



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Departament de Química Analítica i Química Orgànica

Àrea de Química Analítica

**APLICACIÓN DE LA MICROEXTRACCIÓN EN
FASE SÓLIDA AL ANÁLISIS MEDIOAMBIENTAL**

**Memoria presentada por
ALEJANDRA M. PEÑALVER HERNANDO
para optar al grado de
Doctora en Química
Tarragona, 2002**



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Departament de Química Analítica
i Química Orgànica

La Dra. ROSA M. MARCÉ i RECASENS, Professora Titular del Departament de Química Analítica i Química Orgànica de la Facultat de Química de la Universitat Rovira i Virgili, i

La Dra. EVA POCURULL AIXALÀ, Professora Titular del Departament de Química Analítica i Química Orgànica de la Facultat de Química de la Universitat Rovira i Virgili,

CERTIFIQUEM:

Que la present Tesi Doctoral, que porta per títol: "APLICACIÓN DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA AL ANÁLISIS MEDIOAMBIENTAL", presentada per ALEJANDRA M. PEÑALVER HERNANDO per optar al grau de Doctora en Química, ha estat realitzada sota la nostra direcció, a l'Àrea de Química Analítica del Departament de Química Analítica i Química Orgànica d'aquesta universitat, i que tots els resultats presentats són fruit d' experiències realitzades per l'esmentada doctoranda.

I, per a que consti, expedim aquest certificat a Tarragona, 30 de setembre de 2002.

Dra. Rosa M. Marcé i Recasens

Dra. Eva Pocurull Aixalà

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Rosa M. Marcé y a la Dra. Eva Pocerull, mis directoras, la dedicación que me han prestado durante todos los años de realización de esta tesis y la ayuda que me han proporcionado para la redacción de esta memoria.

Desde estas páginas también quiero dar las gracias a todas aquellas personas que, de una u otra forma, han contribuido a la realización de esta tesis, y muy especialmente:

Al Dr. Francesc Borrull por haberme aceptado en su grupo de investigación y darme la oportunidad de realizar esta tesis.

Al Prof. Janusz Pawliszyn de la Universidad de Waterloo, por la buena acogida en su grupo de investigación durante mi estancia de cuatro meses.

A todas las componentes del grupo de investigación en el que he realizado la tesis por la ayuda que me han prestado y por los buenos momentos que hemos pasado juntas durante todos estos años. Espero no dejarme a nadie: Carmen, Dolores, Ester, Lúdia, M. Josep, Margarita, Marta, Núria F., Núria M., Rosana. Aunque hayamos coincidido muy poco, tampoco quiero olvidarme de las personas que se han incorporado más recientemente al grupo: Alba, Patricia, Sandra R. y Silvia.

Finalmente, deseo agradecer especialmente a mi familia y, por supuesto, a Gerard, por el apoyo que me han dado en todo momento para que esta tesis haya llegado a su fin.

ÍNDICE

OBJETIVO	1
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	5
I.1. Microextracción en fase sólida (SPME).....	10
I.1.1. Fundamentos teóricos de la SPME.....	11
I.1.2. Procedimiento de la SPME	14
I.1.2.1. SPME con fibras	16
I.1.2.2. <i>In-tube</i> SPME	21
I.1.2.3. Extracción por sorción con barras magnéticas agitadoras (SBSE)	24
I.1.3. Tipos de fibras en SPME	29
I.1.4. Variables que afectan al proceso de SPME	32
I.1.4.1. Etapa de absorción/adsorción.....	33
I.1.4.2. Etapa de desorción.....	37
I.1.4.3. Derivatización en SPME.....	38
I.2. Bibliografía.....	42
I.3. Aplicación de la microextracción en fase sólida a la determinación de contaminantes orgánicos en muestras medioambientales.....	49
CAPÍTULO II. ESTADO ACTUAL DE LA CUESTIÓN	79
II.1. Fibras de SPME.....	83
II.2. SPME-GC	89
II.2.1. SPME media ponderada en el tiempo	93
II.2.2. Automatización en SPME-GC.....	96
II.3. SPME-HPLC.....	98
II.4. <i>In-tube</i> SPME	101
II.5. SBSE	105
II.6. Bibliografía	111

CAPÍTULO III. PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS	121
III.1. Microextracción en fase sólida de un grupo de antialgas en muestras acuosas.....	127
III.2. Evaluación de parámetros en microextracción en fase sólida.....	147
III.3. Determinación de ftalatos en muestras de agua mediante microextracción en fase sólida y cromatografía de gases- espectrometría de masas	167
III.4. Comparación de diferentes fibras para microextracción en fase sólida de un grupo de ftalatos.....	193
III.5. Microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía de líquidos de alta resolución para la determinación de fenoles en aguas	215
III.6. Desarrollo de un método analítico basado en microextracción en fase sólida y cromatografía de líquidos de alta resolución para la determinación de estrógenos en muestras de agua.....	239
III.7. Extracción por sorción con barras magnéticas agitadoras y inyección de grandes volúmenes en cromatografía de gases para la determinación de un grupo de disruptores endocrinos.....	263
CAPÍTULO IV. PERSPECTIVAS FUTURAS	285
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	289
ANEXOS	295
I. Estructura química de los compuestos estudiados	297
II. Abreviaturas utilizadas.....	305
III. Publicaciones	309

OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar la aplicación de la microextracción en fase sólida (SPME), utilizando fibras como medio de extracción, acoplada a diferentes técnicas cromatográficas en el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de diferentes familias de contaminantes orgánicos en aguas.

Otro objetivo de la presente Tesis Doctoral ha sido estudiar la viabilidad de una nueva modalidad de la microextracción en fase sólida, la extracción por sorción con barras magnéticas agitadoras (SBSE), como nueva técnica de preconcentración para la determinación de contaminantes orgánicos en aguas.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso natural indispensable para la vida. Sin embargo, el progreso y los avances logrados por el hombre han llevado a producir miles de productos químicos con diferentes finalidades que han contribuido a mejorar la calidad de vida pero que, por otro lado, son introducidos directa o indirectamente en el agua causando serios problemas de contaminación [1]. Así pues, su análisis es muy importante para asegurar y mantener la calidad necesaria para que su utilización no comporte ningún peligro para la salud de los seres vivos [1,2].

Cerca de 60000 productos químicos diferentes son usados diariamente y entre 100 y 1500 nuevos productos químicos son sintetizados cada año [3]. La mayoría de estos productos son generados por la actividad industrial pero también por las actividades agrícolas, el tratamiento de los residuos urbanos, etc. Entre estos compuestos se encuentran los plaguicidas, algunos plastificantes de uso muy común como el bisfenol A y los ftalatos, compuestos organoclorados, compuestos fenólicos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), etc. [3-6]. La mayoría de estos compuestos han sido determinados tanto en aguas superficiales como en subterráneas [2,7,8] lo que ha incrementado la preocupación existente sobre el posible impacto de estos compuestos en el medio ambiente así como en la salud de las personas y animales [9]. En consecuencia, diferentes organismos como la Unión Europea (UE), la Agencia Americana de Protección Ambiental (EPA), etc. han introducido una serie de regulaciones y normativas en las que se indican las concentraciones máximas a las que se pueden encontrar algunos de estos compuestos en aguas de diferente procedencia [10,11]. Actualmente no existe una uniformidad en lo que a normativas se refiere, por lo que los valores fijados como máximas concentraciones permitidas para cada compuesto o grupo de compuestos pueden diferir dependiendo del organismo que dicte la normativa. Así por ejemplo, la UE establece un valor máximo para la concentración de plaguicidas en aguas de consumo humano de $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ para cada compuesto individualmente y $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ para el total de plaguicidas (excepto para el aldrín, dieldrín, heptacloro y epóxido heptacloro cuya máxima concentración permitida

es $0.03 \mu\text{g l}^{-1}$) [12] mientras que la EPA establece concentraciones máximas permitidas individuales para cada plaguicida en concreto [11,13].

Actualmente existen diferentes métodos de análisis que permiten identificar y determinar la concentración de estos contaminantes orgánicos en muestras acuosas [14-20]. En el desarrollo de estos métodos se deben tener en cuenta dos factores principalmente. Por un lado, debido a que las muestras medioambientales son muy complejas, los métodos se basan mayoritariamente en el uso de técnicas de separación, básicamente cromatográficas, con las que se lleva a cabo la separación de los diferentes compuestos; por otro lado, como las concentraciones a las que se encuentran presentes estos compuestos en las muestras medioambientales son muy bajas, se precisan sistemas de detección muy sensibles para su cuantificación o bien se utiliza una etapa de preconcentración previa a la separación y detección. La espectrometría de masas (MS) es una de las técnicas de detección más utilizadas ya que permite identificar los compuestos al mismo tiempo que se cuantifican [21,22]. Entre las técnicas cromatográficas más utilizadas en la actualidad se pueden mencionar principalmente la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) aunque existen otras técnicas cromatográficas de uso más minoritario como la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) y la cromatografía de capa fina (TLC) [23-25]. Entre las técnicas no cromatográficas que también se han aplicado al análisis medioambiental se pueden mencionar la electroforesis capilar (CE) [17,26-29] y otras técnicas de desarrollo más reciente y que se caracterizan por ser rápidas y muy selectivas como por ejemplo la técnica *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) y los biosensores [30-32].

Como se ha comentado anteriormente, los contaminantes orgánicos suelen estar presentes en el agua a niveles traza por lo que generalmente no es posible determinar su concentración mediante una medida instrumental directa y se hace necesario utilizar alguna técnica de preconcentración como etapa previa a la determinación de estos compuestos [33-35]. Las técnicas más utilizadas son la extracción líquido-líquido (LLE) [36-39] y la extracción en fase

sólida (SPE) [19,40-46] aunque, de estas dos técnicas, la más usada últimamente es la SPE debido a que precisa de menores cantidades de disolventes orgánicos, generalmente tóxicos, los tiempos necesarios para realizar la extracción son menores y la manipulación de la muestra es también menor. Además la SPE puede ser acoplada en línea con la GC y HPLC de manera que todo el proceso se puede llevar a cabo de forma automatizada incrementando las ventajas que presenta esta técnica frente a la LLE [44,47-51].

El principio en el que se basa la SPE, que es similar al de la cromatografía de líquidos, es la diferente afinidad de los analitos entre una fase sólida, que es el sorbente, y una líquida, que es la muestra. Existen diferentes tipos de sorbentes que se comercializan en forma de cartuchos o discos y que se escogen en función de los analitos que se quieren determinar. Se pueden diferenciar básicamente tres tipos, los sorbentes de sílices enlazadas [19,42], los de carbón [41,43,45] y los poliméricos [40,44,46,48,49,51]. Otros tipos de sorbentes para SPE y que se han desarrollado más recientemente son los inmunosorbentes y los polímeros de huella molecular [52]. La elución de los analitos retenidos se realiza mediante unos pocos mililitros de un solvente orgánico como por ejemplo metanol, diclorometano, o acetato de etilo cuando la SPE se acopla con la GC o fuera de línea con la HPLC, y con la fase móvil cromatográfica cuando la SPE se acopla en línea con la HPLC [52].

Sin embargo, a pesar de las ventajas que presenta la SPE, en los últimos años los avances en el campo del análisis medioambiental se han dirigido al desarrollo de nuevas técnicas de preconcentración que sean de fácil uso, que permitan minimizar la manipulación de la muestra, que no precisen del uso de disolventes orgánicos, que puedan ser fácilmente automatizadas y que sean rápidas [53]. Otro aspecto importante a tener en cuenta es que estas nuevas técnicas de preconcentración permitan realizar análisis de campo [54,55]. Una de las técnicas que apareció a raíz de la investigación en esta línea es la microextracción en fase sólida (SPME) que fue desarrollada a principios de los años 90 por el grupo de investigación de J. Pawliszyn [56]. La SPME era una

técnica de extracción de muy reciente aparición cuando se inició esta tesis y como el planteamiento inicial de ésta era el estudio y desarrollo de métodos analíticos en los que se utilizaran nuevas técnicas de preconcentración para análisis de contaminantes medioambientales, inicialmente, se realizó un estudio bibliográfico sobre el estado de la cuestión en el campo de la SPME que dio lugar a la publicación de un artículo que se incluye en el apartado I.4.

I.1. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME)

La SPME se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de un sorbente, en la mayoría de los casos polimérico, seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico [57]. El pequeño tamaño de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en una jeringa. De esta forma, se facilita su manipulación y al mismo tiempo se protege la fibra cuando no se utiliza, ya que ésta permanece dentro de la aguja de la jeringa. Un esquema del dispositivo comercial de SPME se muestra en la Figura 1. También está disponible comercialmente un dispositivo de SPME diseñado para realizar análisis de campo que presenta algunas pequeñas diferencias con el dispositivo convencional mostrado en la Figura 1 y que están enfocadas básicamente a proteger la fibra durante el transporte desde el punto de muestreo al laboratorio [58].

Esta técnica presenta una serie de ventajas frente a las técnicas de preconcentración mencionadas anteriormente ya que es muy simple, presenta un bajo coste, puede ser automatizada, requiere pequeños volúmenes de muestra y generalmente no precisa del uso de disolventes orgánicos para llevar a cabo la preconcentración, a diferencia de la LLE y la SPE [57,59]. Además, debido a su diseño, es fácilmente transportable por lo que la hace una técnica muy adecuada para realizar análisis de campo [3,59-61]. Otra ventaja que presenta es la posibilidad de utilizarse con todos los tipos de muestras, ya sean gaseosas como por ejemplo aire [61-63] o aliento [64,65], líquidas como aguas

o bebidas [66-70], o sólidas como sedimentos, alimentos, etc. [71-75]. Además, se puede aplicar a la determinación de compuestos de diferente volatilidad [57,59]. Como inconveniente se puede mencionar que debido a la limitada capacidad de las fibras (la cantidad de recubrimiento es muy pequeña) en ocasiones no se obtienen unos límites de detección bajos, sobre todo si la SPME se utiliza combinada con la cromatografía de líquidos [57].

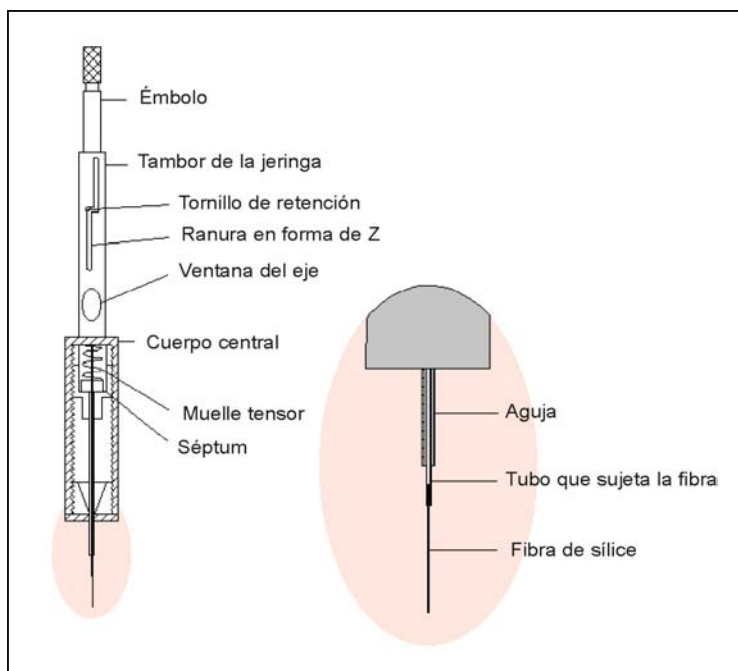


Figura 1. Esquema del dispositivo comercial de SPME.

I.1.1. Fundamentos teóricos de la SPME

El principio en el que se basa la SPME generalmente es la partición de los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de fibra [59]. Así, el transporte de los analitos desde la matriz de la muestra hasta la fibra comienza

cuando la fibra entra en contacto con la muestra y la extracción se considera completa cuando la concentración de analito ha alcanzado el equilibrio de distribución entre la muestra y la fibra.

Existen básicamente dos modos de extracción posibles en SPME, introduciendo la fibra directamente en la muestra o bien en el espacio de cabeza o *headspace*. El modelo matemático que explica la dinámica del proceso de absorción cuando la fibra se introduce directamente en la muestra fue desarrollado por Louch *et al.* [76] y en él se confirma la relación lineal que existe entre la cantidad de analito absorbida por la fibra en el estado de equilibrio y la concentración de éste en la muestra. Esta afirmación se muestra reflejada en la siguiente ecuación:

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_s}{K_{fs} V_f + V_s} \quad (1)$$

donde n son los moles de analito absorbidos por la fibra, V_f y V_s son los volúmenes de fibra y de muestra respectivamente, K_{fs} es el coeficiente de partición del analito entre la fibra y la muestra y C_0 es la concentración inicial de analito en la muestra. En la ecuación (1) se asume que la matriz de la muestra es una única fase homogénea y no se considera el efecto del espacio de cabeza. El modelo matemático del proceso de SPME cuando los analitos se extraen del espacio de cabeza fue desarrollado posteriormente y las ecuaciones y conclusiones a las que se llega son similares a las de la extracción por inmersión pero teniendo en cuenta una tercera fase gaseosa [59,77].

En las condiciones de trabajo de la SPME, generalmente se cumple que $V_s \gg K_{fs} V_f$ ya que en la mayoría de los casos V_f es mucho más pequeño que V_s por lo que la ecuación (1) se transforma en la siguiente:

$$n = K_{fs} V_f C_0 \quad (2)$$

En la ecuación (2) se puede observar que la cantidad de analito extraída (n) es directamente proporcional a la concentración de analito en la muestra e independiente del volumen de muestra. Esta aproximación no es válida en el caso en que los analitos a determinar tengan valores de K_{fs} muy elevados (gran afinidad por la fibra) y se estén utilizando volúmenes de muestra muy pequeños. Otro factor que se debe tener en cuenta es el hecho de que no en todos los tipos de fibras existentes actualmente la extracción de los analitos se realiza mediante un proceso de absorción, que es lo que se considera en este modelo matemático. Así, existen fibras, que se mencionarán posteriormente, en las que la extracción de los analitos se produce mediante un proceso de adsorción por lo que en estos casos el modelo matemático que explica el proceso de extracción es ligeramente diferente [3,78]. La ecuación que define el proceso de extracción por adsorción es la siguiente:

$$n = \frac{K_{fs}^D V_f C_0 V_s (C_{f \max} - C_f)}{K_{fs} V_f + V_s (C_{f \max} - C_f)} \quad (3)$$

donde K_{fs}^D es el coeficiente de distribución del analito entre la muestra y la superficie de la fibra, C_f es la concentración final de analito en la superficie de la fibra y $C_{f \max}$ es la concentración máxima de analito en la superficie de la fibra. Los demás parámetros son los mismos que los que aparecen en la ecuación (1).

En SPME también se debe tener en cuenta la cinética del proceso ya que los analitos deben ser transportados desde la matriz de la muestra a la fibra en inmersión o desde la matriz de la muestra al espacio de cabeza y de allí hacia la fibra, en el caso de que la extracción se realice mediante extracción del espacio de cabeza de la muestra (HS-SPME). Para aumentar la velocidad de la extracción es necesario utilizar un sistema de agitación de manera que se facilite la difusión de los analitos hacia la superficie de la fibra. Esto no es necesario con muestras gaseosas ya que la propia convección del aire es suficiente para llegar al equilibrio de forma rápida. En muestras líquidas, sin

embargo, se han utilizado diferentes modos de agitación como por ejemplo barras magnéticas agitadoras, ultrasonidos o movimientos de la fibra o del vial. Estos sistemas de agitación sirven para disminuir el efecto causado por la zona estática que se forma alrededor de la fibra y que disminuye la velocidad de extracción, así como para compensar los bajos coeficientes de difusión de las matrices líquidas [59].

La agitación con barras magnéticas agitadoras es la más frecuente aunque algunos autores han comparado los diferentes modos de agitación y, según ellos, el más efectivo es la agitación por ultrasonidos [79,80] pero tiene como inconveniente que debido a la elevada cantidad de energía suministrada, se produce un calentamiento de la muestra que puede provocar la degradación de los analitos [59]. Como se puede observar en las ecuaciones (1), (2) y (3) la eficacia de la extracción depende del coeficiente de partición, K_{fs} , o de distribución, K_{fs}^D , que es un parámetro característico de cada pareja analito-fibra y que describe las propiedades del recubrimiento de la fibra y su afinidad para cada analito.

I.1.2. Procedimiento de la SPME

En el proceso de SPME se pueden diferenciar principalmente dos etapas. Una primera etapa de extracción en la que la fibra recubierta del sorbente se pone en contacto con la muestra durante un tiempo y temperatura determinadas, de manera que se produce una migración de los analitos desde la solución a la fibra hasta que se alcanza la situación de equilibrio. Después de esta primera etapa, se realiza la desorción de los analitos retenidos por la fibra.

Como se ha comentado en el apartado anterior, existen dos formas básicas de realizar la extracción en SPME: extracción por inmersión directa o bien del espacio de cabeza. Una tercera forma que no ha sido muy aplicada hasta la actualidad es la denominada SPME con protección de membrana [59,81]. En este modo de extracción, se coloca una membrana semipermeable alrededor de la fibra que evita que compuestos de elevado peso molecular, como ácidos

húmicos o proteínas, que pueden estar presentes en la matriz de la muestra lleguen hasta la fibra y puedan dañarla. El modo de extracción HS-SPME también permite proteger la fibra de estos compuestos de elevado peso molecular u otras interferencias no volátiles. Además permite modificar la matriz de la muestra, como por ejemplo variando el pH, sin dañar la fibra. Este modo de extracción es muy útil para el análisis de muestras sólidas como sedimentos o alimentos [59,73] o muestras biológicas [82,83] donde la interferencia de la matriz es importante, pero está restringido a compuestos volátiles o semivolátiles. En la Figura 2 se muestra una ilustración del proceso de SPME por inmersión y espacio de cabeza.

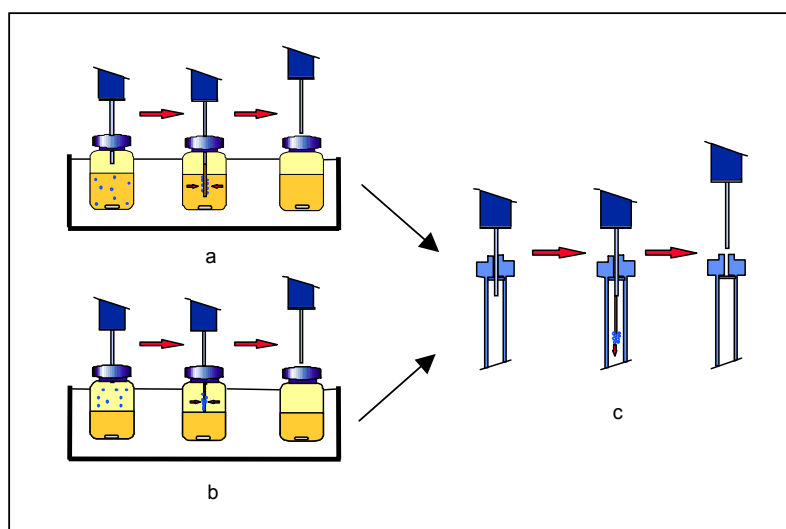


Figura 2. Esquema del proceso de SPME-GC: (a) inmersión directa; (b) HS-SPME; (c) desorción térmica en GC.

En lo que respecta a la etapa de desorción, ésta se realiza térmicamente o bien por adición de un solvente orgánico, dependiendo de la técnica analítica que se utilizará a continuación. Así, si la SPME se acopla a la GC, la desorción se realiza térmicamente, [60-66,68-75,82] y si ésta se combina con la HPLC, se lleva a cabo mediante el uso de un solvente orgánico y, en general, utilizando una interfase [67,84,85].

Aunque la combinación de la SPME con la GC es la que se ha utilizado más frecuentemente en las aplicaciones de la SPME, también se han publicado algunos trabajos en los que la SPME se usa combinada con la HPLC y de una forma más puntual con la CE [3,86-88]. Así pues, compuestos como tensoactivos alquilfenoletoxilados [89], PAHs [90,91], fenoles [92,93] y algún ftalato, como el dietilhexilftalato (DEP) [94] han sido determinados mediante SPME-HPLC.

I.1.2.1. SPME con fibras

La forma más habitual de llevar a cabo la desorción de los analitos es térmicamente en el inyector de un cromatógrafo de gases, como se puede ver en la Figura 2, de forma que al aumentar la temperatura la afinidad de los compuestos por la fibra disminuye y los analitos son introducidos en la columna analítica por el flujo del gas portador. En la ecuación (4) se puede observar como disminuyen linealmente los coeficientes de partición al aumentar la temperatura:

$$\log K_{fs} = a\left(\frac{1}{T}\right) + b \quad (4)$$

donde K_{fs} es el coeficiente de partición del analito entre la fibra y la muestra líquida, a y b son dos constantes y T es la temperatura. Los puertos de inyección, generalmente los inyectores *split/splitless*, de los cromatógrafos de gases son muy adecuados para llevar a cabo la desorción de los analitos de la fibra [59]. En la Tabla 1 se muestra la compatibilidad de la SPME con los diferentes tipos de inyectores generalmente usados en GC [95].

Tabla 1. Compatibilidad de la SPME con los inyectores de GC [95].

Tipo de Inyector	Compatibilidad
<i>Split/splitless</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Puede ser usado con SPME - No son necesarios insertos (<i>liners</i>) con gran volumen
<i>On-column</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Inserto con el menor volumen posible - No adecuado para SPME a no ser que se disponga de un sistema de calentamiento independiente
PTV	<ul style="list-style-type: none"> - Puede ser usado con SPME - Generalmente no son necesarios insertos de gran volumen

En los inyectores *split/splitless* y PTV, la válvula de división de flujo (*split valve*) debe permanecer cerrada durante la desorción para que la totalidad de los analitos sean introducidos en la columna cromatográfica. Además, el diámetro del inserto (*liner*) de dichos inyectores debe ser lo más similar posible al diámetro de la fibra para asegurar una transferencia rápida de los analitos desde el inyector a la columna. En la Figura 3 se puede observar el efecto del volumen del inserto en la desorción [59]. La fibra debe quedar situada en el centro del inserto durante la desorción para que se produzca un calentamiento rápido y reproducible [59].

La desorción térmica es el modo más sencillo de desorber los analitos de la fibra pero hay compuestos que son térmicamente inestables o poco volátiles y por lo tanto no se pueden determinar directamente mediante GC. En estos casos la combinación de la SPME con la HPLC es más adecuada siendo necesario utilizar un disolvente orgánico para desorber los analitos. Ésta se puede llevar a cabo en línea (*on-line*) o bien fuera de línea (*off-line*) con el sistema cromatográfico [3,91,96].

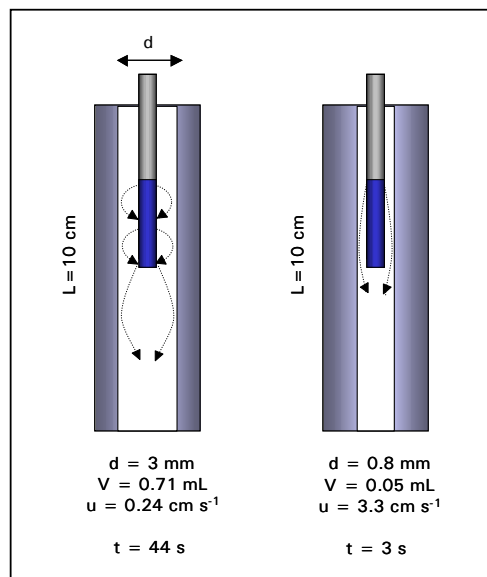


Figura 3. Efecto del volumen del inserto en la desorción térmica en GC [59].

La desorción fuera de línea respecto al sistema cromatográfico se realiza introduciendo la fibra con los analitos retenidos en un vial que contenga una pequeña cantidad de solvente orgánico, que sea compatible con el recubrimiento de la fibra y con la técnica analítica posterior, de manera que se produzca la desorción de los analitos. A continuación, una alícuota de este disolvente es inyectada en el cromatógrafo de líquidos donde se realiza la separación y cuantificación de los mismos. Este modo de desorción ha sido aplicado, por ejemplo, para la determinación de fenoles en aguas y el solvente de desorción usado fue una mezcla de agua-acetonitrilo-metanol (20:30:50) [93].

En el caso de realizar la desorción en línea con la HPLC, se debe utilizar una interfase que permita realizar la desorción de los analitos ya sea con la propia fase móvil del cromatógrafo de líquidos o bien introduciendo un solvente orgánico adecuado en la cámara de desorción de la interfase [89-92,94,97].

Actualmente existe una interfase comercializada por Supelco para llevar a cabo la desorción en HPLC pero en algunos trabajos la interfase utilizada es de elaboración propia [89]. En la Figura 4 se muestra el diseño de la interfase comercial para SPME-HPLC.

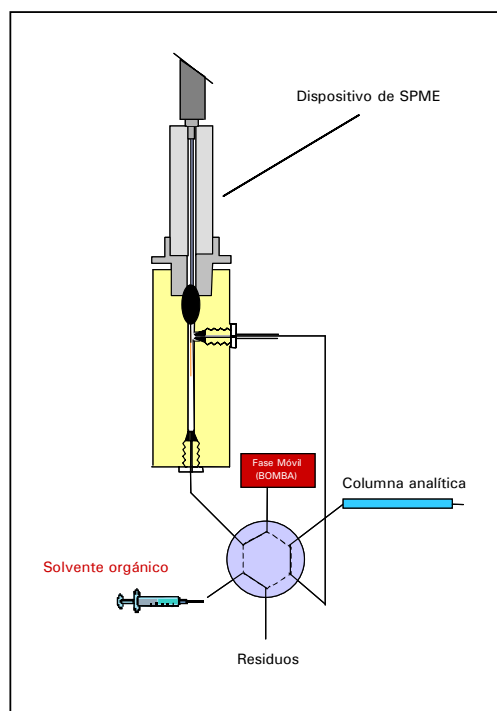


Figura 4. Interfase SPME-HPLC comercial.

Cuando la desorción se realiza en línea utilizando una interfase para SPME-HPLC, ésta se puede realizar de dos maneras distintas que son denominadas desorción dinámica y estática, respectivamente. En la desorción dinámica, la fibra se introduce en la cámara de desorción e inmediatamente se cambia la posición de la válvula de forma que la fase móvil pasa a través de la cámara de desorción y los analitos son desorbidos al mismo tiempo que son arrastrados hacia la columna analítica. Este modo de desorción en ocasiones puede provocar un ensanchamiento de los picos ya que la composición de la fase

móvil puede no tener la suficiente fuerza elutrópica como para proporcionar una rápida desorción de los mismos [3,59].

La desorción en modo estático puede evitar el problema de ensanchamiento de los picos observado en la desorción en modo dinámico. Este modo de desorción consiste en la introducción de la fibra de SPME, que contiene los analitos retenidos, en la cámara de desorción de la interfase durante un tiempo determinado en presencia de la misma fase móvil o bien de un solvente orgánico adecuado, que puede ser introducido en la cámara de desorción con una jeringa, de manera que se produzca la desorción de los analitos. El tiempo de permanencia de la fibra en la cámara de desorción es un parámetro que se debe optimizar. Finalizado este tiempo, se gira la válvula de manera que la fase móvil pasa a través de la cámara de desorción y arrastra los analitos hacia la columna analítica [3,97].

Debido a las buenas características que presenta la SPME como técnica de preconcentración, además de combinarse con técnicas cromatográficas de uso más habitual, como la GC y la HPLC, también ha sido estudiado el acoplamiento tanto fuera de línea como en línea de la SPME con la CE. Al igual que en SPME-HPLC, la diferencia fundamental que presenta el acoplamiento SPME-CE con la SPME-GC es la etapa de desorción.

Si la combinación de la SPME con la CE se realiza fuera de línea, el procedimiento es muy similar a la combinación de la SPME con la HPLC. Una de las formas de llevar a cabo esta combinación consiste en introducir la fibra que contiene los analitos retenidos en un capilar que contenga unos pocos microlitros de un solvente orgánico de manera que se produzca la desorción de los analitos seguida de la inyección hidrodinámica o electrocinética en el capilar de CE. En este caso, los principales inconvenientes son la mayor laboriosidad del proceso y que el factor de preconcentración es bajo debido a que sólo una pequeña parte de los analitos desorbidos son inyectados en CE [3]. Como ejemplo de la combinación de la SPME fuera de línea con la CE se puede mencionar el trabajo realizado por J. Jinno *et al.* [98] en el que se llevaba a

cabo la determinación de un grupo de drogas tóxicas (nitrazepam, flunitrazepan, etc.) en muestras de orina.

Por otro lado, si la desorción se realiza en línea, es necesario utilizar una interfase que permita conectar la fibra que contiene los analitos retenidos con el extremo del capilar de CE en el que se realiza la inyección para llevar a cabo la desorción. Se han publicado muy pocos trabajos en los que se use este acoplamiento ya que el diseño de una interfase que permita acoplar estas dos técnicas no es fácil, debido, principalmente, a que el volumen de inyección en CE es del orden de nanolitros comparados con los microlitos en HPLC [99,100].

I.1.2.2. *In-tube* SPME

Además de las fibras como medio de extracción en SPME, más recientemente ha aparecido una variante de la SPME en la que la extracción se realiza en el interior de un fragmento de columna capilar de GC o micro-LC [59,96,101]. *In-tube* SPME principalmente se aplica combinada en línea con la HPLC utilizándose el automuestreador del cromatógrafo de líquidos para conectar el capilar, en el que se realizará la preconcentración, al sistema cromatográfico.

La longitud del capilar puede variar según la aplicación pero suele oscilar alrededor de los 60 cm y éste se sitúa entre el *loop* de inyección y la jeringa de inyección del automuestreador como se puede observar en el esquema de la Figura 5 [3]. Este acoplamiento permite llevar a cabo la extracción, concentración, desorción e inyección de los analitos de forma completamente automatizada por lo que esta técnica se presenta como una buena alternativa al acoplamiento convencional de la SPME-HPLC utilizando fibras como dispositivo de extracción y una interfase para la desorción. También existen algunas aplicaciones, aunque más puntuales, en las que *in-tube* SPME se utiliza en combinación con la GC y la CE [102,103].

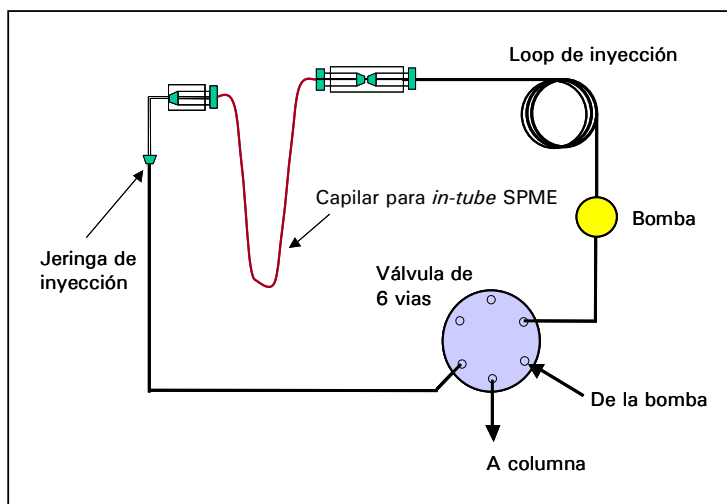


Figura 5. Esquema de *in-tube* SPME-HPLC.

En *in-tube* SPME, durante la etapa de extracción, la muestra es aspirada del vial que la contiene hasta el capilar, pasa a través del capilar y a continuación es devuelta otra vez al vial. Este proceso se repite hasta que se llega a la situación de equilibrio o se extrae la suficiente cantidad de analito en función de la sensibilidad deseada [59]. Así, en este caso, la situación de equilibrio viene definida por el número de pasos de aspiración/dispensa a partir de los cuales no se observa un aumento en la respuesta de los analitos. La desorción de los analitos retenidos en el interior de la columna capilar de GC se lleva a cabo pasando fase móvil o bien solvente adecuado a través del capilar de forma que los analitos son desorbidos y introducidos en la columna analítica [3,104,105].

Esta variante de la SPME presenta como ventajas que permite la automatización de todo el proceso en SPME-HPLC de una forma fácil y robusta y que además, en general, se consiguen límites de detección inferiores a los obtenidos cuando se usan fibras en el acoplamiento de la SPME con HPLC. El principal inconveniente es que sólo puede ser utilizada con muestras muy limpias ya que, de lo contrario, el capilar puede obstruirse fácilmente [3]. En la

Tabla 2 se comparan las características y las ventajas e inconvenientes que presentan *in-tube* SPME y SPME con fibras en su acoplamiento a la HPLC.

Tabla 2. Comparación de la SPME con fibras y *in-tube* SPME en el acoplamiento a la HPLC [96].

	SPME con fibras	<i>in-tube</i> SPME
Dispositivo de extracción	El número de fibras de SPME comercializadas es limitado	Están comercializadas un gran número de columnas capilares con fases estacionarias de diferentes características
Zona de extracción	Superficie externa de la fibra	Superficie interna del capilar
Extracción	Inmersión directa o HS-SPME	Ciclos de aspiración-dispensa de la muestra en el interior del capilar
Desorción	Exposición de la fibra en la cámara de desorción de la interfase llena de fase móvil o un solvente orgánico	Paso de un solvente orgánico o de la fase móvil a través del capilar
Efecto memoria	~ 10% (dependiendo de los analitos)	Inapreciable
Tipo de muestras	Todo tipo de muestras	Sólo muestras muy limpias
Operación	Manual	Automática
Precauciones	La fibra debe ser manipulada con precaución para evitar que se rompa al introducirla y sacarla de la interfase	La muestra debe ser miscible con la fase móvil y no debe contener partículas insolubles para evitar obstrucciones de los capilares

Como se puede ver en la Tabla 2, una de las ventajas de *in-tube* SPME es que todas las columnas comercializadas para GC pueden ser utilizadas por lo que el abanico de aplicaciones de esta modalidad de la SPME es muy amplio. Así por ejemplo, R. Eisert *et al.* [105] llevaron a cabo un estudio comparativo con diferentes columnas capilares de GC para la determinación de un grupo de carbamatos en aguas mediante *in-tube* SPME y la columna que ofreció mejores resultados fue la Omegawax 250.

Más recientemente se han publicado algunos trabajos en los que los autores desarrollan métodos basados en *in-tube* SPME pero en lugar de utilizar columnas capilares comerciales de GC, han introducido otros tipos de recubrimientos, como polipirrol (PPY), en el interior de los capilares para mejorar la extracción de compuestos más polares [106] o como los polímeros de huella molecular (MIPs) para extracciones más selectivas [107].

I.1.2.3. Extracción por sorción con barras magnéticas agitadoras (SBSE)

La extracción por sorción con barras magnéticas agitadoras o *stir bar sorptive extraction* (SBSE) es una técnica de preconcentración de muy reciente aparición, el primer artículo en el que se la menciona es de 1999, que fue desarrollada por el grupo de investigación de P. Sandra [108]. Ésta se basa en los mismos principios de extracción que la SPME ya que la extracción de los analitos de la muestra se realiza también mediante un equilibrio de partición de éstos entre la muestra y un sorbente polimérico [108,109]. En este caso, el sorbente, que es una capa de 1 mm de PDMS, está dispuesto recubriendo una barra magnética agitadora [109].

Estas barras magnéticas agitadoras recubiertas y denominadas comercialmente Twister™ están disponibles en dos tamaños diferentes (10 mm x 3.2 mm d.e. y 40 mm x 3.2 mm. d.e.). En la Figura 6 se muestra un esquema de este dispositivo de extracción. Generalmente, las barras magnéticas agitadoras de 10 mm están recomendadas para volúmenes de muestra entre 1 y 50 ml y las de 40 mm para volúmenes entre 100 y 250 ml [109].

