wastewater treatment [27]. These compounds are known as endocrine disrupting contaminants (EDCs), and several authors have reported their estrogenic activity [28–31].

* Corresponding author. Tel.: +34 923 294483; fax: +34 923 294483.
E-mail address: anacasas@usal.es (A.M.C. Ferreira).

Few works have addressed the analysis of these compounds in environmental matrices. Their presence has been confirmed in aqueous matrices [32–34], although there are also publications dealing with air [35] and dust [36] samples.

Considering that wastewater is increasingly being reused for irrigation, reliable methods for their analysis in soils are required. Nuñez et al. have proposed the analysis of parabens using ultrasonic-assisted extraction [37] or molecularly imprinted polymer solid-phase extraction [38]. Nieto et al. [39] used pressurized liquid extraction for the analysis of parabens in sewage sludge. Regarding the determination of triclosan in soil samples, the techniques that have been reported previously are microwave-assisted solvent extraction (MASE) [40], ultrasonic solvent extraction (USE) [41] and pressurized liquid extraction (PLE) [42–44], all of them techniques that require the use of organic solvents and all of them time-consuming. Sánchez-Brunete et al. and González-Mariño et al. have proposed the determination of triclosan and methyl triclosan in soils and sludge samples by matrix-solid-phase dispersion (MSPD) [45,46].

Direct extraction of parabens, triclosan and methyl triclosan from soils using the SBSE method has not been reported in any previously published work. The aim of this study was to evaluate whether stir bar sorptive extraction with an *in situ* derivatization reaction can be applied successfully for the extraction and determination of these analytes directly from soils without any organic solvent. This method has the potential to reduce the sample preparation and analysis time to a considerable extent in comparison with the usual solid-liquid extractions combined with solid phase extraction (SPE) or liquid-liquid extraction (LLE) methods. Since the acetylation with acetic anhydride is used frequently for the derivatization of phenols, it was selected as *in situ* reaction for the determination of the phenolic target analytes in soil slurry [34,47,48]. Optimization of the derivatization reaction and the extraction step from soils was accomplished in order to obtain the best conditions. The enriched target analytes were desorbed thermally using a thermodesorption system coupled to gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS).

2. Experimental

2.1. Chemicals

Isopropylparaben (iPrP) was supplied by TCI Europe (Zwijndrecht, Belgium). The other parabens (methylparaben (MeP), n-propylparaben (nPrP), n-butylparaben (BuP) and benzylparaben (BzP)), triclosan (TCS) and methyl triclosan (MeTCS) were supplied by Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Analytical grade methanol, acetonitrile, sodium chloride as well as NaHCO₃ buffer salt were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Acetic anhydride (ReagentPlus®) was delivered by Sigma–Aldrich (Munich, Germany). The chemical structure and the octanol/water coefficients of the compounds and the retention times corresponding to the chromatographic method used are shown in Table 1.

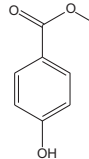
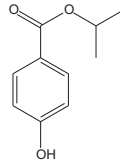
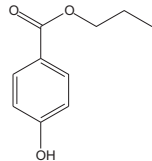
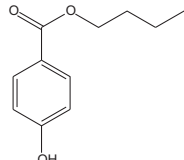
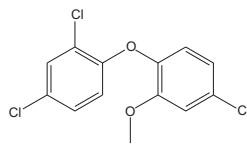
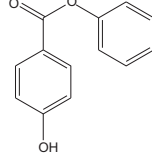
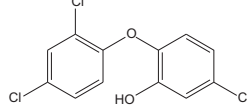
2.2. Standard solutions and soils

2.2.1. Standard solutions

Stock solutions of all the analytes (500 mg/L in methanol) were prepared and stored at 4 °C in the refrigerator. Working solutions containing the compounds were prepared by dilution with acetone at the appropriate concentrations prior spiking the soil samples. Optimization experiments were performed using 0.5 g of soil spiked with the analytes at 100 µg/kg.

Table 1

Structural formulas, logarithm of the octanol/water coefficient, and retention times of the compounds studied.

Name	Structure	Log <i>K</i> _{ow}	<i>t</i> _R (min) ^a
Methylparaben		1.96	5.155
Iso-propylparaben		3.04	5.559
n-propylparaben		3.04	5.899
Butylparaben		3.81	6.521
Methyl triclosan		5.15	8.279
Benzylparaben		3.59	8.40
Triclosan		4.76	8.461

^a Derivatized compounds.

2.2.2. Soil samples

Soil matrices were used to optimize the derivatization and extraction conditions and to determine the analytical characteristics of the method. Three different types of soil were chosen for the experiments: a river sediment (Leipzig, Germany), a garden soil (Norway) and a sandy soil (Leipzig, Germany). The study also included a sludge collected from a wastewater treatment plant in Leipzig, a town with about 500,000 inhabitants. The sludge was dried, sieved, and the fraction below 1 mm was collected and stored in an amber vial at 4 °C in the refrigerator until analysis. The total organic carbon (TOC), total inorganic carbon (TIC) and total carbon (TC) values shown in Table 2 of the soils and the sludge were measured using a “HighTOC II” analyser (elementar Analysensysteme, Hanau, Germany).

The spiked soil samples were prepared by adding 75 mL of a stock solution of parabens, triclosan and methyl triclosan standards

Table 2

Characteristics of the soils studied. TOC, total organic carbon; TIC, total inorganic carbon; TC, total carbon.

Soil	TOC (%)	TIC (%)	TC (%)
River sediment	5.51	0.21	5.73
Garden soil	1.55	0.03	1.58
Sandy soil	7.11	0.03	7.14
Sludge	24.2	0.28	24.5

in acetone to 50 g of soil. Subsequently, the solvent was let to evaporate at room temperature under frequent homogenization. The spiked soils were stored at 4 °C under darkness to prevent the compounds from degrading. In all cases, concentrations of the analytes in the soils were referred to dry weight.

The methods of optimization and evaluation were performed using fractions of 0.5 g of river sediment spiked at the concentration level required in each case. The absence of the analytes was confirmed by subjecting a portion of soil to the extraction procedure and to the ensuing instrumental analysis. Each level was analyzed in triplicate.

2.3. Derivatization and SBSE procedure

0.5 g of spiked soil was placed in a 10-mL headspace vial. Then, 5 mL of an aqueous solution of NaHCO₃ 0.4 M was added. The stir bar (Twister; Gerstel, Müllheim a/d Ruhr; Germany) containing a polydimethylsiloxane (PDMS) coating film (0.5 mm thick; 10 mm long, 24 µL) was inserted into the mixture, followed by the addition of 400 µL of acetic acid anhydride. The vial was sealed with a Teflon-covered silicone septum and the mixture was stirred for 60 min at 1000 rpm (Variomag Multipoint 6/15, H+PLabortechnik, Oberschleissheim, München, Germany) at room temperature. After the extraction, the twister was removed, rinsed with bidistilled water and dried with lint-free tissue. The stir bar was then placed in a glass thermal desorption (TD) tube and desorbed in the TD system for delivery to the gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) system.

2.4. Instrumentation

TD–GC–MS analysis was performed on an Agilent 6890 gas chromatograph (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) coupled to a Gerstel thermodesorption system (TDS A). All experiments were carried out with a programmed temperature vaporizer (PTV) inlet (CIS-4), with an empty liner for cryofocusing the analytes prior to introduction into the capillary column. Cooling was accomplished with liquid nitrogen. The detector was a quadrupole mass spectrometer (HP 5973N).

2.5. TD–GC–MS conditions

The optimized conditions used for the thermodesorption system were set referring to our previous work [34]. Briefly, these

were: desorption temperature, 275 °C; desorption time, 6 min and helium flow rate (desorption flow) 100 mL/min. During the desorption step, the PTV temperature was set at –10 °C (solvent-vent mode). After the desorption, the PTV temperature was programmed to increase from –10 to 280 °C at 720 K/min (held for 5 min) to transfer the analytes to the chromatographic system. The injection was performed in splitless mode at 280 °C with a splitless time of 2 min.

To perform the gas chromatographic measurements, a HP-5MS capillary column (30 m × 250 µm i.d., 0.25 µm film thickness) was used. The carrier gas used was helium at a flow rate of 1.2 mL/min. The column oven temperature program involved an initial temperature of 60 °C for 2 min; an increase at 65 K/min to 175 °C; then an increase at 45 K/min to 200 °C (held 2 min), and an increase at 40 K/min to 280 °C, then holding for 1 min. The mass spectrometer was operated in full scan mode (optimization studies) and selected ion monitoring mode (SIM) (calibration and prediction) for mass analysis after electron impact ionization (70 eV). A solvent delay of 4.5 min was established. The mass range from 50 to 350 amu was considered in full scan analysis. The substance typical target ions used for SIM analysis are listed in Table 3.

2.6. Validation of the method

All the analytes tested showed good linearity in the ranges studied, with good regression coefficients. The limits of detection obtained in SIM mode ranged between 0.08 and 1.06 µg/kg. The limits of quantification were within the 0.24–3.22 µg/kg range.

Reproducibility and repeatability, expressed as coefficients of variation, had satisfactory values (<13%). The accuracy of the method was evaluated by spiking the samples at two concentration levels and apparent recoveries between 91% and 110% were obtained.

3. Results and discussion

3.1. Derivatization reaction

Acetylation is a common reaction widely used for the derivatization of phenolic compounds in aqueous matrices. Fig. 1 compares the signals obtained with and without compound derivatization. A noticeable increase in the signals of the compounds was seen when derivatization took place. In the case of methyl triclosan, the signal remained constant, indicating that the compound was stable under the derivatization conditions.

In order to optimize the derivatization step, the relationship between the base concentration and acid volume was studied. The ranges studied were 0.1–0.4 M for the base concentration (NaHCO₃), and 50–400 µL for the acetic anhydride volume. Fig. 2 shows the results obtained for three of the compounds studied (MePA, BuPA and TCSA) that are representative of the observed behaviour. As the volume of acetic anhydride increased, so did the analytical signal of most of the compounds, with the exception

Table 3

Analytical characteristics of the proposed method.

Compound	<i>m/z</i>		Intercept	Slope	<i>R</i> ²	RSD (%)		LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Recovery (%)	
	Quantitation ion	Qualifier ions				Repeatability	Reproducibility			10 µg/kg	50 µg/kg
MeP	121	152, 194	(17 ± 3) × 10 ⁴	(18 ± 2) × 10 ³	0.9968	7.12	8.3	1.06	3.22	102 ± 3	100 ± 4
iPrP	121	138, 180	(7 ± 8) × 10 ⁴	(38 ± 2) × 10 ³	0.9941	7.40	10.7	0.51	1.56	106 ± 6	106 ± 6
nPrP	138	121, 180	(24 ± 9) × 10 ⁴	(44 ± 2) × 10 ³	0.9987	7.50	10.8	0.74	2.26	110 ± 5	96 ± 5
BuP	138	121, 194	(2 ± 6) × 10 ⁴	(40 ± 2) × 10 ³	0.9986	6.80	12.3	0.08	0.24	104 ± 5	102 ± 4
MeTCS	302	304, 252	(3 ± 10) × 10 ³	(43 ± 2) × 10 ²	0.992	6.82	11.9	0.37	1.12	91 ± 6	95 ± 5
BzP	121	91, 65	(6 ± 13) × 10 ³	(206 ± 4) × 10 ²	0.9974	9.50	8.17	0.18	0.56	96 ± 2	100 ± 2
TCS	288	218, 63	(8 ± 7) × 10 ³	(55 ± 2) × 10 ²	0.9988	5.86	10.7	0.16	0.49	94 ± 3	98 ± 3

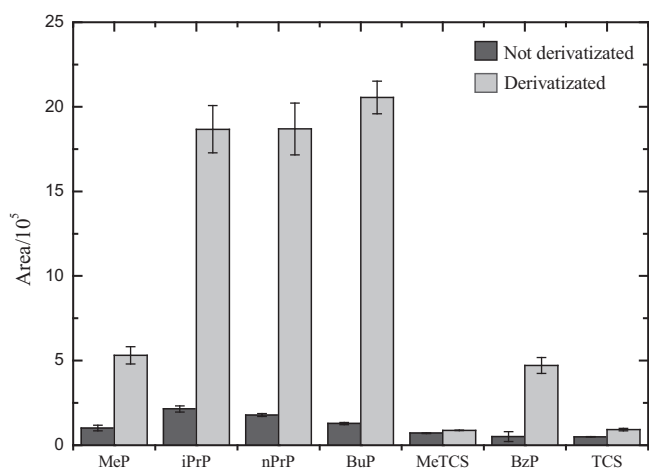
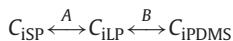


Fig. 1. Comparison of the analyte signals obtained with and without derivatization.

of the most polar ones (MePA). Accordingly, in general the best results were obtained when 400 μL of acetic anhydride was added for NaHCO_3 concentrations of 0.25 or 0.4 M. For the working conditions, this amount of acetic anhydride was chosen, with a NaHCO_3 concentration of 0.4 M, in order to ensure the buffering capacity of the medium.

3.2. Optimization of the SBSE procedure

In the proposed procedure, in which there are several phases (soil, aqueous solution and the stir-bar coating) the exogenous compounds present in the solid matrix were distributed at different proportions among the different phases of the system, as seen in the following equilibria.



where C_{ISP} is the concentration of the analyte in the solid phase, C_{ILP} is the concentration in the liquid phase and C_{IPDMS} is the concentration in the PDMS phase [49].

The distribution of an analyte between phases depends on its hydrophobicity. Equilibria A and B are directly related, since the analyte extracted by the PDMS phase of the aqueous phase (equilibrium B) is partially or wholly re-established by its redistribution between the solid matrix and the liquid phase (equilibrium A).

In order to modify the nature of the liquid phase, and hence its extracting capacity, a study was made concerning the influence of organic solvents and of an electrolyte added to the aqueous phase. Additionally, other variables that affect the SBSE procedure were studied, such as the amount of soil and the extraction time and temperature.

Two organic modifiers, methanol (MeOH , $\log K_{\text{ow}} = -0.63$) and acetonitrile (ACN , $\log K_{\text{ow}} = -0.15$), were tested in order to modify the extractability of the analytes. Different portions of methanol in the aqueous phase were studied: 0, 10, 30 and 50%. Acetonitrile levels (in percentages) were prepared at 10 and 30%. The results are shown in Fig. 3a. The behaviour was similar for both solvents (results only shown for MeOH), with a decrease in the signal for the parabens in parallel with an increase in the percentage of organic solvent. However, in the case of methyl triclosan and triclosan acetate, the optimum conditions would be a 30% content of organic solvent. As a compromise situation for the joint determination of all the analytes, it was decided to work without the addition of an organic modifier to the aqueous solution.

An inert salt, NaCl, was added during SBSE in order to modify the ionic strength of the liquid phase. Three amounts – 0, 1.0 and 2.5 g (supersaturation) – were added to the sample (0.5 g of soil + 5.0 mL

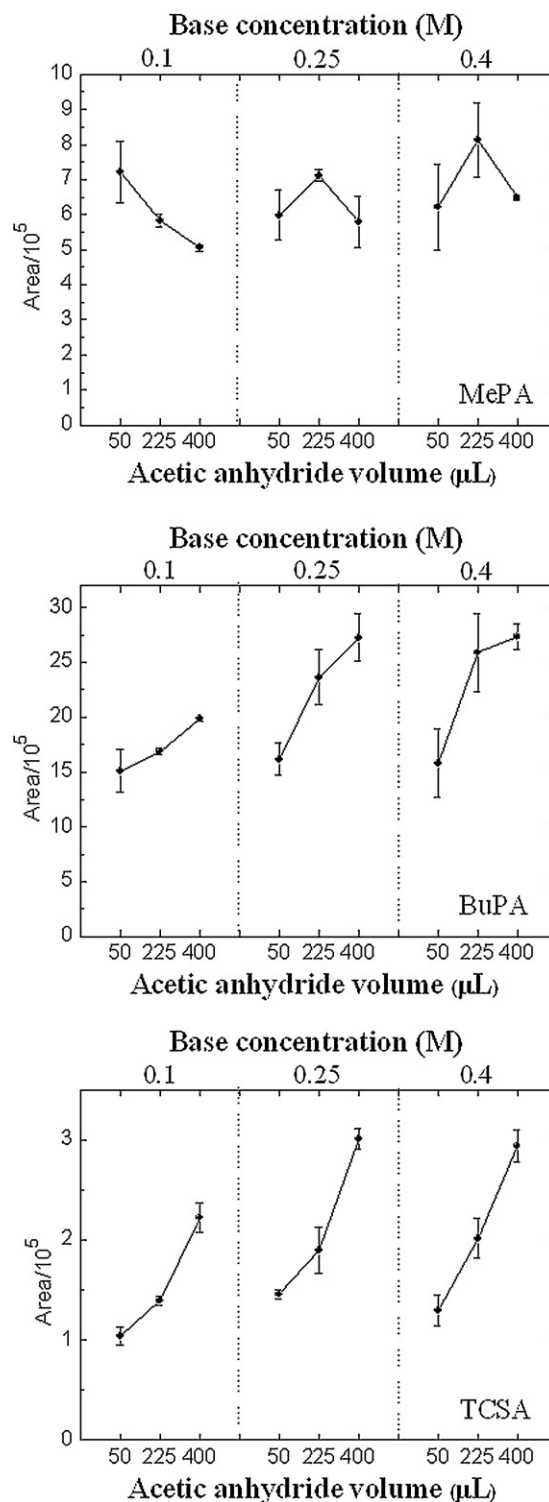


Fig. 2. Variation in the analytical signal upon the addition of different amounts of acetic anhydride and at different NaHCO_3 concentrations.

of aqueous solution, Fig. 3b). On increasing the NaCl concentration, a decrease in signal was observed, with the exception of MePA. It was therefore decided not to add the electrolyte to the medium.

Next, we studied the addition of different amounts of soil. The values studied were 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5 g of soil. The amount of aqueous solution (5.0 mL) was held constant, although the amount of NaHCO_3 and acetic anhydride used to perform the *in situ* reaction was increased proportional to the amount of soil to ensure

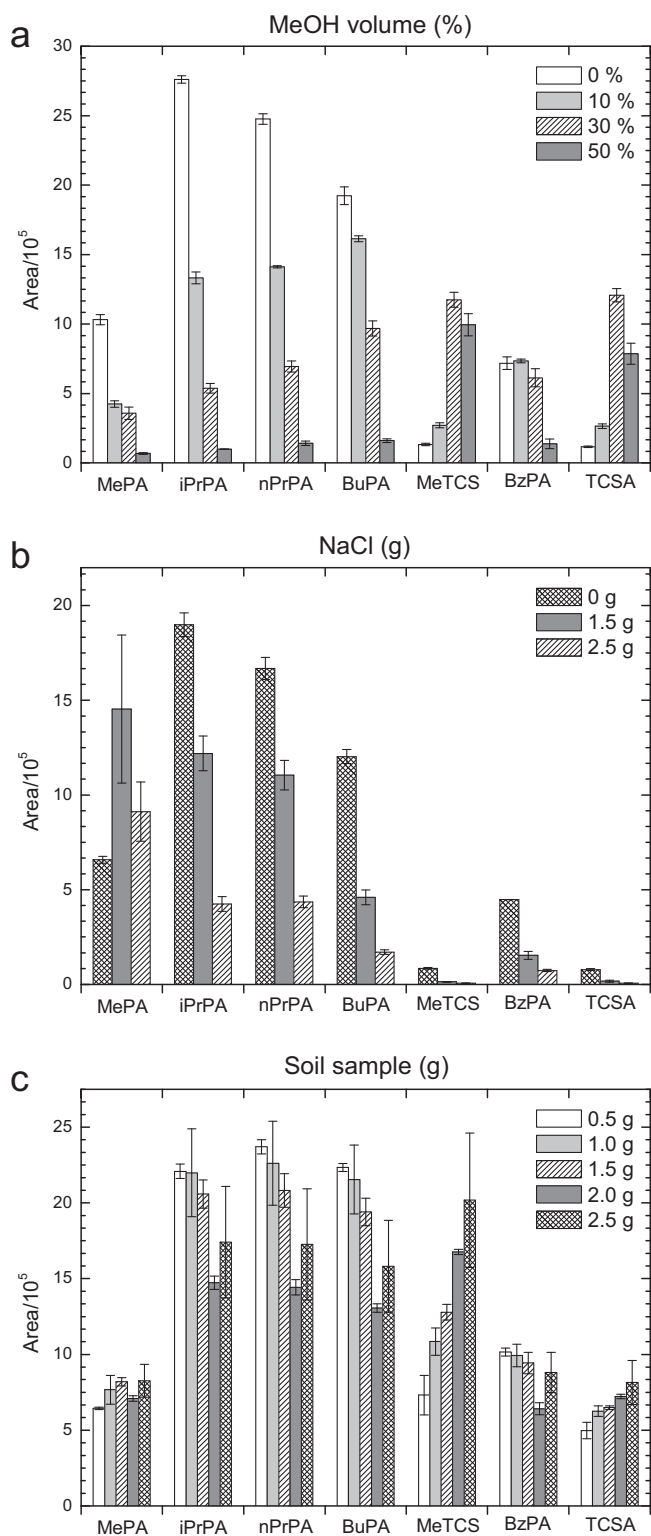


Fig. 3. Evolution of the analytical signal for the different variables studied.

the quantitative derivatization of the compounds. The extraction time was set at 240 min in order to ensure complete extraction of all the analytes. The results are shown in Fig. 3c. The increase in sample amount did not involve an increase in the analytical signal for most of the compounds (except for MeTCS and TCSA). Likewise, in general an increase in the irreproducibility of the process was observed, associated with an increase in the difficulty involved in

stirring the soil–water mixture. Consequently, it was decided to work with 0.5 g of soil.

The extraction time and two different extraction temperatures (ambient temperature and 50 °C) were studied in order to obtain the optimal extraction efficiency for overall analytes. At room temperature, the time required for reaching the partition equilibrium ranged between 60 and 120 min, except for methyl triclosan and triclosan acetate, for which it was necessary to increase the extraction time to values higher than 240 min (Fig. 4). At 50 °C, the equilibrium was reached faster (30 min); longer extraction times resulted in a signal decrease in the chromatogram. However, at 50 °C most of the parabens were extracted less efficiently than at ambient temperature at equilibrium conditions. Methyl triclosan and triclosan acetate showed a different behaviour, with a very significant increase in the signal when the sample was heated. However, it was found that the lifetime of the stir bar was dramatically reduced at 50 °C. As a compromise situation it was decided to work at room temperature, setting an extraction time of 60 min since the increase in the response from 60 min to equilibrium was not very marked.

3.3. Evaluation of the SBSE-TD-GC-MS method

Linear calibration curves were obtained using the river sediment as analyte free matrix spiked at seven concentration levels ranging from 1 to 100 µg/kg (1.0, 5.0, 10, 25, 50, 75 and 100 µg/kg, dry weight). Each level was analyzed in triplicate. The analytical characteristics of the method are shown in Table 3. The calibration model displayed linear behaviour for the target analytes. The validity of the model generated was proved with good fits using ANOVA, and correlation coefficients (R^2) higher than 0.99 were obtained for overall analytes.

In order to study the repeatability and reproducibility of the process, soil samples spiked at 50 µg/kg were analyzed on the same day (six replicates) and on two different days (three replicates each day), respectively. The results, as relative standard deviations (RSD, %), are shown in Table 3, with values not higher than 13%. These results are quite good, even though no internal standard was used in the procedure.

The limits of detection (LODs) and the limits of quantification (LOQs), calculated as 3.3 and 10 times the standard deviation of a sample with an S/N ratio of 3, respectively [50], are also shown in Table 3. The limits of detection were between 0.08 µg/kg for butylparaben and 1.06 µg/kg for methylparaben. Few references are available to compare our results with others previously reported for soil samples. For parabens, Nuñez et al., using ultrasonic-assisted extraction with acetonitrile [37] or molecularly imprinted solid-phase extraction [38], obtained limits of detection between 0.04–0.14 µg/kg and 0.16–0.27 µg/kg, respectively, using 10 and 15 g of sample, respectively. In both cases, the instrumental analysis was carried out using a LC-MS/MS device.

For triclosan and the methyl triclosan, the LODs found in the literature are in the order of a few µg/kg. In all cases, the methodologies proposed involve several steps, which include an exhaustive extraction of the compounds from the soil samples, with techniques such as PLE, USE and MSPD, with later cleaning of the extract with SPE and a later analyte derivatization step [41,44,45].

The methodology proposed here offers advantages over these extraction methods, such as minimizing sample handling, the complete elimination of the use of organic solvents, and simplification of the analytical procedure, with reduced time consumption. Additionally, the use of a derivatization reaction does not complicate the process, since it occurs at the same time as extraction.

The accuracy of the method was evaluated in terms of apparent recoveries. Two river sediment samples were spiked at two concentration levels: 10 and 50 µg/kg. The apparent recoveries (Table 3), calculated as the ratio of the measured concentration to the spiked

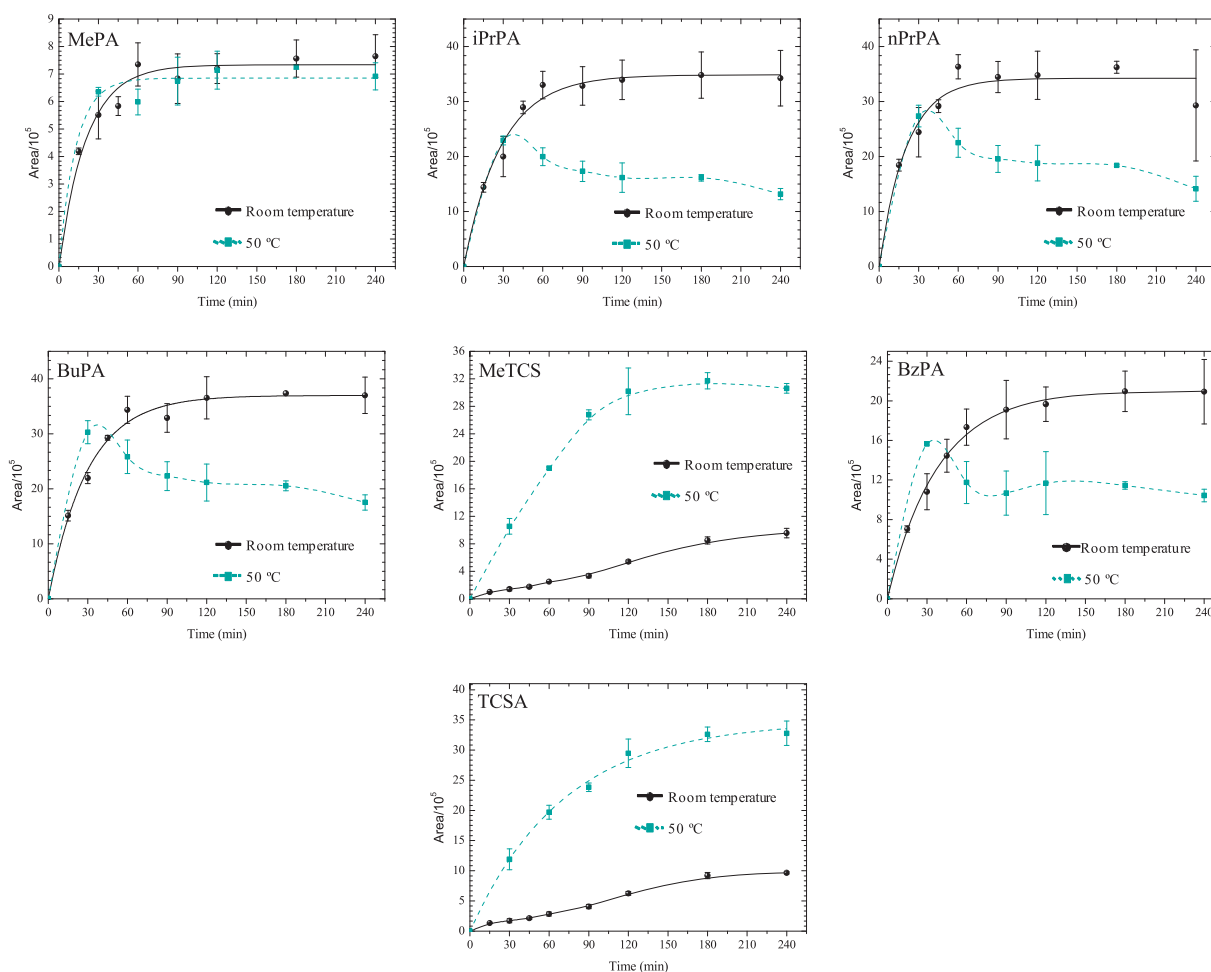


Fig. 4. Extraction curves for each of the analytes as a function of time (min) and working temperature.

concentration (expressed as percentages), were between 91% and 110%.