Así pues, en SBSE, los analitos son extraídos introduciendo, directamente en la muestra o bien en el espacio de cabeza de la misma, una barra magnética agitadora recubierta de PDMS. A continuación la barra magnética agitadora es retirada de la muestra, aclarada con agua, secada con un pañuelo y los compuestos extraídos por la barra magnética agitadora son desorbidos térmicamente en la unidad de desorción y son introducidos en línea en el

cromatógrafo de gases o bien mediante un solvente orgánico para su posterior inyección en HPLC o GC [108,109].

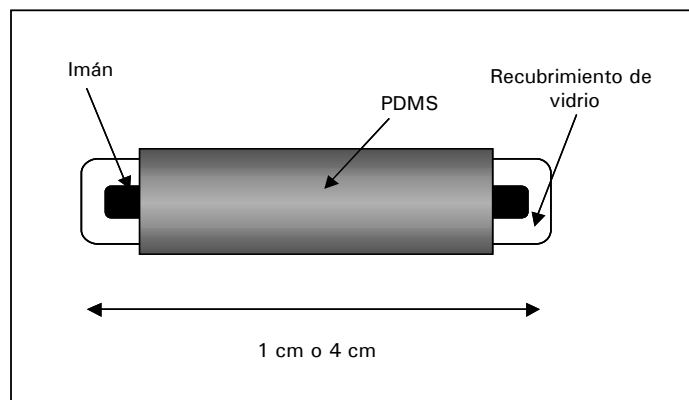


Figura 6. Esquema de las barras magnéticas agitadoras recubiertas de PDMS usadas en SBSE.

La diferencia fundamental que presenta la SBSE con la SPME es la cantidad de sorbente que contienen las barras magnéticas agitadoras recubiertas de PDMS para SBSE en comparación con las fibras de SPME. Así, la cantidad de PDMS en las barras magnéticas agitadoras de SBSE oscila entre los 55 y 300 μL dependiendo del tamaño de la barra magnética agitadora frente a los 0.5 μL de PDMS en las fibras de 100 μm de SPME [110], de manera que, teóricamente, la eficacia de la extracción se ve aumentada de 100 a 1000 veces utilizando SBSE.

Estudios recientes han demostrado que existe una correlación entre los coeficientes de partición octanol/agua ($K_{o/w}$) y el equilibrio de partición de los analitos entre una matriz acuosa y una fase de PDMS [111-113] de manera que en el caso de usar fibras de PDMS las recuperaciones son muy bajas si los $K_{o/w}$ son inferiores a 10000. En cambio, las barras magnéticas agitadoras, al contener una mayor cantidad de PDMS, permiten la recuperación completa de

analitos con $K_{o/w}$ mayores de 500 [109]. La comparación teórica entre las eficacias de extracción en SPME y SBSE se muestra en la Figura 7 [108,109].

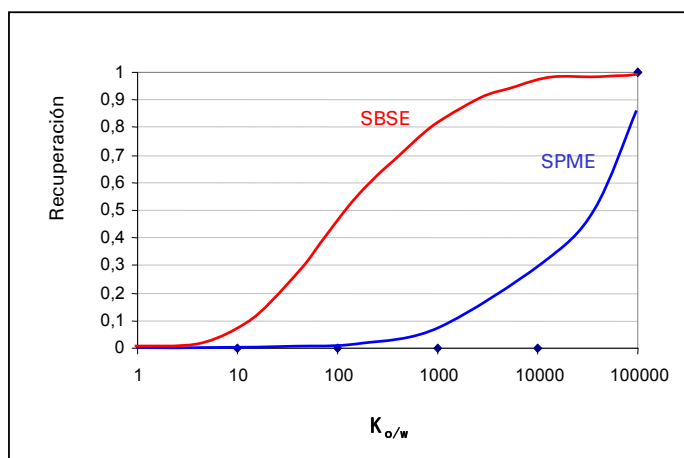


Figura 7. Recuperación total de los analitos en SBSE y SPME de una muestra de 10 ml en función de su $K_{o/w}$. Volumen de PDMS en la fibra de SPME: 0.5 μm ; volumen de PDMS en la barra magnética agitadora de SBSE: 100 μm [108,109].

El modelo matemático que explica el proceso de extracción en SBSE es muy similar al de la SPME y fue desarrollado por el grupo de P. Sandra [108] y en él se aproximan los coeficientes de partición de los analitos entre la matriz acuosa y la fase de PDMS a los $K_{o/w}$. Así, la recuperación de los analitos en una muestra por SBSE puede ser estimada según la ecuación siguiente:

$$\frac{m_s}{m_0} = \frac{K_{o/w} / \beta}{1 + (K_{o/w} / \beta)} \quad (5)$$

donde m_s es la cantidad de analito en la fase PDMS, m_0 es la cantidad de analito inicialmente presente en la muestra acuosa, $K_{o/w}$ es el coeficiente de partición octanol/agua, $\beta = V_w / V_s$, y V_w y V_s son los volúmenes de la fase acuosa y la fase de PDMS respectivamente [108]. Como se puede observar, la ecuación (5) y la ecuación (1), que se obtenía en el desarrollo matemático del

proceso de extracción en SPME [76], son análogas, lo que demuestra que el fundamento de la SPME y la SBSE es el mismo. Así, en principio, la gran ventaja que presenta la SBSE frente a la SPME es la posibilidad de llegar a límites de detección más bajos pero también se debe indicar como inconveniente que hasta ahora sólo se comercializan barras magnéticas agitadoras para SBSE con recubrimiento de PDMS por lo que el campo de aplicación está restringido a compuestos apolares. Es de esperar, sin embargo, que en el futuro se amplie el número de sorbentes de las barras magnéticas agitadoras para poder aplicarlas a la determinación de más familias de compuestos.

La desorción térmica es la opción mayoritaria en las aplicaciones de SBSE desarrolladas actualmente. Para poder llevarla a cabo, se ha desarrollado comercialmente una unidad de desorción térmica que se acopla al sistema de inyección de un cromatógrafo de gases. En la Figura 8 se muestra una representación esquemática de este dispositivo.

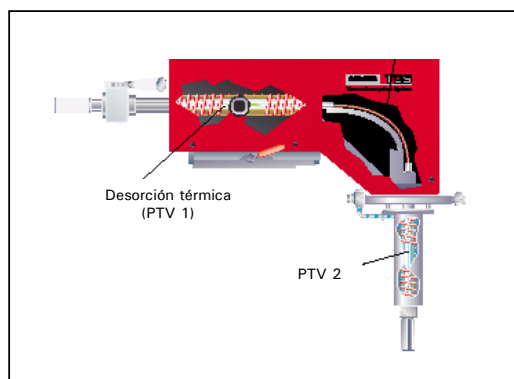


Figura 8. Unidad de desorción térmica para SBSE comercializada por Gerstel [114].

Este sistema consiste básicamente en la combinación de dos inyectores de vaporización de temperatura programable (PTV) conectados en serie. El primero de los PTV consta de un tubo de vidrio (187 mm de largo, 6 mm de d.e. y 4 mm de d.i.) en el que se introduce la barra magnética agitadora para

llevar a cabo la desorción térmica propiamente dicha. Los analitos desorbidos son arrastrados al segundo PTV. Éste se mantiene a temperaturas muy bajas (del orden de $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$) para que los compuestos que son desorbidos en el primer PTV queden retenidos en el segundo debido al efecto de la temperatura. Una vez se ha completado la desorción de todos los analitos en el primer PTV, se procede a aumentar la temperatura del segundo PTV de manera que los analitos son introducidos en la columna analítica por el flujo de gas portador.

Al igual que la SPME, la SBSE puede ser combinada con la HPLC si se realiza la desorción mediante un solvente orgánico. Todas las aplicaciones publicadas en este sentido han sido realizadas fuera de línea con la HPLC ya que, debido a la reciente aparición de esta técnica y a la mayor complejidad de su acoplamiento con la cromatografía de líquidos, aún no se ha diseñado ninguna interfase que permita realizar el acoplamiento en línea. En SPME/HPLC, se introduce la barra agitadora en un determinado volumen de solvente orgánico adecuado (100-1000 μl) y a continuación se procede a la inyección de la totalidad o una alícuota de este solvente. Este modo de desorción también es una alternativa para el uso de la SBSE combinada con la GC si no se dispone de la unidad de desorción térmica. En estos casos, la fracción del solvente de desorción que se puede inyectar directamente en el GC es muy pequeña (0.5-2 μl) por lo que los límites de detección no son tan bajos como cabría esperar.

Los parámetros que deben optimizarse en SBSE en la etapa de absorción son análogos a los de la SPME (tiempo y temperatura de absorción y condiciones de la muestra) y el efecto que tienen en el proceso de SBSE es el mismo que en SPME. El efecto de éstos y otros parámetros en el proceso de SPME se comentarán posteriormente en la presente Tesis Doctoral y también serán válidos para SBSE. En la etapa de desorción, en el caso que ésta se realice térmicamente, la optimización es un poco más compleja en comparación con la SPME debido al uso de la unidad de desorción térmica con los dos PTVs en serie.

I.1.3. Tipos de fibras en SPME

Actualmente hay fibras con diferentes recubrimientos de manera que la SPME puede usarse para determinar un amplio grupo de compuestos. Los primeros recubrimientos comercializados fueron los de polidimetilsiloxano (PDMS) y poliacrilato (PA) pero los tipos de recubrimientos han ido aumentando progresivamente y actualmente cubren un amplio conjunto de aplicaciones. En la Tabla 3 se muestran las fibras comercializadas por Supelco.

Además de las fibras comerciales, algunos autores han fabricado otros recubrimientos para aplicaciones más específicas, como por ejemplo los de carbón [115,116], C₈ [117], C₁₈ [118], polipirrol [119] o incluso fibras recubiertas con polímetros de huella molecular (MIPs) [120] de manera que se consiguen fibras muy selectivas para un determinado compuesto. También se han desarrollado recubrimientos que permiten la extracción de compuestos organometálicos o compuestos inorgánicos [119,121] que son difícilmente extraídos con las fibras comerciales. Generalmente, la naturaleza del analito determina la fibra a utilizar en cada caso. En general, se utilizan recubrimientos polares como PA o carbowax (CW) para analitos polares como fenoles y recubrimientos apolares como PDMS para analitos apolares como PAHs o BTEX (benceno, tolueno, xileno y etilbenceno) [3,59,122].

Las fibras de PDMS, que es un polímero líquido, son las más utilizadas ya que fueron las primeras fibras introducidas para SPME. Estas fibras son las más adecuadas para los analitos apolares aunque, en algunos casos, también pueden ser usadas para la determinación de analitos con cierta polaridad. La afinidad de los analitos por el PDMS puede ser estimada a partir de los tiempos de retención de los compuestos en las columnas de PDMS ya que el polímero que compone las fibras de PDMS y estas columnas capilares es básicamente el mismo [59]. Las fibras de PDMS se comercializan en diferentes espesores (100 μm , 30 μm y 7 μm). En general, se recomienda utilizar las fibras de mayor espesor, como la de 100 μm , para compuestos con coeficientes de partición bajos y de poco espesor para los que presenten coeficientes de partición

elevados. La reducción del espesor de la fibra de 100 μm a 7 μm limita su aplicación a un número más reducido de analitos pero permite trabajar a mayores temperaturas, lo que extiende su aplicación a compuestos con temperaturas de ebullición más elevadas [59].

Tabla 3. Tipos de fibra comercializados para su uso en SPME.

Fase estacionaria / espesor	T ^a máxima de uso	Polaridad ³	Uso recomendado
Polidimetilsiloxano (PDMS)			
100 μm , fase no enlazada	280 °C	No polar	GC/HPLC
30 μm , fase no enlazada	280 °C	No polar	GC/HPLC
7 μm , fase enlazada	340 °C	No polar	GC/HPLC
Polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB)			
65 μm , fase parcialmente entrecruzada	270 °C	Bipolar	GC
60 μm , fase parcialmente entrecruzada	-	Bipolar	HPLC
65 μm , fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹)	270 °C	Bipolar	GC
Poliacrilato (PA)			
85 μm , fase parcialmente entrecruzada	320 °C	Polar	GC/HPLC
Carboxen/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS)			
75 μm , fase parcialmente entrecruzada	320 °C	Bipolar	GC
85 μm , fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹)	320 °C	Bipolar	GC
Carbowax/Divinilbenzene (CW/DVB)			
65 μm , fase parcialmente entrecruzada	265 °C	Polar	GC
70 μm , fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹)	265 °C	Polar	GC
Carbowax/Templated Resin (CW/TPR)			
50 μm , fase parcialmente entrecruzada	-	Polar	HPLC
Divinilbenceno/Carboxen/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS)			
50/30 μm , fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹)	270 °C	Bipolar	GC
50/30 μm , fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹) ²	270 °C	Bipolar	GC

¹ Fibras *Stableflex*: el recubrimiento está depositado sobre una fibra de sílice fundida flexible.

² Longitud especial de 2 cm.

³ Extraído de la referencia [3].

La extracción de los analitos de la muestra mediante las fibras de PDMS se debe principalmente a un fenómeno de absorción [78,122] aunque algunos autores han indicado que la extracción de algunos analitos (sobre todo si son

muy apolares) puede realizarse vía adsorción ya que existe una cierta competitividad entre ambos efectos [123-126]. En la Figura 9 se clasifican las fibras comerciales según si el proceso de extracción se produce mayoritariamente por absorción o adsorción.

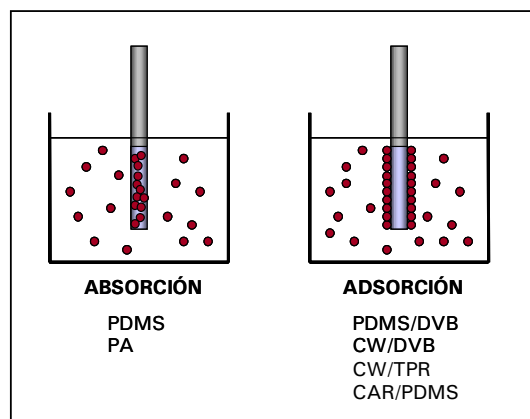


Figura 9. Clasificación de las fibras de SPME según si la extracción se produce por absorción o adsorción.

Las fibras de PA, en cambio, son adecuadas para analitos polares y, aunque el recubrimiento es un polímero sólido, su baja densidad hace que los analitos sean absorbidos por la fibra al igual que en las fibras de PDMS [3,56,78,127]. Sin embargo, los coeficientes de difusión de los analitos en las fibras de PA son menores que los que poseen los analitos en las fibras de PDMS por lo que en general los tiempos de extracción son mayores para los compuestos volátiles en el espacio de cabeza [56]. Las fibras en las que se combina más de un polímero, como por ejemplo las de PDMS/DVB o CW/DVB, son más adecuadas para la determinación de analitos volátiles ya que a diferencia de las fibras de PDMS y PA, la principal interacción entre la fibra y los analitos se produce por adsorción, ya que son polímeros sólidos [59,78]. En general, en este tipo de fibras, los coeficientes de distribución de los analitos son mayores que los que presentan las fibras de PDMS. El principal inconveniente es el

intervalo lineal dinámico, que es menor que en las fibras de absorción, y los problemas de desplazamiento que presentan [59]. En la Figura 10 se muestran unas reglas generales que pueden ser usadas para la selección de la fibra más adecuada para cada aplicación en función de la polaridad y volatilidad de los analitos.

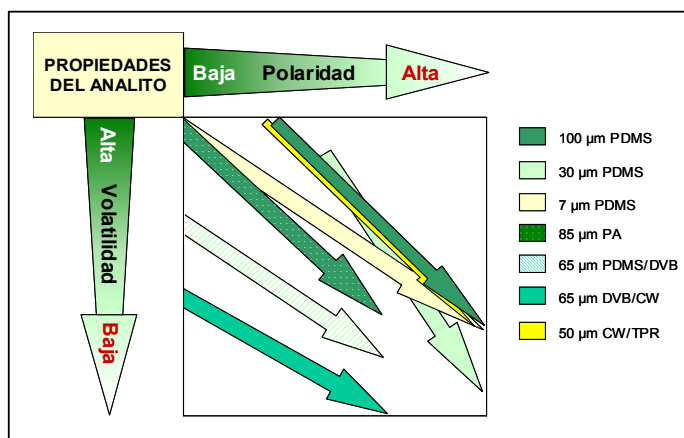


Figura 10. Guía de selección de las fibras de SPME [59].

1.1.4. Variables que afectan al proceso de SPME

El proceso de SPME se puede ver afectado por una serie de variables experimentales que pueden ser modificadas para incrementar la eficacia del proceso de extracción. Como se ha mencionado anteriormente, entre estas variables se encuentra la agitación de la muestra, que incrementa la difusión de los analitos desde la matriz de la muestra a la fibra o al espacio de cabeza por lo que se disminuye el tiempo requerido para llegar al equilibrio. Otros parámetros importantes son el tiempo y la temperatura de extracción, así como la modificación de las condiciones de la muestra, y los parámetros que afectan la etapa de desorción. Estos últimos dependen de la técnica analítica que se utilice a continuación para llevar a cabo la separación y cuantificación de los

analitos. A continuación se comentará como influyen cada uno de estos parámetros en el proceso de SPME y las diferentes observaciones también serán válidas, en general, para *in-tube* SPME y SBSE.

I.1.4.1. Etapa de absorción/adsorción

Los parámetros que pueden afectar de alguna u otra forma el proceso de absorción/adsorción son los siguientes: el tiempo y la temperatura de extracción, la agitación de la muestra, el volumen de muestra así como las condiciones de la muestra (pH, adición de sales o solventes orgánicos).

El tiempo de extracción en SPME es un parámetro muy importante a tener en cuenta. Al desarrollar un método analítico basado en SPME se debe determinar el tiempo necesario para llegar al estado de equilibrio que es característico de cada analito-fibra y intentar trabajar en esas condiciones. El tiempo de equilibrio es aquél a partir del cual la cantidad de analito extraída se mantiene constante [59]. Sin embargo, para algunos compuestos el tiempo necesario para llegar a esta situación es muy elevado por lo que generalmente se opta por trabajar en condiciones de no equilibrio y se seleccionan tiempos de extracción inferiores para no alargar el tiempo de análisis [59,96,128]. En estos casos es muy importante controlar estrictamente el tiempo de extracción ya que pequeñas oscilaciones en la medida del tiempo pueden variar de forma considerable la cantidad de analito extraída, tal y como se puede observar en la Figura 11 [59].

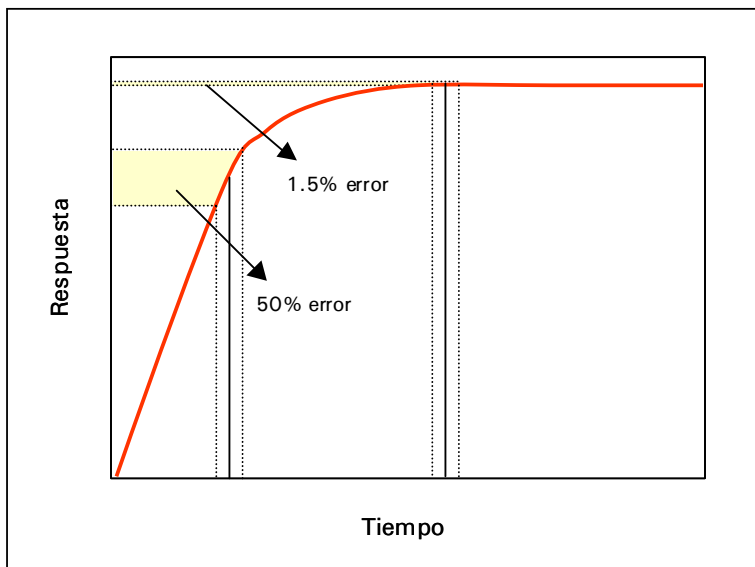


Figura 11. Efecto de la variación en la medida del tiempo de extracción en la cantidad de analito extraída [59].

Otro parámetro importante es la temperatura de extracción. Este parámetro contribuye de dos formas completamente opuestas en el proceso de SPME [59]. Por un lado, los coeficientes de difusión de los analitos en la muestra aumentan al incrementar la temperatura, por lo que aumenta la cantidad de analito extraída. En HS-SPME, además, al aumentar la temperatura aumenta la concentración de los analitos en el espacio de cabeza por lo que la extracción es también más rápida. Por otro lado, un aumento de la temperatura disminuye los coeficientes de distribución del analito entre la muestra y la fibra por lo que la eficacia de la extracción se ve afectada negativamente. Para solucionar este problema, Zhang *et al.* [129] diseñaron un dispositivo de SPME que permite calentar la muestra y enfriar simultáneamente la fibra. En la Figura 12 se muestra un esquema de este dispositivo.

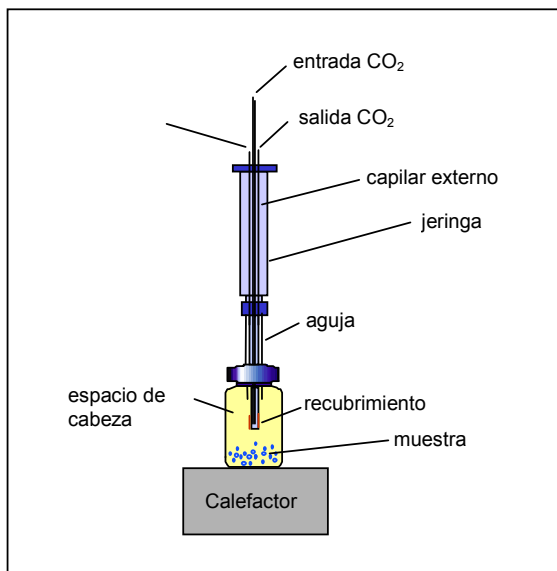


Figura 12. Dispositivo "Internally cooled SPME".

Este modo de extracción fue denominado "SPME enfriada internamente", *Internally cooled SPME*, y está compuesto por un tubo de sílice fundida que está sellado y recubierto en uno de los extremos (capilar externo) de forma que el CO₂ líquido es transportado a través del capilar interno hasta el extremo del capilar externo que está recubierto con el sorbente y que hace la función de la fibra de SPME. De esta forma se conseguía que la fibra estuviera a una temperatura inferior a la de la muestra de forma que la capacidad de la fibra aumentaba. Así, por ejemplo, estos autores obtuvieron recuperaciones cercanas al 100% para compuestos como tolueno, etilbenceno y xileno. Uno de los inconvenientes que presenta este diseño es la disminución de la selectividad, de forma que no sólo los analitos de interés son extraídos exhaustivamente sino también muchas de las interferencias presentes en la muestra, al favorecer las condiciones de extracción [59,129].

La concentración de sal en la muestra y la modificación del pH también pueden afectar al proceso de SPME. La presencia de sales, generalmente NaCl aunque

en algunos casos se han utilizado otras sales como Na_2SO_4 , en la muestra aumenta el coeficiente de distribución de los analitos que están presentes en forma no ionizada por lo que la cantidad de analito extraída generalmente aumenta [59]. Sin embargo, si los analitos están en forma ionizada, se observa una disminución de la eficacia de la extracción. Esto se debe al aumento del coeficiente de actividad de las especies iónicas al aumentar la fuerza iónica de la solución [59]. En consecuencia, el pH de la muestra es otro factor a tener en cuenta en la optimización del proceso de SPME ya que los analitos deben estar siempre presentes en la muestra en su forma neutra para su extracción. Por ejemplo, para que los analitos estén presentes en la forma neutra, es recomendable trabajar a valores de pH al menos dos unidades por debajo de el pK_a si los analitos son ácidos.

El volumen de muestra es otro parámetro a tener en cuenta al desarrollar un método analítico basado en SPME [59,130]. Así, éste se debe seleccionar en función de los coeficientes de distribución de los analitos, K_{fs} . Éstos pueden estimarse a partir de datos bibliográficos o bien calcularse a partir de una serie de ecuaciones matemáticas [59,130,131]. Como podía observarse en la ecuación (1) del apartado I.1.1., al aumentar el volumen de la muestra, V_s , la cantidad de analito extraída, n , también aumenta pero si V_s es significativamente más grande que el producto de K_{fs} y el volumen de la fibra, V_f , la cantidad de analito extraída es independiente del volumen de muestra (ver ecuación (2)). En la práctica, teniendo en cuenta un 5% de error se puede asumir que [59]:

$$V_s = 20 K_{fs} V_f \quad (6)$$

Esto implica que para compuestos con K_{fs} superiores a 200 y una fibra de 100 μm , es suficiente un vial de 2 ml para conseguir la máxima sensibilidad mientras que viales de 40 ml pueden ser usados para compuestos con K_{fs} hasta 4000 [59]. En consecuencia, el uso de volúmenes de muestra mayores del volumen limitante no afectará a la sensibilidad del método pero sí puede mejorar la precisión.

Aunque en general la presencia de solventes orgánicos en muestras acuosas disminuye la cantidad de analito extraída ya que aumenta la solubilidad de los analitos en la muestra, en algunas ocasiones el proceso de extracción puede verse favorecido [132] debido a cambios en las interacciones entre la fibra y los analitos, o bien cuando se analizan muestras sólidas ya que la presencia de agua o de un solvente orgánico puede ayudar a la difusión de los analitos desde la matriz hasta la fibra [96,129,133,134].

I.1.4.2. Etapa de desorción

Los parámetros que afectan a la etapa de desorción dependen del tipo de desorción utilizado (térmica o por solvente orgánico). Si ésta se realiza térmicamente en un cromatógrafo de gases, los parámetros a optimizar son la temperatura y el tiempo de desorción. La temperatura se recomienda fijarla a la máxima temperatura de uso de la fibra recomendada por el fabricante y el tiempo debe ser el adecuado para que la desorción de los analitos de la fibra sea completa y no haya efecto memoria. Esto puede suceder si el tiempo o la temperatura de desorción no son suficientes para la desorción completa de los analitos [59,96].

Cuando la desorción se realiza mediante el uso de un solvente orgánico y fuera de línea con el cromatógrafo de líquidos [93,135], los parámetros a optimizar son el tipo de solvente orgánico (que debe ser compatible con la fibra y con la técnica analítica posterior) y el volumen de solvente [59]. En general, debe utilizarse el menor volumen de solvente orgánico posible sin que se produzca efecto memoria de forma que el factor de preconcentración sea mayor [3].

Cuando la desorción se realiza en la interfase de SPME para HPLC, ésta se puede llevar a cabo en modo estático y dinámico [97]. La forma más sencilla de acoplar la SPME utilizando la interfase de SPME-HPLC es usar la fase móvil como solvente de desorción aunque en algunos casos se debe introducir algún solvente orgánico en la interfase para ayudar a la desorción [136,137]. Así, en modo dinámico los parámetros a optimizar son el flujo de la fase móvil y el

solvente de desorción, si es necesario. En modo estático, además, se debe optimizar el tiempo de desorción. Éste debe ser suficiente para desorber completamente los compuestos sin que se produzca efecto memoria, al igual que el tiempo de desorción en GC. Existen también algunos trabajos [81,136,138] en los que se utiliza SPME-HPLC y en los que se ha indicado que la temperatura de desorción es un factor a tener en cuenta ya que acelera el proceso de desorción, pero la interfase comercial que existe actualmente no permite modificar este parámetro.

I.1.4.3. Derivatización en SPME

La determinación de compuestos polares presenta un mayor problema en el análisis medioambiental. Estos analitos son generalmente muy difíciles de extraer y de separar mediante GC. La derivatización de estos compuestos para formar compuestos menos polares es una alternativa frecuentemente utilizada para intentar resolver este problema. Así, la SPME puede ser combinada con la derivatización de diferentes maneras [139]. La Figura 13 resume los diferentes modos en los que la etapa de derivatización puede ser combinada con la SPME.

En la derivatización directa en la muestra, el reactivo derivatizante es añadido primero al vial que contiene la muestra de manera que se produce la derivatización de los analitos. A continuación los compuestos derivatizados son extraídos por la fibra y desorbidos en el instrumento analítico. Este modo de derivatización ha sido aplicado, por ejemplo, para la determinación de fenoles en muestras acuosas transformando primero los fenoles en los acetatos respectivos [140] o para la determinación de aldehídos en aguas de consumo derivatizándolos previamente a la extracción con perfluorobenzilhidroxilamina (PFBHA) [141].

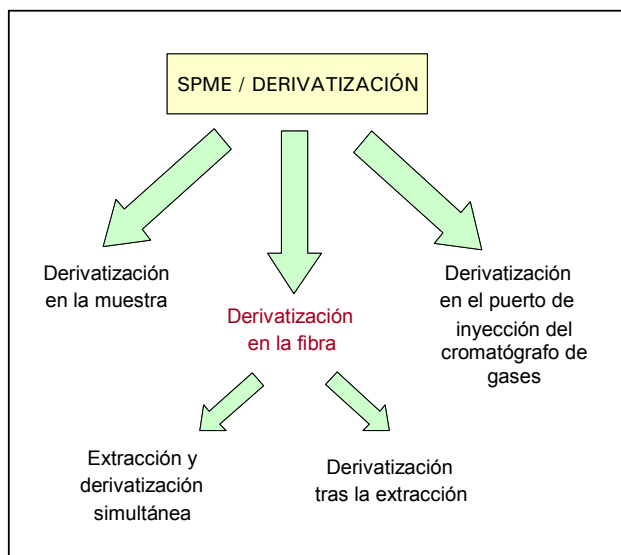


Figura 13. Posibles combinaciones de la SPME /derivatización.

Como existen fibras con polaridad suficiente para extraer compuestos con cierta polaridad [59], la extracción de los analitos de la muestra puede realizarse mediante SPME y posteriormente llevar a cabo la derivatización de los analitos retenidos en la fibra introduciendo ésta en el vial que contiene el reactivo derivatizante. En este modo de trabajo la derivatización se lleva a cabo en la fibra y se denomina derivatización tras la extracción. Un ejemplo de este tipo de derivatización es la determinación de ácidos carboxílicos de elevado peso molecular como el ácido palmítico y esteárico, que fue realizada por Pan *et al.* [142]. Estos compuestos presentan picos muy anchos si se determinan mediante GC sin una etapa de derivatización previa. En cambio, si se expone la fibra que contiene los analitos a diazometano, los ésteres correspondientes pueden ser separados por GC y los picos obtenidos son estrechos. La derivatización en el inyector del GC es también una alternativa en el caso en el que la reacción de derivatización se deba realizar a elevada temperatura. En este caso, los analitos y el reactivo derivatizante son extraídos simultáneamente o en dos etapas distintas y posteriormente la fibra es introducida en el inyector del GC donde se produce la reacción de

derivatización al mismo tiempo que se produce la desorción de los analitos derivatizados y del reactivo derivatizante [59,139].

La combinación más interesante de la SPME con la derivatización es la extracción y derivatización simultánea de los analitos de interés ya que, en este caso, la eficacia de la extracción es muy elevada. Así, la fibra es introducida en el vial que contiene el reactivo derivatizante a una concentración muy elevada de manera que la fibra queda dopada con el reactivo derivatizante. A continuación, se introduce la fibra en el espacio de cabeza del vial que contiene los analitos y se produce la extracción de los mismos y, al mismo tiempo, su derivatización. En este caso no se llega a la situación de equilibrio ya que los analitos son derivatizados a medida que son extraídos por la fibra y por lo tanto la extracción es exhaustiva. En consecuencia, la eficacia de la extracción es muy elevada pero presenta el inconveniente de que su uso está limitado a reactivos derivatizantes de baja volatilidad [59]. En la Figura 14 se muestra una ilustración del procedimiento. Este proceso fue aplicado en el desarrollo de un método para la determinación de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular en el que 1-pirenildiazometano (PDAM) fue utilizado como reactivo derivatizante [139,143,144].

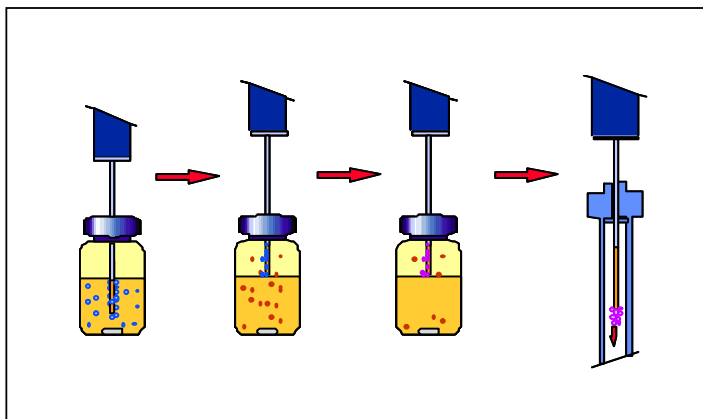


Figura 14. Derivatización y extracción simultánea en la fibra de SPME.

Sin embargo, a pesar de los buenos resultados obtenidos en los casos anteriormente comentados al combinar la SPME con la derivatización de los analitos [139-144], la introducción de una etapa de derivatización en el método analítico se evita siempre que sea posible por los problemas de repetibilidad y reproducibilidad que pueden surgir en algunos casos debidos a la propia reacción de derivatización.

A continuación, después de la bibliografía y como se ha mencionado anteriormente, se incluye una copia del trabajo publicado en la revista Trends in Analytical Chemistry, 18 (1999) 557-568 surgido de la revisión bibliográfica sobre SPME que se realizó al inicio de esta tesis.

I.2. BIBLIOGRAFÍA

- [1] I.F.H. Purchase, G.L.P. Randall, *Pure & Appl. Chem.*, 70 (1998) 1671.
- [2] M. Castillo, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.*, 16 (1997) 574.
- [3] J. Pawliszyn, *Applications of Solid Phase Microextraction*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999.
- [4] M.C. Bruzzoniti, C. Sarzanini, E. Mentasti, *J. Chromatogr. A*, 902 (2000) 289.
- [5] M. Biziuk, A. Przyazny, J. Czerwinski, M. Wiergowski, *J. Chromatogr. A*, 754 (1996) 103.
- [6] M. Castillo, D. Barceló, A.S. Pereira, F.R. Aquino Neto, *Trends Anal. Chem.*, 18 (1999) 26.
- [7] M. Solé, M.J. López de Alda, M. Castillo, C. Porte, K. Ladegaard-Pedersen, D. Barceló, *Environ. Sci. Technol.*, 34 (2001) 5076.
- [8] R. Loos, J. Riu, M.C. Alonso, D. Barceló, *J. Mass Spectrom.*, 35 (2000) 1197.
- [9] S.D. Richardson, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 181R.
- [10] W.A. Telliard, *Critical Reviews Anal. Chem.*, 29 (1999) 249.
- [11] National Primary Drinking Water Regulations; Fed. Reg., Part 112, 40 CFR Part 141, p. 395, US Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1 July 1999.
- [12] Drinking Water Directive 98/83/EEC, Commission of the European Communities, Brussels, 1998.
- [13] M.C. Hennion, V. Pichon, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.*, 13 (1994) 361.
- [14] T. Jones-Lepp, C.L. Gerlach, E.J. Cooter, *Trends Anal. Chem.*, 19 (2000) 286.
- [15] M. Veningerová, V. Prachar, J. Kovacicová, J. Uhnák, *J. Chromatogr. A*, 774 (1997) 333.
- [16] N. Masqué, E. Pocurull, R.M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia*, 47 (1998) 176.
- [17] L. Fang, X. Lu, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 77 (2000) 29.

- [18] A. Di Corcia, A. Bellioni, M.D. Madbouly, S. Marchese, J. Chromatogr. A, 733 (1996) 383.
- [19] P. Parrilla, J.L. Martínez Vidal, Anal. Let., 30 (1997) 1719.
- [20] A.R. Fernández-Alba, A. Agüera, M. Contreras, G. Peñuela, I. Ferrer, D. Barceló, J. Chromatogr. A, 823 (1998) 35.
- [21] T.R. Croley, R.J. Hughes, B.G. Koenig, C.D. Metcalfe, R.E. March, Rapid Commun. Mass Spectrom., 14 (2000) 1087.
- [22] S.D. Richardson, Anal. Chem., 74 (2002) 2719.
- [23] J. Sherma, J. AOAC Intl., 84 (2001) 993.
- [24] M. Shimmo, T. Hyotylainen, K. Hartonen, M.L. Riekkola, J. Microcol. Sep., 13 (2001) 202.
- [25] F. Gritti, G. Felix, M.F. Achard, F. Hardouin, Chromatographia, 53 (2001) 201.
- [26] M.J. Cugat, C. Aguilar, R.M. Marcé, F. Borrull, M. Calull, Electrophoresis, 23 (2002) 2279.
- [27] O. Nuñez, E. Moyano, M.T. Galcerán, J. Chromatogr. A, 946 (2002) 945.
- [28] W. Ahrer, W. Buchberger, Fresenius J. Anal. Chem., 365 (1999) 604.
- [29] O. Jáuregui, L. Pignou, M.T. Galcerán, Electrophoresis, 21 (2000) 611.
- [30] A. Oubina, D. Puig, J. Gascón, D. Barceló, Anal. Chim. Acta, 346 (1997) 49.
- [31] P. Lee Ferguson, C.R. Iden, A.E. McElroy, B.J. Brownawell, Anal. Chem., 73 (2001) 3890.
- [32] M. Seifert, S. Haindl, B. Hock, Anal. Chim. Acta, 386 (1999) 191.
- [33] M. Biziuk, A. Przyjazny, J. Chromatogr. A, 733 (1996) 471.
- [34] L. Wolska, M. Wierowski, K. Galer, T. Górecki, J. Namiesnik, Chemosphere, 39 (1999) 1477.
- [35] V. Camel, Anal. Bioanal. Chem., 372 (2002) 39.
- [36] M.J. Rinken, Intl. J. Environ. Anal. Chem., 82 (2002) 77.
- [37] A.D. Nikolaou, T.D. Lekkas, S.K. Golfopoulos, M.N. Kostopoulou, 56 (2002) 717.
- [38] C. Marianna, Fresenius Env. Bull., 11 (2002) 91.

- [39] J.J. Sauvain, T.V. Due, C.K.Huynh, Fresenius J. Anal. Chem., 371 (2001) 966.
- [40] M. Castillo, D. Puig, D. Barceló, J. Chromatogr. A, 778 (1997) 301.
- [41] R.J.C.A. Steen, A.C. Hogenboom, P.E.G. Leonards, R.A.L. Peerboom, W.P. Cofino, U.A.Th. Brinkman, J. Chromatogr. A, 857 (1999) 157.
- [42] E. Pocurull, M. Calull, R.M. Marcé, F. Borrull, Chromatographia, 38 (1994) 579.
- [43] C. Crescenzi, A. Di Corcia, G. Passariello, R. Sampieri, M.I. Turnes Carou, J. Chromatogr. A, 733 (1996) 41.
- [44] M.J.L. de Alda, D. Barceló, J. Chromatogr. A, 938 (2001) 145.
- [45] R. Curini, A. Gentili, S. Marchese, D. Perret, L. Arone, A. Monteleone, Chromatographia, 53 (2001) 244.
- [46] R. Gimeno, R.M. Marcé, F. Borrull, J. Chromatogr. A, 2002, Pendiente de aceptación.
- [47] I. Liška, J. Chromatogr. A, 655 (1993) 163.
- [48] L. Brossa, E. Pocurull, F. Borrull, R. M. Marcé, Chromatographia, 2002, Pendiente de aceptación.
- [49] M.C. Alonso, D. Barceló, Analyst, 127 (2002) 472.
- [50] M. Gilar, E.S.P. Bouvier, B.J. Compton, J. Chromatogr. A, 909 (2001) 111.
- [51] E. Pocurull, L. Brossa, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Chromatogr. A, 885 (2000) 361.
- [52] N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull, Trends Anal. Chem., 17 (1998) 384.
- [53] V. López-Ávila, Critical Rev. Anal. Chem., 29 (1999) 195.
- [54] E.B. Overton, K.R. Carney, N. Rogues, H.P. Dharmasena, Field Anal. Chem. & Technol., 5 (2001) 97.
- [55] V. López-Ávila, H.H. Hill, Anal. Chem., 69 (1999) 289R.
- [56] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Anal. Chem., 62 (1990) 2145.
- [57] M.F. Alpendurada, J. Chromatogr. A, 889 (2000) 3.
- [58] Supelco, Nota de aplicación n. 143.
- [59] J. Pawliszyn, *Solid phase microextraction, theory and practice*, Wiley-VCH, New York, 1997.

- [60] L. Muller, T. Gorecki, J. Pawliszyn, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 364 (1999) 610.
- [61] J.A. Koziel, J. Noah, J. Pawliszyn, *Environ. Sci. & Technol.*, 35 (2001) 1481.
- [62] Y.C. Chien, S.N. Uang, C.T. Kuo, T.S. Shih, J.F. Jen, *Anal. Chim. Acta*, 419 (2000) 73.
- [63] J.A. Koziel, M.Y. Jia, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 5178.
- [64] R. Hyspler, S. Crhova, J. Gasparic, Z. Zadak, M. Cizkova, V. Balasova, *J. Chromatogr. B*, 739 (2000) 183.
- [65] C. Grote, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 587.
- [66] A.C. Gerecke, C. Tixier, T. Bartels, R.P. Schwarzenbach, S.R. Muller, *J. Chromatogr. A*, 930 (2001) 9.
- [67] E. González-Toledo, M.D. Prat, M.F. Alpendurada, *J. Chromatogr. A*, 923 (2002) 45.
- [68] C. Aguilar, S. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, 795 (1998) 105.
- [69] S.E. Ebeler, G.M. Sun, M. Datta, P. Stremple, A.K. Vickers, *J. AOAC Intl.*, 84 (2001) 479.
- [70] M. Constant, J. Collier, *J. Am. Soc. Brew. Chem*, 55 (1997) 112.
- [71] F.J. Santos, M.N. Sarrión, M.T. Galcerán, *J. Chromatogr. A*, 771 (1997) 181.
- [72] D. Cam, S. Gagni, *J. Chromatogr. Sci.*, 39 (2001) 481.
- [73] J.Y. Liu, G.B. Yiang, Q.F. Zhou, K.W. Yang, *J. Sep. Sci.*, 24 (2001) 459.
- [74] A.L. Simplicio, L.V. Boas, *J. Chromatogr. A*, 833 (1999) 35.
- [75] J. Song, L.H. Fan, R.M. Beaudry, *J. Agric. Food Chem.*, 46 (1998) 3721.
- [76] D. Louch, S. Motlagh, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 1187.
- [77] Z. Zhang, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 1843.
- [78] T. Gorecki, X.M. Xu, J. Pawliszyn, *Analyst*, 124 (1999) 643.
- [79] S. Motlagh, J. Pawliszyn, *Anal. Chim. Acta.*, 284 (1993) 265.
- [80] T. Gorecki, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 3008.
- [81] H. Lord, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A*, 885 (2000) 153.

- [82] E. Schimming, K. Levsen, C. Kohme, W. Schurmann, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 363 (1999) 88.
- [83] S. Ulrich, *J. Chromatogr. A*, 902 (2000) 167.
- [84] Y.C. Wu, S.D. Huang, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 310.
- [85] R. Aranda, R.C. Burk, *J. Chromatogr. A*, 829 (1998) 401.
- [86] S. Li, S.G. Weber, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 1217.
- [87] C.W. Wang, J. Pawliszyn, *Anal. Comm.*, 35 (1998) 353.
- [88] A.-L. Nguyen, J.H.T. Luong, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 1726.
- [89] J. Chen, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 2530.
- [90] V.V. Cardoso, A. Rodrigues, J. Correia, M.J. Benoliel, *Pol. Arom. Comp.*, 19 (2000) 227.
- [91] N.R. Negrao, M.F. Alpendurada, *J. Chromatogr. A*, 823 (1998) 211.
- [92] A. Peñalver, E. Pocrull, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, 953 (2002) 79.
- [93] M.N. Sarrión, F. J. Santos, M.T. Galcerán, *J. Chromatogr. A*, 947 (2002) 155.
- [94] M.T. Kelly, M. Larroque, *J. Chromatogr. A*, 841 (1999) 177.
- [95] SPME Course, Waterloo (Canadá), Abril 2002.
- [96] R. Eisert, J. Pawliszyn, *Critical Rev. Anal. Chem.*, 27 (1997) 103.
- [97] Supelco, Nota de aplicación n. 99.
- [98] K. Jinno, M. Taniguchi, *Chromatography*, 18 (1997) 5001.
- [99] A.L. Nguyen, J.H.T. Luong, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 1726.
- [100] C.W. Wang, J. Pawliszyn, *Anal. Commun.*, 35 (1998) 353.
- [101] H. Kataoka, *Anal. Bioanal. Chem.*, 373 (2002) 31.
- [102] B.C.D.Tan, P.J. Marriot, H.K. Lee, P.D. Morrison, *Analyst* 124 (1999) 651.
- [103] K. Jinno, M. Kawazoe, Y. Saito, T. Takeichi, M. Hayashida, *Electrophoresis*, 22 (2001) 3785.
- [104] Y. Gou, C. Tragas, H. Lord, J. Pawliszyn, *J. Microcol. Sep.*, 12 (2000) 125.
- [105] R. Eisert, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 3140.
- [106] J. Wu, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 55.
- [107] W. Mullet, P. Martin, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 2383.

- [108] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, J. Microcolumn Sep., 11 (1999) 737.
- [109] Gerstel, Nota de aplicación n. 2, (2000).
- [110] Gerstel, Nota de aplicación n. 1, (2000).
- [111] J. Dugay, C. Miede, M.-C. Hennion, J. Chromatogr.A, 795 (1998) 27.
- [112] J. Beltrán, F.J. López, O. Ceprià, F. Hernández, J. Chromatogr. A, 808 (1998) 257.
- [113] L. S. De Bruin, P.D. Josephy, J.B. Pawliszyn, Anal. Chem., 70 (1998) 1986.
- [114] Gerstel, Thermo Desorption System Prospekt.
- [115] R. Aranda, P. Kruus, R.C. Burk, J. Chromatogr. A, 888 (2000) 35.
- [116] F. Mangani, R. Cenciarini, Chromatographia, 41 (1995) 678.
- [117] P. Popp, A. Paschke, Chromatographia, 49 (1999) 686.
- [118] X-R. Xia, R.B. Leidy, Anal. Chem., 73 (2001) 2041.
- [119] J. Wu, X. Yu, H. Lord, J. Pawliszyn, Analyst, 125 (2000) 391.
- [120] E.H.M. Koster, C. Crescenzi, W. den Hoedt, K. Ensing, G.J. de Jong, Anal. Chem., 73 (2001) 3140.
- [121] T.P. Gbatu, K.L. Sutton, J.A. Caruso, Anal. Chim. Acta, 402 (1999) 67.
- [122] R.E. Shirey, R.F. Mindrup, *SPME adsorption versus absorption: which fiber is best for your application*, Presentation at Pittcon, New Orleans, 2000.
- [123] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, H-G. Janssen, C. Cramers, Anal. Chem., 71 (1999) 5213.
- [124] J. Poerschman, T. Gorecki, F.D. Kopinke, Environ. Sci. & Technol., 34 (2000) 3824.
- [125] Y. Yang, S.B. Hawthorne, D.J. Miller, Y. Liu, M.L. Lee, Anal. Chem., 70 (1998) 1866.
- [126] W.H.J. Vaes, P. Mayer, A.G. Oomen, J.L.M. Hermens, J. Tolls, Anal. Chem., 72 (2000) 639.
- [127] W.H.J. Vaes, C. Hamwijk, E. Urresterazu Ramos, H.J.M. Verhaar, J.L.M. Hermens, Anal. Chem., 68 (1996) 4458.
- [128] R. Eisert, K. Levsen, J. Chromatogr. A, 733 (1996) 143.
- [129] Z. Zhang, J. Pawliszyn, Anal. Chem., 67 (1995) 34.

- [130] T. Górecki, J. Pawliszyn, *Analyst*, 122 (1998) 1079.
- [131] T. Górecki, A. Khaled, J. Pawliszyn, *Analyst*, 123 (1998) 2819.
- [132] M. Krogh, H. Grefslie, K.E. Rasmussen, *J. Chromatogr. B*, 689 (1997) 357.
- [133] M. Llompart, K. Li, M. Fingas, *Talanta*, 48 (1999) 451.
- [134] R.A. Doong, P.L. Liao, *J. Chromatogr. A*, 918 (2001) 177.
- [135] P. Popp, C. Bauer, M. Möder, A. Paschke, *J. Chromatogr. A*, 897 (2000) 153.
- [136] M. Möder, P. Popp, R. Eisert, J. Pawliszn, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 363 (1999) 680.
- [137] K. Jinno, T. Muramatsu, Y. Saito, Y. Kiso, S. Magdic, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A*, 745 (1996) 137.
- [138] H. Daimon, J. Pawliszyn, *Anal. Comm.*, 34 (1997).
- [139] L. Pan, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 196.
- [140] K. Buchholz, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 160.
- [141] B. Cancho, F. Ventura, M.T. Galcerán, *J. Chromatogr. A*, 943 (2001) 1.
- [142] L. Pan, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 4396.
- [143] F. Sporkert, F. Pragst, S. Hübner, G. Mills, *J. Chromatogr. A*, 772 (2002) 45.
- [144] G. Mills, V. Walker, H. Mughal, *J. Chromatogr. B*, 730 (1999) 113.

I.3. APLICACIÓN DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA A LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS EN MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES

En el grupo de investigación en el que se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral, ya se habían realizado algunos estudios en los que la SPME se había aplicado a la determinación de varios plaguicidas en muestras de agua obteniéndose buenos resultados [1,2]. Sin embargo, como ya se ha comentado, como la introducción de microextracción en fase sólida (SPME) era bastante reciente, previamente al inicio de la parte experimental de la presente Tesis Doctoral, se realizó un estudio bibliográfico sobre el estado de la investigación en esta técnica de preconcentración. En este estudio, en primer lugar, se realizó una introducción a la SPME y, a continuación, se comentaron las principales aplicaciones de esta técnica de preconcentración al análisis medioambiental ya que es la línea de investigación principal del grupo en el que se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral.

En el estudio bibliográfico que se presenta a continuación, en primer lugar se realizó una introducción a la SPME y se comentaron las principales ventajas e innovaciones que presentaba esta nueva técnica de preconcentración con respecto a las técnicas más convencionales como la extracción líquido-líquido (LLE) y la extracción en fase sólida (SPE). Seguidamente se pasó a describir el procedimiento de la SPME así como los principales aspectos termodinámicos y cinéticos que se deben tener en cuenta. A continuación, se indicaron los principales parámetros que pueden afectar a la etapa de extracción en SPME y que deben ser optimizados cuando se desea desarrollar un método analítico basado en la SPME como la elección de la fibra más adecuada a cada aplicación, el volumen de muestra, el tiempo y la temperatura de la etapa de extracción, la adición de sal o de solventes orgánicos a la muestra, la modificación del pH, la agitación de la muestra y la posibilidad de introducir una etapa de derivatización en el proceso.

Además de los parámetros que influyen en la etapa de extracción, también se dedicó un apartado a la etapa de desorción en SPME. Como esta etapa depende del instrumento analítico que se utilizará posteriormente, se comentaron los parámetros que pueden influir en esta etapa en función del modo de desorción utilizado (térmicamente en un cromatógrafo de gases o

por solvente en cromatografía de líquidos y electroforesis capilar). En SPME-HPLC y SPME-CE se describieron también las diferentes interfases comerciales o de fabricación propia que se habían desarrollado hasta el momento de realización de este estudio para llevar a cabo la desorción en línea en una de estas dos técnicas de separación. Finalmente, se realizó una recopilación de los estudios que habían sido publicados hasta principios de 1999 y en los que la SPME se aplicaba al análisis medioambiental para muestras de aire, acuosas y sólidas.

Así, en la revisión bibliográfica realizada se observó que la SPME había sido aplicada a la determinación de algunos compuestos orgánicos proporcionando unos resultados que la hacían una técnica muy adecuada para el análisis medioambiental. Sin embargo, debido a su reciente aparición, la SPME todavía estaba en su etapa de desarrollo por lo que su uso no estaba muy extendido, sobre todo en el acoplamiento con la HPLC o CE. Por estas razones se consideró oportuno estudiar la aplicación de la SPME acoplada a dos técnicas cromatográficas, la GC y la HPLC, para la extracción de diferentes familias de contaminantes orgánicos en muestras de agua.

A continuación se incluye una copia del trabajo publicado en la revista *Trends in Analytical Chemistry*, 18 (1999) 557-568 surgido a raíz del estudio bibliográfico realizado al inicio de la presente Tesis Doctoral.

Bibliografía

- [1] C. Aguilar, S. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Chromatogr. A, 795 (1998) 105.
- [2] C. Aguilar, A. Peñalver, E. Pocurull, J. Ferré, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Chromatogr. A, 844 (1999) 425.

TRENDS IN SOLID-PHASE MICROEXTRACTION FOR DETERMINING ORGANIC POLLUTANTS IN ENVIRONMENTAL SAMPLES

ABSTRACT

Solid-phase microextraction (SPME) is a recent technique of sample preparation. It has been used successfully to determine environmental pollutants in different matrices like soils, water and air. SPME is a solvent-free technique which has a number of advantages over more conventional sample preparation techniques like liquid-liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE). We describe the most recent developments in SPME and some future ones, including its coupling to HPLC and CE, new fibers, and the automation of the entire SPME process and its application to field analysis. We also review the most important parameters for applying this extraction technique to the analysis of environmental samples.

Keywords: Solid-phase microextraction; Environmental analysis; Organic compounds

INTRODUCTION

Solid-phase microextraction (SPME) is a new extraction technique. Devised by Pawliszyn and coworkers [1], it represents a further advance in sample preparation. SPME has a number of advantages over conventional techniques for extracting organic compounds in environmental samples, like liquid-liquid extraction (LLE) [2] and solid-phase extraction (SPE) [3,4] for semivolatiles and nonvolatiles, or headspace extraction [5] and purge-and-trap (P&T) [6] for volatiles.

Solid-phase microextraction is based on the partition equilibrium of target analytes between polymeric stationary phase, which is a coated fused-silica fiber, and sample matrix. SPME does not require organic solvents, which are expensive and may be harmful to health and to the environment, to extract analytes. This technique is very simple, fast, easy to automate, portable and inexpensive. Also, only small volumes of sample are needed. SPME can be easily coupled to gas chromatography (GC) and, with some modifications, to high resolution liquid chromatography (HPLC) [7-10]. Recently, SPME has also been coupled to capillary electrophoresis (CE) [11,12], and the automated systems SPME/GC [13,14] and SPME/HPLC [9] have been developed by using conventional GC and HPLC autosamplers. New developments in SPME devices and fibers make SPME a very promising technique for field analyses [15,16]. Furthermore, solid-phase microextraction has proved to be very useful for achieving chemical measurements such as the determination of free concentration of organic compounds in complex sample matrices [17], the water solubility and the octanol/water partitioning of hydrophobic chlorinated substances [18].

This technique was first introduced to determine relatively volatile compounds in environmental samples, but today has extended its use to the analysis of a wide variety of matrices and analytes. To date, SPME has been used successfully to analyse gaseous, liquid and solid samples. Also, a wide range of analytes from volatile to nonvolatile compounds have been

determined by SPME. These include environmental pollutants like pesticides [7,19-27], phenols [28-31], polychlorinated biphenyls (PCBs) [32,33], polycyclic aromatic compounds (PAHs) [8,17,34], and to a lesser extent, inorganic compounds [35].

This paper reviews the most recent developments and applications of SPME for determining organic pollutants in environmental samples. We also summarize the application of the most recent developed SPME fibers and the effect of different parameters that should be considered when developing methodologies based on solid-phase microextraction.

SPME PROCEDURE

The SPME process can be summarised by two steps. First, target analytes are extracted from a sample matrix when coated fiber is exposed to the sample for a predetermined time. Second, fiber is removed from the sample and the analytes retained are then desorbed in an analytical instrument to be separated and quantified. The desorption step is usually carried out by placing the fiber in a hot injector of a gas chromatograph (thermal desorption). It can also be performed with an HPLC system by introducing a SPME/HPLC interface. The entire process is very simple and it can be automated with both GC [13,14] and HPLC [9].

Two basic types of sampling mode can be performed using SPME: direct extraction and headspace extraction, which is also called headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) [1]. In direct sampling, fiber is directly immersed into the liquid or gaseous sample while in the HS-SPME, the fiber is suspended in the space above the sample. Direct extraction can be applied to the analysis of gaseous and relatively clean liquid samples. HS-SPME is better for analyzing dirtier liquid samples and can also be applied to solid samples. As an example, Popp *et al.* [36] compared extracting BTEX

compounds from water by direct immersion or extracting them from the headspace by using two different fibers, 80 μm carboxen/polydimethylsiloxane (carboxen/PDMS) and 100 μm polydimethylsiloxane (PDMS). Table 1 shows the limits of detection (LOD) of BTEX compounds from both direct immersion and headspace sampling modes. For example, for PDMS coating, results for the most volatile compounds were better in the extraction from the headspace.

Table 1. Detection limits (LOD) of BTEX compounds for direct immersion and headspace sampling mode with two different coatings: polydimethylsiloxane and carboxen/polydimethylsiloxane. Reprinted with permission from reference [36].

substance	LOD (ng L^{-1})		LOD (ng L^{-1})	
	Headspace extraction		Direct extraction	
	80 μm Carboxen-PDMS	100 μm PDMS	80 μm Carboxen-PDMS	100 μm PDMS
Benzene	55	480	45	1200
Toluene	50	430	35	550
Ethylbenzene	60	225	35	225
m-Xylene + p-xylene	60	200	40	215
o-Xylene	55	215	35	220

The theory of the thermodynamic and kinetic aspects of the SPME process, both direct and headspace extraction, have been widely studied [1,37]. Thermodynamic studies have shown that the amount of analyte extracted by the coating at equilibrium time is directly proportional to the concentration of the analyte in the sample and is independent of the location of the fiber in the system. The term of "partition coefficient" or "distribution constant" between the fiber coating and the sample matrix, K_{fs} , or the headspace, K_{fh} , was introduced. Partition coefficients are temperature dependent and characteristic of each pair coating-analyte. The mathematical model which describes the kinetics of the absorption process in both the direct and headspace extraction modes, have also been developed [1]. The equilibrium time depends on the analyte diffusion rate from the sample into the coating and can be quite

different if the fiber is directly immersed in the sample or in the headspace. Usually, equilibration times are greater in headspace than direct immersion.

PARAMETERS THAT AFFECT THE ABSORPTION PROCESS

The amount of analyte extracted by the fiber in SPME can be affected by several parameters e.g. the characteristics of the coating, the temperature and time of the extraction process, the addition of salt or an organic solvent to the sample, pH modification, agitation of the sample and sample volume. Matrix effects and the introduction of a derivatization step can also affect the extraction of analytes in SPME.

Coatings

The choice of the most suitable coating is very important for achieving good selectivity for the target analytes. The principle of "like dissolves like" can be applied to fiber selection. As shown in Table 2, different polymers are commercially available as coatings for SPME fibers. In addition to these commercially available fibers, some authors have developed other methods for preparing "custom-made" fibers which present concrete properties for extracting selected analytes [38,39]. For example, Mangani *et al.* [38] developed a method for coating a fused-silica fiber with graphitized carbon black, Carbograph 1. Fibers coated by phenyl, C₈ and monomeric and polymeric C₁₈ stationary phases have also been developed and applied to determine PAHs in water samples [39].

Polydimethylsiloxane and polyacrylate were the first coated fibers for SPME. PDMS is apolar and presents high affinity to non-polar compounds such as BTEX compounds (benzene, toluene, ethylbenzene and xylene) [40], volatile organic compounds (VOC's) [41-43] and some pesticides [25,27]. Polyacrylate is a more polar coating and extracts more polar compounds,

such as phenols and their derivatives [28-31] and some pesticides [7,19-24,26,27].

Coatings containing more porous and adsorbent materials, divinylbenzene (DVB) and carboxen blended in PDMS or carbowax (CW), have been introduced more recently: PDMS/DVB, PDMS/carboxen and CW/DVB. These fibers are more polar than PA and are suitable for extracting more polar compounds such as alcohols and ethers [44]. Moreover, carboxen/PDMS fibers have a great potential for extracting organic compounds from air, such a VOCs with low molecular weight [43], because of the larger surface area of these coatings. As Table 1 shows, PDMS/carboxen fibers offer much better results than PDMS fiber for extracting BTEX compounds from water. DVB/TPR fiber, due to the pore dimension in the coating, is designed to reduce molecular weight discrimination between analytes which vary in chain length [11].

The first SPME fibers were developed for GC use. Nowadays, some coating fibers have been developed for use in HPLC. The desorption step in HPLC can only be performed when the fiber coating is stable to the addition of organic solvents. Only bonded phases are compatible with all organic solvents. Table 2 shows the recommended use (GC, HPLC or both) for the commercially available fibers.

Time and temperature of the extraction process

Since SPME is based on an equilibrium distribution process, the maximum amount of analyte will be extracted at equilibrium time. Stirring the sample decreases the time needed to reach equilibrium because it enhances the diffusion of analytes towards the fiber. Compounds with low distribution constants have long equilibration times so a shorter extraction time than equilibrium time has to be selected. In this instance, exposure time must be very controlled to ensure good reproducible data.

Table 2. Fiber coatings commercially available for SPME use.

Fiber coating	Film thickness	Recommended use	Maximum temperature (for GC use)	Application
Polydimethylsilyloxane (PDMS)	100 μm ^c	GC-HPLC	280 °C	Non polar organic compounds like VOCs, PAHs and BTEX.
	30 μm ^c	GC-HPLC	280 °C	
	7 μm ^a	GC-HPLC	340 °C	
Polyacrylate (PA)	85 μm ^b	GC-HPLC	320 °C	Polar organic compounds like triazines and phenols.
Polydimethylsilyloxane/Divinylbenzene (PDMS/DVB)	65 μm ^b	GC	270 °C	Aromatic hydrocarbons and small volatile analytes like solvents. Air analysis.
	60 μm ^b	HPLC	-	
Carboxen/Polydimethylsilyloxane (Carboxen/PDMS)	75 μm ^b	GC	320 °C	VOCs and hydrocarbons.
Carbowax/Divinylbenzene (CW/DVB)	65 μm ^b	GC	265 °C	Polar organic compounds like alcohols.
Carbowax/Templated Resin (CW/TPR)	50 μm ^b	HPLC	-	Anionic surfactants.

^a Bonded phase

^b Partially cross-linked phase

^c Non-bonded phase

The extraction temperature has two opposite effects on the SPME process. An increase in temperature during extraction enhances the diffusion of analytes towards the fiber. Moreover, in the HS-SPME sampling mode, the temperature helps transfer analytes to the headspace. On the other hand, this increase in temperature decreases the distribution constant of the analytes because the absorption step is an exothermic process. Zhang *et al.* [1] introduced a modification of SPME, called internally cooled fiber SPME, to solve this problem. This device allows the sample to be heated and the fiber to be cooled simultaneously, thus making the extraction process more efficient.

pH modification and addition of salt

One way of increasing the amount of some analytes retained in the fiber coating is by adjusting the pH. The pH of the sample can be adjusted to values, which enhance the presence of neutral form in the extraction of acid and basic analytes like phenols and amines.

Most studies have shown that by adding salt, usually sodium chloride, the retention of the analytes in the fiber coating increases. For example, for polar analytes such as triazines, sensitivity can be increased by a factor of up to ten [27]. Adding salt usually increases the ionic strength of the sample. This decreases the solubility of analytes which are more easily retained. This effect is not general and depends on the polarity of the analyte, the concentration of salt and the sample matrix.

Addition of solvent

Adding an organic solvent to aqueous samples has not yet been widely investigated. The presence of organic solvents in water samples usually decreases the amount of analyte extracted. For example, K. Levsen *et al.*

[26] show that increasing the methanol content up to 20% reduced the peak response of triazine compounds by a factor of 2. On the other hand, in soils and sludges, adding water or organic solvents to the sample matrix is a very useful approach. Water or solvent is added to remove analytes from the matrix and enhance the diffusion of analytes from the sample towards the fiber coating [1].

Agitation of the sample

Stirring the sample enhances the diffusion of the analytes towards the fiber coating and decreases the extraction time for both direct immersion and headspace extraction [1]. In HS-SPME, stirring also facilitates mass transfer between headspace and aqueous phase. Magnetic stirring is the most commonly used agitation technique but this does not mix the sample efficiently. Alternative stirring techniques, like sonication and intrusive mixing, improve the extraction times but still do not provide a perfect agitation of the sample. More recent developments, such as fiber vibration and flow-through cell design, should be considered, especially for automated SPME systems [13].

Volume of the sample

Volume is an important parameter to optimize in SPME because it is directly related to the sensitivity of the method. The volume of the sample is usually much higher than the volume of the fiber and the amount of analyte extracted is only proportional to the partition coefficient, sample concentration and fiber volume. Partition coefficients of the analytes between the sample matrix and the fiber should be considered because compounds with large K_{fs} do not accomplish this approximation and are more affected by changes in sample volume than compounds with small affinities to the fiber. For this reason, a good criterion for choosing the best

sample volume is the value of K_{fs} for the analytes [1]. In HS-SPME, the analytes are distributed among sample matrix, fiber coating and headspace, and headspace volumes must generally be small to concentrate the analytes before they diffuse towards the fiber coating. If the headspace volume is too large, sensitivity decreases considerably [22].

Matrix effects

Some authors have also investigated the effects of matrix on the extraction efficiency of analytes [19]. Organic matter like humic and fulvic acids, which are present in real water samples, can decrease the amount of analyte extracted due to the interaction between dissolved organic matter (DOM) and the analytes. For example, Pörschmann *et al.* [17] used SPME to determine the binding state of low-molecular mass pollutants like phenols and PAHs in contaminated water rich in humic organic matter.

Derivatization

Derivatization can enable polar compounds in environmental samples to be determined by SPME. This step and SPME can be combined in three different ways: direct derivatization in sample matrix, derivatization in fiber coating and derivatization in GC injection port [45].

The first approach is direct derivatization in the sample matrix, followed by extraction of the derivatives by SPME. For example, it has been used to determine phenols by transforming them to the corresponding acetate derivatives before SPME [31]. Derivatization in fiber coating can be achieved in two ways: simultaneous derivatization and extraction and derivatization after extraction. In the first case, fiber containing the derivatizing reagent is exposed to the sample, which contains the analytes. This approach is very interesting because it can be applied in field analysis [1].

In the second case, analytes are extracted by the fiber and then exposed to the derivatizing reagent. Derivatization into the GC injection port is performed when the analytes can be derivatized when exposed to high temperatures. For example, Pan and coworkers [46] used this approach to determine long chain carboxylic acids in water samples.

DESORPTION PROCESS

The analytes retained in the fiber coating can be desorbed by GC, HPLC or CE. To date, most applications of SPME are performed in GC because the combination is very simple.

SPME-GC

SPME can be easily coupled to GC because the injection port of the gas chromatograph can be used for the thermal desorption of analytes from the fiber. When the temperature increases, the affinity of analytes towards the fiber decreases and they are liberated. Moreover, the flow of carrier gas within a gas chromatograph injector also helps to remove the analytes from the fiber and transfer them into the gas chromatographic column. Insert liners with low volumes are required to ensure rapid transfer of desorbed analytes to the chromatographic column [1]. Desorption is usually achieved in less than two minutes for most compounds. Thermal desorption in GC can be affected by several parameters such as the temperature of GC injector and the flow rate of the carrier gas that determines the desorption time of the SPME process. In general, the injector temperature is set at the maximum temperature for the stability of the fiber coating. Compounds with high molecular weight normally need higher desorption temperatures than this temperature. Consequently, these compounds can remain retained in the fiber coating and appear in subsequent analyses (carryover effect). High

desorption times can help aid to decrease this carryover effect. Nowadays, a wide range of applications have been developed for the determination of environmental pollutants, e.g. pesticides [19-27] and BTEX compounds [36,40], by SPME/GC coupling.

SPME-GC has easily been automated by a modified commercial autosampler [13,14]. This automated SPME device controls temperature and agitation in the extraction process better and provides more reproducible results than the manual SPME device. More recent developments in SPME-GC automated systems incorporate a new agitation mechanism -fiber vibration- with better results than the more conventional stirring of the sample [14]. This mode of agitation consists of moving the fiber instead of the solution.

SPME-HPLC

SPME-HPLC coupling has been introduced more recently and is more complex than SPME-GC coupling because it needs interfaces to desorb the analytes. The analytes retained in the fiber are desorbed by adding an organic solvent to the fiber in the desorption chamber. These analytes are then introduced into the HPLC analytical column by the mobile phase. An example of an SPME-HPLC interface is shown in Figure 1.

Some authors have evaluated parameters which affect the desorption process in HPLC, such as selecting the most appropriate solvent and heating the interface [8]. Organic solvents can damage the fiber coating. Therefore, not all the SPME fibers can be used for HPLC applications (Table 1). New SPME fibers, such as 60 μm -PDMS/DVB and CW/TPR, which are bonded phases and resist the addition of organic solvents, were developed especially for HPLC use.

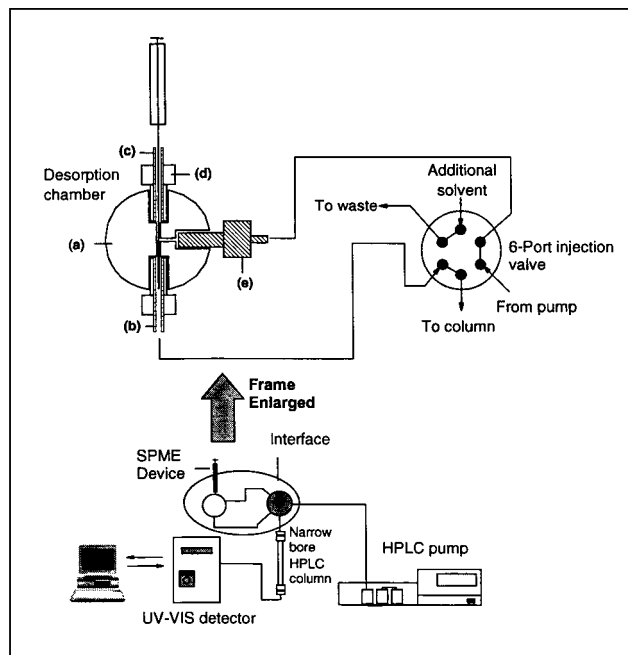


Figure 1. SPME-HPLC interface: (a) stainless steel 1/16 in. tee, (b) 1/16 in. stainless steel tubing, (c) 1/16 in. PEEK tubing (0.02 in. i.d.), (d) two-piece, finger-tight PEEK union, (e) PEEK tubing (0.005 in. i.d.) with a one-piece PEEK union. Reprinted with permission from reference [1].

A more recent development of SPME/HPLC, called in-tube SPME, has been introduced [9] by Eisert and coworkers. This application allows the development of an automated SPME-HPLC system. In this new SPME design, a piece of open tubular capillary GC column or a piece of a micro-LC capillary column was used as extracting phase. Only a few groups of compounds have been determined by SPME-HPLC. Non-ionic surfactants [10], phenylurea and carbamate pesticides [7,9] and PAHs [8,34] are some of these compounds. However, to date, limits of detection are not very low.

SPME-CE

More recently, a few papers have been published which describe methods of determining organic compounds like barbiturates [11] and phenols [12] by SPME-CE coupling. SPME-CE coupling is more difficult than SPME-HPLC because the interface should allow the introduction of very small injection volumes. In CE, nanolitre volumes are injected while in HPLC microlitre volumes are injected. Whang *et al.* [12] have designed an interface for SPME-CE that allows the SPME fiber to be inserted directly into the injection end of a CE capillary. They prepared a "custom-made" polyacrylate fiber to achieve the SPME-CE coupling. Figure 2 shows a scheme of the SPME-CE interface. This interface has been tested for determining phenols in water samples and the limits of detection are low.

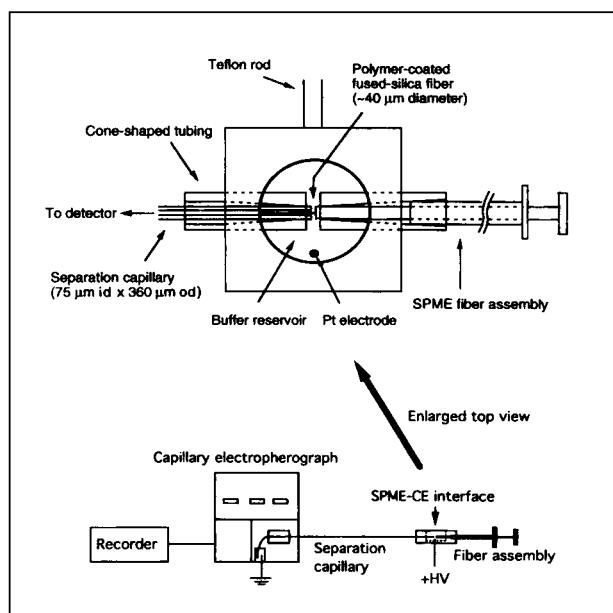


Figure 2. SPME-CE interface. Figure is not to scale. Reprinted with permission from reference [12].

APPLICATION OF SPME TO THE ANALYSIS OF ENVIRONMENTAL SAMPLES

All types of environmental samples such as air [43,45-50], water [7,19-27,29-33,40-42] and soil or sludges [14,28,32] were analyzed by SPME. Table 3 summarizes some references and experimental conditions of SPME environmental analysis as well as the type of fiber used in each application. SPME has recently been introduced as a very useful technique for field analysis [15,16]. A portable field sampler has been designed for this purpose. It contains a septum to prevent the fiber from being contaminated. Few papers have been published about this modification of the SPME device to date but studies about the stability of analytes stored in the fiber and the combination of SPME with a portable GC indicate that SPME is a very promising technique for field analysis [15].

Air samples

The application of SPME to the analysis of air samples has only recently appeared because there are some drawbacks [43,45-50]. For example, it is difficult to prepare standards for gas sampling in a range of concentrations in the calibration process. Also, calibration and sampling always have to be done at the same temperature to obtain reproducible results.

Namiesnik *et al.* [49] have developed a method for determining organic pollutants from gaseous matrices by preparing standard gaseous mixtures with an apparatus for dynamic generation of gaseous mixtures. They have also evaluated how temperature and humidity affects the response of the compounds. Figure 3 shows the chromatogram obtained when an air sample from a students chemical laboratory was analyzed by the SPME-GC-MS method.

Table 3. SPME environmental applications.

Compounds	Fiber coating	SPME conditions ^{ref} (absorption;desorption)	Other references
Pesticides	PDMS	30 min ^a ; 3 min at 260 °C ¹⁴	16,18,20,21,22,25,27
	PA	45 min at 60 °C; 2 min at 260 °C ¹⁹	7,13,20,23,25,26
	XAD coated PDMS/DVB Carbowax/DVB	30 min ^a ; 20 min at 270 °C ²⁰ 30 min ^a ; 5 min at 280 °C ²⁵	
Phenols and derivatives	PA	60 min ^a ; 8 min at 250 °C ²⁹	12,28,30,31
Volatile organic compounds (VOC's)	PDMS	20 min at 80 °C; 5 min at 200 °C ⁴¹	40
	PA	12 min ^a ; 5 min at 260°C ⁴⁰	
	Carboxen/PDMS	30 min ^a ;2 min at 300 °C ³⁶	
BTEX compounds	PDMS	10 min ^a ; 2 min at 150 °C ³⁹	48
	Carboxen/PDMS	30 min ^a ;2 min at 300 °C ³⁶	
Polycyclic aromatic compounds (PAHs)	PDMS	30 min ^a ; 2 min ^{a,b,34}	17,42
	PDMS/DVB	-	8
	Carbowax/DVB	-	8
	Carbowax/TPR	-	8
	C ₁₈	30 min at 60 °C; 1 min at 300 °C ³⁸	
Polychlorinated byphenyls (PCBs)	PDMS	5 h ^a ;1 min at 300 °C ³³	32
	Phenyl bonded phase	30 min at 60 °C; 1 min at 300 °C ³⁸	
Chlorobenzenes	PDMS	25 min at 30 °C; 3 min at 250 °C ⁵⁰	
	PA	30 min at 50 °C; 5 min at 280 °C ⁵¹	
Fatty acids	PA	30 min ^a ; 5 min at 300 °C ⁴⁴	
Formaldehyde	PDMS/DVB	300 s ^a ; 2 min at 210 °C ⁴⁷	

^a t room temperature^b SPME-HPLC analysis

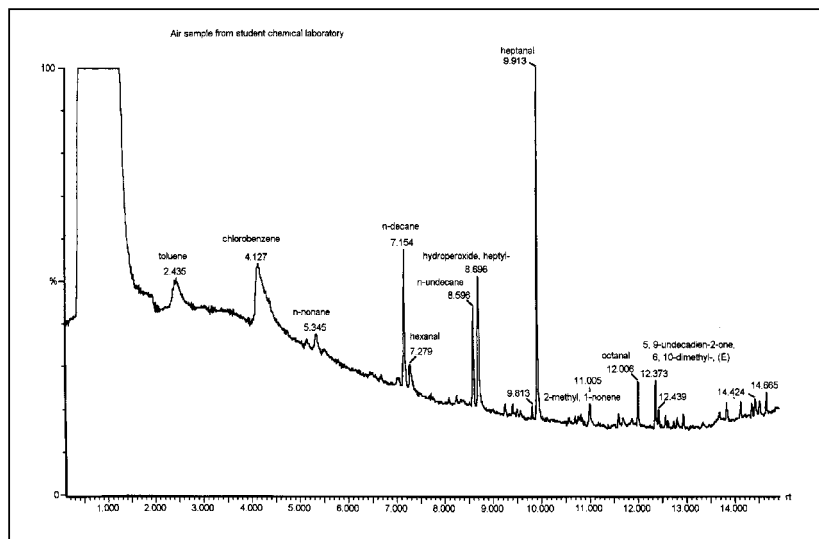


Figure 3. Chromatogram of an air sample from a student chemical laboratory obtained by SPME-GC-MS. Reprinted from reference [49] with permission.

The standard preparation is not necessary to quantify the analytes when the partition coefficients are determined. Martos and co-workers [50] proposed a method for estimating these coefficients with a linear temperature-programmed index. The dependence between the amount extracted and the temperature was solved by calculating the theoretical expression that describes the partition coefficient at any temperature for each pair of fiber-analyte [47].

This method has been used to determine formaldehyde [48], isoparaffins [50] and aromatic compounds such as styrene [50]. Formaldehyde was determined by Martos *et al.* [48] by on-fiber derivatization and the method detection limits (MDLs) and the precision as relative standard deviation (RSD) were calculated at different sampling times. For example, for 300 s sampling, the MDLs were 4.6 ppb and the RSD was 22%. New SPME fibers with high surface areas, such as carboxen/PDMS, have allowed small volatile analytes to be extracted from air samples as gases [43].