Absolute recoveries were calculated by comparing the GC–MS peak areas of the extracted compounds from soil samples with those of a standard solution of the completely acetylated compounds, placed on glass wool packed in a thermodesorption tube [34]. The values obtained were 13% for methylparaben, 12% for isopropylparaben, 11% for n-propylparaben, 6% for butylparaben, 3% for methyltriclosan, 4% for benzylparaben and 3% for triclosan. These values were low, showing that the extraction was not quantitative, as it occurs when using other extraction methods, such as SPME. However, it was constant along the linear range and the limits of detection and quantification of the method were satisfactory.

3.4. Environmental samples

The method developed was applied to the analysis of the parabens, triclosan and methyl triclosan in several environmental solid samples collected from different areas. Two different types of soils (a garden soil and a sandy soil) and a sludge were analyzed. The samples were not subjected to any kind of previous manipulation.

Matrix effects were investigated by comparing the signals obtained for the river sediment and those of the other types of solid matrices studied. The samples were spiked with the compounds at 50 µg/kg (Fig. 5). In all cases, non-spiked samples were also analyzed before the spiking procedure was carried out. The presence

of nPrP in the garden soil and of MeTCS and TCS in the sludge was confirmed. In these cases, the peak areas obtained were subtracted from those corresponding to the spiked samples.

Table 4 shows the ratios between the signals obtained for the analytes in the different matrices studied normalized to those obtained with the river sediment (set as 1). The ratios calculated varied clearly, indicating that the matrix composition significantly influences the extraction procedure. These results emphasize that for the quantification of real samples a standard additions protocol is recommended. This type of calibration is common when working with complex matrices, such as soils, using techniques such as headspace generation [51], QuEChERS [52] or solid-phase microextraction [53]. The greatest differences were obtained for the sludge, which is logical in view of its high organic matter content (Table 2), which leads to a stronger retention of the analytes probably sorbed on the carbon rich sludge surface.

Table 4

Quotient between the signals obtained for the compounds studied in the different soils and signals obtained for the river sediment (reference in bold).

Compound	River sediment	Garden soil	Sandy soil	Sludge
MeP	1	0.40	0.31	0.31
iPrP	1	2.48	0.93	0.43
nPrP	1	2.27	0.82	0.32
BuP	1	4.64	1.20	0.28
MeTCS	1	2.21	0.53	0.17
BzP	1	3.31	0.55	0.28
TCS	1	1.81	0.33	0.14

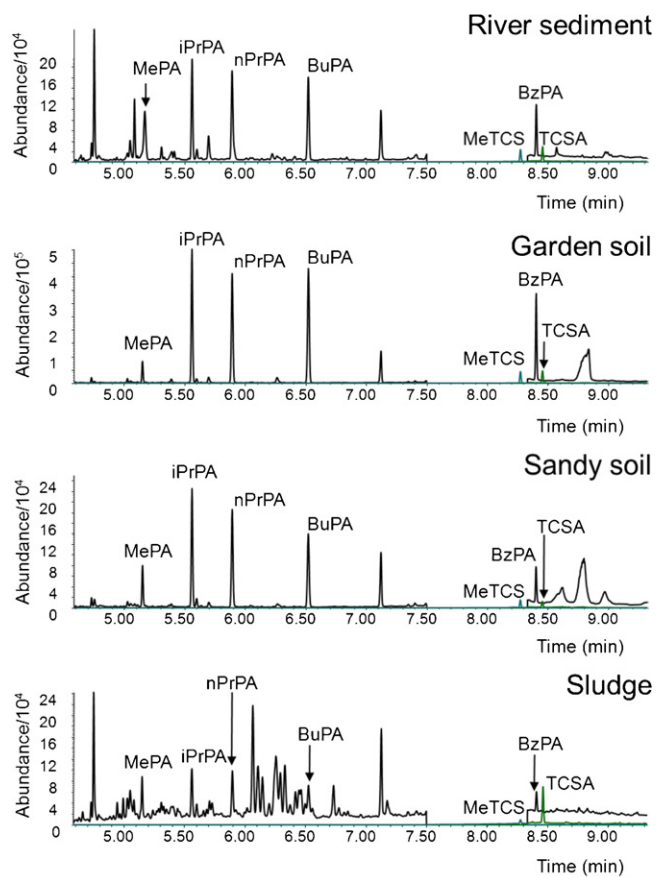


Fig. 5. Chromatograms obtained with the different soil samples studied, spiked at a concentration 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

The standard additions method was used to determine the concentration levels of the analytes found in the different soil samples. In the case of the garden soil, the nPrP concentration was 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and in the case of the sludge, MeTCS was found at a concentration of 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and TCS at a concentration of 280 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

4. Conclusions

In the present work we propose the use of stir bar sorptive extraction with an *in situ* derivatization reaction for the analysis of parabens, triclosan and methyl triclosan in soils. The literature contains few references to direct applications of extraction by SBSE in soils.

The effects of the variables affecting the derivatization reaction and the SBSE extraction were studied using spiked river sediment samples. The optimized method proved to be easy and sensitive, with detection limits ranging from 80 ng/kg to 1.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$. It showed good linearity, with high correlation coefficients (higher than 0.99 in all cases) and no lack of fit. The reproducibility and repeatability of the method were evaluated, with the finding of values below 13%. The accuracy of the method was evaluated in terms of apparent recoveries, with values between 91% and 110%. With these characteristics, it is possible to determine these compounds in real samples, for which a standard additions protocol must be implemented.

Regarding the analytes studied, differences can be seen in behaviour between the parabens and triclosan and methyl triclosan. The working conditions chosen were compromise situations in order to create a multicomponent protocol. When focused on the determination of triclosan and methyl triclosan, other opti-

um conditions have to be chosen and a higher sensitivity can be achieved. Nevertheless, the LODs of overall analytes were satisfactory bearing in mind the concentration levels found in real samples.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of the DGI (CTQ2010-17514/BQU) and of the Consejería de Educación y Cultura of the Junta de Castilla y León (Project GR87). Casas Ferreira A.M. acknowledges a FPU grant from the Spanish Ministry of Education.

The authors are grateful to Iria Gonzalez and Dr. J.B. Quintana of the University of Santiago de Compostela for their kind offer to use reference compounds from their collection for our investigations.

References

- [1] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, J. Microcolumn Sep. 11 (1999) 737.
- [2] E. Baltussen, C. Cramers, P. Sandra, Anal. Bioanal. Chem. 373 (2002) 3.
- [3] F. Sánchez-Rojas, C. Bosch-Ojeda, J.M. Cano-Pavón, Chromatographia 69 (2009) 579.
- [4] E. Coelho, M.A. Coimbra, J.M.F. Nogueira, S.M. Rocha, Anal. Chim. Acta 635 (2009) 214.
- [5] F. David, P. Sandra, J. Chromatogr. A 1152 (2007) 54.
- [6] A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L.A. Fernández, N. Etxebarria, O. Zuloaga, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 2642.
- [7] P. Popp, C. Bauer, L. Wennrich, Anal. Chim. Acta 436 (2001) 1.
- [8] B. Tienpont, F. David, C. Bicchi, P. Sandra, J. Microcolumn Sep. 12 (2000) 577.
- [9] D. Benanou, F. Acobas, M.R. de Roubin, F. David, P. Sandra, Anal. Bioanal. Chem. 376 (2003) 69.
- [10] S. Nakamura, S. Daishima, Anal. Bioanal. Chem. 382 (2005) 99.
- [11] H. Wahl, C. Peterfi, R. Werner, H.M. Liebich, Clin. Chem. 48 (2002) A42.
- [12] M. Kawaguchi, R. Ito, H. Honda, N. Endo, N. Okanouchi, K. Saito, Y. Seto, H. Nakazawa, J. Chromatogr. B 875 (2008) 577.
- [13] M. Kawaguchi, K. Inoue, M. Yoshimura, R. Ito, N. Sakuri, N. Okanouchi, H. Nakazawa, J. Chromatogr. B 805 (2004) 41.
- [14] T. Benijts, J. Vercammen, R. Dams, H. Pham Tuan, W. Lambert, P. Sandra, J. Chromatogr. B 755 (2001) 137.
- [15] B.A. Rocha-Gutierrez, W.Y. Lee, Abstr. Pap. Am. Chem. S229 (2005) U76.
- [16] A.G.J. Tredoux, H.H. Lauer, T. Heideman, P. Sandra, J. High Resolut. Chromatogr. 23 (2000) 644.
- [17] N. Ochiai, K. Sasamoto, M. Takino, S. Yamashita, S. Daishima, A.C. Heiden, A. Hoffmann, Anal. Bioanal. Chem. 373 (2002) 56.
- [18] W. Liu, Y. Hu, J. Zhao, Y. Xu, Y. Guan, J. Chromatogr. A 1095 (2005) 1.
- [19] Y. Hayasaka, K. MacNamara, G.A. Baldock, R.L. Taylor, A.P. Pollnitz, Anal. Bioanal. Chem. 375 (2003) 948.
- [20] M. Martínez-Parreño, J. Llorca-Pórcel, I. Valor, J. Sep. Sci. 31 (2008) 3620.
- [21] J. Llorca-Pórcel, M. Martínez-Parreño, E. Martínez-Soriano, I. Valor, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 5955.
- [22] X. Zhu, J. Cai, J. Yang, Q. Su, Y. Gao, J. Chromatogr. A 1131 (2006) 37.
- [23] R. Rodil, P. Popp, J. Chromatogr. A 1124 (2006) 82.
- [24] B.L.L. Tan, D.W. Hawker, J.F. Müller, L.A. Tremblay, H.F. Chapman, Water Res. 42 (2008) 404.
- [25] C.G. Daughton, T.L. Jones-Lepp (Eds.), Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment (ACS Symposium Series, No. 791), American Chemical Society, Washington, DC, 2001.
- [26] H. Singer, S. Müller, C. Tixier, L. Pillonel, Environ. Sci. Technol. 36 (2002) 4998.
- [27] P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, M. Ramil, R. Cela, J. Chromatogr. A 1188 (2008) 132.
- [28] J.R. Byford, L.E. Shaw, M.G.B. Drew, G.S. Pope, M.J. Sauer, P.D. Darbre, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 80 (2002) 49.
- [29] E. Silva, N. Rajapakse, A. Kortenkamp, Environ. Sci. Technol. 36 (2002) 1751.
- [30] M. Farré, D. Asperger, L. Kantiani, S. González, M. Petrovic, D. Barceló, Anal. Bioanal. Chem. 390 (2008) 1999.
- [31] J. Boberg, C. Taxvig, S. Christiansen, U. Hass, Reprod. Toxicol. 30 (2010) 301.
- [32] J. Regueiro, W. Becerril, C. García-Jares, M. Llompert, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 4693.
- [33] P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, M.H. Bollaín, R. Cela, J. Chromatogr. A 1124 (2006) 3.
- [34] A.M.C. Ferreira, M. Möder, M.E.F. Laespada, Anal. Bioanal. Chem. 399 (2011) 945.
- [35] R.A. Rudel, L.J. Perovich, Atmos. Environ. 43 (2009) 170.
- [36] P. Canosa, D. Pérez-Palacios, A. Garrido-López, M.T. Tena, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, J. Chromatogr. A 1161 (2007) 105.
- [37] L. Nuñez, J.L. Tadeo, A.I. Gacia-Valcárcel, E. Turiel, J. Chromatogr. A 1214 (2008) 178.
- [38] L. Nuñez, E. Turiel, A. Martín-Esteban, J.L. Tadeo, Talanta 80 (2010) 1782.
- [39] A. Nieto, F. Borruel, R.M. Marcé, E. Pocurull, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 5619.

- [40] S.L. Rice, S. Mitra, *Anal. Chim. Acta* 589 (2007) 125.
- [41] J. Xu, L. Wu, W. Chen, A.C. Chang, *J. Chromatogr. A* 1202 (2008) 189.
- [42] S. Chu, C.D. Metcalfe, *J. Chromatogr. A* 1164 (2007) 212.
- [43] J.C. Durán-Alvarez, E. Becerril-Bravo, V. Silva Castro, B. Jiménez, R. Gibson, *Talanta* 78 (2009) 1159.
- [44] J. Cha, A.M. Cupples, *Water Res.* 43 (2009) 2522.
- [45] C. Sánchez-Brunete, E. Miguel, B. Albero, J.L. Tadeo, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 2768.
- [46] I. González-Mariño, I. Rodríguez, J.B. Quintana, R. Cela, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 2289.
- [47] J. Regueiro, E. Becerril, C. García-Jares, M. Llompart, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4693.
- [48] J.L. Pérez Pavón, A.M. Casas Ferreira, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1192.
- [49] C. Bicchi, C. Cordero, P. Rubiolo, P. Sandra, *Eur. Food Res. Technol.* 216 (2003) 449.
- [50] Analytical Methods Committee, *Analyst* 112 (1987) 199.
- [51] J.L. Pérez Pavón, S. Herrero Martín, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6063.
- [52] S. Herrero Martín, C. García Pinto, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4883.
- [53] E. Concha-Graña, V. Fernández-González, G. Grueiro-Noche, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, E. Fernández-Fernández, D. Prada-Rodríguez, *Chemosphere* 79 (2010) 698.



IX

**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 aire, agua, suelo, o sedimentos, requiere habitualmente 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 de la complejidad de la matriz. De forma general, el agua 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 lo que se conoce como “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 en 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.

Se han propuesto modificaciones del método original, con el objetivo de asegurar extracciones eficaces de compuestos con características ácido-base (utilizando diferentes disoluciones amortiguadoras) [9-12], o añadiendo agua a muestras secas con el objetivo de obtener la humedad necesaria [13-15]. También se han propuesto modificaciones en la etapa de limpieza del extracto, tanto utilizando d-SPE con fases extractantes de carbono grafitizado o sorbentes C₁₈ [10] como cartuchos de extracción en fase sólida [16] o cartuchos de Florisil [17,18].

El método QuEChERS se ha aplicado fundamentalmente para la extracción de un amplio conjunto de pesticidas en diversas matrices alimentarias [19-26]. 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 ha recibido la distinción de método oficial de la AOAC Internacional [27] para la

extracción de múltiples residuos de pesticidas en matrices de frutas y verduras.

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 [28], antibióticos β -lactámicos [29,30] o fármacos para animales [30-34]. El uso de QuEChERS con matrices de suelos ha sido muy limitado hasta la fecha [35]. 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. OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo es el de estudiar las posibilidades de la aplicación del método QuEChERS para la extracción de compuestos clorados de muestras de suelos. Para este fin, se desarrollará una nueva versión simplificada del método QuEChERS.

Para solucionar la principal desventaja comúnmente asociada al método QuEChERS (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 [36] y el hexaclorobenceno [37] 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) [36].

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 del 99.9 %) fue suministrado por Supelco (Bellefonte, PA, USA) y el 1,2-diclorobenceno (pureza del 99 %) y el hexaclorobenceno (pureza del 99 %) por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El acetonitrilo (MeCN) fue suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania) y el acetato de etilo (EtOAc) 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 a 4 °C. A partir de éstas se realizaron diferentes diluciones, las cuales 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 de ellos eran 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, Méjico), mientras que el tercero era un material de referencia (RTC-

CRM631), 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 en contacto con la atmósfera sobre una placa calefactora a 90 °C, durante 48 horas, removiendo de forma frecuente. 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 compuestos estudiados.

El procedimiento utilizado para dopar los suelos fue el siguiente: se depositaron 20 g de suelo en un frasco ámbar de 100 mL y sobre él se añadieron 2 mL de una disolución de los analitos objeto de estudio en EtOAc (a las concentraciones adecuadas). El frasco se cerró herméticamente y se agitó vigorosamente durante 15 minutos para conseguir la perfecta homogeneización de los compuestos en la matriz. Finalmente, las muestras fueron almacenadas en nevera (4 °C) durante 15 días para lograr que tuviera lugar la interacción entre los compuestos y la matriz.

3.3. Instrumentación GC- μ ECD

El cromatógrafo de gases utilizado fue un Agilent 7890A, equipado con un micro-detector de captura electrónica (Ni^{63} , 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. Para cromatografía de gases rápida se utilizó una columna capilar DB-VRX (20 m x 0.18 mm x 1 μ m) de Agilent Technologies (J&W Scientific Columns, USA). El gas portador era Helio N50 (99.999% 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*, 180 μ L). Las muestras se introdujeron en el inyector PTV a través de un sistema de inyección de muestras líquidas automatizado (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. En un tubo de centrifuga de 15 mL con tapón roscado se pesan 2.5 g de suelo. 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 añade 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 añade 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 como

consecuencia de la hidratación de la sal. Finalmente, el tubo se centrifuga a una velocidad de 5000 rpm durante 5 min. En la figura 1 se muestra una comparación entre el procedimiento QuEChERS original en muestras secas y la versión simplificada propuesta en este trabajo.

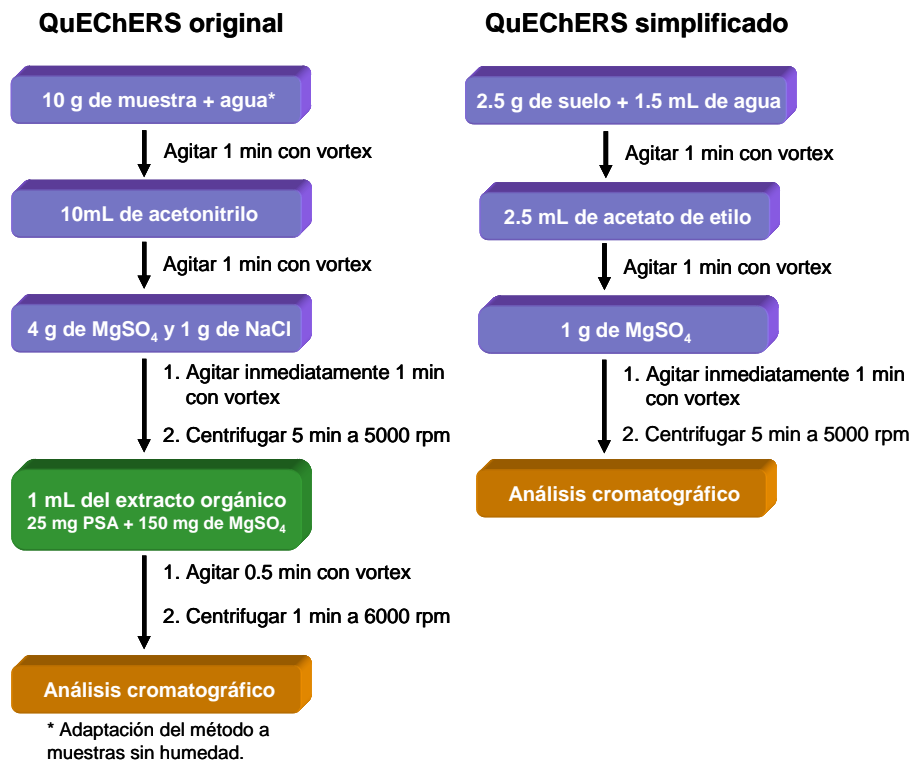


Figura 1: Comparación del procedimiento propuesto respecto al método QuEChERS original, adaptado a muestras sin humedad

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 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 $^{\circ}\text{C/s}$ hasta 300 $^{\circ}\text{C}$. 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 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 min, ésta se incrementó a una velocidad de 65 $^{\circ}\text{C/s}$ hasta 175 $^{\circ}\text{C}$, incrementándose de nuevo a 45 $^{\circ}\text{C/min}$ hasta 240 $^{\circ}\text{C}$ y manteniéndose a esta temperatura durante 3.05 min. Las rampas de temperatura utilizadas son las máximas permitidas por la configuración instrumental utilizada. El gas portador era He, con un flujo de 1.4 mL/min. El tiempo total del análisis cromatográfico era 8.26 min.

Los parámetros del μECD fueron los siguientes: temperatura del detector, 300 $^{\circ}\text{C}$ y flujo de gas auxiliar (N_2), 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 para la extracción de pesticidas en diferentes matrices alimentarias, y con los tres disolventes citados se han conseguido recuperaciones aceptables. Sin embargo, se pueden citar una serie de ventajas y desventajas del uso de cada uno de estos disolventes [8,11].

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 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 operario a los vapores del 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 este disolvente 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.

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 [11] 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.

En este trabajo, el método de extracción QuEChERS se aplicó a la extracción de compuestos clorados 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 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 estos compuestos 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 (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 cromatográfico 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 cada modo de inyección.

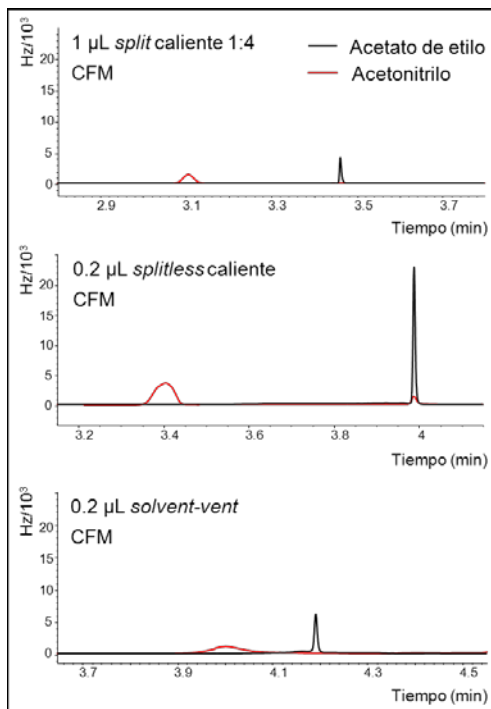


Figura 2: Señales obtenidas con los diferentes modos de inyección para el cloroformo, tanto con acetato de etilo como con acetonitrilo

Con el modo de inyección *split* en caliente, se observó que el pico del CFM era más estrecho y estaba 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) [11]. 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 observó 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 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* empacado 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) mostraba 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, la 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 mismos, lo cual posibilita la inyección de grandes volúmenes de muestra, con el consecuente incremento de sensibilidad.

En la figura 3 se muestran 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.

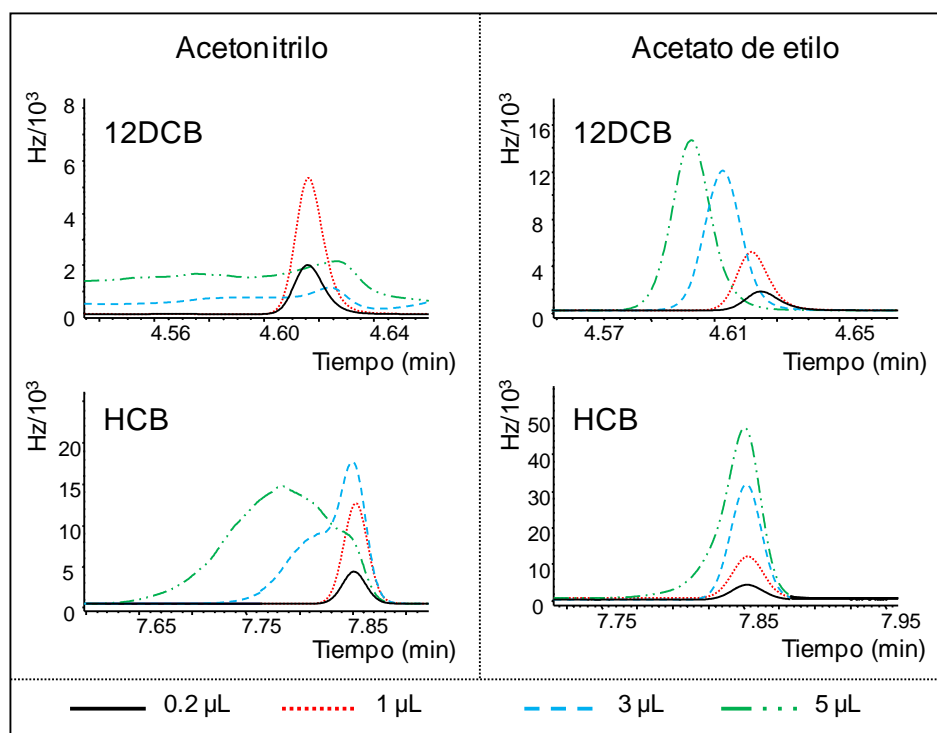


Figura 3: Cromatogramas obtenidos al inyectar diferentes volúmenes de las disoluciones de los compuestos semi-volátiles en los dos disolventes, con el modo de inyección *solvent-vent*

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 mayores 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 eluido 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, 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 que se traduce en una mayor sensibilidad del método.

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 *solvent-vent* 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): se homogeneizaron 2.5 g de suelo dopado con 1.5 mL de agua, utilizando un Vortex. A continuación, se añadió 2.5 mL de disolvente, agitándose la muestra de nuevo. Posteriormente, se añadió una combinación de MgSO₄:NaCl (1 g:0.25 g), agitando la mezcla con Vortex y por último, la muestra se sometió a un proceso de centrifugación, tras el cual 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 figura 4.

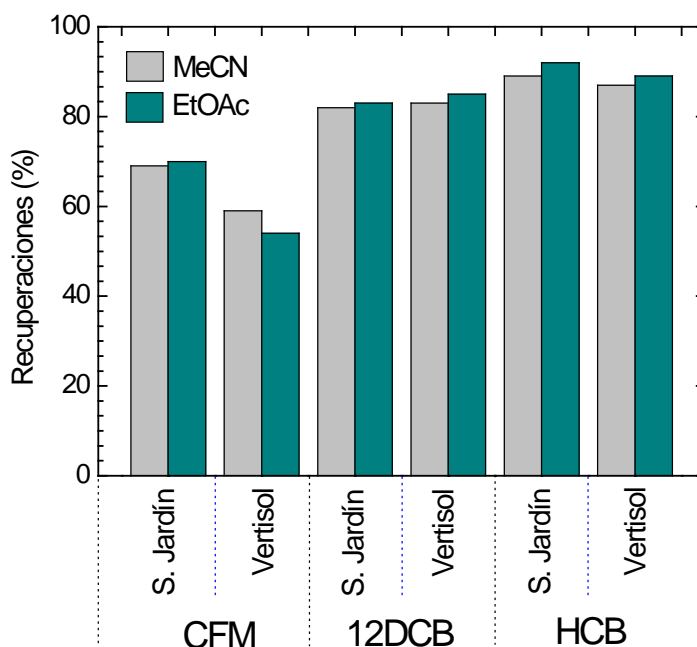


Figura 4: Recuperaciones medias para los compuestos seleccionados en suelo de jardín y Vertisol, utilizando como disolventes de extracción acetonitrilo y acetato de etilo

Los efectos que pueden contribuir a estos resultados son de varios tipos. 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 recuperaciones más altas. Otros autores observaron un comportamiento similar al utilizar el procedimiento de extracción QuEChERS con compuestos que presentaban una fuerte retención en el suelo [35].

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, 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 [13-15]. 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 de agua la muestra, y adecuado para proporcionar una correcta homogeneización durante la etapa de agitación con el Vortex.

4.1.3. Relación entre tamaño de muestra y volumen 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 un mayor espacio de almacenamiento, más trabajo y más tiempo.

En este estudio se evaluaron dos cantidades 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 centrifuga utilizado (15 mL)

impedía la correcta homogeneización de la muestra y la adecuada extracción de los compuestos durante las etapas de agitación.

Los resultados obtenidos mostraron que las señales correspondientes a los compuestos de interés cuando se utilizó la relación muestra:disolvente 2:1 eran entre 1.87 y 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 primera publicación sobre 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. 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 el trabajo propuesto se ha estudiado el efecto de la adición de diferentes cantidades de sales. 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). Por tanto, en el estudio final se ensayó la adición de diferentes cantidades de MgSO_4 , sin y con 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 dopado 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 MgSO₄ 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 $MgSO_4$ en el procedimiento final.

4.2. Recuperaciones y reproducibilidad obtenidas con el método de extracción 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 de linealidad del método (en los intervalos 20 - 600 $\mu g/kg$ para CFM, 50 - 2400 $\mu g/kg$ para 12DCB, y 10 - 400 $\mu g/kg$ para HCB) y son superiores a los límites de detección estimados para cada compuesto (2.2 $\mu g/kg$, 1.3 $\mu g/kg$ y 0.15 $\mu g/kg$, 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. También se muestran los valores de 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.

Las recuperaciones obtenidas para cada compuesto eran similares en las dos matrices estudiadas, a los dos niveles de concentración considerados, y oscilaban entre el 62 % y el 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).

Tabla 3: Porcentajes de recuperación y de desviación estándar relativa para los compuestos de interés en suelo de jardín y en el 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

Con el fin de calcular la reproducibilidad del procedimiento completo (extracción + análisis), se sometieron al procedimiento de extracción 10 alícuotas de una muestra de suelo dopado, 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 (µg/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 comprobar su posible aplicación a diferentes compuestos orgánicos en matrices de suelos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] N. Jakubowska, B. Zygmunt, Z. Polkowska, B. Zabiegała, J. Namieśnik, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 422.
- [2] B. Gilbert-Lopez, 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. Namieśnik, *J. Biochem. Bioph. 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. Štajnbaher, 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. Maštovská, S.J. Yun, *J. AOAC Int.* 88 (2005) 630.
- [11] K. Maštovská, S.J. Lehotay, *J. Chromatogr. A* 1040 (2004) 259.
- [12] S.J. Lehotay, K. Maštovská, 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. Koesukwiwat, K. Sanguankaew, N. Leepipatpiboon, *Anal. Chim. Acta* 626 (2008) 10.
- [16] F.J. Schenck, A.N. Brown, L.V. Podhorniak, A. Parker, M. Reliford, J.W. Wong, *J. AOAC Int.* 91 (2008) 422.
- [17] M.A. Aramendia, 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. Fernández-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. Hercegová, M. Dömötöróvá, E. Matisová, *J. Chromatogr. A* 1153 (2007) 54.
- [24] C. Lesueur, P. Knittl, 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) 485.
- [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.
- [36] Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Summaries & Evaluations, Vol. 73, International Agency for Research on Cancer, 1999.
- [37] Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Summaries & Evaluations, Vol. 79, International Agency for Research on Cancer, 2001.

TRABAJO PUBLICADO
PUBLISHED ARTICLE

IX



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-extractives 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.

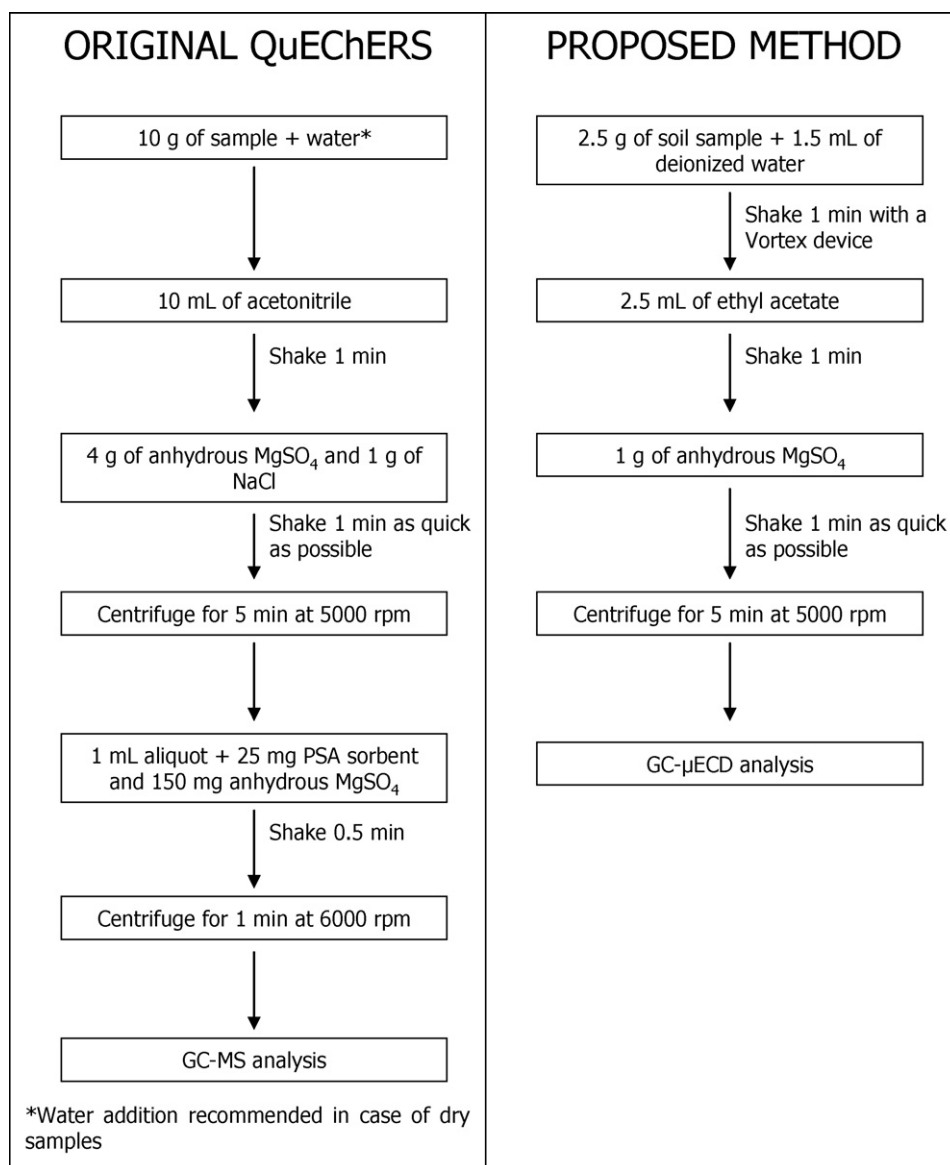


Fig. 1. Comparison of the proposed method with the original QuEChERS adapted to dry samples.

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 (N₂) 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 Lehothay [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 $\mu\text{g/L}$ 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

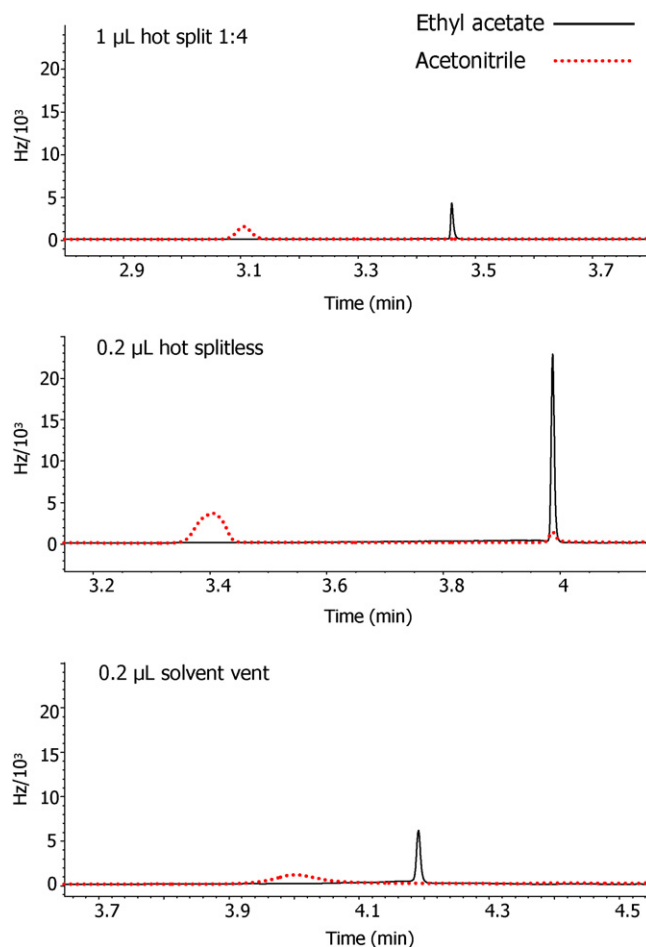


Fig. 2. Different injection modes for chloroform in acetonitrile and ethyl acetate.

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 $\mu\text{g/L}$ and hexachlorobenzene at 50 $\mu\text{g/L}$) when increasingly larger acetonitrile and ethyl acetate solution volumes are injected. It is clear that, for acetonitrile, a strong distortion of the chromatographic

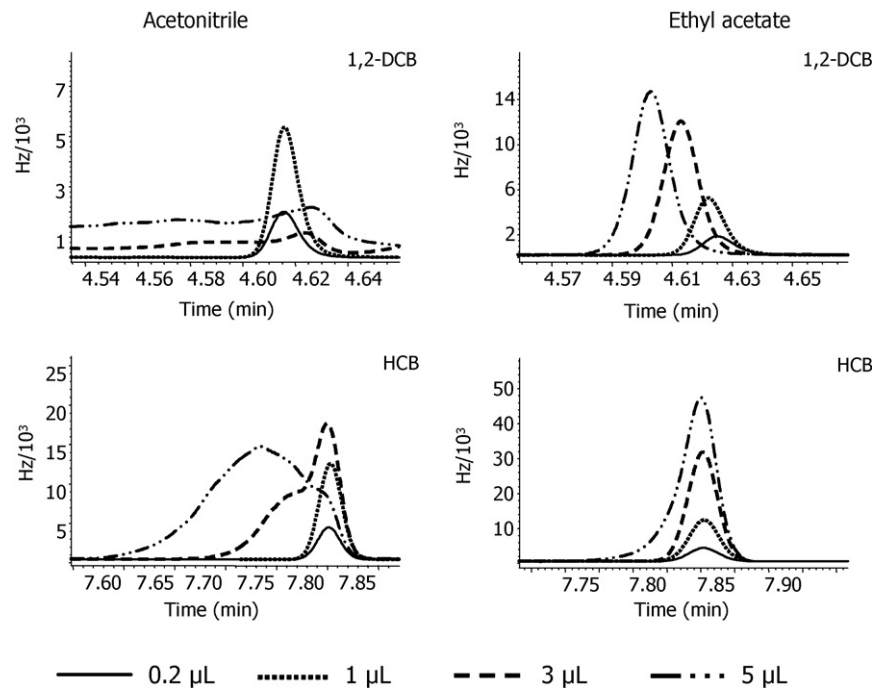


Fig. 3. GC/ECD chromatograms obtained by injecting (solvent vent injection mode) different volumes of semivolatle compound solutions in acetonitrile and ethyl acetate.

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 semivolatle 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 semivolatle 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 semivolatle 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

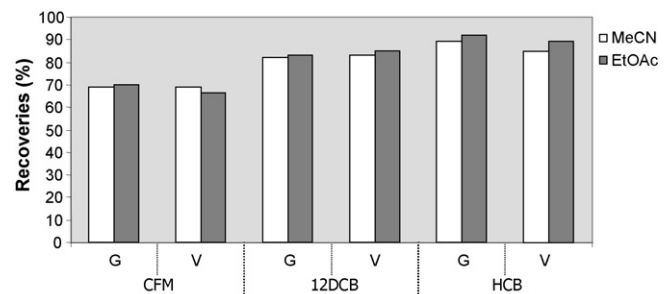


Fig. 4. Average recoveries of selected compounds from garden soil (G) and Vertisol (V).

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 semivolatiles 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 expense 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 ($MgSO_4$ 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)
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)

^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. $MgSO_4$ 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 $MgSO_4$ 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 $MgSO_4$ 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 $MgSO_4$ 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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for CFM, 50–2400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for 1,2-DCB, and 10–400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for HCB) and well above the detection limits (2.2, 1.3, and 0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 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. Curyło, 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. Diez, 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. Koesukwiwat, K. Sanguankaw, N. Leepipatpiboon, Anal. Chim. Acta 626 (2008) 10.
- [16] F.J. Schenck, A.N. Brown, L.V. Podhorniak, 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. Garcia-Reyes, M.D. Hernandez, C. Ferrer, A. Molina-Diaz, 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. Hercegova, 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.



X

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA
VERSIÓN SIMPLIFICADA DE LA
METODOLOGÍA QuEChERS PARA LA
DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS C1-C3
HALOGENADOS Y CLOROBENCENOS EN
SUELOS**

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día los suelos están sometidos a distintos procesos de contaminación por compuestos químicos. Los suelos son matrices complejas, cuya composición es altamente heterogénea. Los contaminantes, una vez llegan al suelo, experimentan interacciones físico-químicas con los componentes minerales y orgánicos de la matriz. El resultado final depende de los parámetros termodinámicos de la retención, infiltración, evaporación, disolución y de la biodegradación de los compuestos, que determinan finalmente su distribución y acumulación en los diferentes componentes del ecosistema [1].

Los compuestos orgánicos halogenados volátiles (*volatile halogenated organic compounds*, VHOCs) y los clorobencenos han recibido especial atención como contaminantes en suelos [2-5]. Los VHOCs se han utilizado principalmente como disolventes, productos de limpieza o desengrasantes, modificadores de reacciones de polimerización y fluidos de intercambio de calor [6]. Dentro de este grupo se incluyen compuestos sospechosos de ser cancerígenos, como, por ejemplo, el tetracloroetileno (incluido en la clase 2A por el IARC) [7,8]. Los clorobencenos también se introducen en el medio ambiente en cantidades considerables como consecuencia de su uso como disolventes, fluidos dieléctricos, aromas y como intermediarios en la fabricación de otros compuestos químicos, tales como pesticidas, fenoles y colorantes [3,9]. Se encuentran de forma frecuente en los residuos industriales, tanto sólidos como líquidos, así como en las descargas a la atmósfera. El clorobenceno, 1,2-diclorobenceno, 1,3-diclorobenceno, 1,4-diclorobenceno, 1,2,4-triclorobenceno y el hexaclorobenceno se incluyen en la lista de contaminantes prioritarios en matrices acuosas declarada por la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (US-EPA) [10] y algunos de ellos, como el hexaclorobenceno, son cancerígenos para los seres humanos [11].

Estos dos grupos de compuestos se incluyen en la “Guía para el cribado de suelos” de la EPA, que ayuda a estandarizar y acelerar la evaluación y limpieza de aquellos suelos contaminados cuyo uso futuro es el de área residencial [12].

Habitualmente los suelos requieren una etapa de pretratamiento de muestra previa a su análisis instrumental. Esta etapa implica el aislamiento de los compuestos de interés de la matriz primaria y su transferencia a una matriz secundaria, con la eliminación simultánea de sustancias interferentes. Se han propuesto varias técnicas para la determinación de estos compuestos en suelos. Para el caso de los analitos volátiles, se han utilizado purga y trampa (P&T) [4,5,13,14], purga y membrana (*purge and membrane*, PAM) [2,15], generación de espacio de cabeza estático (SHS) [16,17] o microextracción en fase sólida en la modalidad de espacio de cabeza (HS-SPME) [3,18,19]. Para los analitos semivolátiles y no volátiles (como el hexaclorobenceno), se ha utilizado la extracción Soxhlet [20,21], la microextracción en fase líquida (LPME) [9], la extracción con agua subcrítica presurizada (PSWE) [22-24], la extracción con disolventes asistida por ultrasonidos (USE) [25-27] y la extracción con disolventes asistida por microondas (MAE) [28,29].

En el año 2003, el grupo de Anastassiades y colaboradores [30] introdujeron el procedimiento QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*) para el análisis de pesticidas en frutas y verduras. Este procedimiento implica una etapa inicial de extracción de la muestra con acetonitrilo, seguida de una partición líquido-líquido, llevada a cabo mediante la adición de MgSO₄ anhidro y NaCl. Tanto la eliminación de agua residual como la etapa de limpieza tienen lugar de forma simultánea, mediante un procedimiento denominado extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE). Aunque el procedimiento QuEChERS se ha utilizado principalmente para la determinación de un gran número de pesticidas en matrices de alimentos [31-33], también se han determinado compuestos

farmacéuticos [34], antibióticos β -lactámicos [35], productos veterinarios [36,37] o hidrocarburos policíclicos aromáticos [38] en matrices biológicas. Respecto a matrices de suelos, el procedimiento QuEChERS se ha aplicado de forma reciente al análisis de pesticidas, insecticidas y fungicidas [26,39-42] y fenoles y cresoles [43] en diferentes tipos de suelos.

2. OBJETIVO

En el capítulo anterior se evaluó una versión simplificada del procedimiento QuEChERS para el análisis de suelos, utilizando tres compuestos halogenados (cloroformo, 1,2-diclorobenceno y hexaclorobenceno) como analitos prueba [44]. Se demostró que la etapa de limpieza (d-SPE) era innecesaria, como consecuencia de la naturaleza no grasa de las muestras analizadas, así como del alto grado de selectividad y sensibilidad del detector utilizado, un micro-detector de captura electrónica (μ ECD). De forma reciente se ha propuesto la determinación de trihalometanos en suelos utilizando este método simplificado de QuEChERS [45,46].

El objetivo principal del presente trabajo es optimizar y validar una metodología basada en la versión simplificada de QuEChERS para la extracción y determinación de contaminantes volátiles y semivolátiles en suelos. Se han seleccionado siete compuestos clorados comunes y cuatro clorobencenos, incluyendo el 1,2-diclorobenceno y el hexaclorobenceno. Las medidas se han llevado a cabo acoplado un inyector de temperatura programada (PTV) a un cromatógrafo de gases (GC) y a un micro-detector de captura electrónica (μ ECD).

3. EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos y disoluciones estándar

Los estándares analíticos del 1,2-dicloroetano, tetracloruro de carbono, 1,3-dicloropropileno, 1,1,2-tricloroetano, tetracloroetileno, 1,1,2,2-tetracloroetano, 1,4-diclorobenceno, 1,2-diclorobenceno, hexacloroetano, 1,2,4-triclorobenceno y hexaclorobenceno fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Las propiedades físicas de los compuestos en estudio se muestran en la tabla 1. El acetonitrilo (MeCN) era de Merck (Darmstadt, Alemania) y el acetato de etilo (EtOAc) y de propilo (PrOAc) eran de Sigma-Aldrich. El sulfato magnésico anhidro (MgSO_4) y el cloruro sódico (NaCl) fueron suministrados por Scharlau (Barcelona, España). El agua ultrapura se obtuvo mediante un sistema de purificación de agua Elgastat.

Tabla 1: *Tiempos de retención y propiedades físicas de los analitos en estudio*

Compuesto	t_R (min)	Punto de ebullición (°C)	Log $K_{o/w}$	Log $K_{o/c}$
1,2-Dicloroetano	4.17	83	1.48	1.24
Tetracloruro de carbono	4.30	77	2.64	2.24
1,3-Dicloropropileno	4.88	97-112	2.00	1.66
1,1,2-Tricloroetano	5.18	115	2.35	1.70
Tetracloroetileno	5.60	121	2.53	2.19
1,1,2,2-Tetracloroetano	6.16	147	2.39	1.97
1,4-Diclorobenceno	6.75	173	3.37	2.79
1,2-Diclorobenceno	6.85	179	3.38	2.79
Hexacloroetano	7.04	185	3.9	3.25
1,2,4-Triclorobenceno	7.44	214	3.98	3.25
Hexaclorobenceno	10.25	323	6.2	4.74

Se prepararon disoluciones patrón de cada compuesto (500 mg/L en acetato de etilo) y se almacenaron a una temperatura de 4 °C en una nevera.

Se prepararon disoluciones de trabajo que contenían los once compuestos por dilución en acetato de etilo a los niveles de concentración requeridos, de forma previa a la optimización de las condiciones instrumentales y al dopaje de las muestras de suelo.

3.2. Muestras de suelos

Se utilizaron matrices de suelos para determinar las características analíticas del método y para estudiar la viabilidad de utilizar diferentes disolventes de extracción y el efecto de la adición de agua y NaCl en el rendimiento de la extracción. Se utilizaron dos tipos de suelos, con características muy diferentes respecto a su capacidad de sorción: un suelo con un contenido de materia orgánica elevado, procedente de jardín público (Salamanca, España) y un suelo comercial (compuesto principalmente por acilla y marga) no contaminado, suministrado por LGC Promochem (RTC-CLN SOIL-2, LG Promochem, Barcelona, España).

Con el fin de evitar la presencia de los compuestos de interés en los suelos, éstos se secaron en contacto con la atmósfera sobre una placa calefactora a 90 °C, durante 48 horas, removiendo de forma frecuente. Con este procedimiento se conseguía eliminar del suelo la humedad y prácticamente cualquier traza de compuesto orgánico volátil presente en él. Se confirmó la ausencia de analitos sometiendo una porción de dicho suelo al proceso de extracción, con la posterior inyección del extracto en el sistema cromatográfico.

Para dopar las muestras, se depositaron 20 g de suelo en un frasco ámbar de 100 mL, y sobre él se añadieron 2 mL de una disolución de los analitos objeto de estudio en EtOAc (a las concentraciones adecuadas). El frasco se cerró herméticamente y se agitó vigorosamente durante 15 minutos para conseguir la perfecta homogeneización de los compuestos en la matriz.

Finalmente, las muestras fueron almacenadas en una nevera, a una temperatura de 4 °C.

Para validar el método optimizado, se analizaron dos materiales de referencia (CRMs). Uno de ellos era un suelo arcillo-limoso (RTC-CRM631), mientras que el segundo era un suelo arcilloso (RTC-CRM635). Ambos suelos fueron suministrados por LGC Promochem (Barcelona, España).

3.3. Procedimiento analítico

En la figura 1 se esquematiza el procedimiento analítico completo, incluyendo la extracción de la muestra, la inyección en el sistema cromatográfico utilizando un inyector de temperatura programada, la separación de los compuestos y la detección en el μ -ECD. Las condiciones experimentales se resumen en los siguientes apartados.

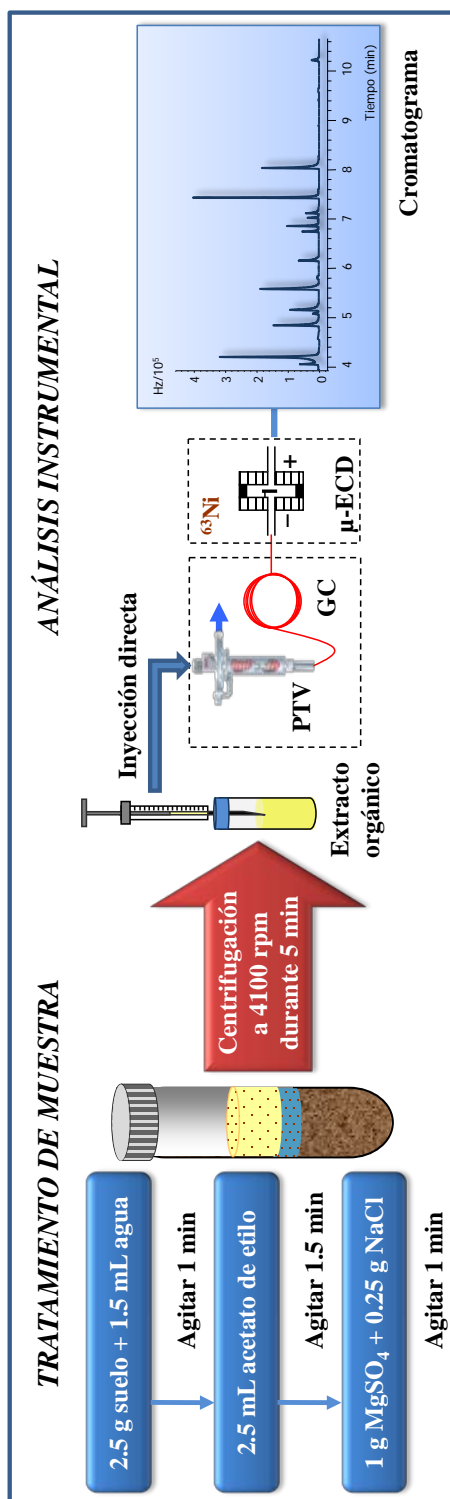


Figura 1: Diagrama completo del procedimiento analítico

3.3.1. Tratamiento de muestra

La extracción se llevó a cabo tomando como base la versión simplificada del método QuEChERS descrita en el capítulo anterior [44]. De forma resumida, se pesaron 2.5 g de suelo dopado en un tubo de centrifuga de 15 mL con tapón roscado, el cual mantuvo el tubo cerrado durante la mayor parte del procedimiento de pretratamiento de la muestra, con lo que se evitaron, en la medida de lo posible, las pérdidas de compuestos volátiles. A continuación se añadieron 1.5 mL de agua ultrapura y la mezcla se agitó durante 1 min con un Vortex. En la siguiente etapa se añadieron 2.5 mL de acetato de etilo y la mezcla se agitó de nuevo durante 1.5 min. Finalmente, se añadieron 1.25 g de sales (1 g MgSO_4 + 0.25 g NaCl), agitando la mezcla durante 1 min. Los tubos fueron centrifugados a 4100 rpm durante 5 min y una porción del disolvente orgánico fue sometida al análisis cromatográfico.

3.3.2. Inyector de temperatura programada

Se inyectó una porción de 3 μL de muestra en el sistema cromatográfico, con ayuda de un inyector de muestras líquidas automatizado (Agilent 7683). Todos los experimentos se realizaron con un inyector PTV Agilent 6890, en el modo de inyección *solvent-vent*. 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. El enfriamiento se conseguía mediante la utilización de CO_2 .

La temperatura inicial del inyector fue 30 °C. El flujo de venteo se ajustó a 20 mL/min, y la presión de venteo a 5.00 psi. Tras 0.5 min, la válvula de *split* se cerró y el *liner* se calentó rápidamente a 12 °C/s hasta 300 °C. Los analitos fueron transferidos del *liner* a la columna cromatográfica (1.5 min). A continuación, la válvula de *split* volvió a abrirse, y el *liner* se mantuvo a 300 °C durante 5.00 min.

3.3.3. Análisis instrumental GC- μ ECD

El análisis instrumental se llevó a cabo con un cromatógrafo Agilent 7890A, equipado con un micro-detector de captura electrónica (Ni^{63} , μ ECD). Para cromatografía de gases rápida se utilizó una columna capilar DB-VRX (20 m x 0.18 mm x 1 μm) de Agilent Technologies (J&W Scientific Columns, USA). El gas portador era Helio N50 (99.999% de pureza; Air Liquid).

La temperatura inicial de la columna cromatográfica era de 45 °C durante 2 min, ésta se incrementó a una velocidad de 20 °C/s hasta 105 °C, incrementándose de nuevo a 60 °C/min hasta 175 °C y, finalmente, incrementándose a 45 °C/s hasta 240 °C, valor en el que se mantuvo durante 3.05 min. Los parámetros del μ ECD fueron los siguientes: temperatura del detector, 300 °C y flujo de gas auxiliar (N_2), 20 mL/min. El tiempo total del análisis cromatográfico era 10.61 min. La recogida de los datos cromatográficos se realizó con el software GC Chemstation, G2075BA Ver. B.03.01, de Agilent Technologies.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Extracción

Se estudió cómo influían sobre la extracción de los once analitos estudiados el tipo de disolvente, la adición de sales y la adición de agua. El tipo de inyección utilizado en el PTV fue la inyección *solvent-vent*. Se utilizaron muestras de suelo dopadas con los compuestos, cada uno de ellos a una concentración determinada, en función de la sensibilidad del detector. Estas concentraciones fueron: 50 mg/kg para el 1,2-dicloroetano; 10 mg/kg para el 1,3-dicloropropileno, 1,1,2-tricloroetano, 1,4-diclorobenceno y el 1,2-diclorobenceno; 5 mg/kg para el tetracloruro de carbono y el 1,2,4-triclorobenceno; 1 mg/kg para el 1,1,2,2-tetracloroetano; 0.5 mg/kg para el tetracloroetileno y 0.2 mg/kg para el hexacloroetano y el hexaclorobenceno.

Como disolventes de extracción se estudiaron: acetonitrilo (MeCN), acetato de etilo (EtOAc) y acetato de propilo (PrOAc). Para este estudio se utilizaron dos tipos de suelos, un suelo de jardín y un suelo arcilloso comercial no contaminado.

Los analitos eran estables y solubles en todos los disolventes estudiados. En el caso del PrOAc, se observó una distorsión de los picos en la zona inicial de los cromatogramas, incluso cuando se inyectaban volúmenes pequeños (0.2 μL). Se observó el mismo efecto para el MeCN, para volúmenes de inyección de 1 μL , mientras que para el EtOAc no se observó este comportamiento con el mismo volumen de inyección (figura 2).