Aqueous samples

Direct immersion is the most frequently used SPME sampling mode in aqueous samples [7,19-21,23-26,29-33,40-42]. For instance, M.R. Lee and coworkers [24] have developed a method for determining acidic herbicides in water by SPME followed by a gas-phase postderivatization of compounds retained in the fiber. Acidic herbicides are very polar compounds that cannot be determined directly by GC. They have to be derivatized to the corresponding methyl esters to make them suitable for GC analysis. In this paper, after the analytes had been retained in the fiber coating, "in fiber derivatization", they were then derivatized with diazomethane gas. PDMS and PA fibers were evaluated. PA was more efficient than PDMS for extracting these compounds. They also studied how varying the pH of the sample and adding salt and humic acids affect the extraction procedure. Figure 4 shows the chromatograms obtained when the analytes were derivatized after (a) and before (b) the SPME process.

HS-SPME sampling mode [22,29,31,42] is also used for extracting organic compounds from aqueous samples. For example, Page *et al.* [22] have developed a method for determining organochlorine pesticides in water samples by HS-SPME-GC-ELCD. They also evaluated how the addition of salt, the absorption temperature and time, and the headspace and sample volumes affected the amount of analyte extracted. With small volumes of sample (15 ml) MDLs ranged from 0.3 to 0.8 ng l⁻¹ and repeatabilities were between 5.9 and 21.7%. Figure 5 shows the chromatograms obtained when a water sample containing organochlorine pesticides in a range between 1 and 10 ng was analyzed by (a) direct injection, and (b) HS-SPME of 15 ml of sample.

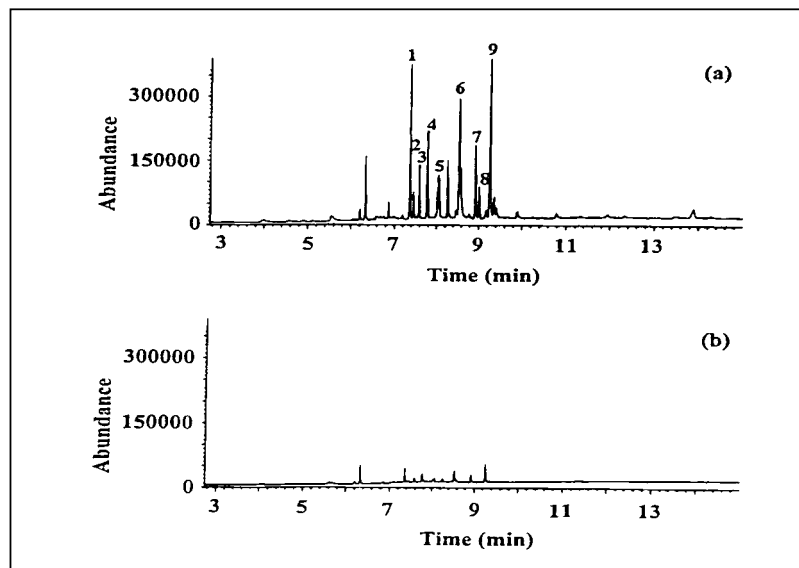


Figure 4. Chromatogram obtained when $25 \mu\text{g l}^{-1}$ of acidic herbicides and with 2.5 mg l^{-1} of humic acids were extracted by (a) gas postderivatization following SPME, and (b) SPME following methylation with diazomethane ether solution. Peak assignation: (1) MCP; (2) dicamba; (3) MCPA; (4) 2,4-DP; (5) 2,4-D; (6) 2,4,5-TP; (7) 2,4,5-T; (8) dinoseb; (9) 2,4-DB. Reprinted with permission from reference [24].

Solid samples

Only a few papers describing methods for determining environmental pollutants such as chlorobenzenes [51,52] and chlorophenols [28] from soil samples have been published to date. Lee *et al.* [28] used SPME to determine five chlorophenols in landfill leachates and real soil samples. Before the real soil samples were analyzed, they evaluated absorption and desorption conditions and the effects of humic acids and surfactants on the determination of chlorophenols in water samples. Limits of detection of ng l^{-1} and relative standard deviations, in repeatability conditions, ranged from 5 to 9% ($n=8$) in water samples. Figure 6 shows the chromatogram obtained when a real soil sample was analyzed by the SPME-GC-MS method.

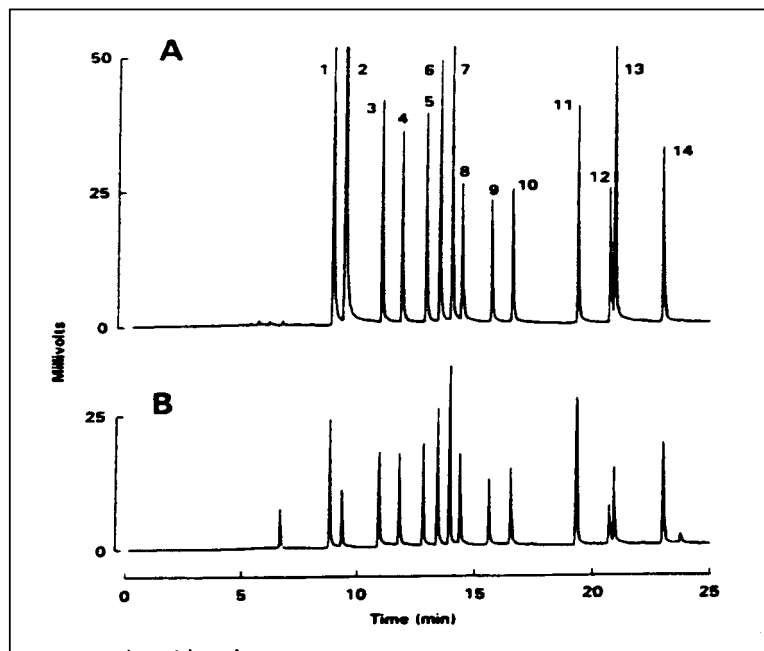


Figure 5. Chromatograms obtained when a water sample spiked with organochlorine pesticides ranged between 1 and 10 ng was analyzed by: (A) direct injection, (B) HS-SPME of 15 ml of salt saturated water sample at 87 °C. Peak assignment: (1) HCB; (2) lindane; (3) heptachlor; (4) aldrin; (5) heptachlor epoxide; (6) γ -chlordane; (7) trans-nonachlor; (8) pp-DDE; (9) op-DDT; (10) pp-DDT; (11) mirex; (12) cis-permethrin; (13) trans-permethrin; (14) DCBP. Reprinted with permission from reference [22].

Santos *et al.* [51] developed a method based on HS-SPME and GC-MS to determine chlorobenzenes in an industrially contaminated soil which is candidate reference material (CRM). Parameters which affect the SPME process in soil samples, like adding water and organic solvents to the sample, as well as the temperature of extraction, were optimized. The authors showed that increasing the extraction temperature does not improve the response of chlorobenzenes. This is probably explained by the decrease in the partition coefficients between fiber and headspace when the temperature increases.

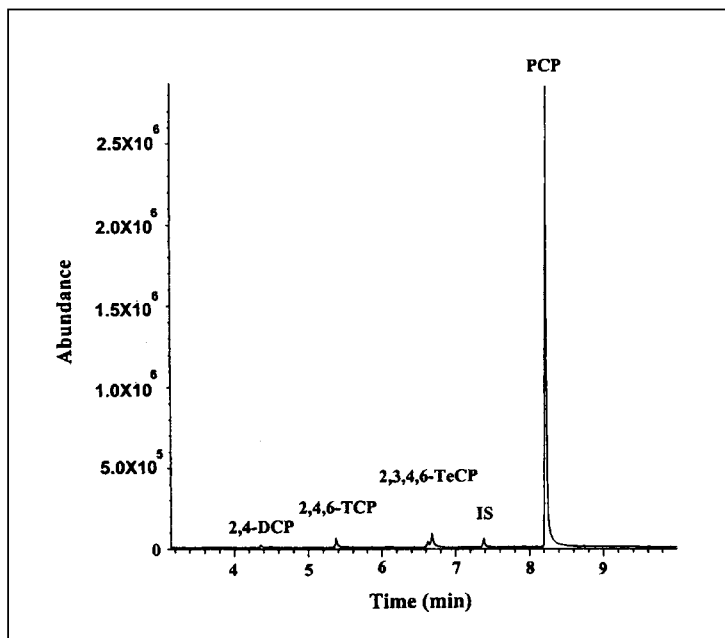


Figure 6. Chromatogram of a real soil sample obtained by SPME-GC-MS. Reprinted with permission from reference [28].

They also compared the effect of adding different volumes of ethanol, methanol, dichloromethane and acetone. Results were best when very low amounts of an organic solvent were added. The results obtained with HS-SPME agreed with those obtained by Soxhlet extraction and those of an European intercomparison exercise. Chlorobenzenes in the CRM-529 soil sample were quantified by standard addition. Reproducibility was good, between 3 and 5%, and MDLs ranged from 0.03 to 0.01 ng g⁻¹ of soil. Table 4 shows the results of the analyses of this soil sample was by the three methods.

Table 4. Analyses of a sample of sandy CRM-529 soil by HS-SPME-GC-MS, Soxhlet extraction and intercomparison exercise. Reprinted from reference [50].

Compound	Concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$ of soil)						
	Headspace SPME-GC-IT-MS		Soxhlet extraction		Intercomparison exercise		
	Mean ¹	S.D. ¹	Mean ²	S.D. ²	N. of results	Mean	S.D.
1,2,3-Trichlorobenzene	0.591	0.032	0.639	0.052	9	0.623	0.064
1,2,3,4-Tetrachlorobenzene	1.557	0.055	1.703	0.135	10	1.517	0.251
Pentachlorobenzene	1.420	0.069	1.588	0.080	11	1.326	0.272

¹ n = 3² n = 5

CONCLUSIONS

To date, solid-phase microextraction has been presented as a very promising extraction technique allowing the determination of a great variety of organic pollutants at trace levels from a wide range of environmental matrices. Soils, sludge, water and air can be successfully analyzed using SPME both direct and headspace extraction. Field analyses can also be achieved by using this extraction technique but this modification of SPME is actually under development.

SPME can be easily coupled to gas chromatography (GC) and, with the use of interfaces, to high resolution liquid chromatography (HPLC). Furthermore, more recent developments have allowed the full automation of the SPME process coupled both these two separation techniques.

The introduction of new SPME fibers that extend the range of application of this technique to other classes of analytes such as inorganic compounds, as

well as the development of new SPME automated devices with more advanced features can show SPME as a good alternative technique in order to more conventional extraction techniques.

REFERENCES

- [1] J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*, Wiley-VCH Inc., New York, 1997.
- [2] D. Barceló, *J. Chromatogr.*, 643 (1993) 117.
- [3] N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull, *Trends Anal. Chem.*, 17(6) (1998) 384.
- [4] C. Aguilar, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, 771 (1997) 221.
- [5] B. Zygmunt, *J. High Resol. Chromatogr.*, 20 (1997) 482.
- [6] M.R. Lee, J.S. Lee, W.S. Hsiang, C.M. Chen, *J. Chromatogr. A*, 775 (1997) 267.
- [7] K. Jinno, T. Muramatsu, Y. Saito, Y. Kiso, S. Magdic, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A*, 754 (1996) 137.
- [8] H. Daimon, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 34 (1997) 365.
- [9] R. Eisert, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 3140.
- [10] A.A. Boyd-Boland, J.B. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 1521.
- [11] S. Li, S.G. Weber, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 1217.
- [12] C.W. Whang, J. Pawliszyn, *Anal. Commun.*, 35 (1998) 353.
- [13] R. Eisert, K. Levsen, *J. Chromatogr. A*, 737 (1996) 59.
- [14] R. Eisert, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A*, 776 (1997) 293.
- [15] R.E. Shirey, *On-site field sampling of pesticides using solid phase microextraction*, Presented at the Residual Pesticide Workshop, St. Petersburg, FL, July 1997.
- [16] Application note 143, Supelco.
- [17] J. Pörschmann, F.D. Kopinke, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A*, 816 (1998) 159.

- [18] A. Paschke, P. Popp, G. Schüürmann, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 360 (1998) 52.
- [19] I. Valor, J.C. Moltó, D. Apraiz, G. Font, *J. Chromatogr. A*, 767 (1997) 195.
- [20] V. López-Ávila, R. Young, W.F. Beckert, *J. High Resol. Chromatogr.*, 20 (1997) 487.
- [21] G.P. Jackson, A.R.J. Andrews, *Analyst*, 123 (1998) 1085.
- [22] B.D. Page, G. Lacroix, *J. Chromatogr. A*, 757 (1997) 173.
- [23] C. Aguilar, S. Peñalver, E. Pocerull, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, 795 (1997) 105.
- [24] M. R. Lee, R.J. Lee, Y.W. Lin, C.M. Chen, B.H. Huang, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 1963.
- [25] J. Dugay, C. Miège, M.C. Hennion, *J. Chromatogr. A*, 795 (1998) 27.
- [26] R. Eisert, K. Levsen, *Am. Soc. Mass Spectrom.*, 6 (1995) 1119.
- [27] Z. Zhang, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 34.
- [28] M.R. Lee, Y.C. Yeh, W.S. Hsiang, B.H. Hwang, *J. Chromatogr. A*, 806 (1998) 317.
- [29] P. Barták, L. Cap, *J. Chromatogr. A*, 767 (1997) 171.
- [30] M. Moder, S. Schrader, U. Franck, P. Popp, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 357 (1997) 326.
- [31] K.D. Buchholz, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 160.
- [32] Y. Yang, D.J. Miller, S.B. Hawthorne, *J. Chromatogr. A*, 800 (1998) 257.
- [32] Y. Yang, S.B. Hawthorne, D.J. Miller, Y. Liu, M.L. Lee, *Anal. Chem.*, 70(9) (1998) 1866.
- [34] M.R. Negro, M.F. Alpendurada, *J. Chromatogr. A*, 823 (1998) 221.
- [35] T. Górecki, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 3008.
- [36] P. Popp, A. Paschke, *Chromatographia*, 46 (1997) 419.
- [37] H. Prosen, *TrAC*, 18(4) (1999) 272.
- [38] F. Magnani, R. Cenciarini, *Chromatographia*, 41 (1995) 678.
- [39] Y. Liu, M.L. Lee, K.J. Hageman, Y. Yang, S.B. Hawthorne, *Anal.*

- Chem., 69 (1997) 5001.
- [40] I. Valor, C. Cortada, J.C. Moltó, J. High Resol. Chromatogr., 472 (1996) 472.
- [41] F.J. Santos, M.T. Galcerán, D. Fraisse, J. Chromatogr. A, 742 (1996) 181.
- [42] T. Nilsson, F. Pelusio, L. Montanarella, B. Larsen, S. Facchetti, J.O. Madsen, J. High Resol. Chromatogr., 18 (1995) 617.
- [43] M. Chai, J. Pawliszyn, Environ. Sci. Technol., 29 (1995) 693.
- [44] R. Shirey, V. Mani, M. Butler, The Reporter, Supelco Bulletin 14(5) (1995) 4.
- [45] L. Pan, J. Pawliszyn, Anal. Chem., 69 (1997) 196.
- [46] L. Pan, M.A. Adams, J. Pawliszyn, Anal. Chem., 67 (1995) 4396.
- [47] H.L. Lord, J. Pawliszyn, LC-GC Intl., May (1998) S41.
- [48] P.A. Martos, J. Pawliszyn, Anal. Chem., 70 (1998) 2311.
- [49] J. Namiesnik, D. Gorlo, L. Wolska, B. Zygmunt, Analusis, 26 (1998) 170.
- [50] P.A. Martos, A. Saraullo, J. Pawliszyn, Anal. Chem., 69(3) (1997) 402.
- [51] F.J. Santos, M.N. Sarrión, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A, 771 (1997) 181.
- [52] A. Fromberg, T. Nilsson, B. Richter Larsen, L. Montanarella, S. Facchetti, J.O. Madsen, J. Chromatogr. A, 746 (1996) 71.

CAPÍTULO II

ESTADO ACTUAL DE LA CUESTIÓN

En el capítulo anterior se ha presentado el estudio bibliográfico sobre la microextracción en fase sólida que se realizó al inicio de la presente Tesis Doctoral. En este capítulo, se presenta una revisión actualizada del estado de la investigación para esta técnica de preconcentración y sus variantes (*in-tube SPME*, extracción por sorción con barras magnéticas agitadoras) así como sus aplicaciones más recientes en el campo del análisis medioambiental.

La SPME hasta la fecha ha sido aplicada en diferentes ámbitos de la Química Analítica tanto en el campo del análisis medioambiental como en el análisis alimentario, clínico, etc. [1,2]. Como ejemplo, en la Figura 15 se muestra una clasificación de las publicaciones en revistas científicas internacionales referentes a la SPME desde sus inicios hasta julio de 2002 en función del campo de aplicación [3].

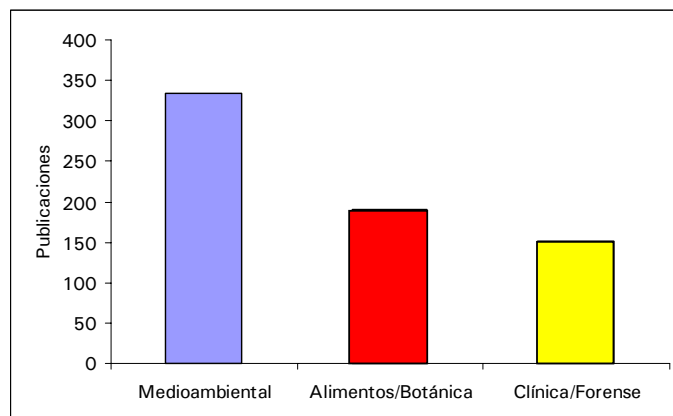


Figura 15. Clasificación por campos de aplicación de las publicaciones relacionadas con la SPME [3].

En los últimos años, se han publicado algunas revisiones bibliográficas en las que se resume el estado de la investigación y las aplicaciones de esta técnica en diferentes campos como en el análisis biomédico [4] y alimentario [5], o para la extracción de determinados compuestos como plaguicidas [6]

o medicamentos en matrices biológicas [7,8]. Sin embargo, el uso más extendido de la SPME, como se puede observar en la Figura 15, sigue siendo como técnica de preconcentración para el análisis medioambiental [6,9-11].

Otras aplicaciones más puntuales de la SPME son aquellas en las que se utiliza como técnica analítica para llevar a cabo determinaciones físico-químicas [12-17]. Como ejemplo, se puede mencionar el trabajo de Lützhof *et al.* [12] en el que la SPME se usa para determinar la influencia del pH en la concentración libre de un grupo de quinolonas en muestras acuosas. Estos compuestos tienen tendencia a quedar retenidos en la materia orgánica disuelta (DOC) que está presente en el agua (principalmente ácidos húmicos y fúlvicos) de manera que el grado de interacción depende del pH del agua. La mayoría de estos trabajos se basan en el hecho de que la SPME extrae una cantidad muy pequeña de analito por lo que no se altera el equilibrio entre los analitos y la matriz (DOC, proteínas, etc.) [12,14]. Otro trabajo en esta línea es el de Treves *et al.* [13]. Estos autores utilizan la SPME para estimar los coeficientes octanol-aire (K_{ow}) de un grupo de hidroxialquil nitratos y comparan los valores obtenidos con los que se encuentran en la bibliografía.

También se han estudiado los mecanismos de fotodegradación de algunos compuestos mediante SPME [18-20]. Como ejemplo, se pueden mencionar los trabajos de Lores *et al.* [18,19]. Estos autores han estudiado la cinética de la fotodegradación de un grupo de bifenilos policlorados [18] y del p,p'-DDT y o,p'-DDT [19] utilizando la SPME. Así, en el estudio de la cinética de degradación del p,p'- y o,p'-DDT, la fibra de PDMS que contiene los analitos de interés es expuesta a radiación ultravioleta (254 nm) durante diferentes intervalos de tiempo (de 2 a 60 min.) y a continuación introducida en el inyector del GC-MS para la desorción de los analitos y sus posibles productos de degradación, de forma que se han identificado los diferentes productos de degradación del DDT así como la cinética de la degradación de los dos congéneres del DDT. Los resultados obtenidos por estos autores han

mostrado que la SPME es una técnica útil para la monitorización de los diferentes caminos de degradación de estos compuestos en aguas y para la determinación de los productos de degradación resultantes. Otro trabajo en esta línea es el de Nilsson *et al.* [20] que también ha mostrado que la SPME es una buena alternativa a la LLE en la determinación de los caminos de degradación catalizados por TiO₂ de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) en aguas de diferentes procedencias.

A continuación en este apartado se comentan algunos de los trabajos más recientes que utilizan la SPME como técnica de preconcentración y que están relacionados principalmente con el análisis medioambiental. En primer lugar se comentarán las aplicaciones más actuales en las que la innovación principal es el tipo de recubrimiento de las fibras de SPME y después las diferentes aplicaciones de la SPME combinada con la GC y HPLC, así como *in-tube* SPME y la extracción por sorción con barras magnéticas agitadoras.

II.1. FIBRAS DE SPME

Como se ha comentado en el apartado I.1.3, actualmente están disponibles comercialmente siete tipos diferentes de recubrimientos para las fibras de SPME: PDMS con tres espesores diferentes (7, 30 y 100 μm), 85 μm PA, 65 μm PDMS/DVB, 75 μm CAR/PDMS, 65 μm CW/DVB, 50 μm CW/TPR y 50/30 μm DVB/CAR/PDMS. En la Figura 16 se muestra la estructura química de algunos de ellos [2].

Estas fibras cubren un amplio conjunto de compuestos y son las utilizadas en la mayoría de las aplicaciones de la SPME. No obstante, en algunos casos la interacción entre los analitos y las fibras comerciales no es muy elevada o bien aparecen problemas de contaminación debidos al proceso de fabricación así como problemas de repetibilidad entre las fibras [21,22]. Otro inconveniente de las fibras comerciales es su limitado uso en HPLC ya que muchas de ellas no son estables en presencia de disolventes orgánicos

fuertes [1,23]. Esto ha llevado a algunos autores a desarrollar nuevas fibras con el objetivo de obtener mejores resultados en la determinación de algunos analitos o para el análisis de un determinado tipo de muestras [24,25].

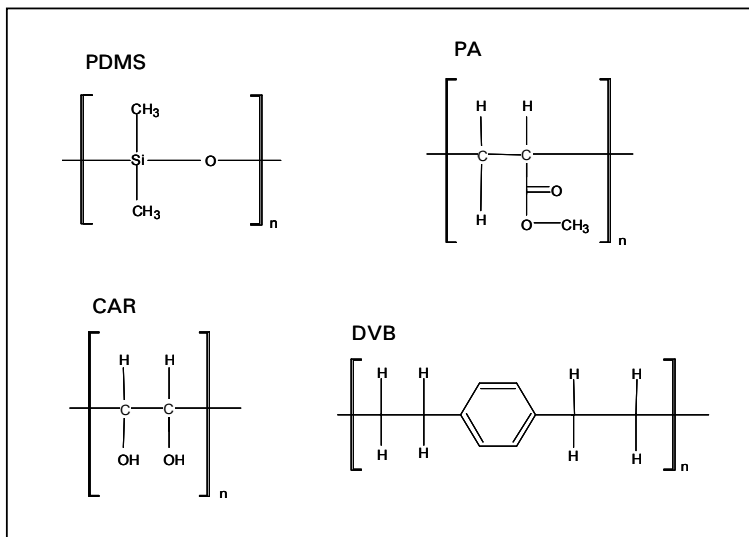


Figura 16. Estructura química de algunos de los recubrimientos comerciales para las fibras de SPME [2].

Por ejemplo, recientemente se han desarrollado fibras recubiertas de materiales de acceso restringido (RAM) como alquil-diol-sílice (ADS) [26]. Este tipo de material se caracteriza por ser poroso por lo que sólo quedan retenidos los compuestos de bajo peso molecular de forma que se evita que los compuestos de elevado peso molecular como proteínas o ácidos húmicos, que pueden estar presentes en la matriz de la muestra, interfieran en la extracción de los analitos de interés y/o disminuyan la vida de la fibra. En este caso, las fibras recubiertas de RAM han sido aplicadas a la determinación de benzodiazepinas en fluidos biológicos pero también pueden ser utilizadas en el campo del análisis medioambiental ya que este tipo de material ya ha sido utilizado en SPE para la preconcentración de

contaminantes orgánicos en aguas que presentaban interferencias de matriz importantes [27].

Otro tipo de fibra, recientemente desarrollada por Xiao *et al.*, es la de 33 μm de polisilicona fulereno, C_{60} (PF) [28]. Los autores de este trabajo han aplicado estas fibras para la determinación de un grupo de PAHs y compuestos de la familia del naftaleno y las han comparado con las fibras de 100 μm PDMS ya que estas dos fibras presentan polaridades similares. Según los resultados obtenidos en este estudio, las fibras de PF presentan una mayor estabilidad térmica, una mejor reproducibilidad ($\text{RSD} < 4\%$) y tienen una vida media más larga (150 análisis sin pérdida de sus propiedades) que las fibras de PDMS. Además tienen una afinidad muy elevada por las moléculas planas como los PAHs. No obstante, el estudio realizado por estos autores sólo está aplicado a muestras de agua desionizada y no se indica el comportamiento de las fibras de PF en la extracción de muestras reales de agua que pueden presentar problemas por el efecto de la matriz.

Uno de los procedimientos para preparar fibras de SPME es el llamado método *sol-gel* [1,24,29]. Con este método, el recubrimiento se crea en la superficie externa de una fibra de sílice fundida introduciéndola en una solución (*sol solution*) que contiene un precursor alcóxido, un polímero *sol-gel* con una terminación hidroxilo activa y un reactivo de derivatización en superficie, disueltos en un disolvente adecuado. En la Figura 17 se muestra un ejemplo de las reacciones químicas implicadas en este método para la síntesis de un recubrimiento de PDMS para fibras de SPME [1]. Los recubrimientos sintetizados con este procedimiento se caracterizan por presentar una estructura porosa y estar químicamente ligados a la superficie de la fibra.

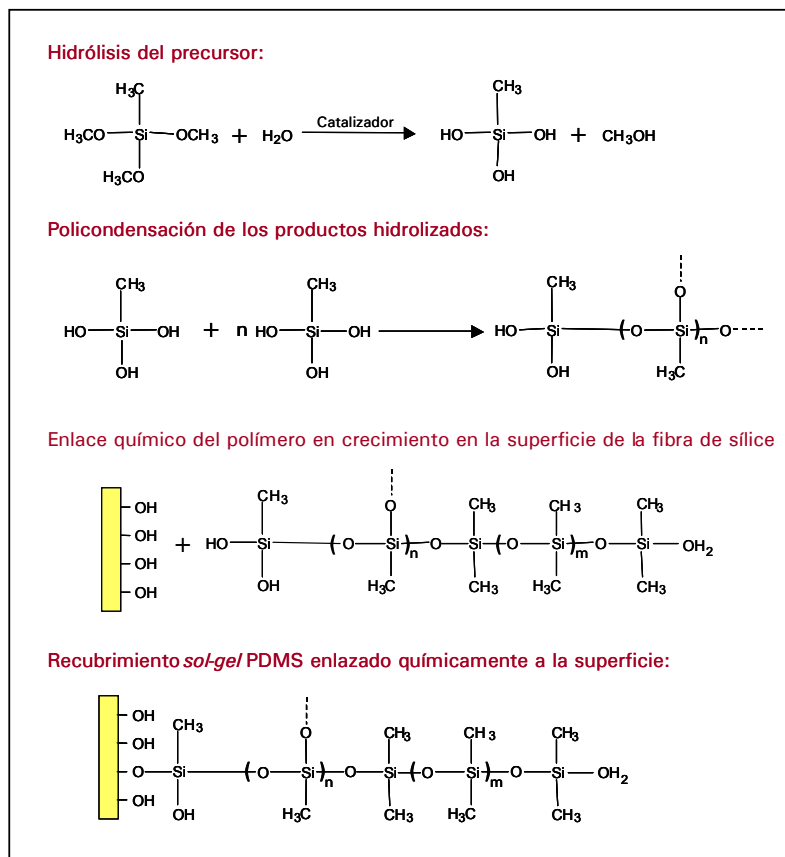


Figura 17. Reacciones químicas implicadas en la síntesis de un recubrimiento de PDMS para fibras de SPME por el método *sol-gel* [1,24].

Así, por este método, Gbatu *et al.* [30] han sintetizado fibras de *n*-octiltrietoxisilano (C_8 -TEOS) para la determinación de un grupo de compuestos organometálicos (arsénico, mercurio y estaño) mediante SPME-HPLC. Las fibras C_8 -TEOS sintetizadas por estos autores han proporcionado límites de detección iguales o mejores que los conseguidos con las fibras comerciales y, a diferencia de éstas, son estables en disolventes orgánicos (no miscibles con el agua y clorados) y a pHs muy ácidos ($\text{pH} \sim 0.3$) y muy básicos ($\text{pH} \sim 13$). Otros ejemplos de fibras que han sido sintetizadas

mediante el método *sol-gel* son las de PDMS [24,31], éter-corona [32,33], polietilenglicol [34] y carbón [35].

Un polímero que también ha sido utilizado como recubrimiento para fibras de SPME y que ha sido desarrollado para intentar ampliar el campo de aplicación de la SPME a la determinación de especies inorgánicas aniónicas (cloruros, fluoruros y bromatos, entre otros aniones), es el polipirrol (PPY) [36]. En este caso, el PPY ha sido directamente depositado sobre la superficie de un alambre mediante polimerización electroquímica. Otro tipo de recubrimiento que se ha evaluado en SPME para la preconcentración de especies inorgánicas, es el poli(3-metiltiofeno) para la determinación de arsenito, arseniato y una serie de compuestos organometálicos de arsénico en aguas [37].

Además de los recubrimientos mencionados anteriormente, también se han desarrollado fibras de BSP3 (combinación de grupos hexafluorobisfenol unidos por puente de hidrógeno con segmentos de oligo(dimetilsiloxano) que es un polímero selectivo para la determinación de sarín en aire (GB) [38], fibras de carbón para la determinación de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) en aire [39], BTEX [40] y PAHs [41] en aguas, hidrocarburos lineales en suelos [42] y surfactantes alquilfenol etoxilatos (APEs) en aguas [43], y las fibras de C₈ para la determinación de BTEX, plaguicidas, PCBs y cloro- y bromobencenos [44]. La mayoría de estas fibras, sin embargo, generalmente se sintetizan depositando las fases estacionarias sobre una base de sílice fundida lo que hace que su estabilidad térmica y química no sea muy elevada, a diferencia de las fibras sintetizadas por el método *sol-gel* [32].

Otro tipo de sorbentes que han sido estudiados en SPME son los polímeros de inmunoafinidad [45] y los de huella molecular (MIPs) [46]. Hasta ahora existen muy pocos estudios que hayan utilizado este tipo de polímeros como recubrimientos para fibras de SPME y además sólo han sido aplicados para el análisis de muestras biológicas. No obstante, debido a su elevada

selectividad y a su probada eficacia como sorbentes en SPE [47,48], este tipo de recubrimientos puede ser una buena alternativa a las fibras comerciales cuando se desea obtener una elevada selectividad. Como ejemplo de polímero de inmunoafinidad se puede mencionar el que ha sido sintetizado por Yuan *et al.* [45] y que ha sido inmovilizado sobre la superficie de una fibra de sílice fundida y usado para la extracción selectiva de teofilina en suero.

Koster *et al.* [46], en cambio, han desarrollado fibras recubiertas de MIP para la extracción selectiva de clenbuterol en muestras de orina humana mediante SPME-HPLC con detección electroquímica (ED) y han conseguido que la preparación de las fibras-MIP así como la extracción de los analitos sean reproducibles. Estas fibras-MIP han sido capaces de extraer cinco análogos estructurales del clenbuterol por lo que los autores de este estudio han sugerido que probablemente los grupos alcohol y amina presentes en todos estos compuestos son los responsables de la interacción con el MIP. El acoplamiento de la SPME con la HPLC en este estudio se ha realizado fuera de línea y únicamente 20 μl de los 200 μl de la solución de desorción (metanol con 1% de ácido acético) han sido inyectados en el cromatógrafo de líquidos. En consecuencia, los límites de detección obtenidos no son muy bajos ($\sim 10 \mu\text{g l}^{-1}$) a pesar de utilizar un detector electroquímico. Al analizar muestras reales los autores han introducido una etapa de limpieza con 200 μl de acetonitrilo entre las etapas de extracción y desorción con el fin de eliminar las interferencias provenientes de la matriz. Esta etapa, sin embargo, produce una disminución de las recuperaciones de los analitos de interés.

Un estudio ligeramente diferente y que también ha sido desarrollado recientemente por Xia *et al.* [49] ha consistido en la utilización de más de una fibra de SPME en la etapa de extracción de forma que tanto la capacidad como la velocidad de extracción se vean incrementadas. Para ello han utilizado fibras de sílice porosa (C_{18}) ya que algunos estudios previos desarrollados por otros autores [50] habían indicado que este tipo de

polímero podía llegar a proporcionar 8 veces más cantidad de analito extraída que las fibras comerciales de 100 μm PDMS. Así, un total de 15 fibras de C_{18} de 2 cm de longitud han sido unidas al extremo de un tubo de acero inoxidable que posteriormente ha sido insertado en el dispositivo comercial de SPME, ligeramente modificado para este trabajo. Este conjunto de 15 fibras ha sido utilizado para la determinación de un grupo de plaguicidas en muestras de agua de manera que se ha obtenido una mayor capacidad y velocidad de extracción así como una interacción más fuerte entre los analitos y el sistema de multifibras que si se utiliza el modo convencional de extracción con una sola fibra. La velocidad de extracción es 10 veces superior a la de las fibras de 100 μm PDMS pero aún así los tiempos necesarios para llegar al estado de equilibrio indicaron que la difusión del analito en la fase estacionaria porosa no es el factor con mayor influencia en el proceso sino la zona estática que se crea alrededor de la superficie de las fibras durante la extracción de los analitos de muestras acuosas.

II.2. SPME-GC

Como se ha comentado anteriormente, la SPME fue inicialmente diseñada para su uso junto con la GC, ya que el acoplamiento SPME-GC es muy sencillo y no es necesario hacer ninguna modificación especial en el cromatógrafo de gases. En consecuencia, como ya se había indicado en la revisión bibliográfica realizada al inicio de la presente Tesis Doctoral, en la mayoría de las aplicaciones de la SPME enfocadas al análisis medioambiental, la etapa de desorción se realiza térmicamente en un GC [1]. Así, por ejemplo, en un estudio bibliográfico sobre SPME realizado por Alpendurada [51] y publicado en el año 2000 se indica que sólo en un 5% de la totalidad de aplicaciones, la SPME se combina con la HPLC.

La SPME combinada con la GC ha sido utilizada para la determinación de muchas clases de contaminantes medioambientales, como por ejemplo,

compuestos orgánicos volátiles (VOCs) [52-54], PAHs [55-57], plaguicidas [58-61], bifenilos policlorados [62], aminas aromáticas [31,63,64], ácidos carboxílicos [65,66], fenoles [67-69], etc. y en diferentes tipos de muestras medioambientales como aire [52,53,55], aguas de diferentes procedencias [53,54,56-59,61-66,68] y suelos [53,57,60,67-69]. En la Tabla 4 se muestra una recopilación de diferentes familias de contaminantes para las que se ha utilizado más recientemente el acoplamiento SPME-GC. A continuación se comentarán algunos de los casos más representativos en los que se utiliza la SPME para la extracción de alguno de estos compuestos, así como las principales innovaciones en SPME-GC respecto al estudio bibliográfico presentado en el capítulo anterior.

Tabla 4. Aplicaciones de la SPME para la determinación de contaminantes en muestras medioambientales.

Compuestos	Matrices	Referencias
Ácidos carboxílicos	Agua	65,66,70,71
Ácidos haloacéticos	Agua	72
Alcoholes	Agua	73,74
Aldehídos	Agua	74,75
Alquilfenoles	Agua	42,76
Amidas	Agua	61
Aminas aromáticas	Agua	31,63,64
Aniones	Agua	35
Bifenilos policlorados (PCBs)	Agua, Suelos	43,62,77,78
BTEX	Agua, Suelos	39,43,79,80
Cetonas	Agua	74
Compuestos organometálicos	Suelos	36,81-83
Explosivos	Agua	84
Fenoles y clorofenoles	Agua, Suelos	43,67-69,85-90
Ftalatos	Agua	91,92
Halobencenos	Agua, Suelo	43,79,93,94
Haloéteres	Agua	73,95,96
Hidrocarburos	Suelos	41,74,97,98
PAHs	Agua, Aire, Suelos	27,40,55-57,99
Plaguicidas	Agua, Suelos	43,49,58-61,100-123
VOCs	Agua, Aire	38,52-54,124,125

Como se puede ver por el número de referencias en la Tabla 4, una de las familias de contaminantes medioambientales para la que se han desarrollado más métodos basados en SPME-GC son los plaguicidas ya que éstos son unos de los compuestos que presentan más problemas de contaminación medioambiental y a que también existen muchos compuestos de diferentes familias que se utilizan como plaguicidas. Éstos han sido determinados tanto en aguas [58,59,61,100-105] como en suelos [60,101,106,107] y plantas [60,126,127] y, si bien en la mayoría de los métodos desarrollados para la determinación de plaguicidas en los primeros años de introducción de la SPME, se utilizaban fibras de PDMS [103,105,107,126,127] y PA [100,104], con el paso del tiempo, las fibras de recubrimientos mixtos y que tienen una naturaleza bipolar como las de PDMS/DVB o CW/DVB han mostrado una mayor eficacia para la determinación de familias concretas de plaguicidas [61,62,101,106] o para el desarrollo de métodos analíticos que tienen como objetivo la determinación de muchos plaguicidas de diferentes características simultáneamente [58,62,102].

Así, por ejemplo, Gonçalves *et al.* [58] han desarrollado un método analítico mediante SPME-GC utilizando dos detectores específicos como el detector de captura electrónica (ECD) y la detección termoiónica selectiva (TSD), que ha permitido la determinación de un grupo de 36 plaguicidas de diferentes familias (organoclorados, organofosforados, piretroides y triazinas) en muestras de agua. Estos autores han evaluado seis fibras comerciales y la que ha proporcionado mejores resultados globalmente ha sido la de 60 μm PDMS/DVB. Los límites de detección obtenidos por este método han estado entre 1-50 ng l^{-1} , lo que ha permitido la determinación de estos compuestos por debajo de las concentraciones reguladas por las normativas.

Otro trabajo interesante es el realizado por Tomkins *et al.* [59]. Estos autores han estudiado la aplicación de la SPME-GC-ECD para la determinación de un grupo de 19 plaguicidas organoclorados en muestras de agua subterránea. La fibra que han utilizado es la de 30 μm PDMS ya que es la que ha proporcionado mejores resultados comparándola con otras fibras

comerciales, con límites de detección entre 11 y 47 ng l⁻¹. Además, los resultados obtenidos al analizar una muestra de agua subterránea real fortificada con los compuestos estudiados han sido comparados con los que han obtenido otros laboratorios para la misma muestra con otros métodos analíticos. Estos resultados han demostrado que la SPME puede ser utilizada para la determinación de este grupo de plaguicidas organoclorados proporcionando resultados comparables a los obtenidos por métodos más tradicionales, que precisan una mayor cantidad de muestra y que son más laboriosos. Sin embargo, el método desarrollado por estos autores presenta como limitación más importante que sólo puede ser aplicado para muestras de agua muy limpias.