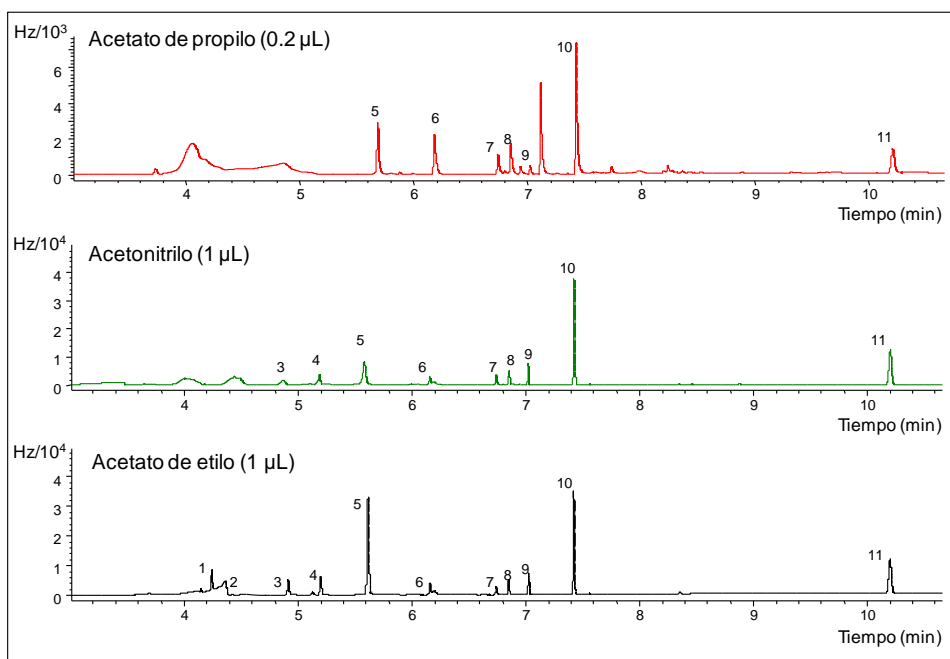


Figura 2: Cromatogramas obtenidos al inyectar diferentes volúmenes de extractos de suelo en acetato de propilo (0.2 µL), acetonitrilo (1 µL) y acetato de etilo (1 µL). **1** 1,2-dicloroetano, **2** tetracloruro de carbono, **3** 1,3-dicloropropileno, **4** 1,1,2-tricloroetano, **5** tetracloroetileno, **6** 1,1,2,2-tetracloroetano, **7** 1,4-diclorobenceno, **8** 1,2-diclorobenceno, **9** hexacloroetano, **10** 1,2,4-triclorobenceno, **11** hexaclorobenceno

Este comportamiento puede atribuirse al hecho de que el acetato de propilo y el acetonitrilo, con puntos de ebullición de 102 °C y 81 °C, respectivamente, en comparación con el acetato de etilo, con un punto de ebullición de 77 °C, no se eliminan adecuadamente e interfieren en la separación cromatográfica. Una modificación de las condiciones del PTV para una mayor eliminación del disolvente no era posible sin la eliminación simultánea de los analitos más volátiles.

Se comparó la capacidad de extracción del acetonitrilo y del acetato de etilo, utilizando un volumen de inyección de 0.2 µL. No se observaron diferencias significativas entre los dos disolventes, excepto para los dos

compuestos iniciales en el suelo de jardín, para los cuales el EtOAc era la mejor elección. A la vista de los resultados obtenidos, ambos disolventes eran adecuados para la extracción, pero se seleccionó el acetato de etilo, ya que era más volátil que el MeCN y presentaba mejores características cromatográficas.

Una vez seleccionado el disolvente de extracción, se llevó a cabo un estudio de la influencia de la adición de sales durante el proceso de extracción, en el intervalo de 0.0 a 2.0 g para el MgSO_4 , y entre 0.0 y 0.50 g para el NaCl. Cuando no se añadía ninguna sal al medio, la separación de fases no tenía lugar de forma adecuada, como consecuencia de la solubilidad del EtOAc en el agua. Se observó que la adición de diferentes cantidades de sales no producía una variación muy acusada en las señales obtenidas. Sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron manteniendo las proporciones del procedimiento QuEChERS original (1 g MgSO_4 + 0.25 g NaCl por 2.5 g de muestra).

También se estudió la influencia de la adición de agua, con el objeto de hacer los poros más accesibles para el disolvente de extracción, así como para homogeneizar el contenido de agua de las diferentes muestras de suelos. Se observó que, si la extracción se llevaba a cabo sin la adición de agua, quedaban partículas sólidas en la fase orgánica, incluso después de centrifugar las muestras. Se añadieron dos volúmenes de agua a 2.5 g de suelo, 1.5 mL y 2.5 mL. Se obtuvieron resultados análogos, por lo que se seleccionó trabajar con 1.5 mL.

En la figura 3 se comparan los cromatogramas obtenidos cuando se inyectó una disolución en acetato de etilo con los compuestos en estudio, y cuando se inyectó un extracto de un suelo de jardín. Como puede observarse, los cromatogramas son bastante similares, con la presencia en el cromatograma del suelo de jardín de otros compuestos que están presentes de forma natural en la matriz, pero que no interfieren en el análisis. Los

picos eran igualmente fáciles de integrar. Dado que los extractos obtenidos eran limpios, no se consideró la necesidad de llevar a cabo ningún proceso de limpieza de extracto previo al análisis cromatográfico.

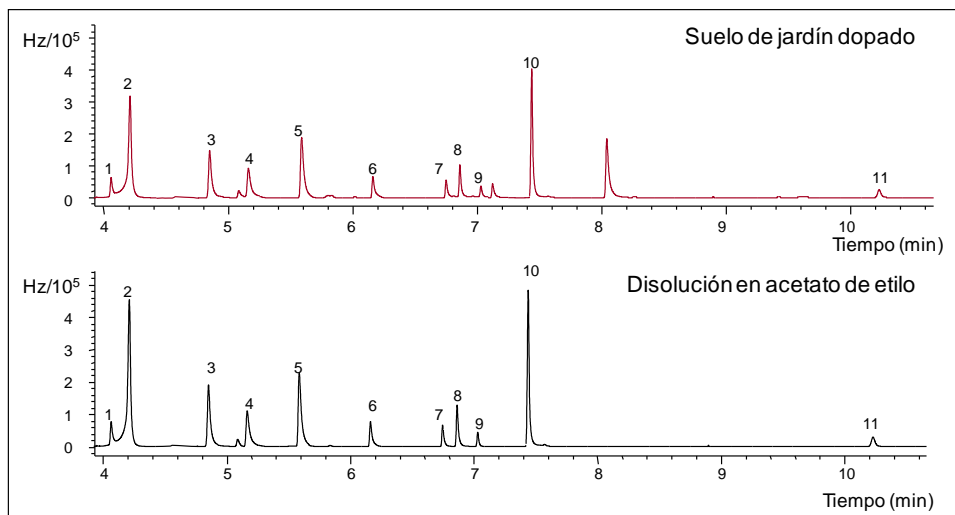


Figura 3: Comparación de los cromatogramas obtenidos al inyectar una disolución en acetato de etilo de los compuestos, y al inyectar un extracto de suelo de jardín en acetato de etilo. **1** 1,2-dicloroetano, **2** tetracloruro de carbono, **3** 1,3-dicloropropileno, **4** 1,1,2-tricloroetano, **5** tetracloroetileno, **6** 1,1,2,2-tetracloroetano, **7** 1,4-diclorobenceno, **8** 1,2-diclorobenceno, **9** hexacloroetano, **10** 1,2,4-triclorobenceno, **11** hexaclorobenceno

4.2. PTV-GC- μ ECD

4.2.1. Optimización del inyector de temperatura programada

Una vez fijadas las condiciones de extracción, se optimizó el modo de inyección. Para este estudio, se utilizaron disoluciones en acetato de etilo de los compuestos, a los siguientes niveles de concentración: 2.5 mg/L para el 1,2-dicloroetano; 0.25 mg/L para el tetracloruro de carbono, 1,1,2-tricloroetano, 1,4-diclorobenceno, 1,2-diclorobenceno y el 1,2,4-triclorobenceno; 125 μ g/L para el 1,3-dicloropropileno; 50 μ g/L para el

hexaclorobenceno; 25 $\mu\text{g/L}$ para el 1,1,2,2-tetracloroetano y 12.5 $\mu\text{g/L}$ para el tetracloroetileno y el hexacloroetano.

Entre los modos de inyección permitidos por el PTV, se seleccionó el modo *solvent-vent*. Para garantizar la retención de los analitos en el *liner* durante el proceso de eliminación del disolvente, se utilizó un *liner* relleno de Tenax-TA. Éste es un polímero poroso hidrofóbico designado específicamente para la retención de compuestos orgánicos. Su uso es especialmente importante para los analitos más volátiles del conjunto estudiado.

Las variables optimizadas en el modo de inyección *solvent-vent* fueron: volumen de inyección, temperatura de venteo, flujo de venteo, tiempo de venteo y tiempo de inyección.

Respecto al volumen de inyección, se estudiaron los valores de 0.2, 1, 2 y 5 μL . A medida que aumentaba el volumen, también lo hacía la señal. El aumento entre 0.2 μL y 3 μL era proporcional. Sin embargo, para 5 μL , el aumento no era tan acusado, excepto para los compuestos menos volátiles. Se seleccionó un volumen de trabajo de 3 μL .

Para el caso de la temperatura inicial del *liner*, o temperatura de venteo, se estudiaron los valores de 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40 y 50 $^{\circ}\text{C}$. Para el flujo y el tiempo de venteo, se estudiaron los valores de 10, 20, 30, 40 y 50 mL/min , y 0.25, 0.50, 0.75 y 1 min, respectivamente. A medida que los valores de estas variables aumentaban, la señal de los compuestos más volátiles (del 1,2-dicloroetano al tetracloroetileno, de 77 $^{\circ}\text{C}$ a 121 $^{\circ}\text{C}$) disminuía, manteniéndose constante para el resto de compuestos. Sin embargo, para valores bajos, los tiempos de retención de estos compuestos volátiles variaban, debido, probablemente, a que no se producía la eliminación del disolvente. Se seleccionaron valores de compromiso para la temperatura, flujo y tiempo de venteo de 30 $^{\circ}\text{C}$, 20 mL/min y 0.5 min, respectivamente, para los cuales los tiempos de retención permanecían constantes.

El tiempo de inyección se estudió entre los valores de 1.0 y 2.0 min. La máxima señal se obtuvo para 1.5 min, tiempo suficiente para la transferencia total de los analitos a la columna cromatográfica.

Finalmente, se comprobó que el modo de inyección seleccionado era el más adecuado. Para ello, se compararon las señales obtenidas, inyectando el mismo volumen (3 μL), en el modo de inyección *splitless* caliente (250 °C, tiempo de *splitless*, 2 min) y *solvent-vent*. Para el caso de los compuestos más volátiles, la señal obtenida con el modo *solvent-vent* era ligeramente inferior, con una disminución entre el 20 % para el 1,2-dicloroetano y el 8 % para el tetracloroetileno. Por el contrario, para el caso de los compuestos menos volátiles (desde el 1,1,2,2-tetracloroetano hasta el hexaclorobenceno, de 147 °C hasta 323 °C) las señales óptimas se obtenían con el modo *solvent-vent*, debido a que se producía distorsión de los picos en el modo *splitless* caliente (figura 4). Este comportamiento se ha citado anteriormente [47]. Cuando se inyectan volúmenes de muestra grandes, los compuestos con un punto de ebullición elevado se extienden al condensar parte del disolvente en cabeza de columna, y los picos se ensanchan y se distorsionan por lo que se conoce como “ensanchamiento de banda en el espacio”.

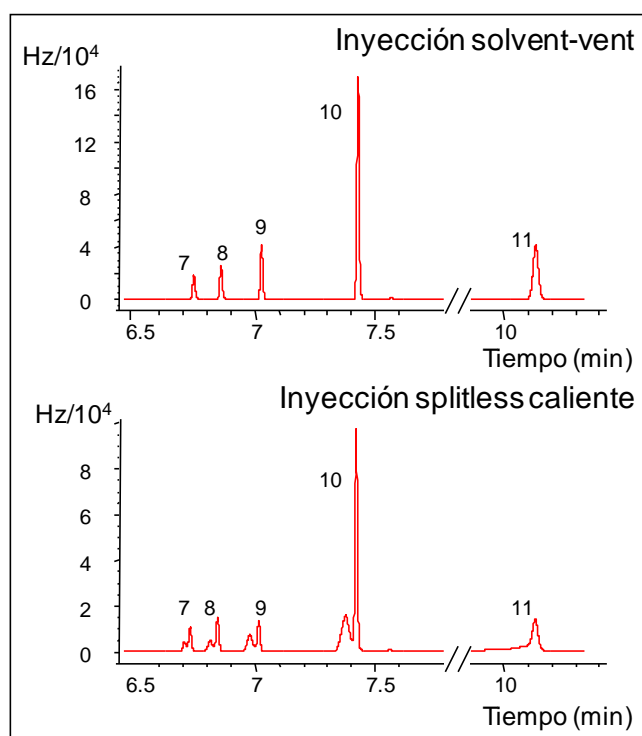


Figura 4: Comparación de las señales obtenidas con el modo de inyección *solvent-vent* y *splitless caliente*. En ambos casos, el volumen de inyección era 3 μL . **7** 1,4-dicloro benceno, **8** 1,2-diclorobenceno, **9** hexacloroetano, **10** 1,2,4-triclorobenceno, **11** hexaclorobenceno

Por lo tanto, se observó que, aunque el modo *solvent-vent* es más habitual para analitos menos volátiles que el disolvente, también puede ser utilizado en métodos en los cuales el punto de ebullición de los compuestos es próximo al del disolvente, tras una optimización adecuada de los diferentes parámetros.

4.3. Estudio del efecto matriz

Los suelos son matrices muy complejas y diversas, en las cuales es difícil alcanzar una extracción exhaustiva de los compuestos. Se estudió la

existencia de efecto de matriz utilizando dos tipos de suelos, un suelo de jardín y un suelo arcilloso comercial no contaminado. Las dos matrices seleccionadas son muestras extremas, el suelo de jardín se caracteriza por su alto contenido en materia orgánica, mientras que el suelo comercial tiene un contenido en arcilla muy elevado. Estas diferencias determinar su capacidad de sorción.

Los dos suelos seleccionados se doparon a cuatro niveles de concentración (tabla 2). Cada nivel se analizó por triplicado, y se compararon las pendientes obtenidas con cada suelo.

Tabla 2: Comparación de las pendientes obtenidas para cada tipo de suelo

Compuesto	Concentración (µg/kg)	Pendientes	
		Suelo de jardín	Suelo arcilloso
1,2-Dicloroetano	150-2500	1.98±0.06	2.1±0.1
Tetracloruro de carbono	150-2500	49±1	58±1
1,3-Dicloropropileno	60-1000	80±1	88±4
1,1,2-Tricloroetano	276-4600	64±2	65±3
Tetracloroetileno	15-250	2242±36	2271±82
1,1,2,2-Tetracloroetano	37.5-625	405±7	410±14
1,4-Diclorobenceno	187.5-3125	17.8±0.4	18.8±0.9
1,2-Diclorobenceno	187.5-3125	33±2	33±2
Hexacloroetano	15-250	1783±54	1878±69
1,2,4-Triclorobenceno	75-1250	246±6	249±7
Hexaclorobenceno	15-250	1004±51	967±10

Para la mayoría de los compuestos, las pendientes de calibración eran similares, con pequeñas diferencias para el tetracloruro de carbono y el 1,3-dicloropropileno, lo que confirma la ausencia de efecto matriz. Este comportamiento se ha descrito previamente, con la utilización de técnicas tales como P&T-GC o PAM-MS [2,4].

Como consecuencia de los resultados obtenidos, la predicción sobre muestras reales se llevó a cabo mediante calibración externa.

4.4. Rendimiento de la extracción

Se llevó a cabo un estudio del rendimiento de la extracción con el método optimizado, a diferentes niveles de concentración de los analitos, utilizando las mismas matrices que en el caso anterior (suelo de jardín y suelo arcilloso comercial no contaminado). Se compararon las señales obtenidas cuando se inyectaba una disolución de los analitos en acetato de etilo, con las obtenidas en los extractos de suelos. En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos para cada compuesto y para cada tipo de suelo, como resultado de la media obtenida para cuatro niveles de concentración.

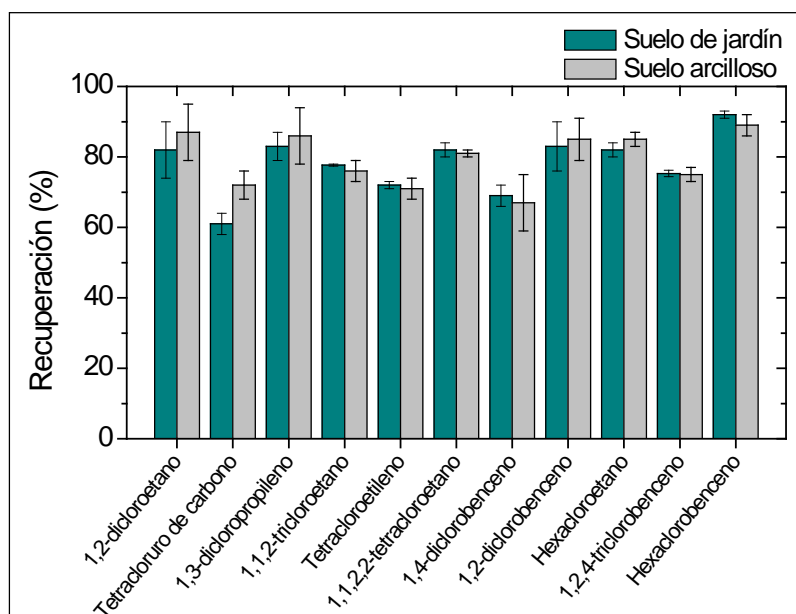


Figura 4: Rendimientos de extracción para cada compuesto en cada uno de los suelos estudiados

Las recuperaciones obtenidas se encontraban entre el 61 % y el 92 %, con desviaciones estándar relativas que no excedían el 10 %. Los rendimientos eran similares en ambos tipos de suelos.

4.5. Validación del método

Se estudiaron las características analíticas del método utilizando muestras de suelo de jardín. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3. Se obtuvieron rectas de calibrado para cada compuesto. Como señal analítica, se utilizó el área de pico. Los modelos de calibración mostraban comportamiento lineal. Se comprobó la validez del modelo utilizando análisis de varianza (ANOVA) y se observó que ninguno de ellos presentaba fallo de ajuste. Los valores del coeficiente de correlación (R^2) eran superiores a 0.99.

Se estudió la repetibilidad del método optimizado, inyectando la misma muestra diez veces. En todos los casos se obtuvieron valores inferiores al 4 %.

También se estudió la reproducibilidad del método, inyectando extractos de 10 porciones de suelo diferentes. Los valores obtenidos son superiores a los de repetibilidad del método (en todo caso, inferiores al 12 %), ya que, en este caso, se incluyen los errores asociados a la manipulación de muestra. Se observó también que los valores más altos correspondían a los dos primeros analitos, los más volátiles y, por lo tanto, los más susceptibles de perderse durante el proceso de extracción.

Los límites de detección (LD) y los de cuantificación (LQ) se calcularon como 3.3 y 10 veces, respectivamente, la desviación estándar de una muestra con una relación S/N de 3. Los valores se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Características analíticas del método

Compuesto	Rango lineal (µg/kg)	R ²	LD (µg/kg)	LQ (µg/kg)	Repetibilidad (%)	Reproducibilidad (%)
1,2-Dicloroetano	20 - 150	0.9988	2.55	7.72	2.36	11.13
Tetracloruro de carbono	20 - 350	0.9988	0.32	0.98	1.74	10.74
1,3-Dicloropropileno	10 - 175	0.9911	0.41	1.26	2.07	6.57
1,1,2-Tricloroetano	20 - 350	0.9944	2.85	8.70	2.33	3.20
Tetracloroetileno	8 - 100	0.9984	0.062	0.188	3.02	9.01
1,1,1,2-Tetracloroetano	7.5 - 93.8	0.999	1.27	3.84	1.09	3.86
1,4-Diclorobenceno	45 - 262.5	0.9997	1.12	3.39	1.01	8.29
1,2-Diclorobenceno	20 - 350	0.9959	2.14	6.50	0.97	3.48
Hexacloroetano	15 - 150	0.997	0.030	0.090	2.29	7.79
1,2,4-Triclorobenceno	15 - 187.5	0.9986	0.46	1.39	1.17	1.07
Hexaclorobenceno	5 - 87.5	0.9997	0.050	0.152	0.89	3.33

Los LDs obtenidos se encuentran entre 30 ng/kg para el hexacloroetano, y 2.87 µg/kg para el 1,1,2-tricloroetano. Estos valores se encuentran entre los más bajos publicados y mejoran los obtenidos con técnicas tales como P&T, SHS, o sus diferentes combinaciones, HS-SPME, PAM o extracción con disolventes-P&T [2,4,15,16,18,19,48]. Aunque las técnicas de extracción de gases presentan importantes ventajas, como la simplicidad de operación sin pérdida de analitos, la eliminación del consumo de grandes volúmenes de disolventes orgánicos y la facilidad de automatización, necesitan un instrumental específico, lo que implica una inversión económica elevada, así como, en algunas ocasiones, tiempos de extracción relativamente altos. La principal ventaja de la metodología propuesta en el presente trabajo radica en la posibilidad de aplicarse para todo tipo de analitos con un coste de reactivos bajo. Además, puede ser llevada a cabo por operarios no especializados, sin la necesidad de una instrumentación específica, lo que la convierte en una alternativa válida a las anteriormente descritas.

Para la determinación de hexaclorobenceno en muestras de suelos (punto de ebullición, 323 °C) se han propuesto técnicas de extracción con disolventes. En la mayoría de los casos, los límites de detección también son mejorados con la metodología propuesta en el presente trabajo [9,23,25,28]. El procedimiento estándar de QuEChERS se ha aplicado previamente para la determinación de hexaclorobenceno en suelos [41]. Los límites de detección obtenidos con el procedimiento estándar y el simplificado (presente trabajo) son similares, pero, en el segundo caso, la eliminación de la etapa de limpieza implica una menor manipulación de la muestra, lo que se traduce en una reducción de los errores asociados a esta etapa, y también una reducción del tiempo de trabajo.

4.6. Determinación de los analitos estudiados en suelos de contenido certificado (CRM)

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el apartado “Estudio de efecto matriz”, se determinaron los analitos en suelos de contenido certificado, utilizando calibración externa en todos los casos. Se utilizaron dos materiales de referencia certificados, un suelo arcilloso (RTC-CRM635) y un suelo arcillo arenoso (RTC-CRM631). El contenido de las muestras había sido certificado utilizando el método USEPA SW846-8260 A (3ª edición) (P&T-GC-MS) [49].

Como se muestra en la tabla 4, las concentraciones encontradas en los suelos CRM631 y CRM635, utilizando el calibrado obtenido con suelo de jardín, concuerdan con los valores certificados. Todas las predicciones se encuentran dentro de los intervalos de predicción establecidos.

Tabla 4: Resultados de predicción obtenidos en los suelos de contenido certificado, utilizando calibración externa

Suelo	Compuesto	Valor de referencia (µg/kg)	Intervalo de predicción (µg/kg)	Predicción (µg/kg)
CRM 631-030	1,3-Dicloropropileno	47 ± 6	8.79 – 84.6	34 ± 7
	Tetracloroetileno	18 ± 6	0 – 37.1	15 ± 2
	1,1,2,2-Tetracloroetano	26 ± 3	10.5 - 42	23 ± 1
	1,4-Diclorobenceno	80 ± 8	30.6- 130	92 ± 4
	1,2-Diclorobenceno	114 ± 11	45.6 ± 181	145 ± 12
CRM 635-030	Tetracloruro de carbono	84 ± 8	34.5 - 133	67 ± 12
	1,2-Dicloroetano	110 ± 8	62.9 - 157	114 ± 3
	Tetracloroetileno	112 ± 11	45.2 - 178	67 ± 2
	1,1,2,2-Tetracloroetano	37 ± 3	18.7 – 55.6	34 ± 1
	1,4-Diclorobenceno	64 ± 5	32.5 - 96	59 ± 3
	1,2-Diclorobenceno	90 ± 6	54.8 - 125	89 ± 10

En el caso de aquellos compuestos no presentes en los suelos de contenido certificado, la capacidad predictiva del modelo se evaluó

dopando ambos suelos CRM con los analitos en cuestión a varios niveles de concentración, obteniéndose la predicción mediante calibración externa. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Los valores de predicción coinciden con las concentraciones utilizadas para dopar los suelos, con pequeñas diferencias para el hexacloroetano en el suelo CRM 635, para el cual se obtienen valores ligeramente inferiores.

Tabla 4: Resultados de predicción obtenidos en los suelos de contenido certificado dopados con los analitos inicialmente no presentes

Suelo	Compuesto	Concentración (µg/kg)	Predicción (µg/kg)
CRM 631-030	1,1,2-Tricloroetano	43.75	45 ± 10
		131.25	134 ± 10
	Hexacloroetano	33	31 ± 5
		98	103 ± 5
	1,2,4-Triclorobenceno	66	64 ± 3
		131	130 ± 3
Hexaclorobenceno	10.9	11.4 ± 0.7	
	32.8	31.9 ± 0.7	
CRM 635-030	1,1,2-Tricloroetano	87.5	84 ± 10
		175	173 ± 10
	Hexacloroetano	33	24 ± 5
		66	44 ± 7
	1,2,4-Triclorobenceno	33	34 ± 3
		98	99 ± 3
Hexaclorobenceno	10.9	10.1 ± 0.8	
	21.8	21.1 ± 0.7	

5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se propone una versión simplificada del procedimiento QuEChERS para la determinación de siete hidrocarburos halogenados y cuatro clorobencenos en matrices de suelos contaminados. El método propuesto es rápido, sencillo, barato, efectivo, robusto y seguro, y, por lo tanto, cumple las características del procedimiento QuEChERS original.

Se estudiaron tres disolventes de extracción. Se seleccionó el acetato de etilo, tras compararlo con el acetonitrilo, como consecuencia de su mejor comportamiento cromatográfico.

Se obtuvieron extractos limpios de suelos sin la necesidad de una etapa de limpieza previa al análisis cromatográfico, lo que supone una reducción de la manipulación de muestra y de los errores asociados a esta etapa. Tras comparar las pendientes obtenidas al preparar calibrados en dos suelos diferentes, se observó que no existía efecto de matriz.

El método propuesto presenta una buena reproducibilidad y es altamente sensible, con límites de detección entre 30 ng/kg y 2.85 µg/kg. Se verificó la exactitud del método analizando dos suelos de contenido certificado y los resultados obtenidos fueron satisfactorios.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] I.P. Breus, A.A. Mishchenko, *Eurasian Soil Sci.* 39 (2006) 1271.
- [2] M. Ojala, I. Mattila, V. Tarkiainen, T. Särme, R.A. Ketola, A. Määttänen, R. Kostiainen, T. Kotiaho, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3624.
- [3] F.J. Santos, M.N. Sarrión, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 771 (1997) 181.
- [4] N. Campillo, P. Viñas, I. López-García, N. Aguinaga, M. Hernández-Córdoba, *Talanta* 64 (2004) 584.
- [5] O. Zuloaga, N. Etxebarria, L.A. Fernández, J.M. Madariaga, *Anal. Chim. Acta* 416 (2000) 43.
- [6] N. Jakubowska, B. Zygmunt, Z. Polkowska, B. Zabiegala, J. Namiésnik, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 422.
- [7] International Agency for Research on Cancer (IARC) (1987) Overall Evaluations of Carcinogenicity, An Updating of IARC Monographs. In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Suppl. 7, World Health Organization, Geneva.
- [8] International Agency for Research on Cancer (IARC) (1995) Dry Cleaning, Some Chlorinated Solvents and Other Industrial Chemicals. In: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 63, World Health Organization, Geneva.
- [9] L. Hou, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A* 1038 (2004) 37.
- [10] U.S. Environmental Protection Agency, Health Assessment Document for Chlorinated Benzenes. Washington, DC, 1985.
- [11] World Health Organization (WHO) (1991) Chlorobenzenes other than Hexachlorobenzene: Environmental Aspects, Vol. 60, Geneva.
- [12] US EPA (1996) Soil Screening Guidance: User's Guide, Office of Emergency and Remedial Response. US Government Printing Office, Washington, USA.
- [13] P. Roose, J. Dewulf, U.A.T. Brinkman, H. Van Langenhove, *Wat. Res.* 35 (2001) 1478.

-
- [14] US EPA (1996) Method 5035: Closed System Purge and Trap Extraction for Volatile Organics in Soil and Waste Samples. In: Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846. US Government Printing Office, Washington, USA.
- [15] R. Kostianen, T. Kotiaho, I. Mattila, T. Mansikka, M. Ojala, R.A. Ketola, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3028.
- [16] A. Serrano, M. Gallego, *J. Chromatogr. A* 1118 (2006) 261.
- [17] US EPA (1996) Method 5021: Volatile Organic Compounds in Soils and Other Solid Matrices Using Equilibrium Headspace Analysis. In: Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846. US Government Printing Office, Washington, USA.
- [18] M. Llompart, K. Li, M. Fingas, *Talanta* 48 (1999) 451.
- [19] X. Li, Z. Zeng, Y. Xu, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 1428.
- [20] F.P.S. Airoidi, V.G. Zuin, M.D. Landgraf, M.O.O. Rezende, *Environmentalist* 25 (2005) 47.
- [21] US EPA (1996) Method 3540: Soxhlet Extraction. In: Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846. US Government Printing Office, Washington, USA.
- [22] R. Rodil, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1124 (2006) 82.
- [23] P. Richter, B. Sepúlveda, R. Oliva, K. Calderón, R. Seguel, *J. Chromatogr. A* 994 (2003) 169.
- [24] US EPA (1996) Method 3545: Pressurized Fluid Extraction. In: Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846. US Government Printing Office, Washington, USA.
- [25] C. Gonçalves, M.F. Alpendurada, *Talanta* 65 (2005) 1179.
- [26] C. Lesueur, M. Gartner, A. Mentler, M. Fuerhacker, *Talanta* 75 (2008) 284.
- [27] US EPA (1996) Method 3550: Ultrasonic Extraction. In: Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846. US Government Printing Office, Washington, USA.

- [28] P. Herbert, S. Morais, P. Paíga, A. Alves, L. Santos, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 810.
- [29] US EPA (1996) Method 3546: Microwave Extraction. In: *Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846*. US Government Printing Office, Washington, USA.
- [30] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Štajnbaher, F.J. Schenck, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412.
- [31] S.J. Lehotay, (2010) In: J. Zweigenbaum (Ed.), *Pesticide Protocols, Methods in Biotechnology Series*, Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- [32] M.A. González-Curbelo, J. Hernández-Borges, L.M. Ravelo-Pérez, M.A. Rodríguez-Delgado, *Food Chem.* 125 (2011) 1083.
- [33] P. Payá, M. Anastassiades, D. Mack, I. Sigalova, B. Tasdelen, J. Oliva, A. Barba, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 1697.
- [34] F. Plössl, M. Giera, F. Bracher, *J. Chromatogr. A* 1135 (2006) 19.
- [35] K. Mastovska, A.R. Lightfield, *J. Chromatogr. A* 1202 (2008) 118.
- [36] G. Stubbings, T. Bigwood, *Anal. Chim. Acta* 637 (2009) 68.
- [37] B. Kinsella, S.J. Lehotay, K. Mastovska, A.R. Lightfield, A. Furey, M. Danaher, *Anal. Chim. Acta* 637 (2009) 196.
- [38] M.J. Ramalhosa, P. Paíga, S. Morais, C. Delerue-Matos, M.B.P.P. Oliveira, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 3529.
- [39] D. Drożdżyński, J. Kowalska, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 2241.
- [40] L. Chen, X.S. Li, Z.Q. Wang, C.P. Pan, R.C. Jin, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73 (2010) 73.
- [41] A. Rashid, S. Nawaz, H. Barker, I. Ahmad, M. Ashraf, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2933.
- [42] M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, L.M. Ravelo-Pérez, M.A. Rodríguez-Delgado, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 2307.
- [43] J.A. Padilla-Sánchez, P. Plaza-Bolaños, R. Romero-González, A. Garrido-Frenich, J.L. Martínez-Vidal, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 5724.

-
- [44] C.G. Pinto, M.E.F. Laespada, S.H. Martín, A.M.C. Ferreira, J.L.P. Pavón, B.M. Cordero, *Talanta* 81 (2010) 385.
- [45] S.H. Martín, C.G. Pinto, J.L.P. Pavón, B.M. Cordero, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4883.
- [46] C.G. Pinto, S.H. Martín, J.L.P. Pavón, B.M. Cordero, *Anal. Chim. Acta* 689 (2011) 129.
- [47] K. Grob, *J. Chromatogr.* 279 (1983) 225.
- [48] O.C. Amaral, L. Olivella, J.O. Grimalt, J. Albaiges, *J. Chromatogr. A* 675 (1994) 177.
- [49] US EPA (1996) Method 8260B: Volatile Organic Compounds by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. In: *Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods*, SW-846. US Government Printing Office, Washington, USA.

TRABAJO ENVIADO PARA SU PUBLICACIÓN
ARTICLE SUBMITTED FOR PUBLICATION

X

1 DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A SIMPLIFIED QuEChERS
2 EXTRACTION METHOD FOR THE DETERMINATION OF C1-C3
3 CHLORINATED HYDROCARBONS AND CHLOROBENZENES IN SOIL
4 SAMPLES

5 Ana María Casas Ferreira, María Esther Fernández Laespada, José Luis
6 Pérez Pavón*, Bernardo Moreno Cordero

7

8 Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de
9 Ciencias Químicas, Universidad de Salamanca, 37008 Salamanca, SPAIN

10

11 * Corresponding author: (fax); +34 923 294483 (e-mail) jlpp@usal.es

12

13

14 Abstract

15

16 A sensitive method based on a modified version of the Quick Easy Cheap
17 Effective Rugged and Safe (QuEChERS) sample preparation method and
18 gas chromatography with a micro-electron capture detector (μ -ECD) for the
19 analysis of chlorinated hydrocarbons and chlorobenzenes in soils has been
20 developed. A programmed temperature vaporizer (PTV) was used in the
21 solvent-vent injection mode. The effects of the variables affecting the
22 extraction procedure (extraction solvent, salt addition and water addition)
23 and the instrumental PTV conditions (injection volume, venting
24 temperature, venting flow, venting time and injection time) were studied.
25 Matrix effect was checked using two types of soil: a garden soil and a non-
26 polluted clay soil. Since the method was free of matrix effect, quantification
27 could readily be carried out by external calibration. Recoveries of the
28 analytes (higher than 70 % for most of the compounds), linearity,
29 repeatability and reproducibility, and the limits of detection (between 0.026
30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 2.61 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and limits of quantification were studied in order to
31 validate the optimized procedure in spiked soils. Accuracy was verified by
32 analyzing two certified reference materials, a silty clay soil (RTC-CRM631)
33 and a clay soil (RTC-CRM635).

34

35 Keywords: chlorinated hydrocarbons, chlorobenzenes, QuEChERS, gas
36 chromatography, μ -ECD.

37

38 **Introduction**

39

40 Currently, soils are subject to intensive contamination with chemical
41 compounds. Soil is a complex matrix whose composition is highly
42 heterogeneous. Following their arrival in the soil, contaminants enter into
43 various physicochemical interactions with the mineral and organic
44 components of the matrix. The final result depends on the rate ratios and
45 the thermodynamic parameters of the retention, infiltration, evaporation,
46 dissolution, and biodegradation of the contaminants, which finally
47 determine their partitioning and accumulation in separate components of
48 the ecosystem [1].

49 Volatile halogenated organic compounds (VHOCs) and chlorobenzenes
50 have received special attention as soil pollutants [2-5]. VHOCs have mainly
51 been used as solvents, cleaning and degreasing agents, polymerization
52 modifiers, and heat-exchange fluids [6]. This group of compounds includes
53 several suspected carcinogens; for example, tetrachloroethylene (class 2A by
54 the IARC) [7,8]. Chlorobenzenes are also introduced into the environment in
55 considerable amounts through their use as solvents, dielectric fluids,
56 deodorants, and as intermediates in the manufacture of other chemical
57 products such as pesticides, phenols and dyestuffs [3,9]. They are prevalent
58 in both solid and liquid industrial effluents and in atmospheric discharges.
59 Chlorobenzene, 1,2-dichlorobenzene, 1,3-dichlorobenzene, 1,4-
60 dichlorobenzene, 1,2,4-trichlorobenzene and hexachlorobenzene, have been
61 listed as priority pollutants in water matrices by the United States
62 Environmental Protection Agency [10] and some of them, such as
63 hexachlorobenzene, are known to be carcinogenic for humans [11].

64 These groups of chemicals have been included in the EPA Soil Screening
65 Guidance to help standardize and accelerate the evaluation and cleanup of

66 contaminated soils at sites on the National Priorities List (NPL) for future
67 residential land use [12].

68 Soil samples usually require special pretreatment prior to the final
69 analysis. Such pretreatment involves the isolation of the compounds from
70 the primary matrix and their transfer to a secondary matrix, with the
71 simultaneous removal of interfering substances.

72 Several methods have been proposed for the extraction of these
73 compounds in soil samples. For volatile analytes, purge and trap (P&T)
74 [4,5,13,14], purge-and-membrane mass spectrometry (PAM) [2,15], static
75 headspace (SHS) [16,17] or headspace-solid phase microextraction (HS-
76 SPME) [3,18,19] are usually used. In the case of semivolatile or non volatile
77 compounds (such as hexachlorobenzene) Soxhlet extraction [20,21], liquid-
78 phase microextraction (LPME) [9], subcritical water extraction [22-24],
79 ultrasonic extraction [25-27] and microwave-assisted extraction [28,29] have
80 also been proposed.

81 In 2003, Anastassiades et al. [30] introduced the quick, easy, cheap,
82 effective, rugged and safe (QuEChERS) method for the analysis of pesticide
83 residues in fruits and vegetables. The procedure involves an initial single-
84 phase extraction of the sample with acetonitrile, followed by liquid-liquid
85 partitioning, performed by the addition of anhydrous $MgSO_4$ plus NaCl.
86 Removal of the residual water and cleanup are performed simultaneously
87 by using a rapid procedure called dispersive solid-phase extraction
88 (dispersive-SPE). Although the QuEChERS method has mainly been used
89 for the determination of a broad range of pesticides in food matrices [31-33],
90 some other determinations such as for pharmaceuticals [34], β -lactam
91 antibiotics [35], veterinary drugs [36,37] or polycyclic aromatic
92 hydrocarbons [38] in biological samples have also been reported. Regarding
93 soil samples, QuEChERS has also recently been used for the analysis of

94 pesticides, insecticides and fungicides [26,39-42] and phenols and cresols
95 [43] in different types of soils.

96 In a previous work developed at our laboratory [44], a modified version
97 of the QuEChERS methodology was evaluated in soil matrices, using three
98 halogenated compounds -chloroform, 1,2-dichlorobenzene, and
99 hexachlorobenzene- as target analytes. The final clean-up step (dispersive
100 SPE) was seen to be unnecessary due to the non-fatty characteristics of the
101 soil matrices and the high degree of selectivity and sensitivity of the GC-
102 μ ECD system. Determination of trihalomethanes in soil matrices by this
103 simplified QuEChERS extraction procedure was also proposed [45].

104 The main objective of the present work was to optimize and validate a
105 simplified QuEChERS methodology for the extraction and determination of
106 volatile and semivolatile pollutants in soils. Seven common chlorinated
107 compounds and four chlorobenzenes were selected. Measurements were
108 collected using a programmed temperature vaporizer (PTV) coupled to a
109 gas chromatograph (GC) and a micro-electron capture detector (μ -ECD).

110

111

112 **Experimental**

113

114 Chemicals and standard solutions

115

116 Analytical standards of 1,2-dichloroethane, carbon tetrachloride, 1,3-
117 dichloropropylene, 1,1,2-trichloroethane, tetrachloroethylene, 1,1,2,2-
118 tetrachloroethane, 1,4-dichlorobenzene, 1,2-dichlorobenzene,
119 hexachloroethane, 1,2,4-trichlorobenzene and hexachlorobenzene were
120 supplied by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). The physical properties

121 of the compounds under study are shown in table 1. Acetonitrile was from
122 Merck (Darmstadt, Germany) and ethyl and propyl acetate were from
123 Sigma-Aldrich. Anhydrous magnesium sulphate and sodium chloride were
124 from Scharlau (Barcelona, Spain). Ultrapure quality water obtained with an
125 Elgastat UHQ water purification system was used.

126 Stock solutions (500 mg/L in ethyl acetate) of each compound were
127 prepared and stored at 4°C in a refrigerator. Working solutions containing
128 the eleven compounds were prepared by dilution with ethyl acetate at the
129 appropriate concentrations prior to optimization of the instrumental
130 conditions and the spiking of the soil samples.

131

132 Soil samples

133

134 Soil matrices were used to determine the analytical characteristics of the
135 method and to study the feasibility of using different extraction solvents
136 and the effects of the addition of water and NaCl on extraction efficiency.
137 Two types of soils that were very different regarding their sorption capacity
138 were chosen: a soil with high organic content, from a public garden
139 (Salamanca, Spain), and a commercial non-polluted clay loam purchased
140 from LGC Promochem (RTC-CLN SOIL-2, LG Promochem, Barcelona,
141 Spain).

142 In order to obtain analyte-free blank matrices of the garden soil, the
143 samples were air-dried on a heating plate at 90 °C for 48 hours, with
144 frequent turning. This procedure removes any organic traces or humidity
145 from the soil. The absence of the analytes was confirmed by subjecting a
146 portion of soil to the extraction procedure and injecting the extract into the
147 GC.

148 To spike the samples, a 20-g portion of soil was placed in an ambered 100
149 mL flask, and 2 mL of a solution of the compounds to be determined in
150 ethyl acetate (at a suitable concentration) was added. The flask was closed
151 hermetically and shaken vigorously for 15 min to achieve perfect
152 homogenization of the compounds in the matrix. The samples were stored
153 in a refrigerator (4 °C).

154 To validate the optimized method, two certified reference materials
155 (CRMs) were analyzed. The CRM soils used were a silty clay soil (RTC-
156 CRM631) and a clay soil (RTC-CRM635). Both were purchased from LGC
157 Promochem (Barcelona, Spain).

158

159 Sample treatment

160

161 Extraction and partitioning were carried out according to a modified
162 version of the QuEChERS method, as described in a previous work [44].
163 Briefly, 2.5 g of spiked soil was weighed in a 15-mL glass centrifuge tube
164 with a screw cap, which kept the tube closed during most of the sample
165 preparation step, thus reducing losses of volatile compounds. 1.5 mL of
166 deionized water was added to the soil sample and the mixture was shaken
167 for 1 min with a Vortex device. Then, 2.5 mL of ethyl acetate was added and
168 the mixture was shaken again for 1.5 min. Following this, 1.25 g of salt was
169 added (1 g MgSO_4 + 0.25 g NaCl), shaking the mixture for 1 min. The tubes
170 were centrifuged at 4100 rpm for 5 min and a portion of the organic solvent
171 was subjected to chromatographic analysis.

172

173

174

175 PTV-GC- μ ECD measurements

176

177 *Programmed temperature vaporization*

178

179 Three micro-litres of sample was introduced through an automatic liquid
180 sample injection system (Agilent 7683). All experiments were carried out
181 with an Agilent 6890 PTV inlet. The solvent-vent mode was used. The PTV
182 was equipped with a 71 mm x 2 mm liner packed with Tenax-TA, a
183 hydrophobic polymer designed to trap organics. Cooling was accomplished
184 with CO₂.

185 The injector starting temperature was 30 °C. The vent flow was adjusted
186 to 20 mL/min and the vent pressure to 5.00 psi. After 0.5 min, the split valve
187 was closed and the liner was flash-heated at 12 °C/s to 300 °C. The analytes
188 were transferred from the liner to the capillary column (1.5 min). The split
189 valve was then opened and the liner temperature was held at 300 °C for 5.00
190 min.

191

192 *Gas chromatography- μ ECD analysis*

193

194 Gas chromatographic analysis was performed with an Agilent 7890A
195 chromatograph equipped with a ⁶³Ni μ -electron capture detector. A DB-
196 VRX capillary column (20 m x 0.18 mm x 1 μ m, working range -10 to 260 °C)
197 for fast gas chromatography from Agilent J&W was used. The carrier gas
198 was helium N50 (99.995 % pure; Air Liquide). The column oven
199 temperature program involved an initial temperature of 45 °C for 2 min; an
200 increase at 20 °C/min to 105 °C, followed by an increase at 60°C/min to 175
201 °C, and finally an increase at 45 °C/min to 240 °C, holding for 3.05 min. The

202 parameters of the μ -electron capture detector were as follows: temperature,
203 300 °C and make-up flow gas (N₂), 20 mL/min. The total chromatographic
204 run time was 10.61 min. Data collection was performed with a GC
205 Chemstation, G2075BA Ver. B.03.01 software from Agilent Technologies.

206

207 **Results and discussion**

208

209 **Extraction**

210

211 Extracting solvent, salt addition and water addition parameters
212 influencing the extraction procedure for the eleven analytes were studied.
213 PTV solvent-vent injection was used. Soils spiked with the assay
214 compounds at different concentrations were used, depending on the
215 sensitivity of the detector. The concentrations used were 50 mg/kg for 1,2-
216 dichloroethane; 10 mg/kg for 1,3-dichloropropylene, 1,1,2-trichloroethane,
217 1,4-dichlorobenzene and 1,2-dichlorobenzene; 5 mg/kg for carbon
218 tetrachloride and 1,2,4-trichlorobenzene; 1 mg/kg for 1,1,2,2-
219 tetrachloroethane; 0.5 mg/kg for tetrachloroethylene and 0.2 mg/kg for
220 hexachloroethane and hexachlorobenzene.

221 Acetonitrile, ethyl acetate and propyl acetate were compared in order to
222 study their suitability as extracting solvents. Two different types of soils
223 were used: a garden soil and a commercial non-polluted clay soil.

224 The analytes were stable and soluble in all the solvents assayed. Propyl
225 acetate elicited severe distortions of the analyte peaks in the initial zone of
226 the chromatograms, even when small volumes (0.2 μ L) were injected. The
227 same effect was observed with acetonitrile, for a 1.0 μ L injection volume,
228 whereas it was not observed upon using the same volume of ethyl acetate
229 (Fig. 1). This could be attributed to the fact that propyl acetate and

230 acetonitrile, with boiling points of 102°C and 81°C, respectively as compared
231 with the 77°C of ethyl acetate are not removed adequately and interfere in
232 the chromatographic separation. Changing the PTV conditions in order to
233 ensure the elimination of the solvent was not possible without
234 simultaneously losing the most volatile analytes.

235 Extraction with acetonitrile and ethyl acetate was compared, using 0.2
236 µL injection volume. No significant differences were observed between the
237 signals afforded by the two solvents, except for the first two compounds in
238 garden soil, for which ethyl acetate was the best choice. In view of the
239 results obtained, both solvents could be adequate for analyte extraction, but
240 ethyl acetate, which is more volatile than MeCN and with better
241 characteristics with respect to solvent effects in GC, was chosen as the
242 extracting solvent.

243 Once the solvent had been selected, we performed a study of the effect of
244 the addition of salts to a spiked garden soil, in the range of 0.0 to 2.0 g for
245 MgSO₄ and of 0.0 to 0.50 g for NaCl. When no salts were added, phase
246 separation did not proceed properly owing to the solubility of ethyl acetate
247 in water. Apart from this, it was observed that the variation of the analytical
248 signals was not very marked when the amount of salts were changed.
249 However, the best results were obtained maintaining the proportions of the
250 original QuEChERS method (1 g of MgSO₄ and 0.25 g of NaCl for 2.5 g of
251 sample).

252 The addition of water in order to render the pores in the sample more
253 accessible to the extraction solvent and to homogenize the water content in
254 the different soil samples was also studied. It was observed that when soil
255 extraction was performed without adding any water, the soil particles
256 remained suspended in the organic phase, even after centrifugation.
257 Volumes of 1.5 and 2.5mL of ultrapure water were added to 2.5 g aliquots of

258 the spiked garden soil sample. Similar results were obtained such that it
259 was decided to work with 1.5 mL.

260 Fig. 2 compares the chromatograms obtained when a solution of the
261 analytes in ethyl acetate was injected with the chromatogram obtained
262 when extraction from the garden soil was performed. As may be seen, the
263 chromatograms are fairly similar, with the presence of other compounds
264 that are naturally present in the soil but that do not interfere with the
265 analytes under study. The analyte peaks were equally easy to integrate.
266 Given that clean extracts were obtained no further extract purification was
267 required prior to chromatographic analysis.

268

269 PTV-GC- μ ECD

270

271 *Optimization of the programmed temperature vaporizer*

272

273 Once the extraction conditions had been fixed, the chromatographic
274 injection mode was optimized. In this case solutions of the compounds in
275 ethyl acetate were employed, at the following concentrations: 2.5 mg/L for
276 1,2-dichloroethane; 0.25 mg/L for carbon tetrachloride, 1,1,2-trichloroethane,
277 1,4-dichlorobenzene, 1,2-dichlorobenzene and 1,2,4-trichlorobenzene; 125
278 μ g/L for 1,3-dichloropropylene; 50 μ g/L for hexachlorobenzene; 25 μ g/L for
279 1,1,2,2-tetrachloroethane and 12.5 μ g/L for tetrachloroethylene and
280 hexachloroethane.

281 Among the injection modes permitted by the PTV, the solvent-vent
282 mode was selected. In order to guarantee analyte retention in the liner
283 during solvent elimination, a liner packed with Tenax-TA was used. This is
284 a porous polymer designed to trap organics without retaining water. Its use
285 is especially important for the most volatile analytes studied here.

286 The variables optimized in the solvent vent injection were: injection
287 volume, venting temperature, venting flow, venting time and injection time.

288 The injection volume was studied for the values 0.2, 1, 3 and 5 μL . As the
289 injection volume increased so did the signal. The increase in signal between
290 0.2 and 3 μL was proportional. However, for 5 μL the signals did not
291 increase very much, except for the least volatile compounds. Accordingly, a
292 working volume of 3 μL was chosen.

293 The initial temperature of the liner, or venting temperature, was studied
294 for values of 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40 and 50 $^{\circ}\text{C}$. In the case of flow and venting
295 time, values of 10, 20, 30, 40 and 50 mL/min and 0.25, 0.50, 0.75 and 1 min,
296 were studied respectively. As these variable values increased, the signals of
297 the most volatile compounds (from 1,2-dichloroethane to
298 tetrachloroethylene, from 77 to 121 $^{\circ}\text{C}$) decreased, remaining constant for
299 the rest of the compounds. However, at low values the retention times of
300 those volatile compounds were modified, probably because not all the
301 solvent introduced into the column had been removed. A compromise
302 temperature of 30 $^{\circ}\text{C}$, 20 mL/min, and 0.5 min were chosen, since as from
303 these values the retention times remained constant.

304 The injection time was studied for values between 1.0 and 2.0 min. The
305 maximum signals were observed as from 1.5 min. This time was sufficient
306 for complete injection of the sample.

307 Finally, in order to confirm that solvent-vent was the most suitable
308 injection mode, we compared it with the signals obtained for the same
309 sample using the hot splitless injection mode (250 $^{\circ}\text{C}$, with a splitless time of
310 2 min). In both cases, the injection volume was 3 μL . In the case of the more
311 volatile compounds the signals obtained with the solvent-vent injection
312 mode were slightly lower, with a decrease ranging from 20% for 1,2-
313 dichloroethane to 8 % for tetrachloroethylene. By contrast, in the case of the
314 least volatile compounds (from 1,1,2,2-tetrachloroethane to

315 hexachlorobenzene, from 147 to 323 °C) the optimum signals were obtained
316 with the solvent-vent injection system, and a distortion of the peaks was
317 observed in the hot splitless injection mode (Fig. 3). This kind of behaviour
318 has been reported previously [46] .When large volumes of sample were
319 injected, components with an elevated boiling point were spread in the
320 column inlet by a flow of condensed solvent and their bands were
321 broadened and distorted by “band broadening in space”.

322 Accordingly, it was observed that although the solvent-vent injection
323 mode is more usual for analytes less volatile than the solvent it can also be
324 used in methods in which the boiling point range begins at values close to
325 that of the solvent, performing a suitable optimization.

326

327 Study of the matrix effect

328

329 Soil samples are highly complex and diverse matrices in which it is
330 difficult to achieve an exhaustive extraction of the compounds. The effect of
331 soil type was studied using two types of soil, a garden soil and a non-
332 polluted clay soil. The two soils analyzed here were extreme examples of
333 soil types: garden soil was characterized by its high proportion of organic
334 matter, while the commercial non-polluted soil had a high clay content.
335 These differences would affect their sorption capacity.

336 The two types of soil chosen were spiked at four different concentration
337 levels (table 2). Each level was analyzed in triplicate and the slopes of the
338 regression curves obtained were compared. For most of the compounds, the
339 slopes of the calibration graphs were similar, with small differences in the
340 case of carbon tetrachloride and 1,3-dichloropropylene, confirming the
341 absence of any matrix effect. This type of behaviour has been reported
342 previously, following the use of techniques such as purge-and-trap capillary

343 gas chromatography and purge-and-membrane mass spectrometry [2,4]. In
344 light of the results obtained, prediction using real samples can be carried
345 out with external calibration, without having to use the standard additions
346 method.

347

348 Extraction yield

349

350 We conducted the recovery study with the final optimized method at
351 different concentrations of the analytes, in the same matrices used for study
352 of the matrix effect (a garden soil and a non-polluted commercial clay soil),
353 comparing the signals obtained in the soils with those obtained upon
354 injecting ethyl acetate solutions of the analytes at the same concentrations.
355 Fig. 4 shows the results obtained for each compound and each soil as means
356 of the values obtained for four concentration values. The recoveries of the
357 spiked samples were in the 61 % - 92 % range, with relative standard
358 deviations that did not exceed 10 %. The extraction yields were similar for
359 both types of soil.

360

361 Validation of the method

362

363 The analytical characteristics of the method were studied using samples
364 of spiked garden soil. The results obtained are shown in table 3. Calibration
365 curves were obtained for each compound. The peak area of the signal was
366 used as the analytical signal. The calibration models displayed linear
367 behaviour. The validity of the models generated was checked using
368 ANOVA, and it was observed that they did not exhibit any lack of fit. The
369 values of the correlation coefficient (R^2) were higher than 0.99.

370 The repeatability of the optimized method was studied by injecting the
371 same sample ten times, values below 4 % being obtained in all cases.

372 A study was also made of the reproducibility of the method this being
373 obtained upon injecting extracts from 10 different soil samples. These values
374 were higher than for the repeatability of the method (in all cases below 12
375 %), since in this case the errors associated with sample handling were
376 involved. We also observed that the highest values corresponded to the first
377 two analytes, the most volatile compounds and those most susceptible to
378 becoming lost during the extraction process.

379 The limits of detection (LODs) and the limits of quantification (LOQs),
380 calculated as 3.3 and 10 times, respectively, the standard deviation of a
381 sample with an S/N ratio of 3, are also shown in Table 3. The LODs obtained
382 were between 25 ng/kg for hexachloroethane, and 2.61 µg/kg for 1,1,2-
383 trichloroethane. These values are among the lowest published in the
384 literature. With respect to gas extraction techniques, P&T, SHS, or their
385 different combinations, such as HS-SPME, PAM or solvent extraction-purge
386 and trap (SE-P&T), in most cases limits of detection are improved
387 [2,4,15,16,18,19,47]. Although gas extraction techniques have important
388 advantages, such as simplicity of operation, without analyte losses, the
389 elimination of high solvent consumption and ease of automation, their
390 principal disadvantages are that they are only applicable to volatile
391 analytes; they need specific instrumental configurations, with relatively
392 high cost, and the extraction times can be relatively long. The main
393 advantages of the method proposed here are its applicability to all types of
394 compounds, the low cost of the reagents employed, and the possibility of
395 being used by non-specialist operators, with no specific instrumentation,
396 such that it is a valid alternative to those described above.

397 For the determination of hexachlorobenzene in soil samples (boiling
398 point, 323 °C) solvent extraction techniques have been proposed. In most of

399 the cases, the limits of detection are also improved with the proposed
400 methodology [9,23,25,28]. The standard QuEChERS protocol has previously
401 been reported for the determination of hexachlorobenzene in soil samples
402 [41]. The limits of detection obtained with the standard and the simplified
403 QuEChERS protocol proposed in this work were very similar, but, in the
404 second case the elimination of the clean-up step involves less sample
405 handling, reducing the errors associated with this step and also the working
406 time.

407

408 *Determination of the target compounds in CRM soils*

409

410 In light of the results obtained in the study of the matrix effect, the
411 analytes were determined in studies addressing samples with certified
412 contents, using external calibration for all the compounds. Two different
413 certified reference materials –a clay soil (RTC-CRM635) and a silty clay soil
414 (RTC-CRM631)-were used. The content of the samples was certified by
415 USEPA SW846, 3rd edition Method 8260B [48] (purge-and-trap/gas
416 chromatography/mass spectrometry).

417 As shown in table 4, the concentrations found in CRM631 and CRM635
418 soils using external calibration with the calibration curves obtained in the
419 garden soil are in good agreement with the certified concentrations, all
420 predictions lying within the prediction intervals fixed.

421 For the compounds not present in the certified soil samples, the
422 predictive ability of the method was assessed by spiking both soils at
423 several concentration levels and obtaining the predictions with the
424 calibration obtained for the garden soil (external calibration). The results are
425 shown in table 5. The predictions coincide with the concentrations at which

426 the soil was spiked, with small differences in the case of hexachloroethane
427 in the CRM 635 soil, for which slightly lower values were obtained.

428

429 **Conclusions**

430

431 Here we propose a simplified version of the QuEChERS method for the
432 determination of seven common chlorinated hydrocarbons and four
433 chlorobenzenes in polluted soil samples. The proposed method is quick,
434 easy, cheap, effective, rugged, and safe and therefore meets the
435 characteristics of the original QuEChERS method.