Algunos grupos de plaguicidas no pueden ser determinados directamente mediante GC ya sea porque se degradan a temperaturas elevadas o porque su volatilidad es muy baja. Así, en algunos estudios, se incluyen en los métodos analíticos etapas de derivatización de los plaguicidas [104,108,115] como en el trabajo desarrollado por Lee *et al.* [104] en el que se ha determinado un grupo de herbicidas fenoxiácidos derivatizándolos una vez extraídos por la fibra con diazometano; o el trabajo de Henriksen *et al.* [108] en el que se ha determinado una familia de plaguicidas ácidos en aguas derivatizándolos previamente a la extracción con butilcloroformiato (BuCF). El inconveniente principal en el trabajo desarrollado por Lee *et al.* se encuentra en la etapa de derivatización ya que la fibra que contiene los analitos se debe introducir en un *kit* de derivatización en el que se genera diazometano a partir de 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina (MNNG) que es un compuesto carcinogénico y mutágeno. En consecuencia, la etapa de derivatización debe llevarse a cabo con muchas precauciones. Además, en el método SPME-GC-MS desarrollado por estos autores se observa también que la presencia de ácidos húmicos en la muestra reduce de forma considerable la eficacia de la extracción por lo que los límites de detección se ven incrementados al analizar muestras reales con contenidos elevados de ácidos húmicos.

Otro grupo de compuestos para los que se han desarrollado bastantes métodos basados en la SPME-GC son los fenoles [85-90]. Algunos de estos compuestos, presentan una polaridad que dificulta su determinación directa mediante GC por lo que en muchos de los métodos desarrollados se incluye una etapa de derivatización previa para transformar los fenoles en compuestos más volátiles para llevar a cabo la separación mediante GC [86,88,89]. Las fibras más extensamente usadas en SPME para estos compuestos son las de PA ya que la polaridad que presentan las hacen muy adecuadas para la extracción de los fenoles [86-88,90]. En algunos trabajos se han utilizado puntualmente otras fibras como las de PDMS [85,89]. Además, en algunos estudios, la extracción del espacio de cabeza, tanto en muestras de agua [85,88] como de suelos [86,89], proporcionó mejores resultados que la inmersión directa.

Como ejemplo de aplicación de la SPME para la determinación de fenoles se encuentra el estudio realizado por Wennrich *et al.* [90] que han combinado la extracción acelerada con solvente (ASE), *Accelerated Solvent Extraction*, con la SPME y a continuación han llevado a cabo la separación y detección mediante GC-MS para la determinación de un grupo de clorofenoles en suelos. Así, muestras de 10 g de suelo han sido extraídas (agua o agua con 3% de modificador orgánico) mediante ASE a un volumen de 13 ml del que se han utilizado únicamente 3 ml para llevar a cabo la extracción con SPME. Los resultados de este trabajo han indicado que la combinación de ASE-SPME es un método muy selectivo para la determinación de clorofenoles en suelos que ha permitido obtener límites de detección que oscilan entre 1.1 y 6.7 $\mu\text{g Kg}^{-1}$.

II.2.1. SPME media ponderada en el tiempo

Además de las aplicaciones de la SPME en las que se determinan las concentraciones de diferentes analitos en una muestra en un momento determinado, también es posible utilizar la SPME para realizar análisis a lo

largo del tiempo [1]. Esta variante de la SPME, que se ha denominado SPME media ponderada en el tiempo o *Time-Weighted Average Sampling* SPME (TWA-SPME), es relativamente reciente y ha sido aplicada al análisis de compuestos en muestras de aire mediante SPME-GC [128-132]. El principio de funcionamiento de la TWA-SPME consiste en que la fase estacionaria (recubrimiento de la fibra) no se expone directamente a la muestra (aire) sino que permanece retraída en el interior de la aguja del dispositivo de SPME [1]. De esta manera, la extracción de los analitos se produce por difusión a través de la fase estática que se forma en el interior de la aguja y se establece un perfil lineal decreciente de concentración de analito, tal como se muestra en la Figura 18.

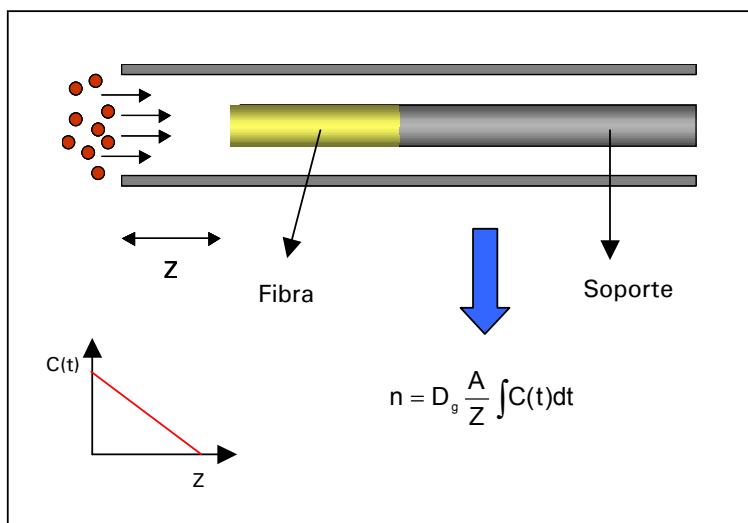


Figura 18. *Time-Weighted Average* SPME. (n , cantidad de analito extraída; D_g , coeficiente de difusión de los analitos en la fase gaseosa; A , superficie de la sección transversal de la aguja; Z , distancia de la fibra al final de la aguja; y $C(t)$ concentración de analito en la entrada de la aguja).

Los fundamentos teóricos de la TWA-SPME han sido desarrollados en la bibliografía y la ecuación fundamental se muestra en la Figura 18 [128]. En ella se puede observar que la respuesta de los analitos es proporcional a la

integral de la concentración de analito a lo largo del tiempo (A , Z y D_0 son constantes).

Esta variante de la SPME no se basa en la realización de medidas de concentración en el equilibrio y además, se debe tener en cuenta que la ecuación presentada anteriormente sólo es válida en las situaciones en las que la cantidad de analito extraída (n) es muy pequeña en comparación con la cantidad extraída en el equilibrio. De esta manera, se puede asumir que la concentración de analito a la altura de la fibra es cero (a medida que los analitos llegan a la fibra son extraídos) y que, en consecuencia, la velocidad de extracción de los analitos por la fibra no está afectada por la cantidad de analito ya extraída [128].

Para poder determinar concentraciones desconocidas, inicialmente se debe calibrar el dispositivo de SPME para cada analito. Una de las ventajas que presenta la TWA-SPME es la posibilidad de utilizarse en un amplio intervalo de concentraciones o a tiempos de muestreo elevados usando diferentes estrategias, como alejar más la fibra del final de la aguja (aumentar Z), disminuir el diámetro de la aguja en la entrada (disminuir A) o utilizar un sorbente con mayor capacidad [1]. El aumento de la capacidad del sorbente se puede realizar utilizando fibras de mayores dimensiones [1] o reactivos derivatizantes [129,130,132].

La TWA-SPME ha sido únicamente aplicada, por ahora, al análisis de muestras de aire pero, en principio, también puede aplicarse a muestras de agua. Así, se ha utilizado para la determinación de hidrocarburos [131], isocianatos [129], *n*-valeraldehído [130] y formaldehído [132]. En alguno de estos trabajos se ha modificado ligeramente el dispositivo de SPME o se ha utilizado otro dispositivo especial para poder usarlo para el análisis de campo o como muestreador personal [130,132]. Por ejemplo, Tsai *et al.* [130], fijaron las fibras de SPME en el interior de un tubo de politetrafluoroetileno (PTFE) con un séptum y sellaron el tubo con tapones de forma que sólo se abría el extremo en el que se encontraba la fibra expuesta en el momento

del muestreo. Este dispositivo de TWA-SPME se utilizó para la determinación de valeraldehído en muestras de aire con fibras de PDMS/DVB que, previamente a la extracción del analito, se habían expuesto a hidrócloruro de *o*-2,3,4,5,6-(pentafluorobencil) hidroxilamina (PFBHA) para llevar a cabo la derivatización en la fibra del valeraldehído.

II.2.2. Automatización en SPME-GC

El desarrollo de métodos automáticos de análisis es una de las tendencias actuales que presenta un mayor interés en la Química Analítica ya que permite reducir costes, aumentar el número de muestras procesadas y la precisión del método [1,133]. Sin embargo, la automatización de todo el proceso de SPME aún no está muy desarrollada y utilizando fibras como medio de extracción, ésta sólo se ha llevado a cabo cuando la SPME se combina con la GC. La interfase comercial o las desarrolladas por algunos autores para el acoplamiento de la SPME con la HPLC dificultan en gran medida la automatización de todo el proceso.

En lo que respecta a SPME-GC, a pesar de que en principio la automatización es mucho más sencilla, todavía no existen muchos estudios en los que se haya utilizado [133-136]. En el caso de SPME-HPLC, la aparición de la *in-tube* SPME ha permitido el desarrollo de métodos totalmente automatizados y actualmente se presenta como la alternativa más viable para la automatización de la SPME junto con la HPLC. Posteriormente en este capítulo, se comentará más detalladamente el estado de la investigación en *in-tube* SPME.

Como ya se ha comentado en el estudio bibliográfico realizado al inicio de la presente Tesis Doctoral, hace unos años Varian comercializó un equipo de GC que permitía la automatización de la SPME-GC utilizando un automuestreador ligeramente modificado. Sin embargo, su diseño no permitía el calentamiento de la muestra (la extracción debía realizarse a

temperatura ambiente) y además el sistema de agitación que utilizaba consistía en la vibración de la fibra en el interior del vial que contenía la muestra [1,137]. En consecuencia, aunque este sistema proporcionó buenos resultados en los casos en los que la agitación y la temperatura de la etapa de extracción no fueran factores muy importantes, su uso no estuvo muy extendido y se desarrollaron pocas aplicaciones [1,136,138,139]. Para la aplicación de este sistema automático se debe utilizar un dispositivo de SPME adaptado para ello, que también está comercializado por Supelco. Por ejemplo, Wenner *et al.* [135] aplicaron este sistema automático SPME-GC-AED a la determinación del plaguicida metazacloro en aguas residuales. En este trabajo las muestras de agua son previamente diluidas 1:100 con una solución al 10% de NaCl para reducir las interferencias de la matriz por lo que, aunque estos autores no indican los límites de detección obtenidos para el compuesto estudiado, en principio el método desarrollado sólo se puede utilizar para la determinación de concentraciones elevadas de este compuesto (del orden de mg l^{-1}). En este estudio tampoco se indica cual es la repetibilidad y la reproducibilidad del método por lo que, en principio, estos autores no han demostrado si la utilización de un método automático de SPME sirve para aumentar la precisión del método.

Otro sistema automático que ha sido estudiado ha consistido en una celda de flujo por la que se pasa la solución de la muestra impulsada con la ayuda de una bomba de HPLC mientras permanece la fibra dentro de la celda. Este sistema está conectado al automuestreador de SPME de manera que una vez extraídos los analitos, la fibra es automáticamente introducida en el inyector del cromatógrafo de gases donde se produce la desorción de los mismos [133].

Recientemente, se ha diseñado un sistema robotizado que permite la automatización de todo el proceso SPME-GC (extracción y desorción) que utiliza un muestreador automático CombiPal™ conectado al cromatógrafo de gases y que ha sido adaptado para poder incorporar el dispositivo de SPME [5,140]. Este sistema se caracteriza por presentar una gran flexibilidad en la

programación de los análisis de SPME. Además, otras diferencias que presenta frente al comentado anteriormente son la posibilidad de agitación del vial (y no de la fibra), y el calentamiento de la muestra durante la extracción [5,140]. Estos cambios, respecto al anterior sistema automático, permiten un mayor control de todo el proceso por lo que es de esperar que se obtengan mejores resultados [136]. Este sistema ha sido desarrollado muy recientemente por lo que no se han publicado todavía muchos estudios que lo apliquen. Sporkert *et al.* [136] lo han utilizado para la determinación de ácido fluoroacético en muestras biológicas (sangre, orina, etc). Para la determinación de este compuesto mediante GC se necesita introducir una etapa de derivatización con 1-pirenildiazometano. Esta etapa también ha podido ser automatizada con este sistema ya que se ha realizado la derivatización en la fibra. El límite de detección conseguido con este sistema automático SPME-GC-MS ha sido de 0.02 mg l⁻¹.

II.3. SPME-HPLC

Las ventajas que presenta la HPLC frente a la GC para la determinación de compuestos térmicamente inestables o con una baja volatilidad ha hecho que con el paso del tiempo se hayan desarrollado diferentes métodos analíticos que permitan la combinación de la SPME con la HPLC [1].

Como se ha comentado en el apartado anterior, se han desarrollado diferentes interfases SPME/HPLC con el objetivo de acoplar la SPME en línea con la HPLC y también se han realizado algunos estudios en los que la SPME se acopla fuera de línea con la HPLC. Mediante estos métodos analíticos, se han determinado diferentes grupos de compuestos como plaguicidas [141,142], explosivos [143], PAHs [144,145], ftalatos [146,147], tensoactivos [146,148,149] y aminas [150,151], entre otros. En la Tabla 5 se muestra una recopilación de aplicaciones en las que se ha utilizado el acoplamiento SPME/HPLC indicando en cada caso si éste se ha llevado a

cabo fuera de línea o en línea con el sistema cromatográfico y si la interfase utilizada ha sido la comercial o de fabricación propia.

Tabla 5. Aplicaciones de SPME-HPLC.

Compuestos	Matriz	Acoplamiento	Interfase	Límites de detección	Referencia
Ácido ciclopiazónico	Queso	<i>On-line</i>	Comercial	7 µg l ⁻¹	152
Ácido tereftálico ^a , acetato de vinilo ^b	Agua	<i>On-line</i>	Comercial	0.59 µg g ⁻¹ ^a 1.56 µg g ⁻¹ ^b	153
Aminas aromáticas	Agua	<i>On-line</i>	Comercial	0.33-2.4 µg l ⁻¹	151
Amitriptilina	Orina	<i>On-line</i>	Propia	3 µg l ⁻¹	154
Alquilbencenos sulfonados lineales (LAS)	Agua	<i>On-line</i>	Comercial	~ 0.5 ng l ⁻¹	148
Alquilfenoles etoxilatos	Agua	<i>On-line</i>	Propia	n.d.	155
Brij 59, 1-hexadecanol	Agua	<i>On-line</i>	Comercial	0.1 mg l ⁻¹	149
Clorofenoles	Agua, Madera	<i>Off-line</i>	-	3-8 ng l ⁻¹	156
Compuestos volátiles	Ajo	<i>On-line</i>	Comercial	n.d.	157
Dietilftalato (DEP)	Agua	<i>On-line</i>	Comercial	1 µg l ⁻¹	147
Esteroides	Agua, Orina	<i>On-line</i>	Comercial	n.d.	158
Explosivos	Agua	<i>On-line</i>	Propia	n.d.	143
Fenoles	Agua	<i>On-line</i>	Comercial	1-10 µg l ⁻¹	159
Ftalatos, ácidos carboxílicos, LAS	Suelos	<i>On-line</i>	Propia	n.d.	146
Hidroxiaromáticos	Agua	<i>On-line</i>	Comercial	n.d.	160
Iones metálicos	Agua	<i>On-line</i>	Propia	n.d.	150
N-metilcarbamatos	Agua	<i>On-line</i>	Comercial	0.3-1.9 µg l ⁻¹	161

(continúa)

PAHs	Agua	<i>On-line</i>	Comercial	7-22 ng l ⁻¹	145
PAHs	Agua	<i>On-line</i>	Propia	n.d.	162
PAHs	Agua	<i>Off-line</i>	-	1- 6 ng l ⁻¹	144
PAHs	Agua	<i>On-line</i>	Comercial	1-5 µg l ⁻¹	163
PAHs	Agua	<i>On-line</i>	Propia	n.d.	164
Plaguicidas (carbamatos)	Fresas	<i>On-line</i>	Comercial	10-50 µg Kg ⁻¹	142
Plaguicidas (carbamatos)	Agua	<i>On-line</i>	Propia	0.1-12 µg l ⁻¹	141
Plaguicidas (carbamatos)	Suelo	<i>On-line</i>	Propia	n.d.	165
Plaguicidas (organofosforados)	Agua	<i>Off-line</i>	-	n.d.	166
Plaguicidas (organofosforados y carbamatos)	Agua	<i>On-line</i>	Comercial	10-80 ng l ⁻¹	110
Tetraciclinas	Agua	<i>On-line</i>	Comercial	<2-40 µg l ⁻¹	167

n.d.: no determinado

Como se puede observar en la Tabla 5, en la mayoría de las aplicaciones se utiliza la interfase SPME/HPLC comercial para llevar a cabo el acoplamiento de las dos técnicas. También se han realizado algunos estudios en los que la desorción ha sido fuera de línea con el sistema cromatográfico, introduciendo la fibra con los analitos retenidos en una pequeña cantidad de solvente o mezcla de solventes orgánicos pero estas aplicaciones son muy puntuales [144,156,166]. Como ejemplo de desorción fuera de línea en SPME-HPLC se encuentra el trabajo realizado por Sarrión *et al.* [156], que han desarrollado un método analítico para la determinación de un grupo de 19 clorofenoles en muestras de agua y madera. Para llevar a cabo la desorción, la fibra ha sido introducida en 40 µL de una mezcla de agua-acetonitrilo-metanol (20:30:50, v/v) durante 5 min. a 30 °C y a continuación una alícuota de 20 µl ha sido inyectada en el cromatógrafo de líquidos conectado a un detector electroquímico. Este método ha permitido

determinar los compuestos estudiados a niveles de concentración inferiores a los dictados por la normativa pero su principal inconveniente es la poca automatización del proceso en comparación con el acoplamiento en línea SPME-HPLC utilizando una interfase para la desorción de los analitos.

En lo que respecta al acoplamiento en línea SPME-HPLC, recientemente se ha publicado un trabajo en el que se utiliza una interfase similar a la comercial pero con unas modificaciones en su diseño que permiten mejorar la sensibilidad del método [143]. La modificación realizada por Wu *et al.* consiste en el uso de una válvula de 10 vías y la introducción de una unidad de preconcentración de C_8 después de la interfase SPME-HPLC. De esta manera, en primer lugar, los analitos son desorbidos de la fibra en modo estático con una mezcla de metanol y agua (50:50) durante 2 minutos y a continuación son arrastrados con la ayuda de una bomba hacia la unidad de C_8 en la que quedan retenidos. Posteriormente los analitos son eluidos de la unidad de C_8 con la fase móvil e introducidos en la columna de HPLC. El incremento medio en la respuesta de los explosivos desorbidos mediante esta interfase respecto a las respuestas obtenidas para los mismos analitos con la interfase comercial es del 83%. Esta interfase además permitió eliminar las distorsiones de los picos que habían sido observados en algunos estudios al utilizar la interfase convencional. Uno de los inconvenientes que presenta este sistema es que los tiempos de análisis son superiores respecto a los obtenidos con la configuración habitual debido a la introducción de la unidad de C_8 en el sistema.

II.4. *IN-TUBE* SPME

La dificultad que presenta la automatización de la SPME con la HPLC ya sea utilizando la interfase comercial o las fabricadas por algunos autores hace que el analista deba intervenir en varias de las etapas del proceso [168]. En cambio, la utilización de *in-tube* SPME permite realizar la automatización del proceso de extracción y desorción de una manera sencilla. Por esta razón,

últimamente están apareciendo muchas aplicaciones que se basan en esta variante de la SPME combinada generalmente con la HPLC y puntualmente a GC para realizar la extracción de los analitos [1,168]. Actualmente, ya se ha publicado un estudio bibliográfico sobre este tema [168].

En lo que respecta al análisis medioambiental, se ha aplicado para la determinación de plaguicidas [169-172], PAHs [173], aminas aromáticas [173], BTEX [174], fenoles [174], ftalatos [175], compuestos organometálicos de plomo [176,177], arsénico [178], y aniones inorgánicos [179]. En la Tabla 6 se puede ver una lista de aplicaciones de *in-tube* SPME para el análisis de diferentes tipos de muestras [168]. Como se puede observar en la tabla, en la mayoría de las aplicaciones de *in-tube* SPME se utilizan columnas comerciales de GC para llevar a cabo la extracción (Supel-Q PLOT, Omegawax 250, DB-1, DB-5, etc.) [180-189]. Sin embargo, al igual que con las fibras de SPME, algunos autores han desarrollado nuevos recubrimientos para el interior de los capilares, como los de polipirrol (PPY) [190,191] o los recubiertos con MIPs [192].

Los capilares de PPY han sido preparados mediante el método de polimerización oxidativa. Este polímero presenta una estructura porosa que aumenta el área superficial efectiva por lo que es de esperar que la eficacia de la extracción sea mayor que la de polímeros no porosos [168]. Los capilares de PPY han sido utilizados para la extracción de un grupo de 16 PAHs y 6 aminas aromáticas [173], compuestos organometálicos de arsénico [178], aniones [179], β -blockers [190], anfetaminas [183], catequinas y cafeína [191]. Los resultados obtenidos en estos estudios han demostrado que estos capilares presentan una mayor eficacia en la extracción que los capilares comerciales, especialmente para PAHs y compuestos polares aromáticos debido, probablemente, al aumento de las interacciones π - π , a las interacciones entre los grupos funcionales polares y a las interacciones hidrofóbicas entre el polímero y los analitos [173].

Tabla 6. Aplicaciones de *in-tube* SPME [168].

Analito	Matriz	Capilar	Separación/ Detección	Referencia
Aminas heterocíclicas	Carne	Omegawax 250	LC-MS	188
Anfetaminas	Orina	Omegawax 250	LC-MS	181,182
Anfetaminas	Orina, pelo	PPY-coated	LC-MS	183
Aniones	Agua	PPY-coated	LC-MS	179
Antidepresivos tricíclicos	Orina	Wire-coated (DB-1)	HPLC-UV	185
Antidepresivos tricíclicos	Orina	Fiber-packed (DB-5)	HPLC-UV	186
β -blockers	Orina, suero	Omegawax 250	LC-MS	180,181
β -blockers	Orina, suero	PPY-coated	LC-MS	190
Benzodiazepinas	Suero	Supel-Q PLOT	LC-MS	187
BTEX, fenoles	Agua	BP-20 PEG	GC-FID	174
Carbamatos	Agua	Omegawax 250	HPLC-UV	168-171
Catequinas, cafeína	Té, zumos, vino	PPY-coated	LC-MS	191
Fenilureas, carbamatos	Agua	Omegawax 250	HPLC-UV	169
Ftalatos	Agua	Fiber-packed (PEEK)	HPLC-UV	175
Ftalatos, fenoles	Alimentos envasados	Supel-Q PLOT	HPLC-UV	189
Organometálicos de As	Agua	PPY-coated	LC-MS	178
PAHs, aminas aromáticas	Agua	PPY-coated	HPLC-UV	173
Plaguicidas fenoxiácidos	Agua	DB-WAX	LC-MS	172
Propanolol	Suero	MIP-packed	HPLC-UV	192
Ranitidina	Orina	Omegawax 250	LC-MS	184
Trimetilplomo, trietilplomo	Agua	Supel-Q PLOT	LC-MS	176,177

Como se ha comentado anteriormente, otros capilares que han sido desarrollados recientemente son los recubiertos internamente con polímeros de huella molecular (MIPs). Hasta la fecha sólo se ha realizado un estudio

con este tipo de polímeros en *in-tube* SPME. Mullett *et al.* [192] han utilizado un tubo de poli(eteretercetona) (PEEK) empaquetado con partículas del material MIP para la determinación en línea mediante *in-tube* SPME-HPLC de propanolol en suero obteniéndose muy buena reproducibilidad (<5%) y una elevada reutilización de las columnas (>500 inyecciones). No obstante, a pesar de que las recuperaciones del propanolol en este trabajo son buenas, la mejora de la selectividad al utilizar el material MIP para la extracción de este compuesto en *in-tube* SPME no está muy demostrada.

Tan *et al.* [174] también han estudiado la combinación de *in-tube* SPME con la GC para la determinación de un grupo de BTEX y fenoles en agua. Este acoplamiento, sin embargo, no es muy habitual ya que no presenta muchas ventajas respecto al acoplamiento convencional SPME-GC con fibras. Así, por ejemplo, el sistema utilizado por estos autores no tiene ningún tipo de automatización, a diferencia de los acoplamientos *in-tube* SPME-HPLC, ya que la desorción se realiza fuera de línea con el sistema cromatográfico. Además, las concentraciones de los analitos en las muestras utilizadas para desarrollar este método son muy elevadas (entre 10 y 40 mg l⁻¹) por lo que su aplicación para la determinación de estos compuestos a las concentraciones a las que se encuentran en las muestras reales no está investigada.

Jinno *et al.* [186] también han desarrollado una interfase para el acoplamiento en línea de *in-tube* SPME con la electroforesis capilar (CE) para la preconcentración y separación de cuatro antidepresivos tricíclicos (TCA) (amitriptilina, imipramina, nortriptilina y desipramina). Estos autores han aplicado el sistema acoplado *in-tube* SPME-CE para la determinación de estos compuestos en matrices biológicas complejas.

II.5. SBSE

Como se ha comentado anteriormente, la extracción por sorción con barras magnéticas agitadoras (SBSE) se basa en los mismos principios que la SPME por lo que los campos de aplicación, en general, son los mismos. A pesar de que su introducción es relativamente reciente [193], ya se han publicado algunos estudios en los que ésta se aplica a la determinación de compuestos de diferentes familias.

Las aplicaciones en el campo del análisis medioambiental todavía no son muy abundantes pero ya se pueden encontrar en la bibliografía algunos estudios que se basan en la SBSE para la determinación de contaminantes orgánicos en aguas [193-195]. Otras aplicaciones de la SBSE son la determinación de contaminantes en alimentos [196] y en fluidos biológicos [197,198], o aromas y aditivos en alimentos o plantas [199-203]. En la Tabla 7 se muestra un resumen de las aplicaciones que se han publicado hasta la actualidad de la SBSE. En la mayoría de los trabajos, la desorción se lleva a cabo en la unidad de desorción térmica que se conecta al inyector del cromatógrafo de gases ya que de esta manera la totalidad de los analitos extraídos son introducidos en el GC para su separación y detección con lo que la sensibilidad es muy elevada [193,194,196-203].

Tabla 7. Aplicaciones de la SBSE.

Compuestos	Matriz	Desorción ¹	Separación/detección	Límites de detección	Referencia
Ácido benzoico	Bebidas	T	GC-MS	< 8 µg l ⁻¹	201
Bifenilos policlorados	Agua/esperma humano	T	GC-MS	< ng l ⁻¹	197
Clorobenzenos, plaguicidas organoclorados	Frutas y vegetales	T	GC-MS	0.5-6 µg Kg ⁻¹ > 40 µg Kg ⁻¹ (DDT,DDE,DDD)	204
Compuestos volátiles (aroma)	Fresas	T	GC-MS	-	205
Compuestos volátiles (aroma)	Plantas medicinales	T	GC-FID	-	200
Compuestos volátiles (aroma)	Café	T	GC-MS	-	206
Conservantes	Bebidas/Vinagre	T	GC-MS	0.015-3.3 µg l ⁻¹	200

(continúa)

Contaminantes volátiles y semivolátiles	Agua	T	GC-MS	~ ng l ⁻¹	193
Fungicidas	Vino	T S	GC-MS HPLC-MS	3-65 µg l ⁻¹ (GC)	198
2-metilisoborneol (2-MIB), geosmin	Agua	T	GC-MS	0.33 ng l ⁻¹ (2-MIB) 0.15 ng l ⁻¹ (geosmin)	202
Monoterpenos	Aceites esenciales	T	GC-MS	-	207
Organometálicos de Sn	Agua/mejillones	T	GC-ICPMS	~ 10 fg l ⁻¹	194
PAHs	Agua	S	HPLC-Fluorescencia	0.2-2 ng l ⁻¹	195
PAHs	Agua	T	GC-MS	0.1-1.9 ng l ⁻¹	208
PAHs	Agua	T S	GC-MS HPLC-Fluorescencia	0.1-1.0 ng l ⁻¹ (GC) 0.2-2.0 ng l ⁻¹ (HPLC)	209
Terpenos, esteroides, fenoles, cannabinoides, ácidos grasos, 1-hidroxipireno, DEPH	Fluidos biológicos	T	GC-MS	0.2 ng l ⁻¹ (1-hidroxipireno) ² 0.3 µg l ⁻¹ (DEPH)	199

(continúa)

Triazinas, PAHs	Agua	T	GC-MS	12-80 ng l ⁻¹ (triazinas) 5-60 ng l ⁻¹ (PAHs)	203
2-trietilisoborneol, 2,4,6-tricloroanisol, geosmin	Agua	T	GC-MS	0.022-0.16 ng l ⁻¹	210

¹T = térmica, S = por solvente

²*Selected Ion Monitoring* (SIM)

Como ejemplo de desorción térmica, se puede mencionar el trabajo desarrollado por Vercauteren *et al.* [194] en el que se utiliza la SBSE combinada con la GC y plasma acoplado inductivamente con detección de espectrometría de masas (ICP-MS) para la determinación de un grupo de compuestos organometálicos de estaño en muestras medioambientales (agua de mar y mejillones). Los compuestos (trifenilestaño, triciclohexilestaño y tributilestaño) son derivatizados previamente a la extracción mediante SBSE con hidróxido de tetrametilamonio (TMAH). Los límites de detección obtenidos para estos compuestos mediante el método SBSE-GC-ICP-MS son del orden de pocos fg l^{-1} . Estos mismos autores habían desarrollado previamente a este trabajo un método analítico basado en SPME-GC-ICP-MS para la determinación de los mismos compuestos y los límites de detección obtenidos con SPME fueron 2 o 3 ordenes de magnitud superiores a los obtenidos mediante SBSE [208].

Como se puede ver en la Tabla 7, una de las familias de compuestos para las que ha sido más estudiada la aplicación de la SBSE son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) [195,203,208,209]. Esto se debe principalmente a que estos compuestos presentan una gran retención en el PDMS por lo que las recuperaciones mediante SBSE son elevadas y, en consecuencia, los límites de detección obtenidos en la mayoría de los estudios son de pocos ng l^{-1} .

También se han realizado algunos estudios en los que la desorción se lleva a cabo introduciendo la barra magnética agitadora en un pequeño volumen de un disolvente orgánico, de forma que la SBSE se puede combinar con la cromatografía de líquidos y extiende el campo de aplicación a compuestos poco volátiles o térmicamente inestables [195,196,209]. Como ejemplos de SBSE combinada con HPLC se pueden mencionar los trabajos desarrollados por Popp *et al.* [195,209] que han estudiado las posibilidades de la SBSE/HPLC con detección de fluorescencia para la determinación de un conjunto de PAHs en muestras de agua. El volumen de muestra preconcentrado es de 10 ml y la desorción se lleva a cabo con 150 μl de

una mezcla de acetonitrilo-agua (4:1) con lo que estos autores han conseguido límites de detección entre 0.2 y 2 ng l⁻¹, inyectando únicamente 15 µl del total de 150 µl en el cromatógrafo de líquidos. Las recuperaciones para estos compuestos oscilan entre 58-111% [209]. Estos autores también han estudiado la posibilidad de utilizar únicamente acetonitrilo como solvente de desorción pero en este caso sólo han podido inyectar 2 µl del total de 150 µl ya que sino la forma de los picos se distorsionaba. Esta distorsión está provocada por la composición de la fase móvil.

Sandra *et al.* [196] también han desarrollado un método analítico para la determinación de funguicidas en vinos mediante SBSE-GC-MS. Además, en este estudio, también se ha utilizado la SBSE con desorción por solvente orgánico seguida de HPLC y espectrometría de masas con ionización química a presión atmosférica (APCI-MS) de forma que se han podido comparar los resultados obtenidos en los dos modos de desorción.

Otros autores también han estudiado la combinación de la SBSE y de la SPME con la ASE [211] para la extracción y preconcentración de un grupo de plaguicidas organoclorados y clorobencenos en frutas y vegetales. La comparación de los dos métodos (ASE-SPME-GC-MS y ASE-SBSE-GC-MS) ha mostrado que los límites de detección son inferiores para la mayoría de los compuestos estudiados (<0.5-6 µg Kg⁻¹) con SBSE que con SPME.

Como se ha podido observar en este apartado, todavía no existen muchos estudios enfocados al análisis medioambiental debido probablemente a que esta técnica se encuentra aún en proceso de desarrollo, además de que sólo está disponible comercialmente un tipo de recubrimiento lo que implica que esta técnica sólo se pueda aplicar para la extracción de compuestos apolares.

I.6. Bibliografía

- [1] J. Pawliszyn, *Applications of Solid Phase Microextraction*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999.
- [2] SPME Course, Waterloo (Canadá), Abril 2002.
- [3] <http://www.sciborg.uwaterloo.ca/chemistry/pawliszyn/>
- [4] S. Ulrich, *J. Chromatogr. A*, 902 (2000) 167.
- [5] H. Kataoka, H. Lord, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A*, 880 (2000) 35.
- [6] J. Beltran, F.J. López, F. Hernández, *J. Chromatogr. A*, 885 (2000) 389.
- [7] N.H. Snow, *J. Chromatogr. A*, 885 (2000) 445.
- [8] H. Lord, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A*, 902 (2000) 17.
- [9] M.D. Alpendurada, *J. Chromatogr. A*, 889 (2000) 3.
- [10] B. Zygmunt, A. Jastrzebska, J. Namiesnik, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 31 (2001) 1.
- [11] H. Prosen, L. Zupancic-Kralj, *Trends Anal. Chem.*, 18 (1999) 272.
- [12] H.C.H. Lützhof, W.H.J. Vaes, A.P. Freidig, B. Hallig-Sorensen, J.L.M. Hermens, *Environ. Sci. Technol.*, 34 (2000) 4989.
- [13] K. Treves, L. Shragina, Y. Rudich, *Atmos. Environ.*, 35 (2001) 5843.
- [14] W.H.J. Vaes, E. Urresterazu Ramos, H.J.M. Verhaar, W. Seinen, J.L.M. Hermens, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 4463.
- [15] A.G. Oomen, P. Mayer, J. Tolls, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 2802.
- [16] A. Paschke, P. Popp, G. Schüürmann, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 363 (1999) 426.
- [17] H. Yuan, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 4410.
- [18] M. Lores, M. Llompert, R. González-García, C. González-Barreiro, R. Cela, *Chemosphere*, 47 (2002) 607.
- [19] M. Llompert, M. Lores, M. Lourido, L. Sánchez-Prado, R. Cela, Presentación en 25th International Symposium on Capillary Chromatography, Riva del Garda, Italia, Mayo 2002.
- [20] T. Nilsson, L. Montanarella, D. Baglio, R. Tilio, G. Bidoglio, S. Facchetti, *Intl. J. Environ. Anal. Chem.*, 69 (1998) 217.
- [21] H. Verhoeven, T. Beuerle, W. Schwab, *Chromatographia*, 46 (1997) 63.

- [22] C. Haberhauer-Troyer, M. Crnoja, E. Rosenberg, M. Grasserbauer, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 366 (2000) 329.
- [23] M. Ligor, M. Ścibiorek, B. Buszewski, *J. Microcol. Sep.*, 11 (1999) 377.
- [24] S.L. Chong, D. Wang, J.D. Hayes, B.W. Wilhite, A. Malik, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 3889.
- [25] H.R. Rogers, S.D.W. Comber, *Chemosphere*, 37 (1998) 1413.
- [26] W.M. Mullett, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 1081.
- [27] E.A. Hogendoorn, R. Hoogerbrugge, R.A. Baumann, H.D. Meiring, A.P.J.M. de Jong, P. van Zoonen, *J. Chromatogr. A*, 754 (1999) 49.
- [28] C. Xiao, S. Han, Z. Wang, J. Xing, C. Wu, *J. Chromatogr. A*, 927 (2001) 121.
- [29] Z.P. Zhou, Z.Y. Wang, C.Y. Wu, W. Zhan, Y. Xu, *Anal. Lett.*, 32 (1999) 1675.
- [30] T.G. Gbatu, K.L. Sutton, J.A. Caruso, *Anal. Chim. Acta*, 402 (1999) 67.
- [31] A.P. Vonderheide, M. Montes-Bayon, J.A. Caruso, *Analyst*, 127 (2002) 49.
- [32] Z. Zheng, W. Qiu, M. Yang, X. Wei, Z. Huang, F. Li, *J. Chromatogr. A*, 934 (2001) 51.
- [33] Z.R. Zeng, W.L. Qiu, Z.F. Huang, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 2429.
- [34] Z.Y. Wang, C.H. Xiao, C.Y. Wu, H.M. Han, *J. Chromatogr. A*, 893 (2000) 157.
- [35] M. Giardina, S.V. Olesik, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 5841.
- [36] J. Wu, X. Yu, H. Lord, J. Pawliszyn, *Analyst*, 125 (2000) 391.
- [37] T.P. Gbatu, O. Ceylan, K.L. Sutton, J.F. Rubinson, A. Galal, J.A. Caruso, H.B. Mark Jr., *Anal. Commun.*, 36 (1999) 203.
- [38] S.D. Harvey, D.A. Nelson, B.W. Wright, J.W. Grate, *J. Chromatogr. A*, 954 (2002) 217.
- [39] F. Mangani, R. Cenciarini, *Chromatographia*, 41 (1995) 678.
- [40] Dj. Djozan, Y. Assadi, *Chromatographia*, 45 (1997) 183.
- [41] Dj. Djozan, Y. Assadi, *Microchem. J.*, 63 (1999) 276.
- [42] M. Farajzadeh, A.A. Matin, *Anal. Sci.*, 18 (2002) 77.
- [43] R. Aranda, P. Kruus, R.C. Burk, *J. Chromatogr. A*, 888 (2000) 35.
- [44] P. Popp, A. Paschke, *Chromatographia*, 49 (1999) 686.

- [45] H. Yuan, W.M. Mullett, J. Pawliszyn, *Analyst*, 126 (2001) 1456.
- [46] E.H.M. Koster, C. Crescenzi, W. den Hoedt, K. Ensing, G. de Jong, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 3140.
- [47] N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull; *Trends Anal. Chem.*, 20 (2001) 477.
- [48] V. Pichon, M. Bouzige, C. Miège, M-C. Hennion, *Trends Anal. Chem.*, 18 (1999) 219.
- [49] X-R. Xia, R.B. Leidy, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 2041.
- [45] Y. Liu, Y.F. Shen, M.L. Lee, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 190.
- [51] M.F. Alpendurada, *J. Chromatogr. A*, 889 (2000) 3.
- [52] J. A. Koziel, J. Pawliszyn, *J. Air & Waste Manag. Ass.*, 51 (2001) 173.
- [53] J. Dewulf, H. Van Langenhove, *Am. Lab.*, 33 (2001) 18.
- [54] P. Bocchini, C. Andalo, D. Bonfigliani, G.C. Galletti, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 13 (1999) 2133.
- [55] L. Lassagne, V. Jacob, P. Desuzinges, F. Tripoli, P. Kaluzni, P. Baussand, P. Foster, *Fresenius. Env. Bull.*, 10 (2001) 381.
- [56] W.J. Havenga, E.R. Rohwer, *Int. Env. Anal. Chem.*, 78 (2000) 205.
- [57] R.A. Dong, S.M. Chang, Y.C. Sun, *J. Chromatogr. Sci.*, 38 (2000) 528.
- [58] C. Gonçalves, M.F. Alpendurada, *J. Chromatogr. A*, 968 (2002) 117.
- [59] B.A. Tomkins, A.R. Barnard, *J. Chromatogr. A*, 964 (2002) 21.
- [60] J. Castro, R.A. Pérez, C. Sánchez Brunete, J.L. Tadeo, *Chromatographia*, 53 (2001) S361.
- [61] R. Hu, D. Elia, J.M. Berthion, S. Poliak, *Chromatographia*, 53 (2001) 306.
- [62] I. Valor, M. Pérez, C. Cortada, D. Apraiz, J.C. Moltó, C. Font, *J. Sep. Sci.*, 24 (2001) 39.
- [63] M. Ábalos, J.M. Bayona, F. Ventura, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 3531.
- [64] L. Muller, E. Fattore, E. Benfenati, *J. Chromatogr. A*, 791 (1997) 221.
- [65] M. Ábalos, J. M. Bayona, *J. Chromatogr. A*, 891 (2000) 287.
- [66] S.P. Yo, *Chemosphere*, 38 (1999) 823.
- [67] R. Baciocchi, M. Attina, G. Lombardi, M.R. Boni, *J. Chromatogr. A*, 911 (2001) 135.
- [68] Z. Takats, K. Torkos, *Chromatographia*, 48 (1998) 74.
- [69] L. Wennrich, P. Popp, M. Moder, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 546.