436 Three solvents for use in extraction were studied. Ethyl acetate was
437 chosen as the extraction solvent, after comparing it with acetonitrile, owing
438 to its better chromatographic behaviour.

439 Clean soil extracts were obtained without a clean-up step, thereby
440 reducing sample handling and the errors associated with this. Upon
441 comparing the slopes obtained on preparing the calibrations in two
442 different types of soil, the absence of a matrix effect was seen.

443 The method proposed here is reproducible and highly sensitive, with
444 detection limits ranging from 25 ng/kg to 2.6 µg/kg. The accuracy of the
445 method was verified by analyzing two certified reference materials and
446 proved to be satisfactory.

447

448

449

450

451

452 Acknowledgements

453

454 The authors acknowledge the financial support from the DGI (CTQ2007-
455 63157/BQU and CTQ2010-17514/BQU) and the Consejería de Educación y
456 Cultura of the Junta de Castilla y León (Project SA112A08) for this research.

457 Casas Ferreira A.M. acknowledges an FPU grant from the Spanish
458 Ministry of Education.

459

460 **References**

- 461 [1] Breus IP, Mishchenko AA (2006) *Eurasian Soil Sci* 39:1271-1283
- 462 [2] Ojala M, Mattila I, Tarkiainen V, Särme T, Ketola RA, Määttänen A,
463 Kostiainen R, Kotiaho T (2001) *Anal Chem* 73:3624-3631
- 464 [3] Santos FJ, Sarrión MN, Galceran MT (1997) *J Chromatogr A* 771:181-
465 189
- 466 [4] Campillo N, Viñas P, López-García I, Aguinaga N, Hernández-
467 Córdoba M (2004) *Talanta* 64:584-589
- 468 [5] Zuloaga O, Etxebarria N, Fernández LA, Madariaga JM (2000) *Anal*
469 *Chim Acta* 416:43-53
- 470 [6] Jakubowska N, Zygmunt B, Polkowska Z, Zabiegala B, Namiéńnik J
471 (2009) *J Chromatogr A* 1216:422-441
- 472 [7] International Agency for Research on Cancer (IARC) (1987) Overall
473 Evaluations of Carcinogenicity, An Updating of IARC Monographs. In:
474 IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to
475 Humans, Suppl. 7, World Health Organization, Geneva
- 476 [8] International Agency for Research on Cancer (IARC) (1995) Dry
477 Cleaning, Some Chlorinated Solvents and Other Industrial Chemicals.
478 In: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans,
479 Vol. 63, World Health Organization, Geneva
- 480 [9] Hou L, Lee HK (2004) *J Chromatogr A* 1038:37-42
- 481 [10] U.S. Environmental Protection Agency, Health Assessment Document
482 for Chlorinated Benzenes. Washington, DC, 1985
- 483 [11] World Health Organization (WHO) (1991) Chlorobenzenes other than
484 Hexachlorobenzene: Environmental Aspects, Vol. 60, Geneva
- 485 [12] US EPA (1996) Soil Screening Guidance: User's Guide, Office of
486 Emergency and Remedial Response. US Government Printing Office,
487 Washington, USA.
- 488 <http://www.epa.gov/superfund/health/conmedia/soil/pdfs/ssg496.pdf>

- 489 [13] Roose P, Dewulf J, Brinkman UAT, Van Langenhove H (2001) *Wat Res*
490 35:1478-1488
- 491 [14] US EPA (1996) Method 5035: Closed System Purge and Trap Extraction
492 for Volatile Organics in Soil and Waste Samples. In: *Test Methods for*
493 *Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846*. US
494 Government Printing Office, Washington, USA.
495 <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/5035.pdf>
- 496 [15] Kostianen R, Kotiaho T, Mattila I, Mansikka T, Ojala M, Ketola RA
497 (1998) *Anal Chem* 70:3028-3032
- 498 [16] Serrano A, Gallego M (2006) *J Chromatogr A* 1118:261-270.
- 499 [17] US EPA (1996) Method 5021: Volatile Organic Compounds in Soils and
500 Other Solid Matrices Using Equilibrium Headspace Analysis. In: *Test*
501 *Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-*
502 *846*. US Government Printing Office, Washington, USA.
503 <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/5021.pdf>
- 504 [18] Llompart M, Li K, Fingas M (1999) *Talanta* 48:451-459
- 505 [19] Li X, Zeng Z, Xu Y (2006) *Anal Bioanal Chem* 384:1428-1437
- 506 [20] K. Dettmer, W. Engewald, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 490.
- 507 [21] US EPA (1996) Method 3540: Soxhlet Extraction. In: *Test Methods for*
508 *Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846*. US
509 Government Printing Office, Washington, USA.
510 <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3540.pdf>
- 511 [22] Rodil R, Popp P (2006) *J Chromatogr A* 1124:82-90
- 512 [23] Richter P, Sepúlveda B, Oliva R, Calderón K, Seguel R (2003) *J*
513 *Chromatogr A* 994:169-177
- 514 [24] US EPA (1996) Method 3545: Pressurized Fluid Extraction. In: *Test*
515 *Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-*
516 *846*. US Government Printing Office, Washington, USA.
517 <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3545.pdf>
- 518 [25] Gonçalves C, Alpendurada MF (2005) *Talanta* 65:1179-1189

- 519 [26] Lesueur C, Gartner M, Mentler A, Fuerhacker M (2008) *Talanta* 75:284-
520 293
- 521 [27] US EPA (1996) Method 3550: Ultrasonic Extraction. In: *Test Methods*
522 *for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846*. US
523 Government Printing Office, Washington, USA.
524 <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3550.pdf>
- 525 [28] Herbert P, Morais S, Paíga P, Alves A, Santos L (2006) *Anal Bioanal*
526 *Chem* 384:810-816
- 527 [29] US EPA (1996) Method 3546: Microwave Extraction. In: *Test Methods*
528 *for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846*. US
529 Government Printing Office, Washington, USA.
530 <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3546.pdf>
- 531 [30] Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ (2003) *J AOAC*
532 *Int* 86:412-431
- 533 [31] Lehotay SJ (2010) In: J. Zweigenbaum (Ed.), *Pesticide Protocols,*
534 *Methods in Biotechnology Series*, Humana Press, Totowa, NJ, USA
- 535 [32] González-Curbelo MA, Hernández-Borges J, Ravelo-Pérez LM,
536 Rodríguez-Delgado MA (2010) *Food Chem* 125:1083-1090
- 537 [33] Payá P, Anastassiades M, Mack D, Sigalova I, Tasdelen B, Oliva J,
538 Barba A (2007) *Anal Bioanal Chem* 389:1697-1714
- 539 [34] Plössl F, Giera M, Bracher F (2006) *J Chromatogr A* 1135:19-26
- 540 [35] Mastovska K, Lightfield AR (2008) *J Chromatogr A* 1202:118-123
- 541 [36] Stubbings G, Bigwood T (2009) *Anal Chim Acta* 637:68-78
- 542 [37] Kinsella B, Lehotay SJ, Mastovska K, Lightfield AR, Furey A, Danaher
543 M (2009) *Anal Chim Acta* 637:196-207
- 544 [38] Ramalhosa MJ, Paíga P, Morais S, Delerue-Matos C, Oliveira MBPP
545 (2009) *J Sep Sci* 32:3529-3538
- 546 [39] Drożdżyński D, Kowalska J (2009) *Anal Bioanal Chem* 394:2241-2247
- 547 [40] Chen L, Li XS, Wang ZQ, Pan CP, Jin RC (2010) *Ecotoxicol Environ Saf*
548 73:73-77

- 549 [41] Rashid A, Nawaz S, Barker H, Ahmad I, Ashraf M (2010) J Chromatogr
550 A 1217:2933-2939
- 551 [42] Asensio-Ramos M, Hernández-Borges J, Ravelo-Pérez LM, Rodríguez-
552 Delgado MA (2010) Anal Bioanal Chem 396:2307-2319
- 553 [43] Padilla-Sánchez JA, Plaza-Bolaños P, Romero-González R, Garrido-
554 Frenich A, Martínez-Vidal JL (2010) J Chromatogr A 1217:5724-5731
- 555 [44] Pinto CG, Laespada MEF, Martín SH, Ferreira AMC, Pavón JLP,
556 Cordero BM (2010) Talanta 81:385-391
- 557 [45] Martín SH, Pinto CG, Pavón JLP, Cordero BM (2010) J Chromatogr A
558 1217:4883-4889
- 559 [46] Grob K (1983) J Chromatogr 279:225-232
- 560 [47] Amaral OC, Olivella L, Grimalt JO, Albaiges J (1994) J Chromatogr A
561 675:177-187
- 562 [48] US EPA (1996) Method 8260B: Volatile Organic Compounds by Gas
563 Chromatography-Mass Spectrometry. In: Test Methods for Evaluating
564 Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846. US Government
565 Printing Office, Washington, USA.
566 <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8260B.pdf>
567
568
569

570 **Figure captions**

571

572 **Fig. 1** Chromatograms obtained upon injecting different volumes of the soil
573 extracts in propyl acetate (0.2 μ L), acetonitrile (1 μ L) and ethyl acetate (1
574 μ L). 1 1,2-dichloroethane, 2 carbon tetrachloride, 3 1,3-dichloropropylene, 4
575 1,1,2-trichloroethane, 5 tetrachloroethylene, 6 1,1,2,2-tetrachloroethane, 7
576 1,4-dichlorobenzene, 8 1,2-dichlorobenzene, 9 hexachloroethane, 10 1,2,4-
577 trichlorobenzene, 11 hexachlorobenzene

578

579 **Fig. 2** Comparison of the chromatograms obtained upon injecting a solution
580 containing the analytes in ethyl acetate and when the extract obtained from
581 a garden soil was injected. 1 1,2-dichloroethane, 2 carbon tetrachloride, 3
582 1,3-dichloropropylene, 4 1,1,2-trichloroethane, 5 tetrachloroethylene, 6
583 1,1,2,2-tetrachloroethane, 7 1,4-dichlorobenzene, 8 1,2-dichlorobenzene, 9
584 hexachloroethane, 10 1,2,4-trichlorobenzene, 11 hexachlorobenzene

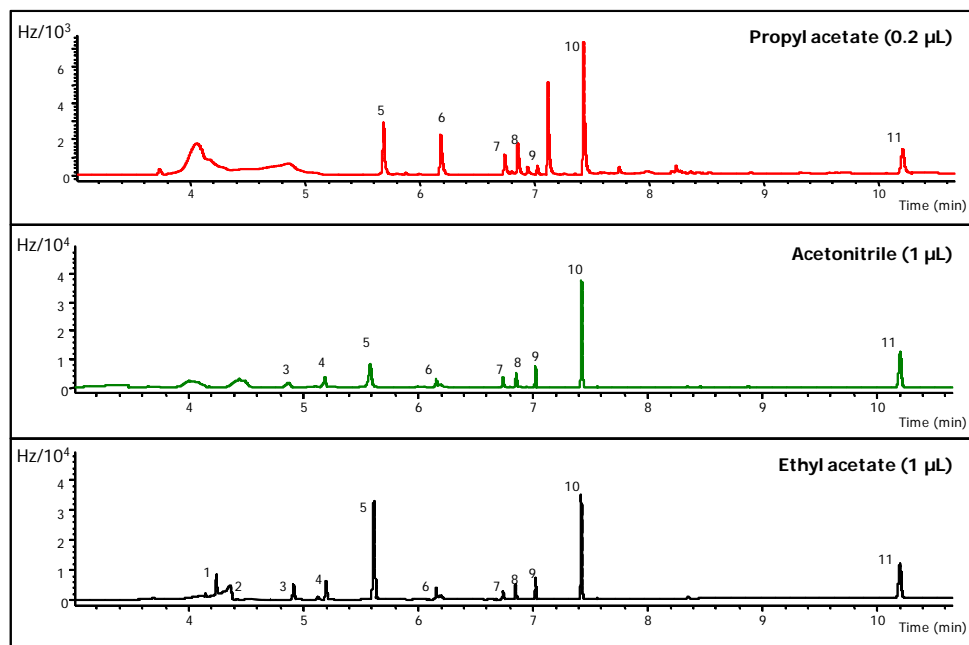
585

586 **Fig. 3** Comparison of the signals obtained in the hot splitless and solvent-
587 injection mode. In both cases, the injection volume was 3 μ L. 7 1,4-
588 dichlorobenzene, 8 1,2-dichlorobenzene, 9 hexachloroethane, 10 1,2,4-
589 trichlorobenzene, 11 hexachlorobenzene

590

591 **Fig. 4** Extraction yields for each compound and for each soil. 1 1,2-
592 dichloroethane, 2 carbon tetrachloride, 3 1,3-dichloropropylene, 4 1,1,2-
593 trichloroethane, 5 tetrachloroethylene, 6 1,1,2,2-tetrachloroethane, 7 1,4-
594 dichlorobenzene, 8 1,2-dichlorobenzene, 9 hexachloroethane, 10 1,2,4-
595 trichlorobenzene, 11 hexachlorobenzene

596

597 **Figure 1:**

598

599

600

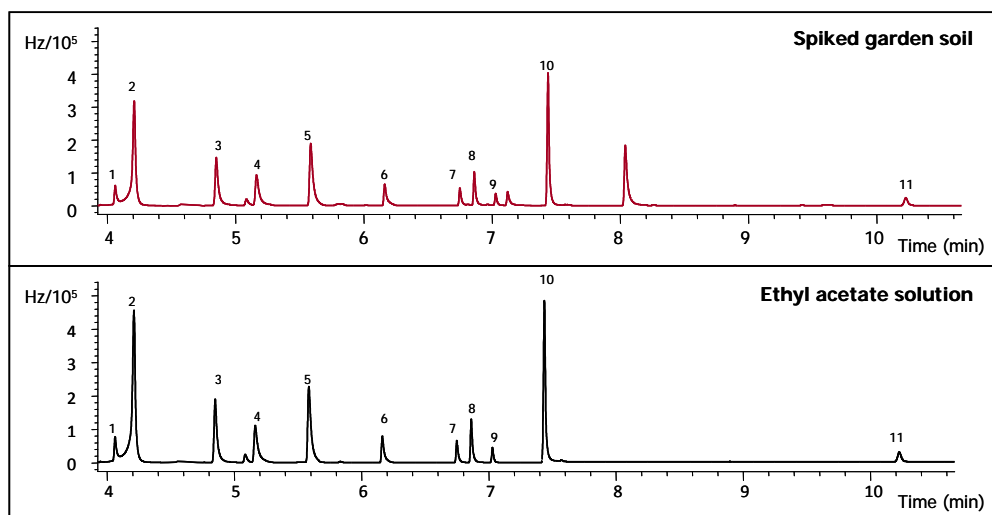
601

602

603

604 **Figure 2:**

605



606

607

608

609 **Figure 3:**

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619

620

621

622

623

624

625

626

627

628

629

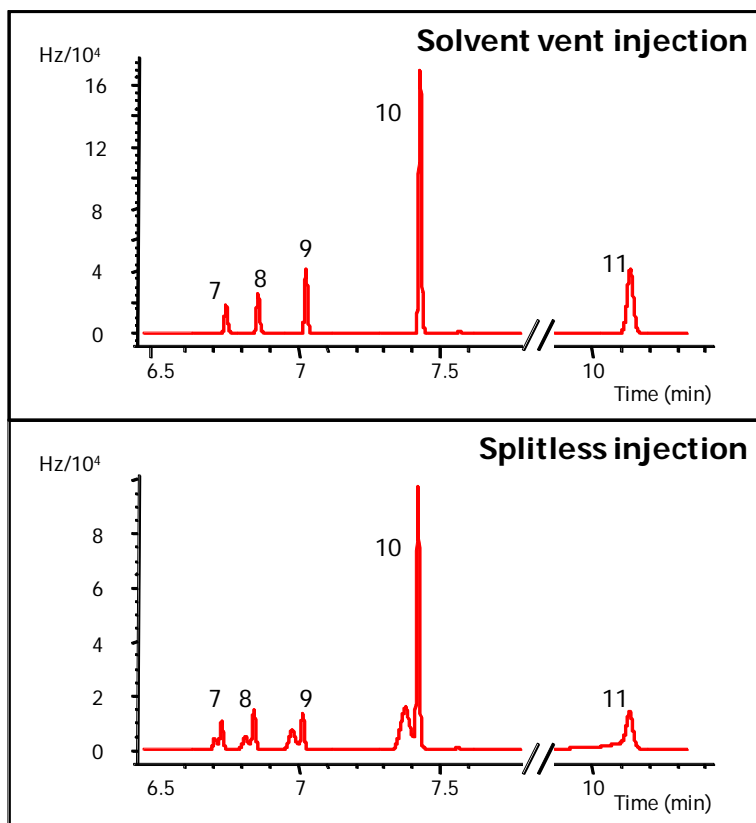
630

631

632

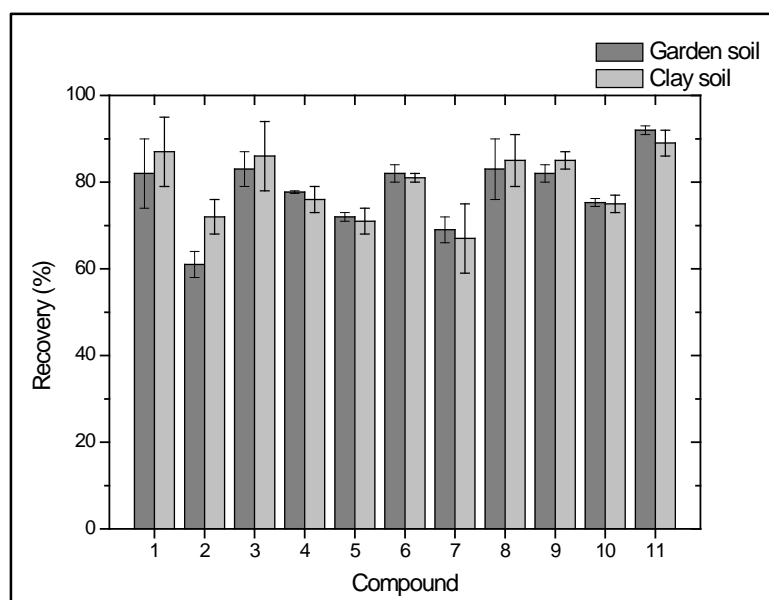
633

634



635 **Figure 4:**

636



637

638

639 **Table 1** Retention times and physico-chemical characteristics of the analytes
640 studied

641

Compound	t _R (min)	Boiling point (°C)	Log K _{o/w}	Log K _{o/c}
1,2-Dichloroethane	4.17	83	1.48	1.24
Carbon tetrachloride	4.30	77	2.64	2.24
1,3-Dichloropropylene	4.88	97-112	2.00	1.66
1,1,2-Trichloroethane	5.18	115	2.35	1.70
Tetrachloroethylene	5.60	121	2.53	2.19
1,1,2,2-Tetrachloroethane	6.16	147	2.39	1.97
1,4-Dichlorobenzene	6.75	173	3.37	2.79
1,2-Dichlorobenzene	6.85	179	3.38	2.79
Hexachloroethane	7.04	185	3.9	3.25
1,2,4-Trichlorobenzene	7.44	214	3.98	3.25
Hexachlorobenzene	10.25	323	6.2	4.74

642

643

644 **Table 2** Comparison of the slopes obtained for each of the soils

645

646

Compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Slopes	
		Garden soil	Clay soil
1,2-Dichloroethane	150-2500	1.98 \pm 0.06	2.1 \pm 0.1
Carbon tetrachloride	150-2500	49 \pm 1	58 \pm 1
1,3-Dichloropropylene	60-1000	80 \pm 1	88 \pm 4
1,1,2-Trichloroethane	276-4600	64 \pm 2	65 \pm 3
Tetrachloroethylene	15-250	2242 \pm 36	2271 \pm 82
1,1,1,2-Tetrachloroethane	37.5-625	405 \pm 7	410 \pm 14
1,4-Dichlorobenzene	187.5-3125	17.8 \pm 0.4	18.8 \pm 0.9
1,2-Dichlorobenzene	187.5-3125	33 \pm 2	33 \pm 2
Hexachloroethane	15-250	1783 \pm 54	1878 \pm 69
1,2,4-Trichlorobenzene	75-1250	246 \pm 6	249 \pm 7
Hexachlorobenzene	15-250	1004 \pm 51	967 \pm 10

647

648

649 **Table 3** Analytical characteristics of the method

650

651

Compound	Linear range ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	R^2	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Repeatability (%)	Reproducibility (%)
1,2-Dichloroethane	20 - 150	0.9988	2.32	7.72	2.36	11.13
Carbon tetrachloride	20 - 350	0.9988	0.30	0.98	1.74	10.74
1,3-Dichloropropylene	10 - 175	0.9911	0.38	1.26	2.07	6.57
1,1,2-Trichloroethane	20 - 350	0.9944	2.61	8.70	2.33	3.20
Tetrachloroethylene	8 - 100	0.9984	0.056	0.188	3.02	9.01
1,1,2,2-Tetrachloroethane	7.5 - 93.8	0.999	1.15	3.84	1.09	3.86
1,4-Dichlorobenzene	45- 262.5	0.9997	1.02	3.39	1.01	8.29
1,2-Dichlorobenzene	20 - 350	0.9959	1.95	6.50	0.97	3.48
Hexachloroethane	15 - 187.5	0.997	0.025	0.083	2.29	7.79
1,2,4-Trichlorobenzene	15 - 187.5	0.9986	0.406	1.353	1.17	1.07
Hexachlorobenzene	5 - 87.5	0.9997	0.046	0.154	0.89	3.33

652

653

654 **Table 4** Results of prediction using external calibration on the soils with a
 655 certified content (CRM)

656

Soil	Compound	Reference value ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Prediction interval ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Prediction ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
CRM 631-030	1,3-Dichloropropylene	47 ± 6	8.79 – 84.6	34 ± 7
	Tetrachloroethylene	18 ± 6	0 – 37.1	15 ± 2
	1,1,2,2-Tetrachloroethane	26 ± 3	10.5 - 42	23 ± 1
	1,4-Dichlorobenzene	80 ± 8	30.6- 130	92 ± 4
	1,2-Dichlorobenzene	114 ± 11	45.6 ± 181	145 ± 12
CRM 635-030	Carbon tetrachloride	84 ± 8	34.5 - 133	67 ± 12
	1,2-Dichloroethane	110 ± 8	62.9 - 157	114 ± 3
	Tetrachloroethylene	112 ± 11	45.2 - 178	60 ± 2
	1,1,2,2-Tetrachloroethane	37 ± 3	18.7 – 55.6	34 ± 1
	1,4-Dichlorobenzene	64 ± 5	32.5 - 96	59 ± 3
	1,2-Dichlorobenzene	90 ± 6	54.8 - 125	89 ± 10

657

658

659 **Table 5** Results of prediction in the CRM soils spiked with the compounds
 660 not initially present (1,1,2-trichloroethane, hexachloroethane, 1,2,4-
 661 trichlorobenzene and hexachlorobenzene) by using external calibration

662

Soil	Compound	Spiked concentration (µg/kg)	Prediction (µg/kg)
CRM 631-030	1,1,2-Trichloroethane	43.75	45 ± 10
		131.25	134 ± 10
	Hexachloroethane	33	31 ± 5
		98	103 ± 5
	1,2,4-Trichlorobenzene	66	64 ± 3
		131	130 ± 3
Hexachlorobenzene	10.9	11.4 ± 0.7	
	32.8	31.9 ± 0.7	
CRM 635-030	1,1,2-Trichloroethane	87.5	84 ± 10
		175	173 ± 10
	Hexachloroethane	33	24 ± 5
		66	44 ± 7
	1,2,4-Trichlorobenzene	33	34 ± 3
		98	99 ± 3
Hexachlorobenzene	10.9	10.1 ± 0.8	
	21.8	21.1 ± 0.7	

663

664

665

666



XI
CONCLUSIONES GENERALES

En la presente memoria se han propuesto nuevas estrategias de tratamiento de muestra para la determinación de contaminantes orgánicos en matrices medioambientales.

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 asociados a la introducción de este tipo de muestra con los inyectores *split/splitless* convencionales, ensanchamiento de banda inicial y mala definición de la morfología de pico. 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 señal/ruido y consecuentemente un aumento de la sensibilidad. El modo de inyección *solvent-vent* aporta las ventajas de la inyección en frío y además permite mejorar la 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 clorofenoles e ibuprofeno en muestras acuosas y en ambos casos se han obtenido resultados altamente satisfactorios. La configuración HS-PTV-GC-MS permite analizar los compuestos volátiles de la muestra sin interferencias de los compuestos no volátiles de la matriz de forma sencilla, rápida, automática, con mínima manipulación de muestra y con una elevada sensibilidad. Por tanto, la nueva configuración instrumental propuesta en este trabajo tiene un gran potencial para el aumento de sensibilidad cuando se trabaja en la modalidad espacio de cabeza.

➤ **Utilización de reacciones de derivatización en medio acuoso para el aumento de la volatilidad de los analitos en estudio en el acoplamiento HS-GC.**

La utilización de reacciones de derivatización *in situ* en el propio vial de generación de espacio de cabeza ha demostrado ser una alternativa eficaz para el aumento de sensibilidad en el acoplamiento HS-GC.

Con la utilización de este tipo de reacciones, en las cuales se generan derivados más volátiles que los analitos originales, se puede ampliar el grupo de compuestos que pueden ser analizados por HS, incluyendo aquellos que, en principio, no podrían serlo, como consecuencia de su baja volatilidad. Además, al reducir la polaridad de los analitos, se produce una mejora de las características cromatográficas, tales como reproducibilidad, sensibilidad y forma de pico.

La utilización de esta configuración instrumental tiene la ventaja de que, desde la mezcla de los reactivos en el vial del HS, todo el proceso tiene lugar en continuo, con la consecuente reducción de errores asociados a la manipulación de muestra. Además, la utilización de una reacción no supone una complicación del proceso, ya que tanto la reacción como la generación de volátiles tienen lugar de forma simultánea.

Se han utilizado varias reacciones de derivatización para aumentar la volatilidad de los analitos en las aplicaciones basadas en el acoplamiento HS-PTV. Para la determinación de clorofenoles, se ha propuesto la utilización de una reacción de esterificación con anhídrido acético en medio básico. Para la determinación de ibuprofeno, se han propuesto dos reacciones, la formación de un éster con metanol en medio ácido y de una amida con 2,2,2-trifluoroetilamina en presencia de una carbodiimida como agente condensante. Como se ha citado anteriormente, los resultados obtenidos son altamente satisfactorios, por lo cual la utilización de reacciones de derivatización *in situ* tiene un elevado potencial para ampliar el número de compuestos que pueden determinarse por generación de espacio de cabeza.

- **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.**

En todas las aplicaciones desarrolladas a lo largo de esta memoria se ha 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 y de los compuestos más volátiles que los analitos de interés, permite introducir grandes volúmenes de muestra en columnas capilares. De esta manera se soluciona la principal limitación de este tipo de columnas, la baja capacidad y, por tanto, la menor sensibilidad del método. Además, se produce una focalización térmica de los analitos en el *liner* del inyector, lo que se traduce en un estrechamiento de los picos cromatográficos.

- **La utilización combinada de la extracción por adsorción en barra agitadora (Twister) con reacciones de derivatización *in situ* en muestras de agua y de suelos.**

La utilización de una reacción de derivatización *in situ* de forma combinada con la extracción por adsorción en barra agitadora (SBSE) se ha aplicado de forma satisfactoria para la determinación de parabenos, triclosán y metil triclosán en muestras acuosas y suelos. La limitación más importante de esta modalidad de extracción radica en el recubrimiento de los *twisters*, ya que el único polímero comercialmente disponible es el polidimetilsiloxano, con el cual se obtienen rendimientos de extracción bajos para el caso de analitos polares. La utilización de una reacción de derivatización, con la formación de compuestos menos polares, atenúa este problema con una mejora en el rendimiento de la extracción. Además, la utilización de una reacción de derivatización no complica el proceso, ya que tiene lugar de forma simultánea con el proceso de extracción.

Las metodologías propuestas, tanto para muestras acuosas como para sólidas, son eficaces, sencillas y muy sensibles. Los límites de detección obtenidos se encuentran entre los menores encontrados en bibliografía. Además, ofrecen importantes ventajas respecto a las técnicas de extracción convencionales, tales como la minimización de la manipulación de muestra, la eliminación total del uso de disolventes orgánicos, así como la simplificación del procedimiento analítico y una reducción del tiempo de trabajo. Respecto a las muestras de suelo, la metodología propuesta mejora de forma muy acusada las anteriormente propuestas en bibliografía para estos compuestos, las cuales implican varias etapas, con una extracción exhaustiva de las muestras de suelo, posterior limpieza del extracto y una etapa posterior de derivatización.