- [70] M. Ábalos, J.M. Bayona, *J. Chromatogr. A*, 891 (2000) 287.
- [71] Gy. Wittmann, H. Van Langenlove, J. Dewuff, *J. Chromatogr. A*, 874 (2000) 225.
- [72] M.N. Sarrión, F.J. Santos, M.T. Galcerán, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 4865.
- [73] D.A. Cassada, Y. Zhang, D.D. SNow, R.F. Spalding, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 4654.
- [74] M. Bao, O. Griffini, D. Burrini, D. Santianni, K. Barbieri, M. Mascini, *Analyst*, 124 (1999) 459.
- [75] E.E. Stashenko, M.A. Puertas, W. Salgar, W. Delgado, J. René Martínez, *J. Chromatogr. A*, 886 (2000) 175.
- [76] A. Díaz, F. Ventura, M.T. Galcerán, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 3869.
- [77] S.B. Hawthorne, C.B. Grabanski, K.J. Hageman, D.J. Miller, *J. Chromatogr. A*, 814 (1998) 151.
- [78] Y. Yang, S.B. Hawthorne, D.J. Miller, Y. Liu, M.L. Lee, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 1866.
- [79] M. Llompert, K. Li, M. Fingas, *J. Chromatogr. A*, 48 (1999) 451.
- [80] J.C. Flórez Menéndez, M.L. Fernández Sánchez, J.E. Sánchez Uría, E. Fernández Martínez, A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta*, 415 (2000) 9.
- [81] S. Tutschku, M.M. Schantz, S.A. Wise, *Anal. Chem.*, 2002, pendiente de publicación.
- [82] A. Beichert, S. Padberg, B.W. Wenclawiak, *Appl. Organometal. Chem.*, 14 (2000) 493.
- [83] G.B. Jiang, J.Y. Liu, *Anal. Sci.*, 16 (2000) 585.
- [84] S.-A. Barshick, W.H. Griest, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 3015.
- [85] L. Santos dos Santos, M.G. Rodrigues Vale, M. Bertrand Campos de Araujo, E. Bastos Caramao, E. Conceição Oliveira, *J. Sep. Sci.*, 24 (2001) 309.
- [86] M.-R. Lee, Y.-C. Yeh, W.-S. Hsiang, B.-H. Hwang, *J. Chromatogr. A*, 806 (1998) 317.
- [87] K.D. Buchholz, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 160.
- [88] M. Möder, S. Schrader, U. Franck, P. Popp, *fresenius J. Anal. Chem.*, 357 (1997) 326.

- [89] M. Llompарт, B. Blanco, R. Cela, J. Microcol. Sep., 12 (2000) 25.
- [90] L. Wennrich, P. Popp, M. Möder, Anal. Chem., 72 (2000) 546.
- [91] K. Luks-Betlej, P. Popp, B. Janoszka, H. Paschke, J. Chromatogr. A, 938 (2001) 93.
- [92] G. Prokupkova, K. Holadova, J. Poutska, H. Hajslova, Anal. Chim. Acta, 457 (2002) 211.
- [93] M.N. Sarrión, F.J. Santos, M.T. Galcerán, Rapid Comm. Mass Spectrom., 14 (2000) 2271.
- [94] Y. He, Y. Wang, H.K. Lee, J. Chromatogr. A, 874 (2000) 149.
- [95] S.-D. Huang, C.Y. Ting, C.-S. Lin, J. Chromatogr. A, 769 (1997) 239.
- [96] C. Achten, W. Püttmann, Environ. Sci. Technol., 34 (2000) 1359.
- [97] D. Cam, S. Gagni, J. Chromatogr. Sci., 39 (2001) 481.
- [98] W.J. Havenga, E.R. Rohwer, J. Chromatogr. A, 848 (1999) 279.
- [99] D. Cam, S. Gagni, L. Meldolesi, G. Galletti, Chromatogr. Sci., 38 (2000) 55.
- [100] I. Valor, J.C. Moltó, D. Apraiz, G. Font, J. Chromatogr. A, 767 (1997) 195.
- [101] F. Hernández, J. Beltrán, F.J. López, J.V. Gaspar, Anal. Chem., 72 (2000) 2313.
- [102] C. Gonçalves, M.F. Alpendurada, J. Chromatogr. A, 963 (2002) 19.
- [103] J. Vercauteren, A. De Meester, T. De Smaele, F. Vanhaecke, L. Moens, R. Dams, P. Sandra, J. Anal. At. Spectrom., 15 (2000) 651.
- [104] M.-R. Lee, R.-J. Lee, Y.-W. Lin, C.-M. Chen, B.-H. Hwang, Anal. Chem., 70 (1998) 1963.
- [105] B.D. Page, G. Lacroix, J. Chromatogr. A, 757 (1997) 173.
- [106] R.-A. Doong, P.-L. Liao, J. Chromatogr. A, 918 (2001) 177.
- [107] I. Brás, L. Santos, A. Alves, J. Chromatogr. A, 891 (2000) 305.
- [108] T. Henriksen, B. Svenmark, B. Lindhart, R.K. Julher, Chemosphere, 44 (2001) 1531.
- [109] D.A. Lambropoulou, I.K. Konstantinou, T.A. Albanis, J. Chromatogr. A, 893 (2000) 143.
- [110] M.L. Reyzer, J. S: Brodbelt, Anal. Chim. Acta, 436 (2001) 11.

- [111] M.C. Sampedro, O. Martín, C. López de Armentia, M.A. Goicolea, E. Rodríguez, Z. Gómez de Balugera, J. Costa-Moreira, R.J. Barrio, J. Chromatogr. A, 893 (2000) 347.
- [112] H. Prosen, L. Zupančič-Kralj, Acta Chim. Slov., 45 (1998) 11.
- [113] M.T. Sng, F.K. Lee, H.Å. Lakso, J. Chromatogr. A, 759 (1997) 225.
- [114] T. Nilsson, D. Baglio, I. Galdo-Minguez, J.O. Madsen, S. Facchetti, J. Chromatogr. A, 826 (1998) 211.
- [115] J. Beltran, F.J. López, O. Cepria, F. Hernández, J. Chromatogr. A, 808 (1998) 257.
- [116] R. Ferrari, T. Nilsson, R. Arena, P. Arlati, G. Bartolucci, R. Basla, F. Cioni, G. Del Carlo, P. Dellavedova, E. Fatore, M. Fungi, C. Grote, M. Guidotti, S. Morgillo, L. Müller, M. Volante, J. Chromatogr. A, 795 (1998) 371.
- [117] S. Magdic, J.B. Pawliszyn, J. Chromatogr. A, 723 (1996) 111.
- [118] J. Dugay, C. Miège, M.-C. Hennion, J. Chromatogr. A, 795 (1998) 27.
- [119] R. Boussahel, S. Bouland, K.M. Moussaoui, M. Baudu, A. Montiel, Water Res., 36 (2002) 1909.
- [120] A. Navalon, A. Prieto, L. Araujo, J. L. Vilchez, J. Chromatogr. A, 946 (2002) 239.
- [121] M. Natangelo, S. Tavazzi, E. Benfenati, Anal. Let., 35 (2002) 327.
- [122] Z.W. Yao, G.B. Yiang, J.M. Liu, W. Cheng, Talanta, 55 (2001) 807.
- [123] A. Bouaid, L. Ramos, M.J. González, P. Fernández, C. Cámara, J. Chromatogr. A, 939 (2001) 13.
- [124] A.T. Nielsen, S. Jonsson, J. Chromatogr. A, 963 (2002) 57.
- [125] R.A. Murray, Anal. Chem., 73 (2001) 1646.
- [126] W.-H. Ho, S.-J. Hsieh, Anal. Chim. Acta, 428 (2001) 111.
- [127] W. Chen, K-F. Poon, M.H.W. Lam, Environ. Sci. Technol., 32 (1998) 3816.
- [128] P.A. Martos, J. Pawliszyn, Anal. Chem., 71 (1999) 1513.
- [129] R. Batlle, A. Colmsjö, U. Nilsson, Fresenius J. Anal. Chem., 371 (2001) 514.
- [130] S.-W. Tsai, T. -A. Chang, J. Chromatogr. A, 954 (2002) 191.
- [131] A. Khaled, J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A, 892 (2000) 455.

- [132] J.A. Koziel, J. Noah, J. Pawliszyn, *Environ. Sci. Technol.*, 35 (2001) 1481.
- [133] R. Eisert, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A*, 776 (1997) 193.
- [134] E. Belau, C. Grote, M. Spiekermann, K. Levsen, *Field Anal. Chem. Technol.*, 5 (2001) 37.
- [135] A. Wenner, M. Wortberg, *J. High Resol. Chromatogr.*, 21 (1998) 661.
- [136] F. Sporkert, F. Pragst, S. Hübner G. Mills, *J. Chromatogr. B*, 772 (2002) 45.
- [137] *SPME III: Automated Solid-Phase Microextraction with Sample Agitation capability*, Varian.
- [138] Nota de Aplicación n. 3, Varian.
- [139] Nota de Aplicación n. 47, Varian.
- [140] *Combi PAL: Headspace, Liquid, and SPME GC Injection System*, Varian.
- [141] K. Jinno, T. Muramatsu, Y. Saito, Y. Kiso, S. Magdic, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr.*, 754 (1996) 137.
- [142] Z. Wang, B. Hennion, L. Urruty, M. Montury, *Food Add. Contam.*, 17 (2000) 915.
- [143] L. Wu, J.R. Almirall, K.G. Furton, *J. High Resol. Chromatogr.*, 22 (1999) 279.
- [144] P. Popp, C. Bauer, M. Möder, A. Paschke, *J. Chromatogr. A*, 897 (2000) 153.
- [145] V.V. Cardoso, A. Rodrigues, J. Correia, M.J. Benoliel, *Polyc. Arom. Hydroc.*, 19 (2000) 227.
- [146] M. Möder, P. Popp, J. Pawliszyn, *J. Microcol. Sep.*, 10 (1998) 225.
- [147] M.T. Kelly, M. Larroque, *J. Chromatogr. A*, 841 (1999) 177.
- [148] U. Ceglarek, J. Efer, A. Schreiber, E. Zwanziger, W. Engewald, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 365 (1999) 674.
- [149] R. Aranda, R.C. Burk, *J. Chromatogr. A*, 829 (1998) 401.
- [150] C.R. Lia, Y.Z. Luo, J. Pawliszyn, *J. Microcol. Sep.*, 10 (1998) 167.
- [151] Y-C. Wu, S-D. Huang, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 310.
- [152] C.G. Zambonin, L. Monaci, A. Aresta, *Food Chem.*, 75 (2001) 249.
- [153] R. Batlle, C. Sánchez, C. Nerín, *J. AOAC Intl.*, 84 (2001) 431.
- [154] K. Jinno, M. Kawazoe, M. Yayashida, *Chromatographia*, 52 (2000) 309.

- [155] A. Boyd-Boland, J.B. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 1521.
- [156] M.N. Sarrión, F.J. Santos, M.T. Galcerán, *J. Chromatogr. A*, 947 (2002) 155.
- [157] B. Jaillais, F. Cadoux, J. Auger, *Talanta*, 50 (1999) 423.
- [158] K. Kureckova, B. Maralikova, K. Ventura, *J. Chromatogr. B*, 770 (2002) 83.
- [159] E. González-Toledo, M.D. Part, M.F. Alpendurada, *J. Chromatogr. A*, 923 (2001) 45.
- [160] Y.C. Wu, S.D. Huang, *J. Chromatogr. A*, 835 (1999) 127.
- [161] D.A. Volmer, J.P.M. Hui, *Archiv. Environ. Contam. Toxicol.*, 35 (1998) 1.
- [162] J. Chen, J.B. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 2530.
- [163] M.R. Negrão, M.F. Alpendurada, *J. Chromatogr. A*, 823 (1998) 211.
- [164] H. Daimon, J. Pawliszyn, *Anal. Comm.*, 34 (1997) 365.
- [165] M. Möder, P. Popp, R. Eisert, J. Pawliszyn, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 363 (1999) 680.
- [166] S.H. Salleh, Y. Saito, Y. Kiso, K. Jinno, *Anal. Chim. Acta*, 433 (2001) 207.
- [167] C. M. Lock, L. Chen, D. Volmer, *Rap. Comm. Mass Spectrom.*, 13 (1999) 1744.
- [168] H. Kataoka, *Anal. Bioanal. Chem.*, 373 (2002) 31.
- [169] R. Eisert, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 69 (2000) 3140.
- [170] Y. Gou, C. Tragas, H.L. Lord, J. Pawliszyn, *J. Microcol. Sep.*, 12 (2000) 125.
- [171] Y. Gou, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 2774.
- [172] M. Takino, S. Daishima, T. Nakamara, *Analyst*, 126 (2001) 602.
- [173] J. Wu, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 55.
- [174] B.C.D. Tan, P.J. Marriot, H.K. Lee, P.D. Morrison, *Analyst*, 124 (1999) 651.
- [175] Y. Saito, Y. Nakao, M. Imaizumi, T. Takeichi, Y. Kiso, K. Jinno, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 368 (2000) 641.
- [176] Z. Mester, J. Pawliszyn, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 13 (1999) 1999.

- [177] Z. Mester, H.L. Lord, J. Pawliszyn, *J. Anal. At. Spectrom.*, 15 (2000) 595.
- [178] J. Wu, Z. Mester, J. Pawliszyn, *Anal. Chim. Acta*, 424 (2000) 211.
- [179] J. Wu, W. Xie, H.L. Lord, J. Pawliszyn, *Analyst*, 125 (2000) 391.
- [180] H. Kataoka, H.L. Lord, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 4237.
- [181] H. Kataoka, H.L. Lord, S. Yamamoto, S. Narimatsu, J. Pawliszyn, *J. Microcol. Sep.*, 12 (2000) 493.
- [182] H. Kataoka, H.L. Lord, J. Pawliszyn, *J. Anal. Toxicol.*, 24 (2000) 257.
- [183] J. Wu, H.L. Lord, J. Pawliszyn, *Talanta*, 54 (2001) 655.
- [184] H. Kataoka, H.L. Lord, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. B*, 731 (1999) 353.
- [185] Y. Saito, M. Kawazoe, M. Hayashida, K. Jinno, *Analyst*, 125 (2000) 807.
- [186] K. Jinno, M. Kawazoe, Y. Saito, T. Takeichi, M. Hayashida, *Electrophoresis*, 17 (2001) 3785.
- [187] H. Yuan, Z. Mester, H.L. Lord, J. Pawliszyn, *J. Anal. Toxicol.*, 24 (2000) 718.
- [188] H. Kataoka, J. Pawliszyn, *Chromatographia*, 50 (1999) 532.
- [189] H. Kataoka, M. Ise, S. Narimatsu, *J. Sep. Sci.*, 25 (2002) 77.
- [190] J. Wu, H.L. Lord, J. Pawliszyn, H. Kataoka, *J. Microcol. Sep.*, 12 (2000) 255.
- [191] J. Wu, W. Xie, J. Pawliszyn, *Analyst*, 125 (200) 2216.
- [192] W. Mullett, P. Martin, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 73 (2000) 2383.
- [193] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, *J. Microcol. Sep.*, 11 (1999) 737.
- [194] J. Vercauteren, C. Pérès, C. Devos, P. Sandra, F. Vanhaecke, L. Moens, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 1509.
- [195] P. Popp, C. Bauer, L. Wennrich, *Anal. Chim. Acta*, 436 (2001) 1.
- [196] P. Sandra, B. Tienpont, J. Vercammen, A. Tredoux, T. Sandra, F. David, *J. Chromatogr. A*, 928 (2001) 117.
- [197] T. Benijts, J. Vercammen, R. Dams, H.P. Tuan, W. Lambert, P. Sandra, *J. Chromatogr. A*, 755 (2001) 137.
- [198] B. Tienpont, F. David, K. Desmet, P. Sandra, *Anal. Bioanal. Chem.*, 373 (2002) 46.

- [199] C. Bicchi, C. Cordero, C. Iori, P. Rubiolo, J. High Resol. Chromatogr., 23 (2000) 539.
- [200] N. Ochini, K. Sasamoto, M. Takino, S. Yamashita, S. Daishima, A.C. Heiden, A. Hoffman, Anal. Bioanal. Chem., 373 (2002) 56.
- [201] A.G. Tredoux, H.H. Lauer, T. Heideman, P. Sandra, J. High Resol. Chromatogr., 23 (2000) 644.
- [202] S. Nakaruma, N. Nakaruma, S. Ito, J. Sep. Sci., 24 (2001) 674.
- [203] I. Valor, B. Álvarez, M.A. Cobollo, Presentación (póster) en EXTECH 2001, Barcelona, Septiembre 2001.
- [204] L. Wennrich, P. Popp, J. Breuste, Chromatographia, 53 (2001) S380.
- [205] M. Kreck, A. Scharrer, S. Bilke, A. Mosandl, Eur. Food Res. & Technol., 213 (2001) 389.
- [206] C. Bichi, C. Iori, P. Rubiolo, P. Sandra, J. Agric. Food Chem., 50 (2002) 449.
- [207] M. Kreck, A. Scharrer, S. Bilke, A. Mosandl, Flav. Frag. J., 17 (2002) 32.
- [208] B. Kolaghar, A. Hoffmann, A.C. Heiden, Presentación (póster) en EXTECH 2001, Barcelona, Septiembre 2001.
- [209] P. Popp, C. Bauer, B. Hauser, H. Paschke, L. Wennrich, Presentación (póster) en EXTECH 2001, Barcelona, Septiembre 2001.
- [210] N. Ochiai, K. Sakamoto, M. Takino, S. Yamashita, S. Daishima, A. Heiden, A. Hoffman, Analyst, 126 (2001) 1652.
- [211] L. Wennrich, P. Popp, G. Koller, J. Breuste, J. AOAC Intl., 84 (2001) 1194.

CAPÍTULO III

PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

Teniendo en cuenta todas las consideraciones comentadas en los capítulos anteriores y que cuando se inicio la presente Tesis Doctoral la microextracción en fase sólida era una técnica de reciente aparición y por lo tanto su uso no estaba muy extendido, se procedió a estudiar la viabilidad de esta técnica de preconcentración para la extracción de diferentes familias de contaminantes orgánicos en muestras de agua.

En este apartado se incluye la parte experimental y los resultados obtenidos en los diferentes estudios realizados durante la presente Tesis Doctoral. Éstos se presentan en forma de artículos que han sido publicados en diferentes revistas científicas. Previamente a cada uno de los artículos, se incluye una breve introducción en la que se indican los objetivos de cada trabajo así como la innovación que representa cada estudio respecto a la investigación en el momento de su realización y se comentan los resultados obtenidos en cada caso. En los trabajos realizados se utilizó la SPME o la SBSE siempre combinada con alguna técnica cromatográfica como la cromatografía de gases y la cromatografía de líquidos de alta resolución. Los sistemas de detección utilizados fueron la espectrometría de masas en el caso de utilizar la cromatografía de gases como técnica de separación y los detectores ultravioleta-visible y electroquímico cuando se utilizó la cromatografía de líquidos. En la mayoría de los trabajos, se estudia principalmente la aplicación de la SPME para la determinación de alguna familia de compuestos cuya presencia en aguas de diferentes procedencias puede ser problemática para el medio ambiente o para los seres vivos. En dos de los trabajos, en cambio, se realizan estudios más teóricos, ya sea del efecto de algunos parámetros en la etapa de extracción en SPME o bien se comparan diferentes tipos de fibras comerciales de SPME para la extracción de un mismo grupo de compuestos.

Para llevar a cabo estos estudios, se seleccionaron diferentes analitos de interés medioambiental como plaguicidas, ftalatos, compuestos fenólicos y un grupo de compuestos considerados disruptores endocrinos entre los que se encuentran un grupo de estrógenos derivados del estradiol, compuestos

alquilfenólicos y el bisfenol A. En el Anexo I se muestran las estructuras de cada uno de los analitos estudiados.

En los primeros cuatro estudios presentados en este capítulo se utiliza la SPME en combinación con la GC y la espectrometría de masas como sistema de detección. Así, en el primero de ellos se desarrolla un método analítico para la determinación de un conjunto de antialgas, utilizados generalmente como aditivos en las formulaciones de pinturas para barcos, en muestras de agua. En el segundo trabajo se estudia la influencia de una serie de parámetros en el proceso de SPME como el tiempo de permanencia de los analitos en la fibra tras la etapa de extracción y si la utilización de un patrón interno mejora la precisión de los resultados obtenidos mediante SPME. El tercer estudio consiste en el desarrollo de un método analítico para la determinación de un grupo de ftalatos en muestras de agua. La fibra utilizada en este estudio es la de 85 μm poliacrilato que era junto con la de PDMS una de las fibras más utilizadas en aquel momento. En el cuarto trabajo se presentan los resultados correspondientes a un estudio comparativo entre diferentes fibras comerciales (65 μm polidimetilsiloxano/divinilbenceno, 65 μm carbowax/divinilbenceno, 85 μm poliacrilato, 75 μm carboxen/divinilbenceno y 30 μm polidimetilsiloxano), algunas de las cuales habían sido más recientemente introducidas en el momento de realizar el trabajo. Para ello se utilizó el mismo grupo de ftalatos que se habían seleccionado para el estudio anterior y se desarrolló un método analítico para la determinación de estos compuestos utilizando la fibra que proporciona mejores resultados.

En el quinto y sexto apartados se estudia el acoplamiento de la SPME con la HPLC utilizando en los dos casos la interfase comercializada para este propósito. En el primero de ellos se escogió el grupo de 11 compuestos fenólicos regulados por la Agencia Americana de Protección Ambiental (EPA) y se lleva a cabo un estudio comparativo conectando la interfase de SPME/HPLC a dos configuraciones de HPLC diferentes. En el segundo de los estudios de SPME-HPLC se escogieron un grupo de compuestos

estrogénicos como el β -estradiol y derivados, el bisfenol A y varios alquilfenoles con el objetivo de desarrollar un método analítico para la determinación de estos compuestos debido a los buenos resultados obtenidos en el trabajo anterior. En los dos trabajos se utilizaron los sistemas de detección UV y electroquímica conectados en serie para mejorar la sensibilidad del método.

En el último estudio presentado en este capítulo, se utiliza la extracción por sorción con barras magnéticas agitadoras, que es una técnica de preconcentración que se puede considerar una variante de la SPME y que ha sido desarrollada muy recientemente, para la determinación de un grupo de plaguicidas considerados disruptores endocrinos. En este trabajo, la SBSE se combinó con la inyección de grandes volúmenes en GC para mejorar la sensibilidad del método ya que en este estudio la desorción se lleva a cabo mediante la adición de un disolvente orgánico.

**III.1. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DE UN GRUPO DE ANTIALGAS EN
MUESTRAS ACUOSAS**

Desde hace años se añaden algunos plaguicidas a las formulaciones de las pinturas utilizadas en barcos y botes para evitar el crecimiento de algas en las superficies que están en contacto con el agua. Los compuestos utilizados en la actualidad sustituyen a los compuestos organometálicos de estaño, como el tributil estaño (TBT), que se han utilizado desde hace años y cuyo uso como aditivos en las pinturas para barcos de longitud inferior a 25 m está actualmente prohibido debido a los problemas de toxicidad que estos compuestos presentan para el medio ambiente [1,2]. La prohibición total del uso del TBT en las pinturas para barcos entrará en vigor en el 2003 [3]. Entre los plaguicidas que se utilizan actualmente en sustitución de los TBTs se encuentran el irgarol 1051, el 4-cloro-3-metilfenol y el diclofluanid, que fueron los compuestos seleccionados para este estudio, o el diuron, el clorotalonil, el 2-tiocianometiltiobenzotiazol y el Sea-Nine 211 [4].

Hasta la fecha de realización de este trabajo no se habían realizado muchos estudios sobre el posible impacto de estos plaguicidas en el medio ambiente pero en algunos de ellos ya se había indicado que estos compuestos podían exhibir toxicidades similares a las de los compuestos derivados del estaño [5]. En otros estudios, estos compuestos se habían determinado a concentraciones de $\mu\text{g l}^{-1}$ en aguas del Mar Mediterráneo de diferentes procedencias debido probablemente al intenso tránsito marítimo [2,5].

La extracción en fase sólida (SPE), combinada tanto con la cromatografía de gases [6] como con la cromatografía de líquidos [7], es la técnica más utilizada para la determinación de estos compuestos. Sin embargo, se optó por utilizar la SPME debido a su reciente aparición y para determinar si podía ser aplicada como técnica de preconcentración alternativa a la SPE. Además, en el momento de realización de este estudio no se había publicado ningún trabajo en el que se utilizara la SPME para la determinación de alguno de los compuestos incluidos en este estudio y también se consideró interesante para determinar los niveles de concentración a los que se encontraban estos compuestos en la costa de Tarragona.

En este primer trabajo se utilizó la SPME junto con el acoplamiento GC-MS y la fibra utilizada para la extracción de los tres plaguicidas fue la de 85 μm poliacrilato. Los objetivos planteados en este trabajo fueron la optimización de las diferentes variables que afectan el proceso de extracción y desorción en SPME (tiempo y temperatura de extracción, pH de la muestra, adición de NaCl a la muestra y tiempo y temperatura de desorción), la validación del método analítico desarrollado en los dos modos de adquisición del espectrómetro de masas y su posterior aplicación al análisis de muestras reales de agua de la costa de Tarragona. El método desarrollado permitió determinar las concentraciones a las que se encuentra generalmente el irgarol 1051 en aguas portuarias (100-1700 ng l^{-1}) pero no en aguas marinas (1-40 ng l^{-1}). Uno de los compuestos estudiados, el irgarol 1051 fue detectado en una de las aguas de puerto analizada, pero no pudo ser cuantificado en el modo de adquisición *Full Scan* porque la concentración a la que se encontraba estaba entre los límites de detección y cuantificación. En modo SIM, en cambio, sí pudo ser cuantificado. La concentración de este compuesto fue del orden de pocos $\mu\text{g l}^{-1}$, que es una concentración que se encuentra dentro de los niveles a los que se había encontrado este compuesto en aguas portuarias.

Este compuesto también fue determinado por otros autores mediante SPE-HPLC-MS [8,9] o SPE-GC-MS [9,10] en muestras de agua de mar lo que corrobora el interés en el desarrollo de métodos analíticos que permitan la determinación de este compuesto a bajas concentraciones. Los límites de detección que se obtuvieron en otros trabajos realizados dentro del grupo de investigación [10] con SPE acoplada a GC-MS para los mismos antialgas en muestras de agua fueron ligeramente inferiores a los obtenidos con SPME-GC-MS pero con SPE el tiempo de análisis y el volumen de muestra fueron mayores.

Posteriormente a este estudio, se han publicado otros en los que se desarrollan métodos analíticos para la determinación de alguno de los compuestos estudiados en este trabajo y en los que se realiza una

monitorización de la presencia de ellos en las aguas costeras de diferentes países [2,4,11,12]. No obstante, son muy pocos los estudios que utilicen la SPME para la preconcentración de estos compuestos ya que en la mayoría de ellos la técnica utilizada sigue siendo la SPE [3,4]. Lambropoulou *et al.* han desarrollado recientemente dos métodos analíticos basados en la SPME y GC para la determinación de Irgarol 1051 [11] y diclofluanid [12], entre otros compuestos, en aguas de mar. En general, los límites de detección ($1-60 \text{ ng l}^{-1}$) obtenidos por estos autores son mejores que los obtenidos en el estudio realizado en la presente Tesis Doctoral pero esto puede ser debido a que los sistemas de detección utilizados son más sensibles (detección de captura electrónica, ECD, y termoiónica de llama, FTD).

A continuación, se adjunta una copia del trabajo publicado en la revista *Journal of Chromatography A*, 839 (1999) 253-260, que resume los resultados obtenidos.

Bibliografía

- [1] K. Fent, *Crit. Rev. Toxicol.*, 26 (1996) 1.
- [2] M.H. Lamoree, C.P. Swart, A. van der Horst, B. van Hattum, J. Chromatogr. A, *J. Chromatogr. A*, 970 (2002) 183.
- [3] IMO, *International Convention on the Control of Harmful Anti-Fouling Systems on Ships, International Maritime Organization*, London 2001, adopted 5 October 2001.
- [4] M.D. Hernando, L. Piedra, A. Belmonte, A. Agüera, A.R. Fernández-Alba, *J. Chromatogr. A*, 938 (2001) 103.
- [5] I. Ferrer, D. Barceló, *J. Chromatogr. A*, 926 (2001) 221.
- [6] I. Ferrer, B. Ballesteros, M.P. Marco, D. Barceló, *Environ. Sci. Technol.*, 31 (1997) 3530.
- [7] E. Pocurull, R.M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A*, 738 (1996) 1.
- [8] L. Piedra, A. Tejedor, M.D. Hernando, A. Agüera, D. Barceló, A. Fernández-Alba, *Chromatographia*, 52 (2000) 631.

- [9] R. Gimeno, C. Aguilar, R.M. Marcé, F. Borrull, J. Chromatogr. A, 915 (2001) 139.
- [10] E. Pocurull, L. Brossa, F. Borrull, R.M. Marcé, J Chromatogr. A, 885 (2000) 361.
- [11] D.A. Lambropoulou, I.K. Konstantinou, T.A. Albanis, J. Chromatogr. A, 893 (2000) 143.
- [12] D.A. Lambropoulou, V.A. Sakkas, T.A. Albanis, J. Chromatogr. A, 952 (2002) 215.

SOLID-PHASE MICROEXTRACTION OF THE ANTIFOULING IRGAROL 1051 AND THE FUNGICIDES DICHLOFLUANID AND 4-CHLORO-3-METHYLPHENOL IN WATER SAMPLES

ABSTRACT

Three pesticides usually added to paint formulations, Irgarol 1051, dichlofluanid and 4-chloro-3-methylphenol, were determined by solid-phase microextraction (SPME) with 85 μm polyacrylate fibers and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The parameters affecting the SPME process (the pH, the addition of salt to the sample, and the time and temperature of the absorption step) were optimized. The method developed was applied to the analysis of water samples from Ebro River, marinas and fishing ports. The method enables these compounds to be detected at concentrations between 0.2 and 3.0 $\mu\text{g l}^{-1}$ under full scan conditions and between 0.05 and 0.08 $\mu\text{g l}^{-1}$ under SIM mode.

Keywords: Irgarol 1051; Dichlofluanid; 4-chloro-3-methylphenol, Water analysis.

INTRODUCTION

Several organic compounds with different chemical characteristics, such as pesticides, are currently added to paint formulations. Irgarol 1051, 4-chloro-3-methylphenol and dichlofluanid are some of these compounds. Irgarol 1051 is a biocide agent, which has recently been used in antifouling paints for boats and vessels, to substitute organotin compounds whose use has been restricted by European Union regulations [1]. To date, only a few studies have been published about this compound in environmental samples [1-3] and the concentrations found in marina waters range from 100 to 700 ng l⁻¹ [4]. Dichlofluanid and 4-chloro-3-methylphenol are fungicides, which are added to paints. Depending on where the paint is applied, these compounds can contaminate different environments, such as soil, water and air [2].

Pesticides are usually present at trace levels in aqueous samples. Consequently, the determination of these compounds involves preconcentration or extraction techniques. Irgarol 1051 and 4-chloro-3-methylphenol are usually determined by liquid-liquid extraction (LLE) [5] or solid phase extraction (SPE) [3,4,6,7] followed by gas chromatography (GC) [5,6] or high performance liquid chromatography (HPLC) [3,6]. Immunochemical techniques (ELISA) [9] have also been applied to determine Irgarol 1051. Only a few studies have been published to date about dichlofluanid in environmental samples. This compound is frequently determined in air samples by using GC and different trapping sorbents [8].

In the last few years, a new extraction technique, solid-phase microextraction (SPME), has been introduced by Pawliszyn and co-workers [10,11]. It is a further advance in the isolation of organic contaminants from aqueous samples at trace levels because it is a good alternative to the conventional extraction techniques, LLE and SPE. This new extraction technique is very simple, solvent-free, fast and easily automated [12].

To date, SPME has been successfully applied to the analysis of a wide range of organic compounds such as pesticides [13,14], phenols [15] and volatile organic compounds (VOCs) [16,17] in different matrices. To our knowledge, SPME has not been tested for determining Irgarol 1051 and dichlofluanid.

EXPERIMENTAL

Reagents and standards

The pesticides studied were two fungicides, 4-chloro-3-methylphenol and dichlofluanid, and one antifouling, Irgarol 1051. The fungicides were purchased from Riedel-de Haen (Seelze-Hannover, Germany) and they were more than 98% pure. Irgarol 1051 was supplied by Ciba-Geigy (Barcelona, Spain) with a purity of 100%. A stock standard solution of 2000 mg l⁻¹ of each compound was prepared in ethyl acetate. Working standard solutions were prepared by diluting the stock solutions with ethyl acetate. The stock and working standards were stored at 4°C in the refrigerator. Aqueous solutions (Milli-Q, tap and sea water) were prepared by spiking the water with an appropriate amount of the working solution.

Ethyl acetate was of PAR quality (for residue analysis) (Fisher Scientific, Leicestershire, UK). Water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). Helium carrier gas (99.995% quality) was supplied by Carbueros Metalicos (Tarragona, Spain). Sodium chloride with a purity of more than 99.5% was obtained from Probus (Barcelona, Spain).

Instrumentation

GC analyses were performed on a Hewlett-Packard 5890 Series II gas chromatograph (Palo Alto, CA, USA) equipped with a split/splitless injector and an HP5972 mass spectrometer. A Merlin microseal high pressure septum and an insert liner of 0.75 mm ID, both from Hewlett-Packard, were used. Analytes were separated using a Hewlett-Packard HP-1 fused-silica capillary column (cross-linked 5% methyl silicone) of 30 m x 0.25 mm with a phase thickness of 0.25 μm .

The optimized temperature program was as follows: the initial temperature was 80 °C, which was increased to 250 °C at 35 °C min⁻¹. This temperature was held for 8 min. The total run time was 16.65 min. The detector and the injector temperatures were set at 280 °C and 250 °C, respectively. The helium carrier gas was maintained at a flow rate of 1.8 ml min⁻¹. The samples were injected in splitless mode and the splitter was opened after 4.5 min (delay time). The injection volume in direct injection was 2 μl .

The conditions for electron impact ionization (EI) were an ion energy of 70 eV and the mass range scanned was 50-350 m/z under full-scan acquisition mode. In the selected ion monitoring (SIM) acquisition mode, two peaks of each compound studied were monitored. The MS was tuned to m/z 69, 219 and 502 for EI corresponding to perfluorobutylamine (PFBA).

The data were acquired with the HP Chemstation equipped with the mass spectral libraries Hppest and Wiley 138 which were used to compare the experimental spectra obtained.

SPME procedure

The SPME device and the 85 μm polyacrylate coated fibers were supplied by Supelco (Bellefonte, PA, USA). Before initial application, the fiber was

conditioned in the hot port of the gas chromatograph at 300 °C for 3 h, according to the instructions provided by the supplier. After the conditioning process, a fiber blank was run to confirm that there were no extraneous peaks which might have been due to contaminants introduced during the manufacture of the fiber.

For the SPME process, 3 ml of water samples spiked with an appropriate amount of each pesticide was introduced in 4 ml vials. The concentration of NaCl in the samples was 180 g l⁻¹, which is half the saturated concentration of NaCl in water, and the pH was not modified. In the extraction process, the fiber was directly immersed in the sample solution during 60 min at 60°C. The samples were heated with a heater unit from Selecta (Abrera, Spain) and continuously stirred magnetically. Finally, the compounds were thermally desorbed from the fiber in the gas chromatograph injector at 250 °C for 2 min. In real water samples the desorption time was increased to 5 min to avoid carryover effects. The performance of the fiber was checked and at least 40 samples were analyzed with the same fiber.

Samples from Ebro River, marinas and fishing ports were filtered through a 0.45- μ m membrane filter (MSI, Wetsboro, MA, USA) before analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Chromatographic separation

The separation of the three pesticides studied, Irgarol 1051, dichlofluanid and 4-chloro-3-methylphenol, was optimized before the parameters which affect the SPME process. The optimal conditions are reported in the experimental part.

The linearity of the response for each pesticide, the limits of detection (calculated by Winefordner and Long's method with the K value equal to 6 [18]), the repeatability and reproducibility of the response between days were studied under full scan and selected ion monitoring (SIM) by directly injecting 2 μ l of standard solutions in ethyl acetate. In the full scan mode, only the base peak of each pesticide (182 for Irgarol 1051, 123 for dichlofluanid and 107 for 4-chloro-3-methylphenol) was selected for quantifying. Two ions were selected from the spectrum of each compound to quantify the response under SIM mode: 182 (100) and 253 (71) for Irgarol 1051; 123 (100) and 167 (37) for dichlofluanid; and 107 (100) and 142 (96) for 4-chloro-3-methylphenol; the values in parentheses give the relative abundance (%) of each peak in the spectrum.

Optimization of the SPME process

Taking into account the characteristic of the compounds to be determined and previous experience of our group [13], a polyacrylate fiber was selected for this study.

The effect of various parameters on the SPME process was evaluated. The main parameters, the sample pH, the addition of NaCl to the sample, the temperature of the absorption process and the absorption time, were optimized by using standard solutions containing 30 μ g l⁻¹ of each pesticide in Milli-Q water under full scan acquisition mode. The absorption conditions chosen for the optimization process were 45 min at 40 °C. The desorption conditions were 2 min at 250 °C [13].

Effect of the pH. Three pH values were tested: the pH of the sample was about 6 and it was modified to values of 2.5 and 4 by adding hydrochloric acid before the SPME process. No salt was added. The results are shown in Figure 1a. The pH of the sample solution had no significant effect on the extraction efficiency of dichlofluanid, but higher pH values improved the recovery of

Irgarol 1051. For 4-chloro-3-methylphenol, the extraction was most efficient at pH 4, because the decrease in pH causes the acid-base equilibrium of the hydroxyl group to shift towards the neutral form, which has a higher affinity for the fiber [19]. On the basis of the results, the pH selected was pH 6, which means that the pH of the sample did not have to be modified.

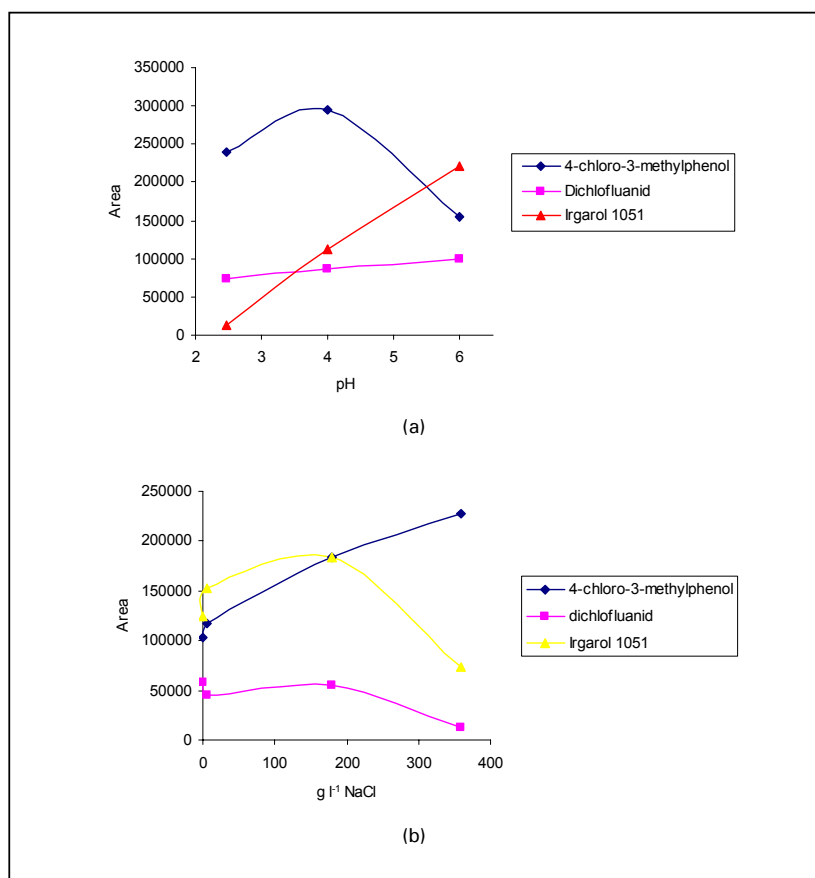


Figure 1. Effect of varying the pH (a) and the NaCl addition to the sample (b) for the three pesticides. For experimental conditions, see *SPME procedure*.

Effect of salt addition. The effect of increasing the ionic strength of the sample was determined with standard solutions containing 0-360 g l⁻¹ of sodium chloride. The data of Figure 1b show that the expected salting-out effect was indeed observed for 4-chloro-3-methylphenol [15] but the effect of Irgarol 1051 and dichlofluanid was rather limited; best results were obtained at 180 g l⁻¹, which was used in all further studies.

Effect of the temperature of the absorption process. Figure 2a shows that the amount of compounds extracted increases up at 60 °C that was selected for further work. The decrease at higher temperatures can be attributed to the exothermic nature of the absorption step [12-14].

Effect of the absorption time. Absorption times were varied from 30 to 90 min at an absorption temperature of 60°C. Figure 2b shows that the extraction efficiency depends on the compound studied. Equilibrium was reached within 60 min for all compounds and this absorption time was selected.

Analysis of real samples

Firstly, The performance of the method was tested with marina water samples. NaCl was added to sea water samples taking into account the initial NaCl concentration of these samples. The desorption time was 5 min to avoid memory effects. First, a blank of Tarragona marina water sample in the full scan mode was analyzed in order to verify the presence of different peaks at the same retention time as the pesticides being studied. Some peaks appeared in the blank chromatogram but none appeared at the retention times of the pesticides, so this sample was used as a blank. The linearity, limits of detection, and the repeatability and the reproducibility of the method were checked under full scan and SIM modes (Table 1). Although the levels that can be determined are low enough to detect Irgarol in marinas (typically 100-1700 ng l⁻¹) it does not enable low levels such as those that can be present in coastal and estuarine waters (1-40 ng l⁻¹). However, this level can be lowered

by using more sensitive detection, such as tandem mass spectrometry [4]. Figure 3 shows the chromatograms of a Tarragona marine water sample and the same sample spiked at $15 \mu\text{g l}^{-1}$ of each pesticide.

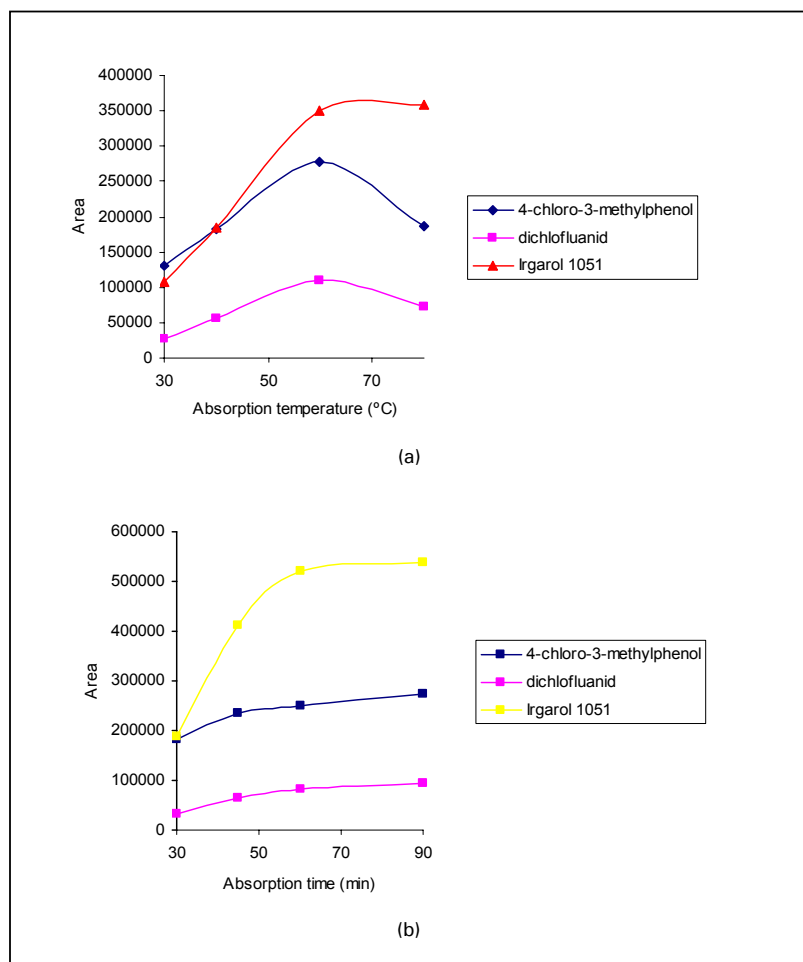


Figure 2. Effect of the temperature (a) and the time (b) of the absorption process on the amount of the pesticides extracted. For experimental conditions, see *SPME procedure*.

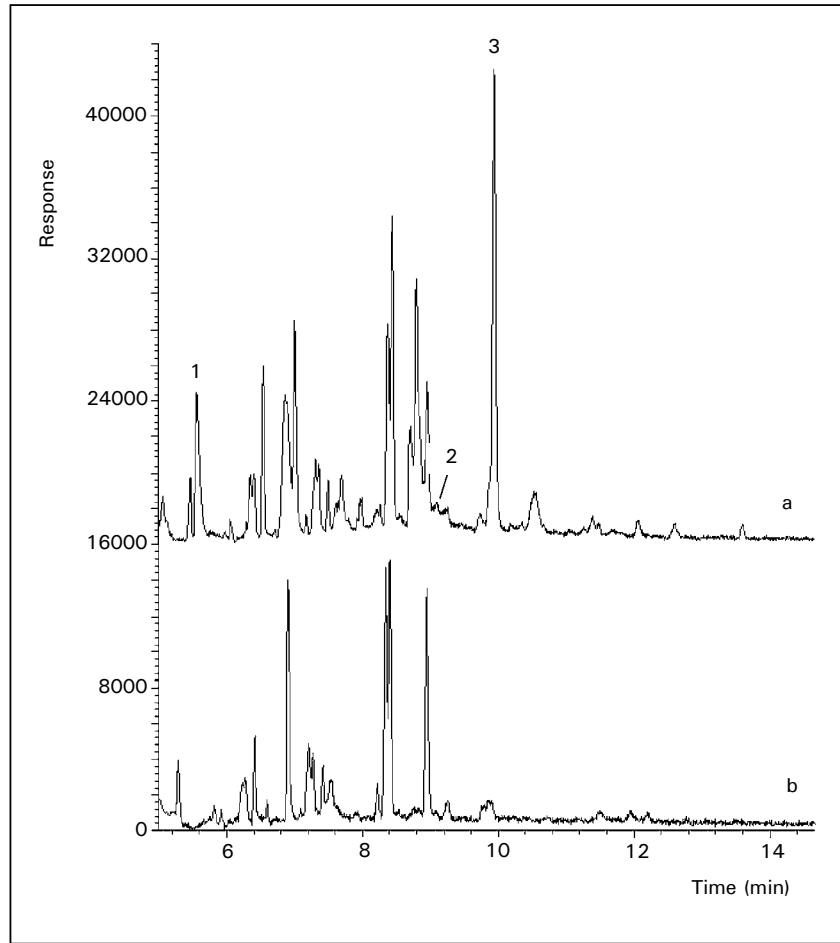


Figure 3. Chromatograms obtained by SPME-GC-MS under full scan mode of acquisition of (a) Tarragona marina water and (b) Tarragona marina water spiked with a standard solution of pesticides at a concentration of $15 \mu\text{g l}^{-1}$ level. Peak assignment: (1) 4-chloro-3-methylphenol, (2) dichlofluanid, (3) Irgarol 1051.

Table 1. Analytical data for SPME-GC-MS of target analytes in Tarragona marina water samples.

Compounds	Full Scan					SIM				
	Linear range ($\mu\text{g l}^{-1}$)	R ²	LOD ($\mu\text{g l}^{-1}$)	% Repeatability (n = 5) ^a	% Reproducibility (n = 5) ^a	Linear range ($\mu\text{g l}^{-1}$)	R ²	LOD ($\mu\text{g l}^{-1}$)	% Repeatability (n = 5) ^b	% Reproducibility (n = 5) ^b
4-chloro-3-methylphenol	2-30	0.9971	0.5	12	16	0.2-10	0.9963	0.06	12	13
Dichlofluanid	10-30	0.9999	3.0	24	26	0.2-10	0.9910	0.08	18	19
Irgarol 1051	1-30	0.9947	0.2	17	19	0.2-10	0.9989	0.05	10	15

^a Determined at 15 mg l⁻¹

^b Determined at 0.5 mg l⁻¹

Various marina, fishing port and Ebro river water samples were also analyzed by SPME-GC-MS under full scan mode, and Irgarol 1051 was detected in some of them. Figure 4 shows the total ion chromatogram obtained when a water sample from the fishing port in Cambrils (Tarragona) was analyzed by SPME-GC-MS under full scan acquisition mode. As can be observed, there is one peak that appears at the same retention time as Irgarol 1051 and the presence of this compound was confirmed by comparing the experimental spectrum and the corresponding standard. Figure 4 also shows the extracted ion chromatogram of Irgarol 1051 and the insert corresponding to the spectrum of the peak. However, it could not be quantified because Irgarol 1051 was found in a concentration between the detection limit and the quantification limit of the method. Quantification was possible when the SIM acquisition mode was used and the concentration of Irgarol 1051 was found to be $0.3 \mu\text{g l}^{-1}$.

CONCLUSIONS

SPME-GC can be used to rapidly determine Irgarol 1051, dichlofluanid and 4-chloro-3-methylphenol in different environmental waters. Optimum absorption required 60 min at 60 °C. NaCl should be added to improve the extraction efficiency; the pH of the samples was not modified. SPME-GC-MS enables the compounds studied to be determined at $0.2 \mu\text{g l}^{-1}$ in real water samples.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CICYT (AMB98-0913) and the authors thank Ciba-Geigy (Barcelona, Spain) for donating the Irgarol 1051.

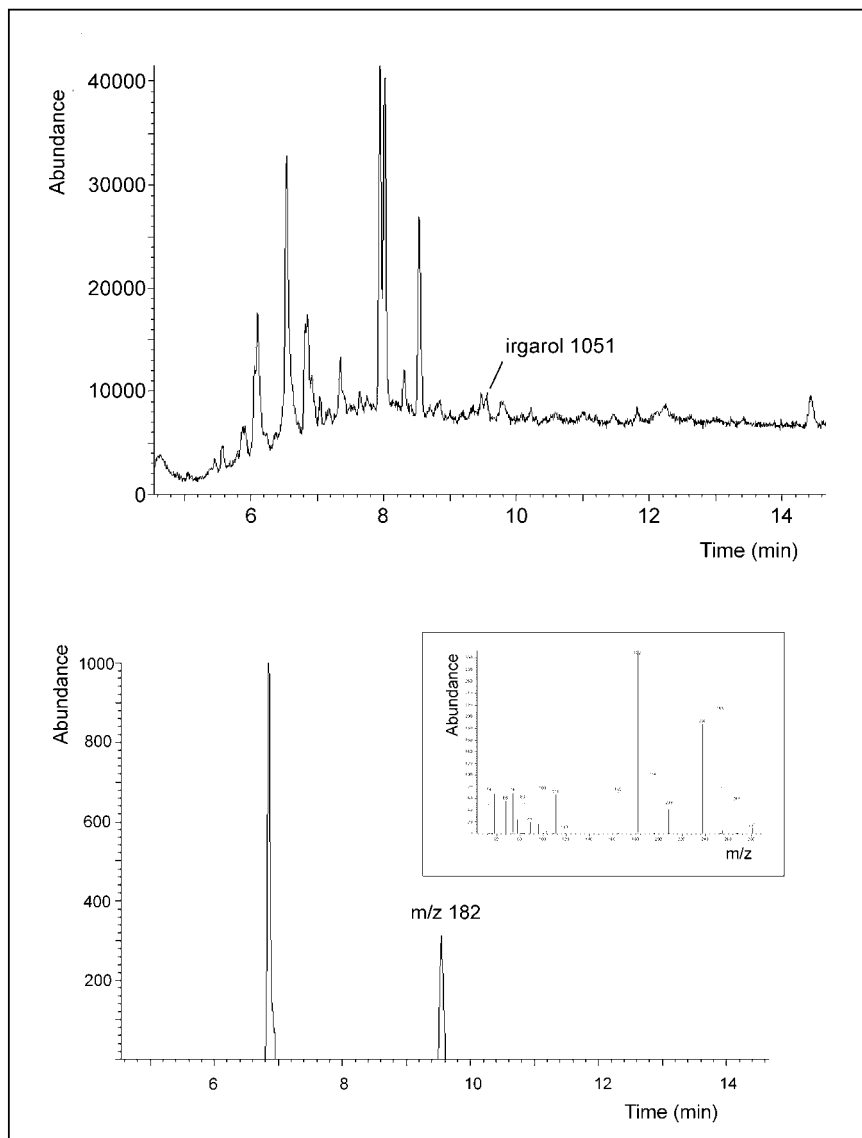


Figure 4. (a) Full scan chromatogram obtained by SPME-GC-MS of a water sample from the fishing port in Cambrils (Tarragona), and (b) the extracted-ion chromatogram of Irgarol 1051 (m/z 182). The insert in b shows the spectrum of the Irgarol 1051 peak.

REFERENCES

- [1] Europeene, C. Eur. Community, Off. J. Eur. Community 1989, 19.
- [2] I. Tolosa, J.W. Readman, A. Blaevoet, S. Ghilini, J. Bartocci and M. Horvat, Mar. Pollut. Bull., 32 (1996) 335.
- [3] I. Ferrer, B. Ballesteros, M.P. Marco, D. Barceló, Environ. Sci. Technol., 31 (1997) 3530.
- [4] R.J.C.A. Steen, P.E.G. Leonards, U.A.Th. Brinkman, W.P. Cofino, J. Chromatogr. A, 766 (1997) 153.
- [5] I. Tolosa, J.W. Readman, Anal. Chim. Acta, 335 (1996) 267.
- [6] S. Tólh, K. Becker-van Slooten, L. Spack, L.F. de Alencastro, J. Tarradellas, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 57 (1996) 426.
- [7] E. Pocurull, R.M. Marcé, F. Borrull, J. Chromatogr. A, 738 (1996) 1.
- [8] J. Siebers, P. Mattusch, Chemosphere, 33 (1996) 1597.
- [9] B. Ballesteros, D. Barceló, F. Camps, M.P. Marco, Anal. Chim. Acta, 347 (1997) 139.
- [10] C.L. Arthur, D.W. Potter, K.D. Buchholz, S. Motlagh, J. Pawliszyn, LC-GC Intl., 10 (1992) 10.
- [11] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Anal. Chem., 62 (1990) 2145.
- [12] J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction, Theory and Practice*, Wiley-VCH Inc., 1997.
- [13] C. Aguilar, S. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Chromatogr. A, 795 (1998) 105.
- [14] I. Valor, J.C. Moltó, D. Apraiz, G. Font, J. Chromatogr. A, 767 (1997) 195.
- [15] P. Barták, L. Cáp, J. Chromatogr. A, 767 (1997) 171.
- [16] T. Nilsson, R. Ferrari, S. Facchetti, Anal. Chim. Acta, 356 (1997) 113.
- [17] K.J. James, M.A. Stack, J. High Resol. Chromatogr., 19 (1996) 515.
- [18] R. Boqué, F.X. Rius, J. Chem. Educ., 70 (1993) 230.
- [19] K. Buchholtz, J. Pawliszyn, Anal. Chem., 66 (1994) 160.

**III.2. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS EN MICROEXTRACCIÓN EN FASE
SÓLIDA**

En el trabajo anterior se desarrolló un método analítico basado en SPME-GC-MS para la determinación de un grupo de plaguicidas en muestras acuosas. Para obtener la máxima sensibilidad, se optimizaron una serie de parámetros que se había visto en la bibliografía que afectaban al proceso de SPME: tiempo y temperatura de extracción, adición de NaCl a la muestra y pH. Éstos son los parámetros que generalmente se optimizan cuando se desarrolla un método analítico que incluye una etapa de SPME [1,2]. También se suelen optimizar los parámetros que afectan a la etapa de desorción. Así, si se lleva a cabo térmicamente en un GC, se optimizan la temperatura del inyector y el tiempo de permanencia de la fibra en éste (generalmente los tiempos son inferiores a 5 min.).

Sin embargo, existen otros parámetros que también pueden ser importantes cuando se desea desarrollar un método analítico, como son la utilización de un patrón interno durante todo el proceso de SPME o el efecto que produce el tiempo de almacenamiento de los analitos en la fibra. En consecuencia, antes de continuar con otros estudios que aplicaran la SPME a la determinación de otras familias de contaminantes orgánicos, se optó por estudiar si la utilización de un patrón interno durante el proceso de SPME podía ayudar a mejorar la precisión del método analítico. Otro parámetro, que había sido muy poco estudiado [3] hasta el momento de realización de este trabajo, es el efecto del tiempo de almacenamiento en la fibra. Este parámetro es interesante de cara a las posibilidades que presenta la SPME para el análisis de campo [3,4].

Para llevar a cabo el estudio del efecto de estos dos parámetros en la SPME, se seleccionaron un grupo de plaguicidas de diferentes familias: dos triazinas (irgarol 1051 y atrazina), dos plaguicidas organoclorados (lindano y dieldrín) y un tiocarbamato (molinato). La presencia de alguno de estos compuestos en muestras de agua había sido extensamente estudiada debido a su toxicidad y persistencia [5] y se habían encontrado en muestras de agua de la zona geográfica de Tarragona que es donde se ha aplicado este estudio [6,7,8]. Además, como ya se habían desarrollado previamente diferentes

métodos analíticos basados en SPME para la determinación de estos compuestos, las condiciones de trabajo eran conocidas [6,7,8]. En consecuencia, las condiciones de separación (GC-MS) y de extracción mediante SPME fueron seleccionadas a partir de las condiciones descritas en estos estudios.

En primer lugar se procedió a determinar si la adición de un patrón interno cromatográfico durante todo el proceso de SPME mejoraba la repetibilidad y la reproducibilidad entre días del método analítico. Los resultados obtenidos mediante la calibración por patrones externos fueron comparados con los que se obtuvieron al añadir un patrón interno mediante una serie de tests estadísticos, en los que se comparaban las pendientes y las varianzas de las pendientes de las curvas de calibrado para cada analito, que indicaron que para los compuestos estudiados la calibración utilizando un patrón interno era estadísticamente comparable a la calibración por patrones externos. Actualmente no existen muchos trabajos que hayan estudiado el efecto del patrón interno en el proceso de SPME [9,10] y en algunos de ellos se recomienda la utilización de un patrón interno o *surrogate* [9] cuando se analizan muestras muy complejas como suelos o muestras biológicas.

El efecto de tiempo de almacenamiento en la fibra de PA fue determinado variando el tiempo que transcurría entre la finalización de la etapa de absorción y la posterior desorción de los compuestos en el inyector del cromatógrafo de gases. La finalidad de estudiar el efecto de este parámetro era determinar si existía una disminución de la respuesta de los analitos si la desorción de éstos no se realizaba inmediatamente tras la etapa de absorción. En caso que la respuesta no se viera afectada, permitiría aplicar la SPME al análisis de campo, que es una línea de investigación en la que actualmente ya se han realizado algunos estudios, sobre todo utilizando TWA-SPME [11]. Se estudiaron diferentes tiempos de almacenamiento que oscilaron entre los 0 min. y los 900 min. y los resultados mostraron que se producía una ligera disminución de la respuesta de todos analitos, excepto para el irgarol 1051, compuesto para el que la disminución era bastante

significativa, a partir de los 30 min. Después de este tiempo, la respuesta se mantuvo prácticamente constante. La mayor disminución de la respuesta para el irgarol 1051 se debió probablemente a procesos de degradación de éste en la superficie de la fibra.

El efecto del tiempo de almacenamiento de los analitos en la fibra es un parámetro sobre el que no se han realizado prácticamente estudios hasta la fecha, aunque recientemente Llompart *et al.* [12] han realizado un trabajo en el que se estudia la cinética de degradación del p,p'-DDT y o,p'-DDT en la superficie de la fibra de SPME y en solución acuosa. Los resultados obtenidos por estos autores para estos plaguicidas indican que la degradación en la superficie de la fibra es más lenta que la observada en solución acuosa.

Tras la bibliografía, se incluye un resumen de los resultados obtenidos en la realización de este estudio y que han sido publicados en la revista científica *Chromatographia*, 50 (2000) 685-688.

Bibliografía

- [1] J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*, Wiley-VCH Inc., New York, 1997.
- [2] J. Dugay, C. Miega, M.C. Hennion, *J. Chromatogr. A*, 795 (1998) 27.
- [3] Nota de Aplicación n. 143, Supelco.
- [4] R.E. Shirey, R.F. Mindrup, *Presentation at the Pittsburgh Conference*, March 1998.
- [5] G.P. Jackson, A.R.J. Andrews, *Analyst*, 123 (1998) 1085.
- [6] C. Aguilar, S. Peñalver, E. Pocrull, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, 795 (1998) 105.
- [7] C. Aguilar, A. Peñalver, E. Pocrull, J. Ferré, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, 844 (1999) 425.
- [8] A. Peñalver, E. Pocrull, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*,

- 839 (1999) 253.
- [9] M. Natangelo, S. Tavazzi, E. Benfenatti, *Anal. Let.*, 35 (2002) 327.
- [10] S.A. Coach, V. Giannellini, V. Furlanetto, M. Bambagiotti, M. Alberti, S. Pinzauti, *J. Chromatogr. A*, 915 (2001) 209.
- [11] P.A. Martos, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 1513.
- [12] M. Llompart, M. Lores, M. Lourido, L. Sánchez-Prado, R. Cela, Presentación en *25th International Symposium on Capillary Chromatography*, Riva del Garda, Italia, Mayo 2002.

EVALUATION OF DIFFERENT PARAMETERS IN THE SOLID-PHASE MICROEXTRACTION PROCESS

ABSTRACT

Solid-phase microextraction has been used successfully to determine organic pollutants in environmental samples. To date, absorption and desorption conditions in SPME have been widely studied. This paper evaluates the effect of other parameters in the SPME process, such as storage time and the addition of an internal standard to the sample, for a group of five pesticides (irgarol 1051, atrazine, lindane, dieldrin and molinate) in aqueous samples. Adding an internal standard to the sample does not improve the repeatability and the reproducibility of the results. A storage time of 900 minutes does not significantly decrease the response of any of the pesticides studied except irgarol 1051. Storage times of less than 15 minutes were needed to determine this pesticide without a decrease in the response.

Keywords: Solid-phase microextraction; Pesticides; Aqueous samples; Optimization

INTRODUCTION

Solid-phase microextraction (SPME) is an extraction technique recently introduced by Pawliszyn and coworkers [1] that has some advantages over the conventional sample preparation techniques such as solid-phase extraction (SPE) and liquid-liquid extraction (LLE). It is solvent-free, usually only small volumes of sample are required, and it is easy to use and to automate.

The SPME process can be divided into two steps: first the analytes are absorbed by a coated fused silica fiber and then the retained analytes are desorbed into the analytical instrument. The desorption step is usually performed in a gas chromatograph (GC) [1]. Applications of SPME in which the desorption step is performed in a high-resolution liquid chromatograph (HPLC) [2] and in capillary electrophoresis (CE) [3] have been developed more recently. Also, a modified SPME device for applying this technique in field analysis has recently been presented but to date few studies have been published [1,4].

Since the introduction of SPME, different types of fibers have been developed for increasing the range of compounds to which SPME can be applied. Fibers containing more porous and adsorbent materials, such as carboxen and divinylbenzene, have been added to the first commercially available SPME fibers, polydimethylsiloxane (PDMS) and polyacrylate (PA). SPME can therefore be used to extract volatile, semivolatile and nonvolatile compounds in gaseous, liquid and solid samples. Environmental pollutants, such as pesticides [5-8] and phenols [9,10], were the first compounds determined by SPME but its use today has extended to a wide range of organic compounds including flavors [11] and pharmaceuticals [12].

The different parameters that can affect the SPME process, such as the time and temperature of the absorption and desorption steps, the modification of the pH, the addition of salt to the sample and the sample

volume have been widely investigated and optimized to increase the amount of analyte extracted by the fiber [1,13]. The main objective of this paper is to evaluate the effect of other less-studied parameters such as the introduction of an internal standard and the effect of the storage time between the absorption and desorption steps in the SPME process, which is interesting because of the recent advances of SPME in field analysis [4].

EXPERIMENTAL

Reagents and standards

The pesticides selected were: irgarol 1051, atrazine, lindane, dieldrin and molinate. They were all purchased from Riedel-de H en (Seelze, Hannover, Germany) except irgarol 1051 which was donated by Ciba-Geigy (Barcelona, Spain) and all were more than 98% pure. The stock standard and working solutions were prepared in ethyl acetate. Aqueous solutions were prepared by diluting the working solution in Ebro river water. The internal standard, endosulfan sulfate (99.9% purity), was supplied by Riedel-de H en.

Ethyl acetate was of PAR quality (for residue analysis) (Fisher Scientific, Leicestershire, United Kingdom). Ultra-pure water was obtained from the Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) water purification system. Helium was supplied by Carburos Metálicos (Tarragona, Spain). Sodium chloride with a purity of more than 99.5% was supplied by Probus (Barcelona, Spain).

Instrumentation

Gas chromatographic analyses were performed on a Hewlett-Packard 5890 Series II chromatograph (Palo Alto, CA, USA) equipped with a split/splitless injector and an HP5972 mass spectrometer detector. A Merlin microseal

high pressure septum and an insert liner of 0.75 mm ID, both from Hewlett-Packard, were used. Pesticides were separated by a Hewlett-Packard HP-5MS fused-silica capillary column (cross-linked 5% methyl silicone) of 30 m x 0.25 mm with a phase thickness of 0.25 μm .

The oven temperature profile was as follows: the initial temperature was 80°C, which was increased to 180 °C at 30 °C min⁻¹, and then to 250 °C at 5°C min⁻¹. This temperature was held for 5 min. The total run time was 22.33 min. The detector and the injector temperatures were set at 280 °C and 250 °C, respectively. Helium was the carrier gas and the initial flow rate was 1.8 ml min⁻¹. In direct injection, splitless mode was used and the injection volume was 2 μl .

The conditions for electron impact ionization were: an ion energy of 70 eV and the mass range scanned was 50-350 m/z under full scan acquisition mode. The MS was tuned to m/z 69, 219, and 502 for EI corresponding to perfluorobutylamine (PFBA). The data were acquired with the HP Chemstation equipped with the mass spectral libraries Hppest and Wiley 138.

SPME procedure

The SPME device and the 85 μm polyacrylate coated fibers were supplied by Supelco (Bellefonte, PA, USA). The fiber conditioning process was the same described in a previous paper [5].

For the SPME process, 3 ml of aqueous solutions were introduced in 4 ml vials. The NaCl concentration in all aqueous samples was 180 g l⁻¹, which corresponds to the half-saturated concentration of NaCl, in water and the samples were continuously stirred. During the extraction process the fiber was directly immersed in the aqueous solution for 45 min at 55 °C. The samples were heated and stirred with a magnetic stirrer and heater unit from

Selecta (Abrera, Spain). Desorption was achieved by placing the fiber in the injection port of a gas chromatograph for 5 min at 250 °C. Ebro river samples were filtered through a 0.45 μm membrane filter (MSI, Wetsboro, MA, USA) before analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Chromatographic separation

The chromatographic conditions for separating the pesticides and the internal standard were optimized from the conditions described in previous papers [5,8,14]. The optimal conditions are reported in the experimental section. These pesticides can be divided into three groups: triazines (irgarol 1051 and atrazine), tiocarbamates (molinate) and organochlorine pesticides (lindane and dieldrin). Their presence in water samples has been widely studied [5,6] because of their toxicity and persistence in the environment. They have been selected because they are present in the water samples of the geographical area under study and have also been included in previous papers, so their optimal conditions for SPME are known [5,8,14].

Previous papers have also studied the linearity of the response for each pesticide in direct injection mode, the correlation coefficients, the limits of detection and the repeatability and reproducibility of the method under full scan acquisition mode [5,8,14].

Optimization of the SPME process

The effect of the time and temperature of absorption and desorption steps in SPME process for these pesticides, as well as the effect of adding salt to the sample and modifying the pH have been evaluated in previous

experiences of the group [5,8,14]. The values of these parameters have therefore not been optimized in this paper and the optimized values have been selected from the results of the previous ones. The SPME conditions selected were 45 min at 55 °C for the absorption step and 5 min at 280 °C for the desorption step. The concentration of NaCl in the aqueous samples was 180 g l⁻¹ and the pH was not modified. Adding salt to the sample enhances the amount extracted for most pesticides because it increases the ionic strength of the sample. This increase in the ionic strength decreases the solubility of the pesticides in the aqueous phase and enhances their diffusion towards the fiber. This effect is not general and depends mainly on the characteristics of the analyte, fiber and sample. Polyacrylate was the fiber selected because it has been successfully used in previous works [5,8,14] for the pesticides studied.

Effect of the internal standard on the SPME process

The injection step in gas chromatography and the use of a preconcentration technique before the analytes are separated can decrease the repeatability and reproducibility of the results. Internal calibration mode is commonly used to minimize this problem. To date, few studies into the effect of introducing an internal standard to the sample in SPME have been made.

To test how adding an internal standard affects the quantification of the pesticides, the linear range, the correlation coefficients, the limits of detection and the repeatability and reproducibility in both external and internal standard calibration modes were determined under full scan acquisition mode. The internal standard selected was endosulfan sulfate. It was added to the Ebro river water samples in a concentration of 40 µg l⁻¹.

Table 1 shows the linear range, the coefficients of determination (r^2) and the repeatability and reproducibility, expressed as relative standard deviation (RSD), for both internal and external calibration modes. The repeatability

($n=6$) and the reproducibility between days ($n=6$) of the method were calculated by analyzing an Ebro river water sample spiked with $1 \mu\text{g l}^{-1}$ of each pesticide and $40 \mu\text{g l}^{-1}$ of endosulfan sulfate. Figure 1 shows the chromatograms corresponding to the Ebro river water blank and one of these spiked samples. The limits of detection of the method were calculated by Winefordner and Long's method with the value of K equal to 6 [16]. They were between 0.003 and $0.3 \mu\text{g l}^{-1}$ in both external and internal calibration modes.

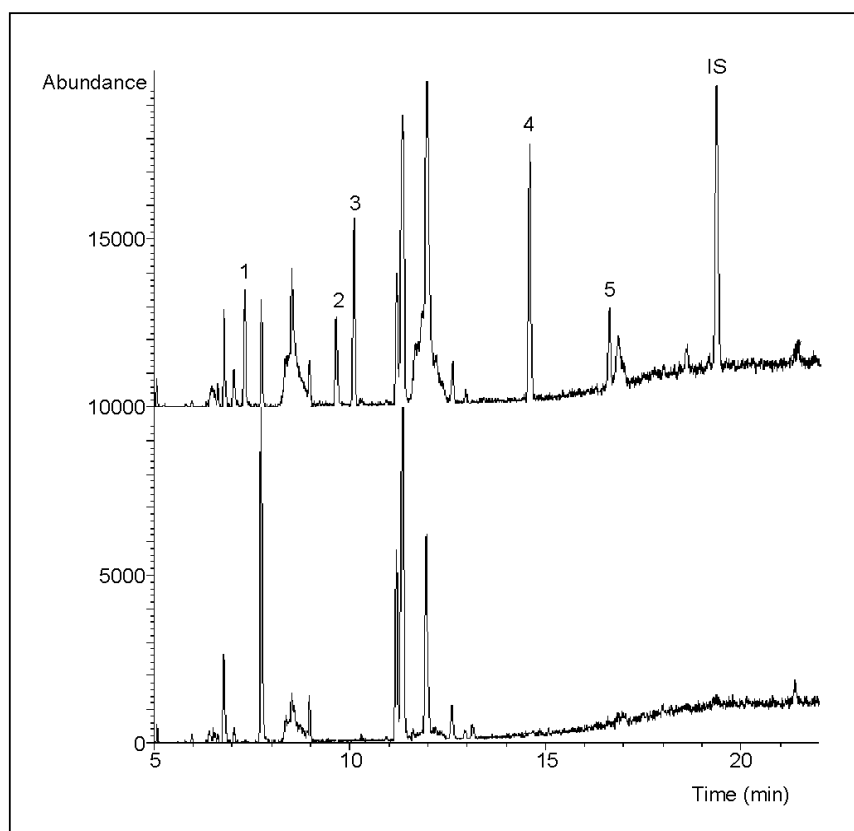


Figure 1. Chromatograms obtained by SPME-GC-MS of: (a) Ebro river water, and (b) Ebro river water sample spiked with $1 \mu\text{g l}^{-1}$ of each pesticide and $40 \mu\text{g l}^{-1}$ of internal standard. Peak assignment: (1) molinate; (2) atrazine; (3) lindane; (4) irgarol 1051; (5) dieldrin.

Table 1. Linear range, determination coefficients and repeatability and reproducibility for Ebro river water by SPME-GC-MS using full scan acquisition mode in both external and internal calibration modes.

Compounds	Linear range ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Without internal standard			With internal standard		
		r^2	RSD (n = 6) ^a	RSD (n = 6) ^b	r^2	RSD (n = 6) ^a	RSD (n = 6) ^b
Molinate	0.05-25	0.9971	3.7	7.7	0.9964	3.5	6.8
Atrazine	0.1-25	0.9963	2.4	4.7	0.9943	2.1	3.0
Lindane	0.05-25	0.9939	2.2	7.2	0.9930	3.6	7.9
Irgarol 1051	0.05-25	0.9943	2.3	3.1	0.9926	2.8	2.8
Dieldrin	0.05-25	0.9962	8.6	11.6	0.9995	7.8	13.5

^a In repeatability conditions.

^b In reproducibility between days conditions.

As can be seen in Table 1, introducing an internal standard in the sample does not improve the repeatability and reproducibility between days. A test F was made to determine if the values of RSD in both external and internal calibration mode were significantly different. The values were not different with a level of confidence (α) equal to 0.05.

The values of RSD in this study are lower than those obtained in previous ones [5,8,14] but they are agree with values obtained by other authors for similar compounds [7,15]. These changes in the repeatability and the reproducibility may be due to differences in the sample matrix, which can increase or decrease the RSD values.

Effect of the storage time

It was evaluated the decrease in the response of the compounds when they remain stored in the 85 μm polyacrylate fiber for a period of time before they are desorbed in the gas chromatograph. This parameter is interesting for checking the use of SPME in field analysis but it has not yet been fully investigated.

Standard solutions of 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ of each pesticide in Ebro river water under full scan acquisition mode were analyzed at different times of storage. Internal standard was not added to the aqueous samples since this parameter has no important effect on the repeatability and reproducibility of the SPME process.

The time periods studied were 0, 5, 15, 30, 60, 120 and 900 minutes. Each experiment was repeated three times and the mean of the response for each pesticide was calculated. Relative standard deviation (RSD) ranged from 2.4 to 11.5% for 120 minutes of storage time. During this time, the fiber was placed in an empty vial with a septum to prevent the fiber from being contaminated by interferences that may be present in the air. Standard

solutions of $5 \mu\text{g l}^{-1}$ of each pesticide in Ebro river water under full scan acquisition mode were analyzed at different times of storage. Figure 2 shows the effect of storage time on the response of each pesticide.

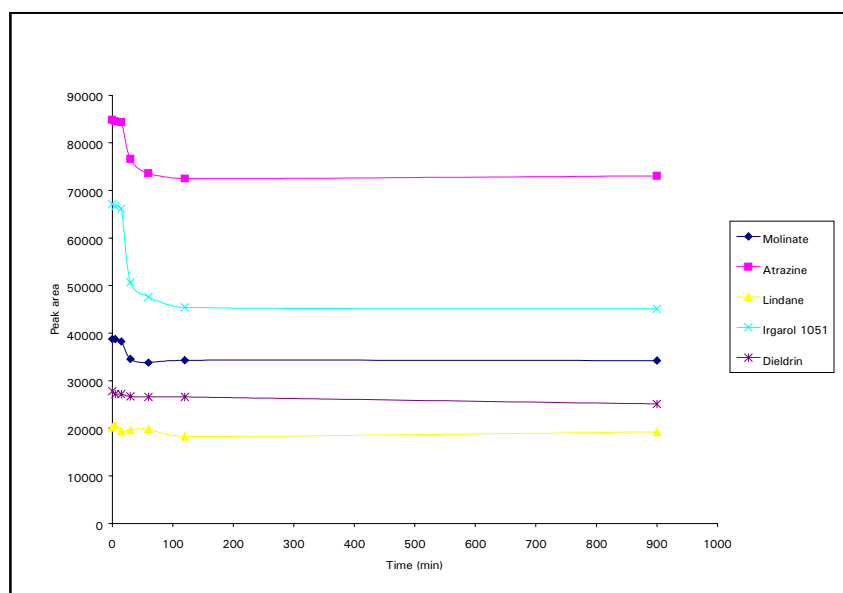


Figure 2. Effect of varying the storage time on the amount of pesticide extracted. For experimental conditions, see section 3.

For all pesticides there was observed a slight decrease in the response after 30 minutes. This decrease may be due to volatilization or degradation processes of the compounds retained into the fiber. Table 2 shows the percentage of decrease in the response from 0 minutes to 30 minutes for all pesticides. After this time, the response remained almost constant. A t-student test was made in to determine if the values of the responses obtained at 0 minutes of storage time were significantly different from those at 900 minutes of storage time. They were significantly different only for irgarol 1051 at a level of significance (α) of 0.05. For this compound, the response did not show a significant decrease until 15 minutes.

Table 2. Percentage of decrease (R.S.D.) in the response after 30 minutes of storage.

Compound	Percentage decrease
Molinate	-10.8
Atrazine	-9.7
Lindane	-2.6
Irgarol 1051	-24.4
Dieldrin	-4.0

So, for determining all pesticides except irgarol 1051, storage times of 900 minutes can be applied without a decrease in response. On the other hand, for irgarol 1051, the storage time should be less than 15 minutes. Shirey *et al.* [4] also observed a decrease in the response of volatile organic compounds (VOCs) at different storage times for 100 μm polydimethylsiloxane (PDMS). They reported decreases of 100% in PDMS after three days of storage and evaluated the effect of the storage temperature on the decrease of the response. The same study was made for carboxen/PDMS. The response with these fibers did not decrease much over long periods of time, so they are suitable for field analyses.