- **La aplicación de la técnica de pretratamiento de muestra QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Simple), basada en la extracción con disolventes asistida por sales (salt assisted liquid-liquid extraction, SALLE) para la extracción de compuestos orgánicos clorados en muestras de suelos.**

Se ha puesto a punto una simplificación del método QuEChERS para la extracción de compuestos orgánicos clorados (cloroformo, hidrocarburos C1-C3 clorados y clorobenzenos) en muestras de suelos. Los resultados obtenidos en las diferentes aplicaciones ponen de manifiesto la validez de este método de extracción. Se han obtenido altos porcentajes de recuperación y buena reproducibilidad con un procedimiento rápido, sencillo, económico, que utiliza pequeños volúmenes de disolvente y que no requiere instrumentación compleja.

Los extractos obtenidos se han analizado mediante inyección directa en un cromatógrafo de gases con un micro-detector de captura electrónica, equipado con un inyector de temperatura programada. Gracias a la elevada selectividad y sensibilidad del detector utilizado para compuestos halogenados, se obtienen límites de detección muy bajos.

Los buenos resultados obtenidos tanto para compuestos volátiles como para semivolátiles, ponen de manifiesto las grandes posibilidades de esta técnica para el análisis de todo tipo de compuestos, sin la necesidad de adoptar diferentes técnicas de extracción en función de la volatilidad de los compuestos.



XII

VERSIÓN RESUMIDA EN INGLÉS
SUMMARY IN ENGLISH

The following document is a summary of the developed work. It includes: a table of contents in which the different chapters and sections have been marked, general aims of this work, a brief introduction about the new trend in Analytical Chemistry, instrumental configuration used, aim and conclusions for each studied application and finally, the general conclusions of the whole work.

The six published articles and the one 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 AIM.....	409
II. INTRODUCTION.....	413
III. INSTRUMENTAL CONFIGURATION.....	415
1. Gas chromatograph with programmed temperature vaporizer and mass spectrometer detector.....	415
1.1. Gas chromatograph.....	415
1.2. Programmed temperature vaporizer.....	416
1.3. Quadrupole mass spectrometer detector.....	418
1.4. Modules for sampling injection.....	418
1.4.1. Static headspace.....	418
1.4.2. CombiPAL autosampler.....	419
1.5. Scheme of the instrumental configuration.....	419
2. Gas chromatograph with programmed temperature vaporizer and micro electron capture dete.....	423
2.1. Gas chromatograph.....	423
2.2. Programmed temperature vaporizer.....	423
2.3. Micro electron capture detector.....	423
2.4. Liquid samples injector.....	424
2.5. Scheme of the instrumental configuration.....	424

3. Gas chromatograph with programmed temperature vaporizer coupled to thermal desorption system and quadrupole mass spectrometer.....	426
3.1. Gas chromatograph.....	426
3.2. Programmed temperature vaporizer.....	426
3.3. Quadrupole mass spectrometer detector.....	426
3.4. Thermal desorption system.....	427
3.5. Scheme of the instrumental configuration.....	428

IV. USE OF A PROGRAMMED TEMPERATURE VAPORIZER AND AN IN SITU DERIVATIZATION REACTION TO IMPROVE SENSITIVITY IN HEADSPACE-GAS CHROMATOGRAPHY. APPLICATION TO THE ANALYSIS OF CHLOROPHENOLS IN WATER.....	429
1. Aim.....	429
2. Conclusions.....	431
3. References.....	432

V. IN SITU DERIVATIZATION REACTION AND DETERMINATION OF IBUPROFEN USING HEADSPACE GENERATION-PROGRAMMED TEMPERATURE VAPORIZATION -GAS CHROMATOGRAPHY - MASS SPECTROMETRY.....	433
1. Aim.....	433
2. Conclusions.....	434

3. References.....	435
VI. HEADSPACE SAMPLING WITH IN SITU CARBODIIMIDE-MEDIATED DERIVATIZATION FOR THE DETERMINATION OF IBUPROFEN IN WATER SAMPLES.....	437
1. Aim.....	437
2. Conclusions.....	438
3. References.....	439
VII. GC-MS DETERMINATION OF PARABENS, TRICLOSAN AND METHYL TRICLOSAN IN WATER BY IN SITU DERIVATIZATION AND STIR-BAR SORPTIVE EXTRACTION.....	441
1. Aim.....	441
2. Conclusions.....	442
3. References.....	443
VIII. STIR BAR SORPTIVE EXTRACTION OF PARABENS, TRICLOSAN AND METHYL TRICLOSAN FROM SOIL SLURRY WITH IN SITU DERIVATIZATION.....	445
1. Aim.....	445
2. Conclusions.....	447
3. References.....	448

IX. SIMPLIFIED QuEChERS APPROACH FOR THE EXTRACTION OF CHLORINATED COMPOUNDS FROM SOIL SAMPLES.....	449
1. Aim.....	449
2. Conclusions.....	451
3. References.....	452
X. DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A SIMPLIFIED QuEChERS EXTRACTION METHOD FOR THE DETERMINATION OF C1-C3 CHLORINATED HYDROCARBONS AND CHLOROBENZENES IN SOIL SAMPLES.....	453
1. Aim.....	453
2. Conclusions.....	454
3. References.....	455
XI. GENERAL CONCLUSIONS.....	457

I. AIM

The general aim of this PhD Thesis is to propose and develop new sample treatment strategies for the determination of organic contaminants at trace levels in different environmental matrices.

The determination of organic compounds in environmental matrices, such as water and soil, usually requires pre-treatment techniques prior to the instrumental analysis. The principal objective is the isolation from the matrix of the compounds of interest. Commonly, this step has been considered the most polluting and time-consuming of the analytical procedure, as well as one of the most frequent sources of errors. Accordingly, the lesser sample handling, the higher the quality of the results. The methodologies proposed in this work have followed that trend.

Regarding the samples studied, water and soil matrices have been considered.

With regard to the analytes, they were selected on the basis of their documented toxicity for the environment (chlorophenols, volatile halogenated organic compounds and chlorobenzenes) or as a result of the lack of information about their effect on the environment (emerging contaminants, pharmaceutical compounds and personal care products).

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 use of *in situ* derivatization reactions to increase the volatility of the target analytes in the HS-GC coupling.

- The combination of fast gas chromatography with sample introduction by means of solvent vent injection mode allowed by the programmable temperature vaporizer.
- The combination of stir bar sorptive extraction (Twister) with *in situ* derivatization in water and soil samples.
- The application of the sample pre-treatment technique QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) to the extraction of halogenated organic compounds from soil samples.

In order to prove the analytical possibilities of the proposed methodologies, different methods have been developed to solve specific environmental problems:

- Use of a programmed temperature vaporizer and an *in situ* derivatization reaction to improve sensitivity in headspace-gas chromatography. Application to the analysis of chlorophenols in water.
- *In situ* derivatization reaction and determination of ibuprofen in water samples using headspace generation - programmed temperature vaporization - gas chromatography - mass spectrometry.
- Headspace sampling with *in situ* carbodiimide mediated derivatization for the determination of ibuprofen in water samples.
- GC-MS determination of parabens, triclosan and methyl triclosan in water by *in situ* derivatization and stir bar sorptive extraction.
- Stir bar sorptive extraction of parabens, triclosan and methyl triclosan from soil slurry with *in situ* derivatization.

-
- Simplified QuEChERS approach for the extraction of chlorinated compounds from soil samples.
 - Determination of volatile halogenated organic compounds and chlorobenzenes in soil matrices by simplified QuEChERS extraction and fast gas chromatography with electron capture detection.

II. INTRODUCTION

Gas chromatography (GC) is a widely used technique for the analysis of volatile and semivolatile compounds. For the last decades many efforts have been focused on the development of the technique and nowadays it is possible to separate compounds at low concentration levels very fast. However, due to the complexity and the diversity of the matrices studied, in many cases the pre-treatment prior to the final determination is the most critical step of the whole analytical procedure.

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. These multistep pre-treatment techniques are time consuming and, in many cases, require longer times than the chromatographic analysis. This step has been considered the most polluting of all the analytical procedure, as well as one of the most frequent sources of errors.

Development of solventless (or at least with low solvent consumption) sample preparation techniques constitutes a pillar of Green Analytical Chemistry and has experienced a rapid development during last years. The great interest in this approach is due to toxicological, environmental and economic aspects. A number of techniques with those characteristics have been developed.

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 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 microextraction by packed sorbents (MEPS).

The most representative examples of solventless techniques are: solid phase microextraction (SPME), stir-bar sorptive extraction (SBSE) with thermal desorption or membrane introduction mass spectrometry (MIMS). Among techniques based on gas extraction, static headspace (SHS) and purge and trap (P&T), or the new possibilities of coupling HS with SDME, MASE or SPME, can be mentioned

Despite the slow acceptance of these new sample treatment techniques by official organisms, they offer important advantages over the conventional ones, such as reduction of the sample volumes required, of solvent consumption and labour effort, improvement of the selectivity and easiness of automation.

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.

III. INSTRUMENTAL CONFIGURATION

Throughout the PhD Thesis, three different instrumental configurations have been used: (1) a gas chromatograph (GC) equipped with a programmed temperature vaporizer (PTV) and a quadrupole mass spectrometer detector (q-MS); (2) a gas chromatograph equipped with a programmed temperature vaporizer and a micro-electron capture detector (μ -ECD) and (3) a gas chromatograph equipped with a programmed temperature vaporizer coupled to a thermal desorption system (TDS) and to a quadrupole mass spectrometer detector.

1. GAS CHROMATOGRAPH WITH PROGRAMMED TEMPERATURE VAPORIZER AND QUADRUPOLE MASS SPECTROMETER DETECTOR

1.1. Gas chromatograph

To perform the gas chromatographic measurements, an Agilent 6890 GC equipped with a low polarity DB-VRX capillary column (20 m x 0.18 mm x 1 μ m, working range -10 – 260 °C) from Agilent Technologies (J&W Scientific Columns, USA) was used. 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).

In one of the applications described in the PhD Thesis, the Agilent 6890 GC was equipped with a Modular Accelerated Column Heater (MACH™). 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 temperature and 400 °C can be programmed at a maximum rate 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 quickly, making total analysis cycle times very short.

The entire column is coiled into the protective case on the door panel of the classical GC, with heated transfer lines going through the oven door and column ends connected to inlet and detector with deactivated fused silica capillaries using low dead volume connectors. The GC oven serves as a heated interface for the transfer lines and is set to the maximum temperature programmed on the column, to avoid cold point formation.

Figure 1 shows the column without the protective case (a) and with it (b).

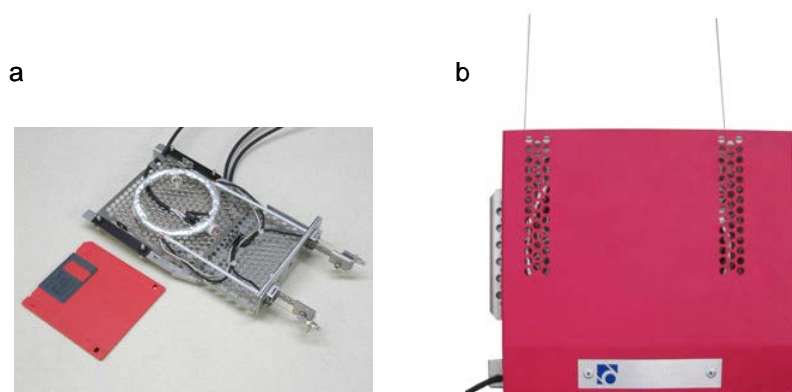


Figure 1: Packed column without (a) and with (b) the protective case

1.2. Programmed temperature vaporizer

The PTV used was from Gerstel (CIS-4; Gerstel, Baltimore, MD, USA). A scheme of the device used is shown in figure 2.

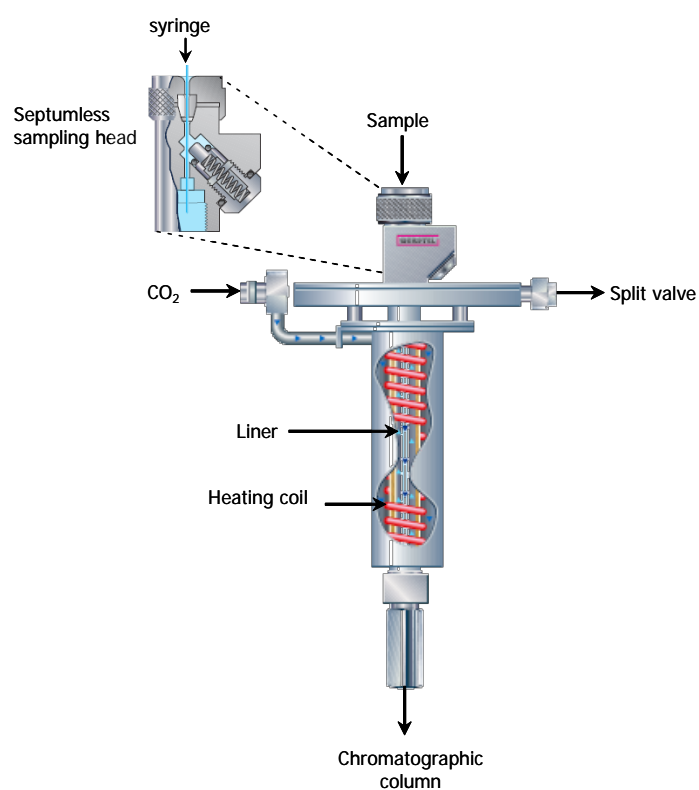


Figure 2: PTV CIS-4 injector from Gerstel

It has a septumless sampling head. Cooling was accomplished with liquid CO₂, which allows reaching a temperature of -78 °C. Heating was achieved by means of a heating coil, which provides a homogenous heating of the injector body. Heating rate can be selected between 2 °C/s and 12 °C/s, and it is possible to use two consecutive heating ramps. Programmed temperature control is performed with an electronic controller.

There are different types of liners commercially available for this injector: empty (straight, baffled) and packed with different materials (Tenax-TA®, glass wool, quartz wool, Carbotrap B, Carbotrap C or polydimethylsiloxane). The dimensions of the liners are 71 mm length x 2.0 mm width.

1.3. Quadrupole mass spectrometer detector

The quadrupole mass spectrometer used was an HP 5973 from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany), 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.

Two acquisition modes were allowed: Scan mode, in which the detector scans from high to low across a range of masses, previously specified; and selected ion monitoring (SIM) mode, where only a selected number of representative ions needed to characterize the compounds are analyzed and the instrument rapidly switches between the selected ions until the measurements are complete.

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 HP 7694 from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany) equipped with a tray for 44 consecutive samples, and an oven with positions for six sample vials, which allows the simultaneous heating of the 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.

1.4.2. CombiPAL autosampler

Another device for sample introduction that has been coupled to the PTV-GC-MS configuration is the CombiPAL (CTC analytics AG, Zwingen, Switzerland). This autosampler adds versatility to the equipment due to the possibility to choose between different modalities of sample injection (liquid injection, static headspace and solid phase microextraction) by coupling specific modules to the robotic arm of the device, on which the syringe is mounted. Different types of sample trays are also available based on the application used. For headspace sampling, the device is provided with a heater module with positions for six sample vials. The oven can be heated from 35 °C to 200 °C and orbital agitation of the samples from 250 to 750 rpm can be used.

Headspace mode enables different syringe sizes (from 1.0 mL to 5.0 mL) and different injection speeds (from 0.01 $\mu\text{L/s}$ to 250 $\mu\text{L/s}$). The syringe can be heated from 35 °C to 150 °C. Once sample injection is complete, the hot syringe is automatically cleaned by purging with inert gas.

1.5. Scheme of the instrumental configuration

Figure 3 shows an image of the instrumental configuration HS-PTV-GC-MS.

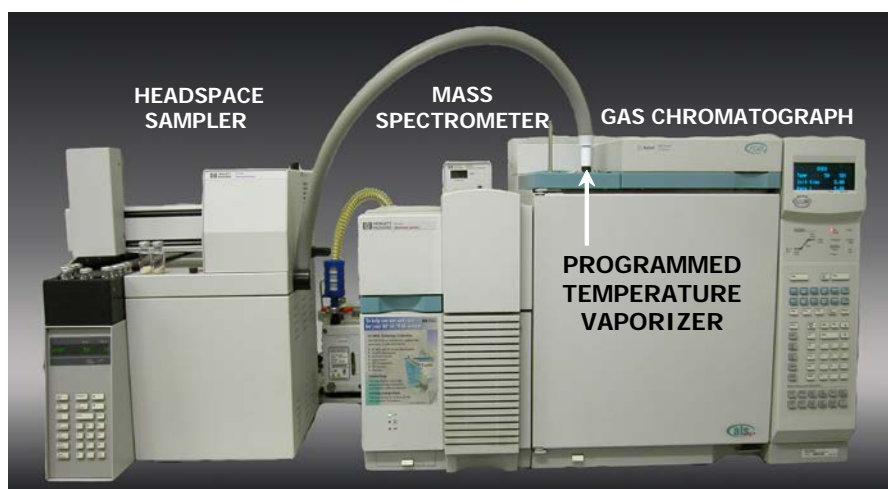


Figure 3: *Instrumental configuration HS-PTV-GC-MS*

The gas chromatograph, PTV and detector control, as well as the data acquisition was performed using specific software with a personal computer. The static headspace was programmed using an independent controller.

This instrumental configuration has been used in the development of the application for the determination of chlorophenols in water samples (chapter IV).

Figure 4 shows the instrumental configuration previously described with the MACH™ device mounted outside the GC oven.



Figure 4: Instrumental configuration HS-PTV-GC (MACH™) -MS

The column module is programmed and controlled together with the PTV using Maestro software.

This instrumental configuration has been used in the development of the application for the determination of ibuprofen in water samples with *in situ* derivatization, using methanol in acidic medium (chapter V).

Finally, figure 5 shows the instrumental configuration CombiPAL-GC-PTV-MS.

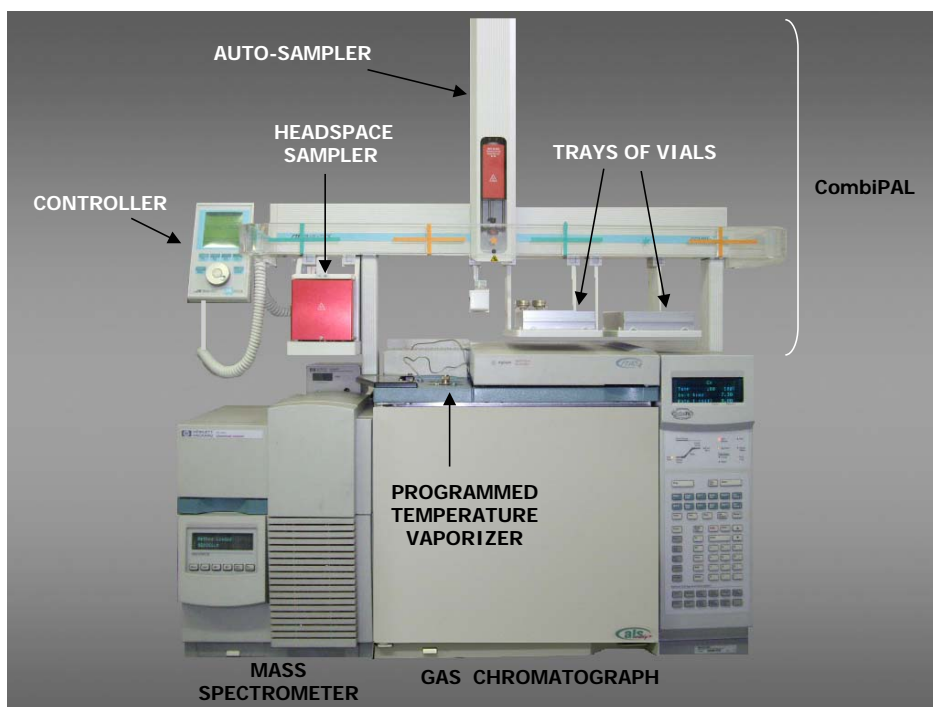


Figure 5: Instrumental configuration CombiPAL-PTV-GC-MS

The CombiPAL is programmed using an independent controller, in which the injection mode and the different conditions of the variables involved are fixed. Subsequently, the sample sequence is programmed.

This autosampler has been used in the development of the application for the determination of ibuprofen in water samples, using headspace sampling with an *in situ* carbodiimide-mediated derivatization reaction (Chapter VI).

2. GAS CHROMATOGRAPH WITH PROGRAMMED TEMPERATURE VAPORIZER AND MICRO 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 μ m) for fast gas chromatography from Agilent (J&W Scientific Columns, USA). The oven allows five temperature ramps. The maximum temperature ramps allowed are 120 $^{\circ}$ C/min to 70 $^{\circ}$ C, 95 $^{\circ}$ C/min from 70 to 115 $^{\circ}$ C, 65 $^{\circ}$ C/min from 115 to 175 $^{\circ}$ C, 45 $^{\circ}$ C from 175 to 300 $^{\circ}$ C and 35 $^{\circ}$ C/min from 300 to 400 $^{\circ}$ 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 Ni⁶³ micro electron capture detector (μ ECD) from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). The maximum temperature allowed by the radiation source is 400 $^{\circ}$ C. According to the specifications, the detection zone volume of this detector is 10 times smaller than a conventional ECD, which translates into greater sensitivity and decreases the chance of cell contamination.

To speed the analytes movement through the detector, an auxiliary gas flow is used, which enters the detector close to the end of the column. This auxiliary flow influences the sensitivity of the detector and the chromatographic separation, decreasing the chance of cell contamination and improving uptime. The gas used is nitrogen (99.999 % purity; Air Liquid) and the usual values adopted are between 20 and 60 mL/min. Another innovation of the micro electron capture detector is the anode disposal (hidden anode) that minimizes the chance for contamination to reach the anode.

2.4. Liquid samples injector

The automatic liquid sample injection system was an Agilent 7683 equipped with a 10 μ L microsyringe. It is possible to select three syringe plunger speeds, low (5 μ L/s), high (100 μ L/s) and variable (between 0.03 and 100 μ L/s).

2.5. Scheme of the instrumental configuration

Figure 6 shows an image of this instrumental configuration, which has been used in the development of a simplified QuEChERS approach for the determination of halogenated compounds in soils (Chapters IX and X).

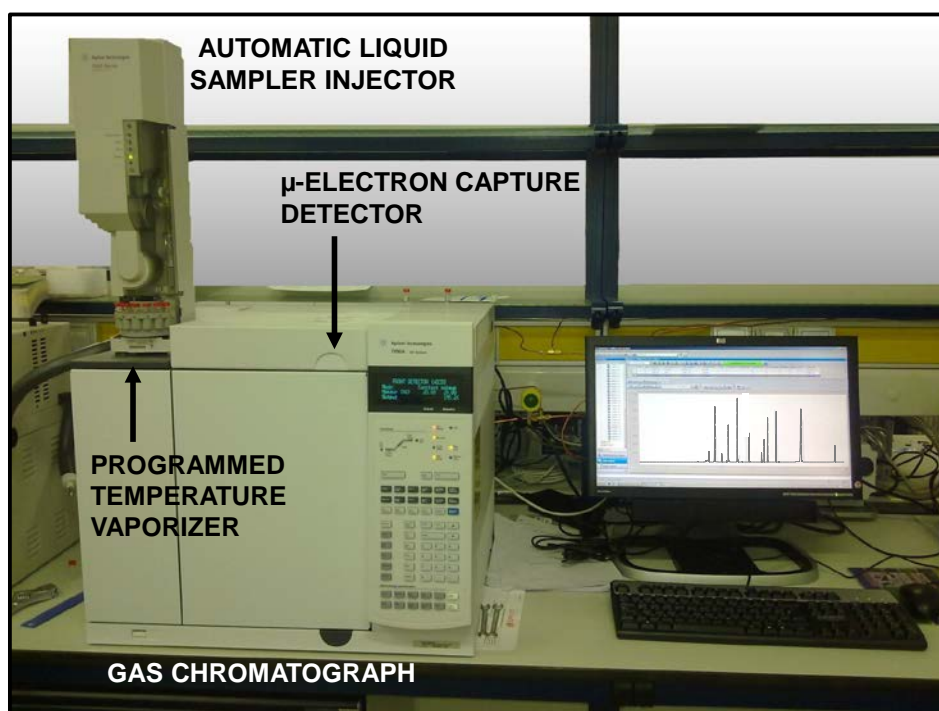


Figure 6: *Instrumental configuration PTV-GC-ECD*

The liquid sampler injector, gas chromatograph, PTV and detector control, as well as the data acquisition were performed using specific software with a personal computer.

3. GAS CHROMATOGRAPH WITH PROGRAMMED TEMPERATURE VAPORIZER COUPLED TO THERMAL DESORPTION SYSTEM AND QUADRUPOLE MASS SPECTROMETER

3.1. Gas chromatograph

The gas chromatograph was an Agilent 6890 from Agilent Technologies equipped with a HP-5MS capillary column (30 m x 250 μm x 0.25 μm) from Agilent (J&W Scientific Columns, Waldbronn, Germany). The oven allows five temperature ramps. The maximum temperature ramps allowed by the oven were 70 $^{\circ}\text{C}$ /min from 45 to 175 $^{\circ}\text{C}$, 45 $^{\circ}\text{C}$ /min from 175 to 300 $^{\circ}\text{C}$ and 35 $^{\circ}\text{C}$ /min from 300 to 450 $^{\circ}\text{C}$. The carrier gas was helium N50 (99.999 % pure; Air Liquid).

3.2. Programmed temperature vaporizer

The PTV used was from Gerstel (CIS-4; Gerstel, Baltimore, MD, USA). It has the same technical specifications as the one described in section 1.2.

3.3. Quadrupole mass spectrometer detector

The quadrupole mass spectrometer used was an HP 5973 from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). The technical specifications are described in section 1.3.

3.4. Thermal desorption system

The device used for sample introduction was a thermal desorption system (TDS) from Gerstel (Mülheim an der Ruhr, Germany) equipped with a tray for 20 consecutive samples, a desorption oven and a transfer line coupled to the programmed temperature vaporizer.

Analytes can be desorbed and concentrated from adsorbent tubes (glass wool, Tenax-TA, etc.), from twisters or directly from solid or viscous samples that have been placed in TDS tubes. Subsequently, a robotic arm introduces the tubes in the desorption oven, where the analytes are submitted to high gas flow and temperature and are transferred, throughout the transfer line, to the PTV, which operates as a cryogenic trap. The maximum temperature ramp allowed by the TDS oven was 12 °C /s to a maximum temperature of 400 °C. In the same way, the maximum temperature allowed by the transfer line was 350 °C. Once the desorption step had been completed, the liner of the PTV was flash-heated, such that the analytes were transferred to the chromatographic column. Figure 7 shows a more detailed image of this configuration.

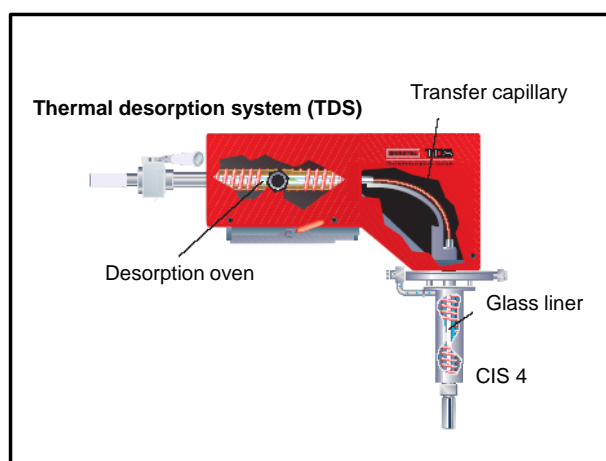


Figure 7: TDS oven configuration

3.5. Scheme of the instrumental configuration

Figure 8 shows an image of this instrumental configuration.

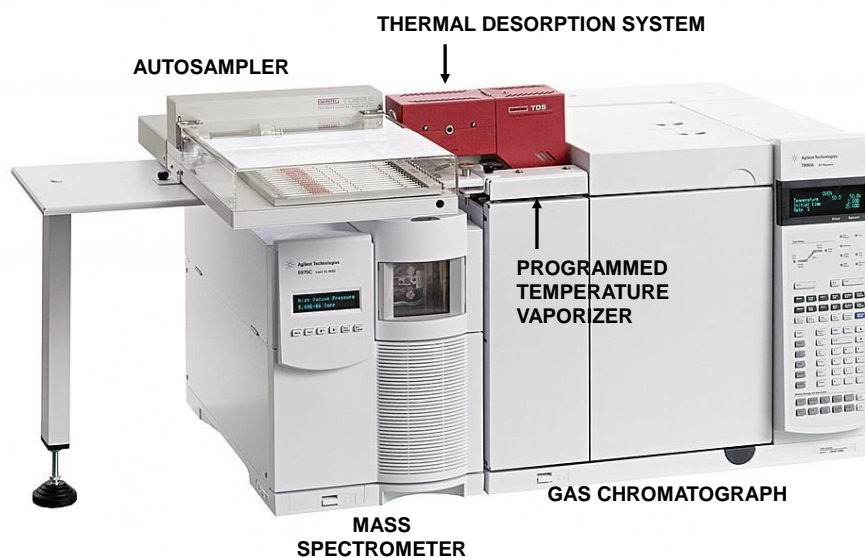


Figure 8: Instrumental configuration TDS-PTV-GC-MS

The thermal desorption system, PTV, gas chromatograph and detector control, as well as the data acquisition was performed using specific software with a personal computer.

This instrumental configuration has been used for the determination of parabens, triclosan and methyl triclosan in water and soil samples using stir bar sorptive extraction (SBSE) with an *in situ* derivatization reaction.

IV. USE OF A PROGRAMMED TEMPERATURE VAPORIZER AND AN *IN SITU* DERIVATIZATION REACTION TO IMPROVE SENSITIVITY IN HEADSPACE-GAS CHROMATOGRAPHY. APPLICATION TO THE ANALYSIS OF CHLOROPHENOLS IN WATER

1. AIM

In the present work we propose to combine the advantages of using derivatization reactions together with those of using a programmed temperature vaporizer to increase the sensitivity in headspace sampling and to expand the number of compounds that can be analyzed with this technique.

As representative analytes for this approach, four chlorophenols were chosen: 2-chlorophenol (2CP), 2,4-dichlorophenol (24DCP), 4-chloro-3-methylphenol (4C3MP) and 2,4,6-trichlorophenol (246TCP). These are semi-volatile compounds, and hence are not very suitable for direct analysis with HS. They are also polar due to the presence of –OH group, which hinders their separation by GC. If they are not derivatized previously they tend to give broad and tailed peaks, largely compromising chromatographic separation, peak integration and method reliability.

We propose a rapid and sensitive analytical method for the determination of these compounds in water samples, using *in situ* acetylation with acetic anhydride. We have chosen this reaction over silylation [1,2] or methylation [3,4] because it can be carried out in aqueous medium [5-7].

These chlorophenols are found among priority pollutants in water according to the Environmental Protection Agency (EPA) [8] and the World Health Organization (WHO) [9], who propose a guideline value of 200 µg/L

for 2,4,6-trichlorophenol in drinking water. Directive 80/778/EC of the European Union establishes a maximum content of total phenols in drinking water of 0.5 µg/L. The concentration of each of them should not exceed 0.1 µg/L.

2. CONCLUSIONS

In the present work it was possible to increase sensitivity in the coupling of a headspace sampler with a gas chromatograph for the analysis of semi-volatile compounds through use of a derivatization reaction in the headspace vial and of a programmed temperature vaporizer inlet for transfer of the headspace to the chromatographic column. Injection in solvent vent mode allows the compounds to be focused in the liner and affords narrow peaks that are typical of fast/very-fast chromatography.

The instrumental configuration used in this study has the advantages that extraction-preconcentration and the instrumental measurement of the analytes are carried out on-line, with no need for intermediate steps, as it occurs when working with other modes of sample introduction such as SPME or SBSE.

The choice of the suitable liner for the PTV is important. In the case of using a liner packed with Tenax-TA, the repeatability of the method decreases considerably, owing to the degradation of the derivatized chlorophenols at the surface of the adsorbent.

The method proposed for the determination of chlorophenols is highly sensitive, with detection limits ranging from 5 to 8 ng/L. The linearity, repeatability and accuracy of the method were analyzed and proved to be satisfactory.

3. REFERENCES

- [1] T. Heberer, H.J. Stan, *Anal. Chim. Acta* 341 (1997) 21.
- [2] M. Saraji, M. Bakhshi, *J. Chromatogr. A* 1098 (2005) 30.
- [3] M. Amijee, J. Cheung, R.J. Wells, *J. Chromatogr. A* 738 (1996) 43.
- [4] A. Geibler, H.F. Schöler, *Water Res.* 28 (1994) 2047.
- [5] I. Turnes, I. Rodriguez, C.M. Garcia, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 743 (1996) 283.
- [6] M. Llompart, M. Lourido, P. Landín, C. García-Jares, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 137.
- [7] L. Montero, S. Conradi, H. Weiss, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1071 (2005) 163.
- [8] L.H. Keith (Ed.), *Compilation of Sampling Analysis Methods*, US Environmental Protection Agency, Boca Raton, FL, 1991.
- [9] *Guidelines for Drinking Water Quality*, 2nd ed., vol. 2, Health Criteria and Other Supporting Information, 1996, p. 940 and Addendum to vol. 2, 1998, p. 281, World Health Organization, Geneva.

V. *IN SITU* DERIVATIZATION REACTION AND DETERMINATION OF IBUPROFEN USING HEADSPACE GENERATION-PROGRAMMED TEMPERATURE VAPORIZATION-GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

1. AIM

The aim of the present work follows the objective proposed in Chapter IV, in which we reported the use of headspace generation with an *in situ* derivatization reaction in the vial of the headspace sampler for the determination of semivolatile compounds in aqueous samples. A programmed temperature vaporizer to introduce the sample into the chromatographic system was proposed. Our research team has gained broad experience in the use of this type of injector for the analysis of compounds in different matrices [1-3].

Thus, the aim of this work is to propose a simple method based on headspace generation for the determination of ibuprofen, as a typical representative of NSAIDs in aqueous samples. To accomplish this, we propose an *in situ* derivatization reaction with methanol in acid aqueous medium with minimum sample manipulation, since analyte extraction is not required either before or after the reaction.

To the best of our knowledge, this is the first time that such an approach has been used for determining this kind of compounds. Measurements were collected by coupling the headspace sampler (HS) to a programmed temperature vaporizer (PTV), a gas chromatograph (GC) and a mass spectrometer.

2. CONCLUSIONS

Here we propose a rapid and sensitive method for the determination of the emerging contaminant ibuprofen in aqueous samples by coupling a headspace sampler to a programmed temperature vaporizer injector with a gas chromatograph and a mass spectrometer, using an *in situ* derivatization reaction in aqueous medium in the headspace vial.

This instrumental configuration has the advantage that, as from the mixing of the reagents in the HS vial, the whole process takes place on-line, with the consequent reduction in errors associated with sample manipulation.

The method is fast: after the first hour of equilibration of the vials it is possible to analyze a sample every 10.5 min. The method is also sensitive, the limits of detection and quantification achieved are good, taking into account that an *in situ* derivatization method in aqueous medium with no previous preconcentration step is proposed.

These limits, 0.23 $\mu\text{g/L}$ and 0.69 $\mu\text{g/L}$, would make it appropriate for the analysis of ibuprofen in urban wastewater, in which concentrations of the drug of the order of $\mu\text{g/L}$ have previously been found.

3. REFERENCES

- [1] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, J. *Chromatogr. A* 1202 (2008) 196.
- [2] J.L. Pérez Pavón, S. Herrero Martín, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, J. *Chromatogr. A* 1194 (2008) 103.
- [3] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández Laespada, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, J. *Chromatogr. A* 1141 (2007) 123.

VI. HEADSPACE SAMPLING WITH *IN SITU* CARBODIIMIDE-MEDIATED DERIVATIZATION FOR THE DETERMINATION OF IBUPROFEN IN WATER SAMPLES

1. AIM

In the previous Chapter, an *in situ* methylation reaction in the vial of a headspace sampler for the determination of ibuprofen (2-(p-isobutylphenyl)propionic acid) in aqueous samples was proposed. A programmed temperature vaporizer was used to introduce the sample into the gas chromatographic system.

In the present work we propose a similar approach, using carbodiimide-mediated amide formation with water soluble 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide (EDC) and 2,2,2-trifluoroethylamine (TFEA). Ibuprofen was again selected among the NSAIDs due to its frequent detection in environmental waters and the higher concentrations habitually found [1,2], probably as a result of its high prescription extent and wide usage. It has been included in studies aimed to obtain a first overview of contamination with pharmaceuticals [3,4].

With the proposed set-up, it is not necessary to implement previous extraction of the analyte from the aqueous matrix to an organic or hydro-organic medium, this step being mandatory in the types of derivatization most frequently used for NSAIDs prior to their GC analysis, such as silylation [5-8] or alkylation [9-11]. Moreover, headspace sampling makes the liquid-liquid extraction step of the ibuprofen derivative unnecessary to perform the analysis by gas chromatography, thereby simplifying the analytical process.

2. CONCLUSIONS

In the present work, we optimized an *in situ* derivatization method in aqueous medium for the analysis of ibuprofen in static headspace mode. 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide (EDC) and 2,2,2-trifluoroethylamine (TFEA) were used as derivatization reagents.

The instrumental configuration used (HS-PTV-GC-MS) has the advantage that, as from the mixing of the reagents in the HS vial, the whole process takes place on-line, with the consequent reduction in errors associated with sample manipulation. The main limitation to extend this approach to other carboxylic acids present in waters is that their derivatives have to be volatile enough.

The proposed method is highly sensitive, with a limit of quantification of 32 ng/L, allowing the determination of this analyte in both surface and wastewater samples with good repeatability (RSD below 10 %) and accuracy values (apparent recoveries between 96 % and 104 %). This limit is improved with respect to that obtained in the previous Chapter (limit of quantification, 0.69 $\mu\text{g/L}$), in which derivatization was carried out with methanol in a strongly acid medium. Additionally, the reaction time and headspace generation were reduced from 60 to 15 min.

When quantification was performed in complex aqueous matrices, such as wastewater samples, a standard additions protocol was required.

3. REFERENCES

- [1] M.J. Gómez, M.J. Martínez Bueno, S. Lacorte, A.R. Fernández-Alba, A. Agüera, *Chemosphere* 66 (2007) 993.
- [2] L.H.M.L.M. Santos, A.N. Araújo, A. Fachini, A. Pena, C. Delerue-Matos, M.C.B.S.M. Montenegro, *Journal of Hazard. Mater.* 175 (2010) 45.
- [3] S. Weigel, U. Berger, E. Jensen, R. Kallenborn, H. Thoresen, H. Hühnerfuss, *Chemosphere* 56 (2004) 583.
- [4] Z. Moldovan, *Chemosphere* 64 (2006) 1808.
- [5] A. Sebók, A. Vasánits-Zsigrai, Gy. Palkó, Gy. Záray, I. Molnár-Perl, *Talanta* 76 (2008) 642.
- [6] R. Gibson, E. Becerril-Bravo, V. Silva-Castro, B. Jiménez, *J. Chromatogr. A* 1169 (2007) 31.
- [7] A. Togola, H. Budzinski, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 627.
- [8] I. Rodriguez, J. Carpinteiro, J.B. Quintana, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1024 (2004) 1.
- [9] S. Öllers, H.P. Singer, P. Fässler, S.R. Müller, *J. Chromatogr. A* 911 (2001) 225.
- [10] S.S. Verenitch, C.J. Lowe, A. Mazumder, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 193.
- [11] N. Migowska, P. Stepnowski, M. Paszkiewicz, M. Gołębiowski, J. Kumirska, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 3029.

VII. GC-MS DETERMINATION OF PARABENS, TRICLOSAN AND METHYL TRICLOSAN IN WATER BY *IN SITU* DERIVATIZATION AND STIR-BAR SORPTIVE EXTRACTION

This work was developed in the Laboratory of Analytical Chemistry of the Helmholtz Centre for Environmental Research-UFZ (Leipzig, Germany) under the supervision of Monika Möder.

1. AIM

Following the trend proposed in the present PhD Thesis, the aim of this work was to combine the advantages of SBSE and an *in situ* derivatization reaction for the analysis of parabens and triclosan in water samples. Methyl triclosan was also included as possible product of degradation of triclosan in water samples. This is the first time that this methodology has been applied for the determination of these compounds in such matrices. To date, the use of SBSE for the determination of parabens in aqueous samples is limited to the work by Ochiai et al. [1] in which the authors determined preservatives in different types of beverages and sauces with no derivatization. In the case of triclosan, SBSE has also been used without any type of derivatization [2,3].

Since the acetylation with acetic anhydride is used frequently for the derivatization of phenols, it was selected as *in situ* reaction for the determination of the phenolic target analytes.

The enriched target analytes were desorbed thermally using a thermodesorption system coupled to a gas chromatograph (GC) and a mass spectrometer (MS). The aim of the method development was to establish a highly sensitive, fast and robust method for the determination of these compounds in complex water samples such as surface water or wastewater.

2. CONCLUSIONS

In the present work, a new method for the analysis of parabens, triclosan and methyl triclosan in water samples has been developed. An *in situ* acetylation reaction simultaneously with a stir bar sorptive extraction (SBSE) procedure was proposed. The enriched analytes were thermally desorbed and subjected to GC-MS analysis.

The variables affecting the simultaneous acetylation reaction performed to decrease analyte polarity were basic medium and volume of acetic anhydride. The variables related to the sorptive extraction step included sample volume, extraction time and the addition of NaCl. Thermal desorption parameters (cryofocusing temperature, desorption flow, desorption time, desorption temperature) were optimized using a Box-Behnken experimental design.

The optimized method proved to be efficient, easy-to-use and highly sensitive, with recoveries higher than 80 % in most cases. It showed good linearity, high correlation coefficients and no lack of fit. The detection limits were of low nanograms per litre, equalling or improving the results obtained with other proposed techniques.

The method was successfully applied in real water samples. Triclosan and n-propylparaben were detected in the micrograms per litre range in influent water from the main wastewater treatment plant of Leipzig.

3. REFERENCES

- [1] N. Ochiai, K. Sasamoto, M. Takino, S. Yamashita, S. Daishima, A.C. Heiden, A. Hoffmann, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 56.
- [2] M. Kawaguchi, R. Ito, H. Honda, N. Endo, N. Okanouchi, K. Saito, Y. Seto, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. A* 1206 (2008) 196.
- [3] A.R.M. Silva, J.M.F. Nogueira, *Talanta* 74 (2008) 1498.

VIII. STIR BAR SORPTIVE EXTRACTION OF PARABENS, TRICLOSAN AND METHYL TRICLOSAN FROM SOIL, SEDIMENT AND SLUDGE WITH *IN SITU* DERIVATIZATION AND DETERMINATION BY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

This work was developed in the Laboratory of Analytical Chemistry of the Helmholtz Centre for Environmental Research-UFZ (Leipzig, Germany) under the supervision of Monika Möder.

1. AIM

The aim of the present work follows the general trend proposed in this PhD Thesis, in which new sample strategies for the determination of organic contaminants in environmental matrices are proposed, following the new trend known as Green Analytical Chemistry, in which the final objective is to restrict organic solvents consumption, as well as to minimize waste generation.

Previous Chapters have focused on the determination of different types of contaminants in water matrices. By reference to Chapter VII, in which a new methodology for the determination of parabens, triclosan and methyl triclosan in water samples using stir bar sorptive extraction (SBSE) with an *in situ* derivatization reaction was proposed, the aim of this study was to evaluate whether SBSE with an *in situ* reaction could be successfully applied for the extraction and determination of these analytes directly from soils without any organic solvent.

For the analysis of soil samples with SBSE, most applications reported require a previous soil analyte extraction step with techniques such as ultrasonic solvent extraction (USE) [1,2], pressurized liquid extraction (PLE)

[3], or pressurized subcritical water extraction (PSWE) [4]. The extract, previously diluted in water, is subjected to the SBSE extraction process. The method proposed in this work has the potential to reduce the sample preparation and analysis time to a considerable extent in comparison with these conventional techniques.

Optimization of the derivatization reaction and the extraction step from soils were accomplished in order to obtain the best conditions. The enriched target analytes were desorbed thermally using a thermodesorption system coupled to gas chromatography (GC)-mass spectrometry (MS).

2. CONCLUSIONS

In the present work we propose the use of stir bar sorptive extraction with an *in situ* derivatization reaction for the analysis of parabens, triclosan and methyl triclosan in soils. The literature contains few references to direct applications of extraction by SBSE in soils.

The effect of the variables affecting the derivatization reaction and the SBSE extraction were studied using spiked river sediment samples. The optimized method proved to be easy and sensitive, with detection limits ranging from 80 ng/kg to 1.06 µg/kg. It showed good linearity, with high correlation coefficients (higher than 0.99 in all cases) and no lack of fit. The reproducibility and repeatability of the method were evaluated in terms of apparent recoveries, with values between 91 % and 110 %. With these characteristics, it is possible to determine these compounds in real samples, for which a standard additions protocol must be implemented.

Regarding the analytes studied, differences were found in behaviour between the parabens and triclosan and methyl triclosan. The working conditions chosen were a compromise in order to create a multicomponent protocol. When focused on the determination of triclosan and methyl triclosan, other optimum conditions should be chosen and a higher sensitivity could be achieved. Nevertheless, the limits of detection of overall analytes were satisfactory bearing in mind the concentration levels found in real samples.

3. REFERENCES

- [1] M. Martínez-Parreño, J. Llorca-Pórcel, I. Valor, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 3620.
- [2] J. Llorca-Pórcel, M. Martínez-Parreño, E. Martínez-Soriano, I. Valor, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5955.
- [3] X. Zhu, J. Cai, J. Yang, Q. Su, Y. Gao, *J. Chromatogr. A* 1131 (2006) 37.
- [4] R. Rodil, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1124 (2006) 82.

IX. SIMPLIFIED QuEChERS APPROACH FOR THE EXTRACTION OF CHLORINATED COMPOUNDS FROM SOIL SAMPLES

1. AIM

The main objective of this work was to evaluate the possibilities of the QuEChERS extraction method for the extraction of chlorinated pollutant compounds from soil samples. For this purpose, a simplified version of the QuEChERS protocol was proposed.

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, was proposed.

The principal advantage of the proposed version is related to the elimination of the dispersive SPE (d-SPE) step after the extraction. This step has demonstrated to be highly effective to reduce lipid matrix co-extractives 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 EDC system, it was decided to analyze 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, three chlorinated compounds of different characteristics related to their volatility and polarity were chosen: chloroform, 1,2-dichlorobenzene and hexachlorobenzene. These analytes are very important organic pollutants,

because of their common use and high toxicity. The International Agency for Research of 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 in experimental animals [1,2].

Two solvents (acetonitrile and ethyl acetate) were 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 ethyl acetate and acetonitrile can be used for analyte extraction, although EtOAc was 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.

New research is required to address more extensive validation of this method in order to extend it to different organic compounds in soil matrices.

3. REFERENCES

- [1] Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Summaries & Evaluations, vol. 73, International Agency for Research on Cancer, 1999.
- [2] Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Summaries & Evaluations, vol. 79, International Agency for Research on Cancer, 2001

X. DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A SIMPLIFIED QuEChERS EXTRACTION METHOD FOR THE DETERMINATION OF C1-C3 CHLORINATED HYDROCARBONS AND CHLOROBENZENES IN SOIL SAMPLES

1. AIM

In the previous Chapter, a modified version of the QuEChERS methodology was evaluated in soil matrices, using three halogenated compounds -chloroform, 1,2-dichlorobenzene and hexachlorobenzene- as target analytes. The final clean-up step (dispersive SPE) was seen to be unnecessary due to the non-fatty characteristics of the soil matrices and the high degree of selectivity and sensitivity of the GC- μ ECD system. Determination of trihalomethanes in soil matrices by this simplified QuEChERS extraction procedure has also been proposed by our research group [1,2].

The main objective of the present work was to optimize and validate the simplified QuEChERS methodology for the extraction and determination of volatile and semivolatile pollutants in soils. Seven common chlorinated compounds and four chlorobenzenes were selected. Measurements were collected using a programmed temperature vaporizer (PTV) coupled to a gas chromatograph (GC) and a micro-electron capture detector (μ -ECD).

2. CONCLUSIONS

In the present work we propose a simplified version of the QuEChERS method for the determination of seven common chlorinated hydrocarbons and four chlorobenzenes in polluted soil samples. The proposed method is quick, easy, cheap, effective, rugged and safe and therefore meets the characteristics of the original QuEChERS method.

Three solvents for use in extraction were studied. Ethyl acetate was chosen as the extraction solvent, after comparing it with propyl acetate and acetonitrile, owing to its better chromatographic behaviour.

Clean soil extracts were obtained without a clean-up step, thereby reducing sample handling and the errors associated with this. Upon comparing the slopes obtained on preparing the calibrations in two different types of soils, the absence of a matrix effect was seen.

The method proposed is reproducible and highly sensitive, with limits of detection ranging from 30 ng/kg to 2.87 µg/kg. The accuracy of the method was verified by analyzing two certified reference materials and proved to be satisfactory. These results prove that the multistep QuEChERS sample preparation method can be successfully applied to volatile, as well as semivolatile compounds, avoiding the need to use different extraction techniques according to the volatility of the analytes.

3. REFERENCES

- [1] S.H. Martín, C.G. Pinto, J.L.P. Pavón, B.M. Cordero, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 4883.
- [2] C.G. Pinto, S.H. Martín, J.L.P. Pavón, B.M. Cordero, Anal. Chim. Acta 689 (2011) 129.

XI. GENERAL CONCLUSIONS

In this PhD Thesis new sample treatment strategies for the determination of organic contaminants at trace levels in different environmental matrices have been proposed.

In order to study 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 it is possible to eliminate the drawbacks usually linked to HS-GC coupling when conventional split/splitless injectors are used, of initial band broadening and poor definition of peak morphology. Cold injection modes achieve the focalization of the analytes in the liner, with the subsequent fast transference to the chromatographic column. This results in an increment in the signal-to-noise 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 chlorophenols and ibuprofen in water samples and, in both cases, results have been highly satisfactory. The main advantages of the instrumental configuration HS-PTV-GC-MS is that it is possible to analyze the volatile compounds of the sample without interferences of the non-volatile components of the matrix, and it is simple, fast, automatic, with minimal sample handling and highly sensitive. Therefore, the instrumental configuration proposed here has a great potential for the improvement of sensitivity in headspace analysis.

➤ **Use of *in situ* derivatization reactions to increase the volatility of the target analytes in the HS-GC coupling.**

The use of *in situ* derivatization reactions in the headspace vial has proved to be a very effective alternative in order to increase the sensitivity in headspace analysis.

The use of derivatization reactions that generate compounds more volatile than the original analytes has the advantage that it enables the use of the HS sampling technique for compounds to which, owing to their low volatility, in principle it would not be applicable. Additionally, with the formation of less polar compounds, an improvement of the chromatographic characteristics (such as reproducibility, sensibility and peak shape) is observed.

This instrumental configuration has the advantage that, as from the mixing of the reagents in the HS vial, the whole process takes place on-line, with the consequent reduction in errors associated with sample manipulation. Furthermore, the use of a derivatization reaction does not complicate the procedure since it takes place at the same time as the extraction of the volatile compounds from the aqueous matrix.

In the present work, several reactions have been used to increase the volatility of the analytes when headspace sampling is used. For the determination of chlorophenols in water samples, esterification with acetic anhydride in basic medium has been proposed. For the determination of ibuprofen in water samples, two reactions have been used, an ester formation with methanol in acid aqueous medium, and a carbodiimide-mediated amide formation with water-soluble 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide and 2,2,2-trifluoroethylamine (TFEA). As it has been previously noted, the results obtained are highly satisfactory, which shows the great potential of the derivatization reactions to improve the sensitivity in headspace analysis

➤ **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 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). Moreover, cold injection modes achieve the focalization of the analytes in the liner, which results in a narrowing of the chromatographic peaks.

➤ **Combination of stir bar sorptive extraction (Twister) with *in situ* derivatization in water and soil samples.**

The use of stir bar sorptive extraction (SBSE) with an *in situ* derivatization reaction has been successfully applied to the determination of

parabens, triclosan and methyltriclosan in water and soil samples. The most important limitations of this extraction technique are related to the coating of the stir bars; the non-polar polydimethylsiloxane is currently the only polymer commercially available, thus providing poor recoveries for polar analytes. *In situ* derivatization reactions, with the formation of less polar compounds, can be applied to improve the extraction yields. Besides, the use of a derivatization reaction does not complicate the procedure since it takes place at the same time as the extraction from the aqueous matrix.

The methodologies proposed in this work (for both water and soil samples) are simple, effective and highly sensitive. The detection limits achieved in both applications were among the lowest in comparison with others described in literature, and they offer important advantages over conventional extraction methods, such as minimization of sample handling, complete elimination of the use of organic solvents, and simplification of the analytical procedure, with reduced time consumption. With regard to soil matrices, the improvement is very accused; the methodologies previously proposed in literature involve several steps, which include an exhaustive extraction of the compounds from the soil samples, with later cleaning of the extract and a later analyte derivatization step.

➤ **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 (chloroform, C1-C3 chlorinated hydrocarbons and chlorobenzenes) 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 micro electron capture detection has been used to analyze the extracts. Thanks to the high selectivity and sensitivity of the detector, very satisfactory detection limits have been achieved.

The good results obtained for volatile and semivolatile compounds show the great potential of this technique in the extraction of all type of organic compounds, avoiding the need to use different extraction techniques according to the volatility of the analytes.

**ANEXO I:
Informes sobre el trabajo
realizado**

***APPENDIX I:
Reports on developed work***



Report on Thesis summary of Ana Maria Casas Ferreira

Thesis summary entitled "New sample treatment strategies for the determination of organic contaminants in environmental matrices" is written on 135 pages and organized within eight main chapters plus three for General Aim, Introduction and General conclusions, all well supported with new literature data.

General comments

Bearing in mind toxicological importance of pollution by organic contaminants in environmental compartments and lots of unsolved problems dealing with identification, determination and management this work is an exceptional contribution.

Complexity of environmental matrices requires great internal knowledge of chemical environment in analyzed matrices (soil and water) as well as a very systematic approach in designing experiments. This work met all demands.

Total uncertainty of one analysis is a sum of variance for sample preparation and measurements of particular analyte. Sample preparation is, in general, the most tedious part of each analysis and errors made in that part influence directly on final results and conclusions that have to be made. In that sense, focus on a new sample treatment procedures for determination of organic contaminants is certainly an excellent approach in real samples problems solving.

Selection of target analytes was made in accordance with current demands and requirements and well-known toxicity so, the obtained results could be also very helpful in risk assessment evaluations.

Detailed comments

Beside general goals mentioned above the methodological objectives of special analytical importance were defined through several approaches successfully applied in further analysis:

- a. The coupling of a headspace autosampler with a programmable temperature vaporizer
- b. The use of in situ derivatization reactions to increase the volatility of the target analytes in the HS-GC



- c. The combination of fast gas chromatography with sample introduction by means of solvent vent injection mode allowed by the programmable temperature vaporizer.
- d. The combination of stir bar sorptive extraction with *in situ* derivatization in water and soil samples.
- e. The application of the sample pre-treatment technique QuEChERS to the extraction of halogenated organic compounds from soil samples.

Based on above methodologies several analytical methods were developed and successfully applied for determination of chlorophenols, ibuprofen, parabens, triclosan and methyl triclosan in water samples as well as for extraction of parabens, triclosan and methyl-triclosan from soil slurry, the extraction of chlorinated compounds from soil samples and finally for determination of volatile halogenated organic compounds and chlorobenzenes in soil matrices.

The obtained results were published in six leading analytical journals what confirm their true value.

So, in my conclusion I would like to stress that this Thesis has significant degree of scientific novelty and presents real contribution to analytical sciences.

Prof. Dr. Slavica Ražić

In Belgrade, June 8, 2011.

Universidad de Salamanca
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Química Analítica

June 12, 2011

Statement over the PhD thesis of Ana María Casas Ferreira

The thesis “New sample treatment strategies for the determination of organic contaminants in environmental matrices” consist of eleven chapters. In the two first chapters Ana María Casas Ferreira gives the general aim of the thesis work and the introduction to the subject of the thesis. Then she describes the instrumentation in a very thorough and comprehensive way. In each of the following chapters she first describes the aim of the work published in the paper of the chapter and the main conclusions of the results. The corresponding paper is included to the chapter. The final chapter consists of the general conclusions of the thesis. The thesis is based on six papers published in highly ranked journals and one that has been submitted.

Ana María Casas Ferreira has developed new headspace gas chromatographic methods for determination of organic substances in environmental samples. She has also developed methods for extraction of the target compounds from the samples.

The thesis is in the field of instrumental analytical chemistry where both instrumentation and methods of analysis have been developed. The methods are then used in practical analytical work demonstrating the capabilities of the developed methods. This kind of thesis work shows the importance of combining method development with practical application. My opinion is that we should see more of this kind of theses published at the universities.

The thesis is well written, the content well organized and logically presented and shows high quality of the research work done by Ana María Casas Ferreira. I strongly propose that her thesis would be accepted as part of the requirements for receiving the PhD degree in the Department.

Sincerely yours,



Professor of Analytical Chemistry