CONCLUSIONS

Adding an internal standard to the sample did not improve the repeatability and reproducibility of the results. External calibration mode is therefore sufficient to quantify in SPME.

Storage times of 900 minutes did not significantly decrease the response for any of the pesticides studied except irgarol 1051. For this compound storage times of less than 15 minutes are needed to avoid a decrease in the response.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported financially by CICYT (95-0243-OP) and the Consorci d'Aigües de Tarragona. A. Peñalver would like to thank the Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica for a predoctoral grant.

The authors thank Ciba-Geigy (Barcelona, Spain) for donating the Irgarol 1051.

REFERENCES

- [1] J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*, Wiley-VCH Inc., New York, 1997.
- [2] K. Jinno, T. Muramatsu, Y. Saito, Y. Kiso, S. Magdic, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A*, 754(1996) 137.
- [3] C.W. Whang, J. Pawliszyn, *Anal. Commun.*, 35 (1998) 353.
- [4] R.E. Shirey, R.F. Mindrup, *Presentation at the Pittsburgh Conference*, March 1998.
- [5] C. Aguilar, S. Peñalver, E. Pocerull, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, 795 (1997) 105.
- [6] G.P. Jackson, A.R.J. Andrews, *Analyst*, 123 (1998) 1085.
- [7] J. Beltran, F.J. López, O. Ceprià, F. Hernández, *J. Chromatogr. A*, 808 (1998) 257.
- [8] C. Aguilar, A. Peñalver, E. Pocerull, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, 795 (1998) 105.
- [9] K.D. Buchholz, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 160.
- [10] M. Moder, S. Schrader, U. Franck, P. Popp, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 357 (1997) 326.
- [11] T. Peppard, X. Yang, *J. Agric. Food Chem.*, 42 (1994) 639.
- [12] H.L. Lord, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 3899.

- [13] J. Dugay, C. Miede, M.C. Hennion, *J. Chromatogr. A*, 795 (1998) 27.
- [14] C. Aguilar, A. Peñalver, E. Pocurull, J. Ferré, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, 844 (1999) 253.
- [15] I. Valor, J.C. Moltó, D. Apraiz, G. Font, *J. Chromatogr. A*, 767 (1997) 195.
- [16] R. Boqué, F.X. Rius, *J. Chem. Educ.*, 70 (1993) 230.

**III.3. DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN MUESTRAS DE AGUA MEDIANTE
MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES-
ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

Otra familia de compuestos de interés en el campo del análisis medioambiental son los ésteres ftálicos o ftalatos (PAEs). Estos compuestos se utilizan como plastificantes en la manufactura de muchos plásticos, sobre todo del PVC, por lo que su uso actualmente está muy extendido [1]. Sin embargo, su utilización está en controversia debido a que varios estudios han indicado que los ftalatos podrían estar relacionados con diferentes alteraciones observadas en el sistema endocrino y reproductor de algunos seres vivos [2,3]. En consecuencia, algunos de los ftalatos más utilizados han sido incluidos en las listas de contaminantes prioritarios de muchos países. Por ejemplo, la Agencia Americana de Protección Ambiental (EPA) establece que la concentración máxima admisible (MAC) en aguas de consumo para el bis(2-etilhexil) ftalato (DEHP), el ftalato más utilizado, es de $6 \mu\text{g l}^{-1}$ [4]. La Unión Europea, en cambio, aún no ha establecido ninguna concentración máxima permitida para esta familia de compuestos aunque ya ha incluido algunos de ellos en la lista de contaminantes prioritarios [5].

El objetivo de este estudio fue el desarrollo de un método analítico para la determinación de un grupo de ftalatos mediante el uso de la SPME combinada con la GC-MS. Los ftalatos incluidos en este estudio son los siguientes: dimetilftalato (DMP), dietilftalato (DEP), di-n-butilftalato (DnBP), butilbencilftalato (BBP), DEHP y di-n-octilftalato (DnOP), además del bis(2-etilhexil) adipato, que es un compuesto que también se utiliza como plastificante y está incluido en las listas de contaminantes. Los métodos analíticos utilizados para la determinación de estos compuestos en muestras de agua generalmente se basan en la utilización de la GC o la HPLC junto con la SPE o LLE como técnicas de preconcentración [6,7]. Cuando se planteó este trabajo, se habían desarrollado pocos métodos analíticos basados en la SPME que permitieran la determinación de ftalatos en muestras de agua por lo que se confirmó el interés en estudiar si la SPME podía ser una técnica adecuada para la preconcentración de esta familia de compuestos. Por ejemplo, Kelly *et al.* [8] habían desarrollado un método basado en SPME-HPLC-UV para la determinación de uno de los compuestos incluidos en este estudio, el dietilftalato (DEP).

La fibra seleccionada para llevar a cabo este estudio fue la de 85 μm de poliacrilato ya que se mostraba adecuada para la extracción de estos compuestos teniendo en cuenta las características de polaridad de los ftalatos. Así, se optimizaron los diferentes parámetros de la SPME que pueden afectar el proceso de extracción y desorción y cuyo efecto ya se había estudiado para la extracción de diferentes grupos de plaguicidas [9-12]. Una vez optimizados los parámetros, se procedió a la validación del método analítico desarrollado y se analizaron diferentes muestras de agua de los puertos pesqueros e industriales de Tarragona y del río Ebro. También se analizaron aguas minerales de varias marcas comerciales que estaban embotelladas en recipientes de diferentes materiales y se intentó determinar si la presencia de determinados ftalatos (DEP, DnBP y DEHP) podía relacionarse con el material del recipiente que contenía las diferentes aguas minerales.

La principal problemática que presenta el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de ftalatos es la precaución que se debe tener al seleccionar y limpiar el material que se va a utilizar durante los análisis ya que de lo contrario pueden, fácilmente, aparecer problemas de contaminación. Esto se debe, principalmente, a que, en la actualidad, el uso de alguno de estos compuestos está muy extendido. Así, por ejemplo, se debe evitar, en la medida de lo posible, el uso de material de plástico para contener las muestras y se debe tener un gran cuidado en la limpieza del material de vidrio utilizado para llevar a cabo la extracción mediante SPME.

Los resultados obtenidos en la elaboración de este estudio fueron publicados en la revista *Journal of Chromatography A*, 872 (2000) 191-201 y se adjuntan a continuación.

Bibliografía

- [1] M. Castillo, D. Barceló, A.S. Pereira, F.R. Aquino Neto, *Trends Anal. Chem.*, 18 (1999) 26.
- [2] M. Castillo, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.*, 16 (1997), 574.
- [3] S. Jobling, T. Reynolds, R. White, M.G. Parker, J.P. Sumpter, *Environm. Health Persp.*, 103(6) (1995) 582.
- [4] *Environmental Protect Agency, Federal register; Part 12 CFR parts 141, 142 and 143; National primary drinking water regulations*, July 1st 1991.
- [5] Lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, Diario Oficial de las Comunidades Europeas, Decisión 2455/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo, Noviembre 2001.
- [6] M. Castillo, A. Oubiña, D. Barceló, *Environ. Sci. Technol.*, 32 (1998) 225.
- [7] K. Holadová, J. Hajslová, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 59 (1995) 43.
- [8] M.T. Kelly, M. Larroque, *J. Chromatogr. A*, 839 (1999) 177.
- [9] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, 839 (1999) 253.
- [10] C. Aguilar, S. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, 795 (1998) 105.
- [11] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *Chromatographia*, 50 (2000) 685.
- [12] C. Aguilar, A. Peñalver, E. Pocurull, J. Ferré, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, 844 (1999) 425.

DETERMINATION OF PHTHALATE ESTERS IN WATER SAMPLES BY SOLID-PHASE MICROEXTRACTION AND GAS CHROMATOGRAPHY WITH MASS SPECTROMETRIC DETECTION**ABSTRACT**

Solid-phase microextraction (SPME) with an 85 μm polyacrylate fiber, coupled to gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used to determine six phthalate esters and bis(2-ethylhexyl) adipate in water samples. The variables affecting the SPME absorption process were optimized and the method developed was applied to analyze both tap and commercial mineral water samples as well as water from the Ebro river and fishing and industrial ports. The linear range in full scan acquisition mode was between 0.02 and 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ for most compounds, and the limits of detection of the method were between 0.006 and 0.17 $\mu\text{g l}^{-1}$. Commercial water samples contained in recipients which were made from different materials were analyzed, and the influence of the material of the recipients on the concentration of phthalates was evaluated.

Keywords: Solid-phase microextraction; Water analysis; Phthalate esters

INTRODUCTION

Phthalate esters are widely used as additives in the manufacture of plastics, mainly PVC, to make them flexible. Because of their properties as plasticizers, in recent years phthalates have been produced and used significantly more and, as a result, they are often found in environmental matrices such as waters and soils [1-3]. Little is known about the possible effects of these substances on the environment and human health [5] but some recent studies have shown that they may cause hormone disrupting activity [3,4].

The most commonly used phthalates (dimethyl-, diethyl-, di-n-butyl-, butylbenzyl, bis(2-ethylhexyl)- and di-n-octyl phthalate esters) have been included on the list of priority pollutants in several countries. Another compound, which is used as a plasticizer and which also appears in these lists, is the bis(2-ethylhexyl) adipate, and for this reason it was also included in this study. For example, the Environmental Protection Agency (EPA) has established a maximum admissible concentration (MAC) in water of $6 \mu\text{g l}^{-1}$ for the bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and 0.4 mg l^{-1} for the bis(2-ethylhexyl) adipate [6]. The bis(2-ethylhexyl) phthalate is the most used and it represents a quarter of the total production of plasticizers [7]. The European Union (EU) has not set any regulations on the maximum concentration allowed for phthalates or for bis(2-ethylhexyl) adipate on water, but they will probably be established in the near future.

Gas chromatography (GC) [1,2,8,9] and high resolution liquid chromatography (HPLC) [4,10] have been used for determining these compounds in water samples but when the levels of concentration are low, a previous enrichment step is usually needed. The preconcentration techniques which are commonly applied to determine phthalates in water are liquid-liquid extraction (LLE) [2,9] with dichloromethane or hexane, and solid-phase extraction (SPE) [2,4,10]. Solid-phase microextraction (SPME) is a preconcentration technique which has recently been introduced for the

extraction of organic compounds [11-17]. To our knowledge, there are only few papers in which the suitability of SPME has been tested for the extraction of phthalates esters [12,14,15]. Möder *et al.* [12] extracted some phthalates in a study on the characterization of water-soluble compounds of slurries by a SPME-HPLC-MS method, and Kelly and Larroque [14] used SPME-HPLC-UV to determine diethylphthalate in water samples. These studies have used polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) [14] and Carbowax-coated [12] fibers.

The main aim of this study was to develop a method for determining the six phthalates mentioned above and the bis(2-ethylhexyl) adipate in water samples using solid-phase microextraction as the preconcentration technique and gas chromatography with mass spectrometric detection (GC-MS). The experimental conditions for SPME were optimized and the method was validated under the best conditions with real water samples.

EXPERIMENTAL

Reagents and standards

The compounds studied were dimethyl- (DMP), diethyl- (DEP), di-n-butyl- (DnBP), butylbenzyl (BBP), bis(2-ethylhexyl)- (DEHP), and di-n-octyl (DnOP) phthalate esters, and the bis(2-ethylhexyl) adipate ester. The phthalate esters were purchased from Riedel-de Hën (Seelze-Hannover, Germany) and the adipate from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany). All the compounds were more than 98% pure.

A stock standard solution of 2000 mg l⁻¹ of each compound was prepared in ethyl acetate. Working standard solutions of 100 mg l⁻¹ were prepared weekly in ethyl acetate. Stock and working standards were stored at 4 °C in

the refrigerator. The aqueous solutions were prepared daily by diluting the working solution with water (Milli-Q, tap, sea, river and drinking water).

Ethyl acetate was of Suprasolv quality (for organic trace analysis) and Methanol of Lichrosolv quality (for liquid chromatography) and they were both supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Sodium chloride, more than 99.5% pure, was obtained from Prolabo (Fontenay S. Bois, France). Water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). Helium carrier gas (99.995% quality) was supplied by Carburos Metálicos (Tarragona, Spain).

Instrumentation

Gas chromatographic analyses were performed on a Hewlett-Packard 5890 Series II gas chromatograph (Palo Alto, CA, USA) equipped with a split-splitless injector and an HP 5972 mass spectrometer. A Merlin microseal high pressure septum and an insert liner of 0.75 mm ID, both from Hewlett-Packard, were used. A Hewlett-Packard HP-5MS fused silica capillary column (cross-linked 5% methyl silicone) of 30 m x 0.25 mm and with a phase thickness of 0.25 μm was selected to separate the analytes.

The temperature program used for the analyses was as follows: the initial temperature was 60 °C which was then increased to 280 °C at 20 °C min^{-1} . This temperature was held for 5 min. The total run time was 16 min. The injector and detector temperatures were 250 °C and 280 °C respectively. The helium flow rate was maintained at 1.2 ml min^{-1} . The samples were injected in the splitless mode and the splitter was opened after 4.5 min (delay time). The sample volume in the direct injection mode was 2 μl .

The conditions for electron impact ionization (EI) were an ion energy of 70 eV and the mass range scanned was 50-465 m/z under full scan acquisition mode. In the selected ion monitoring mode (SIM), two peaks of each

compound were monitored. The MS was tuned to m/z 69, 219 and 502 for EI corresponding to perfluorobutylamine (PFBA). The data were acquired with the HP Chemstation. It was equipped with the mass spectral library Wiley 198 which was used to compare the experimental spectra obtained.

SPME procedure

The SPME device and the 85 μm polyacrylate fibers were obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Before the initial application, the fiber was conditioned in the hot port of the gas chromatograph at 300 °C for 3 h, according to the supplier's instructions. After the conditioning process, a fiber blank was run to confirm that there were no extraneous peaks which could be assigned to compounds introduced during the manufacture of the fiber.

For the SPME process, water samples (3.5 ml) spiked with an appropriate amount of each pesticide were put in 4 ml vials. The concentration of NaCl in the samples was 180 g l^{-1} , which is half the saturated concentration of NaCl in water, and the pH was not adjusted. In the extraction process, the fiber was directly introduced into the sample solution for 90 min at 45 °C. The samples were heated and continuously stirred with a magnetic stirrer and heater unit from Selecta (Abrera, Spain). Finally, the compounds were thermally desorbed from the fiber in the gas chromatograph injector at 250 °C. The fiber remained in the injector throughout the run time.

Real samples (tap, drinking, Ebro river and sea water) were filtered through a 0.45 μm membrane filter (MSI, Wetsboro, MA, USA) before analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Chromatographic separation

First, the separation of the six phthalates and the adipate was optimized and the optimal conditions are described in the experimental section.

To determine the linearity of the response, 2 μ l of standard solutions in ethyl acetate were injected under full scan and selected ion monitoring (SIM) modes. Linearity was good in the range from 0.05 to 25 mg l⁻¹ for most of the analytes with determination coefficients higher than 0.9949 in full scan acquisition mode. The limits of detection (LODs), the repeatability and the reproducibility of the method were also studied. The LODs were calculated by Winefordner and Long's criterion with the K value equal to 6 [18]. They were between 0.015 and 0.05 mg l⁻¹. Repeatability, expressed as a percentage of relative standard deviation (%RSD), was lower than 6.2% and reproducibility (%RSD) between days was lower than 8.4%.

Optimization of SPME

The fiber selected was 85 μ m polyacrylate since this kind of fiber gave good results in previous works [13,15,16] and, to our knowledge, this fiber has not been used to extract phthalate esters. The main parameters that can affect the SPME process were optimized under full scan acquisition mode: the time and the temperature of the absorption process, and the addition of NaCl and methanol to the sample. Standard solutions containing 2 μ g l⁻¹ of each phthalate and adipate in Milli-Q water were used to evaluate the effect of these parameters. Desorption parameters were the same as in previous papers [13,16], since good results were obtained with additional experiments with phthalate esters. In the desorption step, the fiber remained into the injector of the gas chromatograph at 250 °C for the total run time. The splitter was opened at 4.5 min, so only the analytes desorbed at this

time were transferred to the analytical column, but the fiber was maintained in the injector throughout the run to avoid carryover effects in subsequent analyses. If the fiber was kept in the injection port for shorter times, some peaks appeared at the same retention times as the analytes indicating that the analytes had not been completely removed from the fiber. This was also observed by other authors [15]. The same fiber was used to analyze about 20 samples. The fact that the lifetime of the 85 μm polyacrylate fiber was shorter than in other studies [13,16,17,19] is due to the long exposure time in the injection port. Likewise, to prevent the fiber from being contaminated by the room atmosphere it was kept in the auxiliary injector of the gas chromatograph between analyses. All the material used (e.g. glassware and stirring bars) had to be also carefully cleaned and three blanks were run to verify the absence of phthalate peaks.

Absorption time

The absorption time profile was studied by monitoring the area counts as a function of the absorption time. The standard solution was exposed for times which ranged from 5 to 120 min. The temperature of absorption was set at 45 °C throughout the extraction process and neither NaCl nor methanol were added to the sample. The sample was continuously stirred to decrease the time required for the analytes to reach the equilibrium. After the absorption time, the phthalates and the adipate were desorbed from the fiber which had been kept throughout the run at 250 °C in the injector of the gas chromatograph. The equilibrium was reached for most of compounds at 120 min. However, an absorption time of 90 min was selected for subsequent analysis so the analysis time was shortened and the response was acceptable. At absorption times lower than the equilibrium time and if the stirring rate, the absorption time and the temperature are held constant, quantification is possible [20].

Absorption temperature

The absorption temperature was the next parameter to be optimized. The effect on the amount of analyte absorbed was studied by exposing the fiber to the sample for 90 min at temperatures ranging from 25 °C (room temperature) to 65 °C. The other experimentation parameters were the same as for the optimization of the absorption time. The results obtained show an increase in the peak area of the phthalates and adipate when temperature increases. Increasing the absorption temperature enhances the diffusion of the analytes from the solution to the fiber. However, at temperatures over 45 °C, there is a decrease in the amount of DEHP, BnOP and BBP extracted. This is because the absorption of the analytes by the fiber is an exothermic process and high temperatures can decrease the amount extracted [7]. For this reason, the plot of the area peak versus the absorption temperature usually shows a maximum for some analytes (DEHP as example). An absorption temperature of 45 °C was selected since at this temperature the peak area for most compounds was maximum.

NaCl addition

NaCl is often added to the sample in order to increase the ionic strength and enhance the amount of analyte extracted by the fiber [15,16,20,21]. The optimum concentration of NaCl was determined by analyzing a set of samples which contained amounts of NaCl which ranged from 0 to 360 g l⁻¹ (the NaCl saturation concentration). The absorption time and temperature were set at 90 min and 45 °C respectively, and the desorption conditions were the same as those for the optimization of the absorption time. The results obtained showed that the peak areas were highest at 180 g l⁻¹ NaCl for most of the analytes studied except for DEP and DEHP. The maximum peak area of these two compounds was at 360 g l⁻¹. Results were best, for most compounds, at a NaCl concentration of 180 g l⁻¹, so this was the concentration selected to carry out the next experiments.

SPME-GC-MS

Once the SPME parameters had been optimized, the method was checked by analyzing 3.5 ml Milli-Q water samples spiked with the compounds studied. Full scan was the acquisition mode low levels of concentration were achieved and the presence of the phthalates could be confirmed with the mass spectra.

The linearity of the response was checked in the range 0.02 to 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ using full scan acquisition mode. The limits of detection (LODs) were calculated using Winefordner and Long's criterion and they were between 0.006 $\mu\text{g l}^{-1}$ and 0.1 $\mu\text{g l}^{-1}$. The repeatability and the reproducibility of the method, expressed as a percentage of relative standard deviation (%RSD) and calculated at a spiking level of 1 $\mu\text{g l}^{-1}$ ($n=4$) were between 4.2% and 14.2% for repeatability and between 7.8% and 17.4% for reproducibility. Reproducibility was calculated with the results obtained by analyzing a sample in consecutive days. These results are typical for SPME. The addition of an internal standard was not considered since a previous work [19] showed that it did not improve significantly the repeatability and the reproducibility of the SPME-GC-MS method.

REAL SAMPLES

The performance of the method was tested with water from Tarragona's fishing and industrial ports, the Ebro river and also commercial waters samples. The quantity of NaCl added to sea water samples depended on the initial concentration in these samples.

The linearity of the method was checked in tap water samples. The results were similar to those for Milli-Q water and they are given in Table 1. Analytical data were calculated in the same way as for Milli-Q water. Figure

1 shows the chromatograms obtained when both unspiked tap and Milli-Q water and tap water spiked with $1 \mu\text{g l}^{-1}$ of each compound were analyzed. No phthalate or adipate ester peaks were observed in Milli-Q and tap water blank chromatograms and the peaks that appeared could not be identified by the mass spectral databases.

Samples from the Tarragona fishing port and the Ebro river were analyzed in order to verify the presence of different peaks at the same retention time as the compounds studied. Some peaks appeared at the retention times corresponding to DEP, DnBP and DEHP. The spectra of these peaks confirmed that they corresponded to these three phthalates. Then, we determined whether the calibration curves obtained for tap water were valid for these samples. Therefore, the samples were spiked at two different levels of concentration ($0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ and $2 \mu\text{g l}^{-1}$) and the values of the areas of DEP, DnBP and DEHP were subtracted from the mean of the areas obtained in the blank chromatograms ($n = 5$).

The concentration of the phthalate and adipate esters in these samples, calculated by means of the calibration curves for tap water, agreed with the spiked concentration. The concentration of these compounds in the blanks was calculated with the calibration curves obtained for tap water. DEHP was found in a concentration of $0.6 \mu\text{g l}^{-1}$ and $0.7 \mu\text{g l}^{-1}$ in fishing port and Ebro river water, respectively. However, DEP and DnBP could not be quantified because their concentrations were between the detection limit and the quantification limit of the method.

Table 1. Linear range, determination coefficients, limits of detection and repeatability and reproducibility for tap water by SPME-GC-MS.

Compound	Linear range ($\mu\text{g l}^{-1}$)	r^2	LOD ($\mu\text{g l}^{-1}$)	RSD (%) (n = 4) ^{a,c}	RSD (%) (n = 4) ^{b,c}
DMP	0.5-10	0.9948	0.17	10	13
DEP	0.05-10	0.9961	0.02	10	16
DnBP	0.02-10	0.9986	0.007	17	18
BBP	0.05-10	0.9965	0.02	19	21
bis(2-ethylhexyl) adipate	0.1-10	0.9936	0.03	15	18
DEHP	0.02-10	0.9990	0.006	7	10
BnOP	0.1-10	0.9991	0.03	10	14

^a in repeatability conditions

^b in reproducibility between days conditions

^c spiking level: $1 \mu\text{g l}^{-1}$

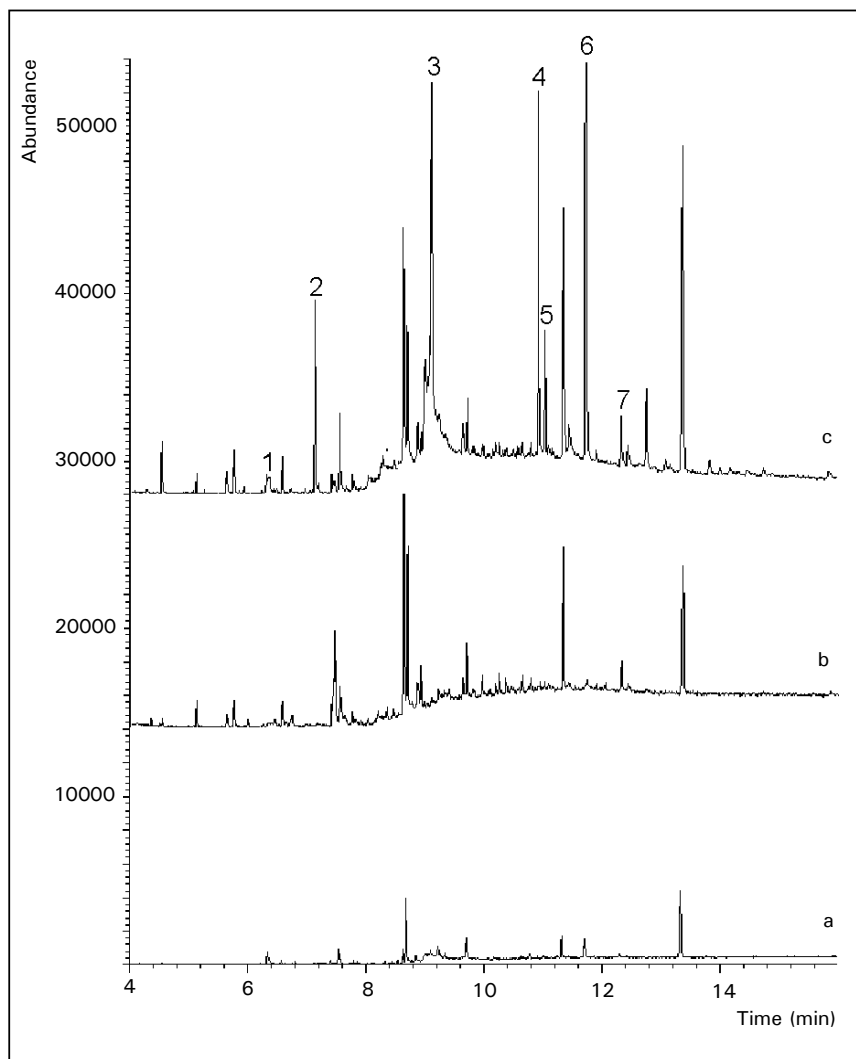


Figure 1. Chromatograms obtained by SPME-GC-MS under full scan acquisition mode of (a) Milli-Q water (b) tap water and (c) tap water spiked with $1 \mu\text{g l}^{-1}$ of the compounds studied. Peak assignation: (1) DMP, (2) DEP, (3) DnBP, (4) BBP, (5) bis(2-ethylhexyl) adipate ester, (6) DEHP, (7) BnOP.

Various samples from the Tarragona industrial port and another from the Ebro river were analyzed by SPME-GC-MS, and the same three phthalates, which appeared in the water samples from Tarragona fishing port and Ebro river, were found. The concentrations and RSD obtained by SPME-GC-MS for these water samples are shown in Table 2. Figure 2 shows the total ion chromatogram for one of the samples from the Tarragona industrial port and the insert corresponding to the spectrum of the DEHP. The other peaks that appear in the chromatograms could not be identified.

Table 2. Concentration ($\mu\text{g l}^{-1}$) and RSD ($n=3$) of phthalates found in water samples from the Tarragona industrial port and the Ebro river by SPME-GC-MS.

Compounds	Industrial port I		Industrial port II		Ebro river	
	Concentration ($\mu\text{g l}^{-1}$)	RSD (%) ^a	Concentration ($\mu\text{g l}^{-1}$)	RSD (%) ^a	Concentration ($\mu\text{g l}^{-1}$)	RSD (%) ^a
DMP	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
DEP	0.62	8	0.39	9	0.26	11
DnBP	0.16	13	0.12	13	n.q.	-
BBP	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
Bis(2-ethylhexyl) adipate	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
DEHP	1.62	12	2.12	11	0.70	16
BnOP	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-

^a $n=3$.
n.d. = not detected.
n.q. = not quantified.

Various commercial mineral waters were also analyzed since it is described in the literature that the additives of polyvinyl chloride (PVC) packaging materials, especially adipate and phthalate esters, can migrate from the container to the water [23]. In this study, DEHP and BnOP were the principal compounds identified.

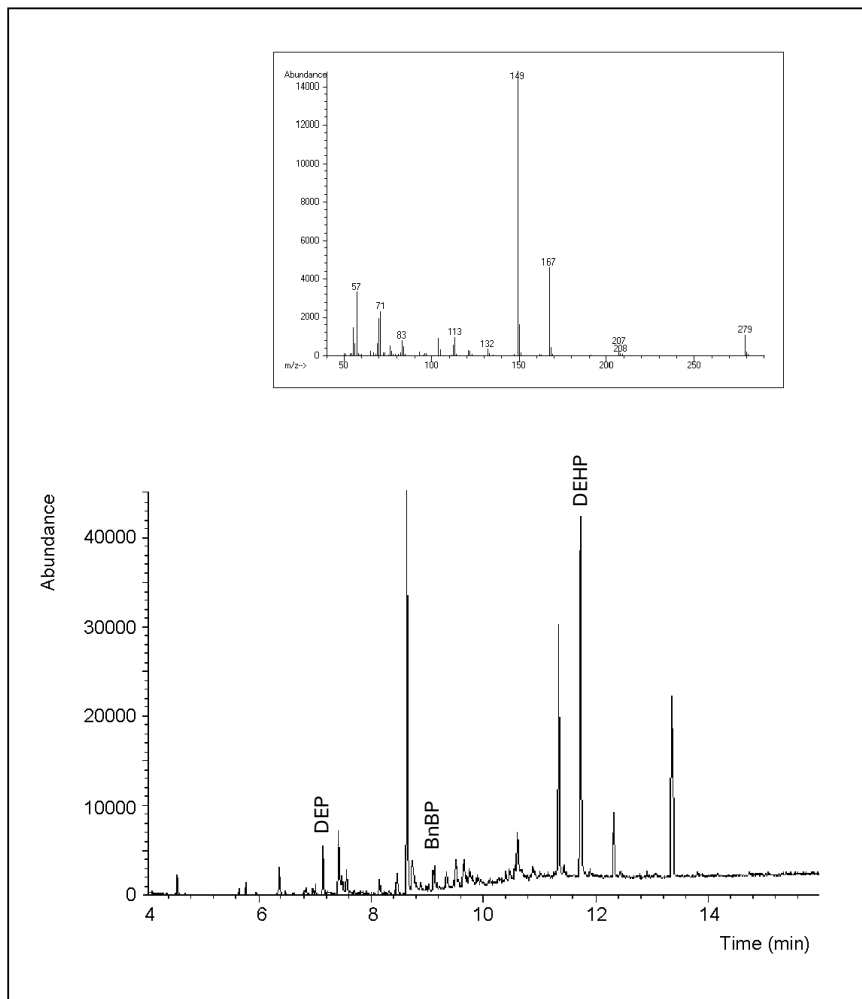


Figure 2. Total ion chromatogram of marine water sample analyzed by SPME-GC-MS method. The insert corresponding to the spectrum of the DEHP.

The original recipients containing the water samples were made from materials such as polyethylene terephthalate (PET), polyvinyl chloride (PVC), glass and tetra-brick. The phthalate esters are used in the manufacture of some of these recipients, so the influence of the material on the

concentration of the phthalates has also been evaluated. Figure 3a shows the results obtained for mineral water samples from the same brand but with different recipient material (PVC, PET and glass). Different concentrations of DEP, DnBP and DEHP were found in all samples. Each sample was analyzed three times and Figure 3a shows the mean values. Nevertheless, no peaks corresponding to the other phthalate and adipate esters appeared in the chromatograms. As can be observed in Figure 3a, the concentration of DEHP and DEP was similar in all the samples, and DEHP was the phthalate ester with the highest concentrations, about $1.0 \mu\text{g l}^{-1}$. This phthalate ester is the most widely used and EPA has established that its MAC in drinking water is $6 \mu\text{g l}^{-1}$ [6]. It can be also observed that the concentration of DnBP in the water samples from PVC bottles was higher than the samples from the other materials.

On the other hand, Figure 3b shows the results obtained for mineral water samples, which are from different brands (see numbers 1 to 3 in the categories axis), and two materials (PVC and PET). The same three phthalates (DEP, DnBP and DEHP) were found and the concentration of two of the phthalates, DEP and DEHP, in brand 3 was higher than in the other two brands. Moreover, a similar distribution in the concentrations of the three phthalates can be observed between PET and PVC containers. Figure 4 shows the total ion chromatogram for brand 1 in PVC bottles and the insert corresponding to the spectrum of the DEHP.

A commercial water sample in a tetra-brick recipient was also analyzed. This recipient also contains a plastic film. The results were similar to the other commercial waters except for DEP, the concentration of which was slightly lower. On the basis of these results, the recipient which contains the mineral water affect the concentrations of phthalates. Moreover, glass and tetra-brick showed lower concentrations of some of the phthalates.

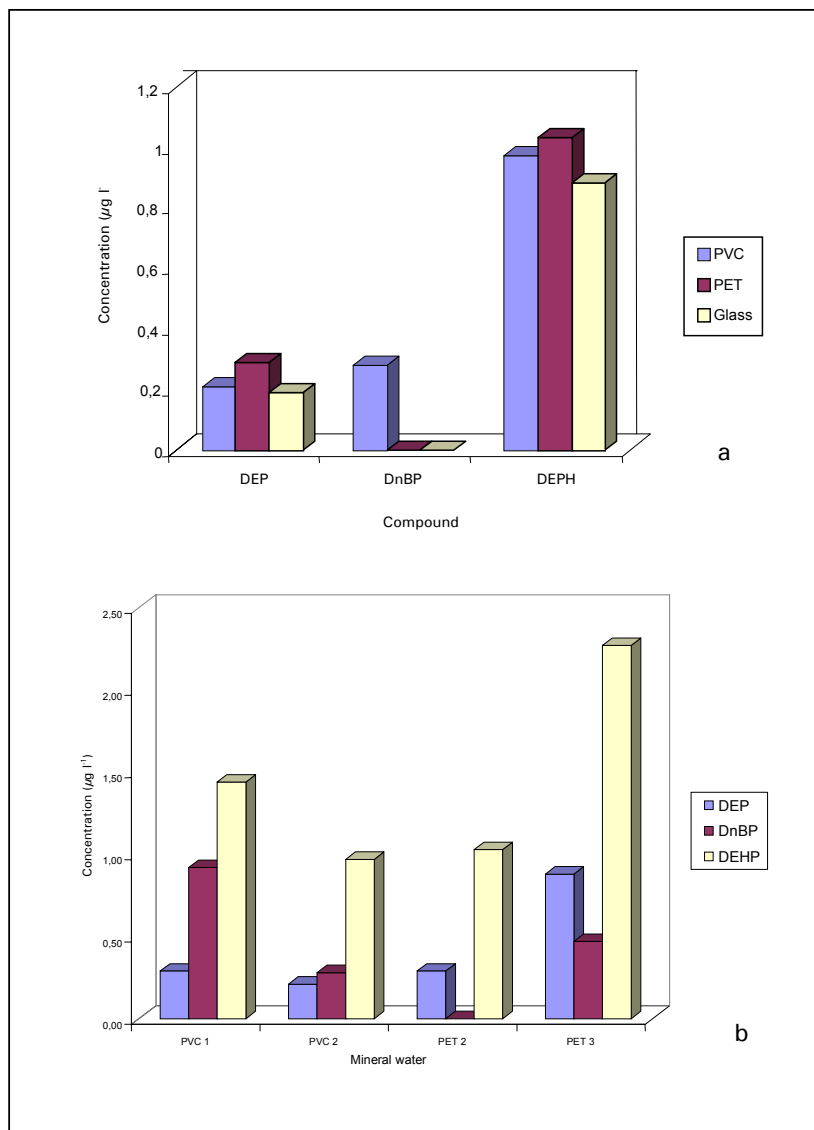


Figure 3. Concentrations of DEP, DnBP and DEHP obtained (a) in three recipient materials for the same brand, and (b) in different mineral waters (numbers 1 to 4) and recipient materials determined by SPME-GC-MS. The legend shows the type of material of the recipient in which the water was contained.

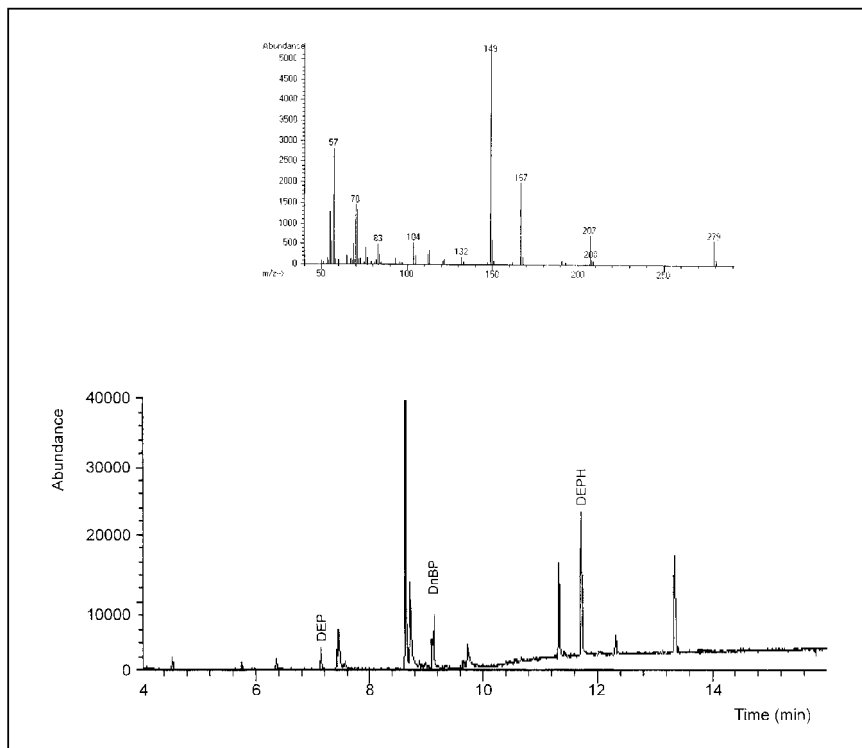


Figure 4. Total ion chromatogram for brand 1 in PVC bottles. The insert corresponds to the spectrum of the DEHP.

CONCLUSIONS

In this study, SPME was used to determine a group of plasticizers in aqueous samples. Parameters that affect the SPME absorption process were optimized. Optimum conditions were 90 min at 45 °C for the absorption process. Adding NaCl to the water samples increased the amount extracted of most phthalates. The combination of SPME with GC-MS in full scan acquisition mode enables these compounds to be determined at low $\mu\text{g l}^{-1}$ concentration levels in real water samples. A similar relation between the

concentrations of the phthalate esters found in mineral water samples bottled with the same material (PVC, PET) was observed.

Real water samples from different sources were analyzed by the SPME-GC-MS method developed and phthalates were found in some of them. The material of the recipient which contains the water samples slightly affect the concentration of phthalates found in the commercial mineral water studied.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported financially by CICYT (95-0243-OP) and the Consorci d'Aigües de Tarragona. A. Peñalver would like to thank the Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica for a predoctoral grant.

REFERENCES

- [1] M. Castillo, D. Barceló, A.S. Pereira, F.R. Aquino Neto, Trends Anal. Chem., 18 (1999) 26.
- [2] K. Holadová, J. Hajslová, Intern. J. Environm. Anal. Chem., 59 (1995) 43.
- [3] M. Castillo, D. Barceló, Trends Anal. Chem., 16 (1997), 574.
- [4] S. Jobling, T. Reynolds, R. White, M.G. Parker, J.P. Sumpter, Environm. Health Persp., 103(6) (1995) 582.
- [5] C.A. Staples, D.R. Peterson, T.F. Parkerton, W.J. Adams, Chemosphere, 35(4) (1997) 667.
- [6] *National primary drinking water regulations; Federal register Part 12 40 CFR parts 141, p. 395, US Environmental Protect Agency, Washington, DC, July 1st 1991.*

- [7] M. Castillo, M.F. Alpendurada, D. Barceló, J. Mass Spectrom., 32 (1997) 1100.
- [8] J. Bartulewicz, E. Bartulewicz, J. Gawlowski, J. Niedzielski, Chem. Anal. (Warsaw), 41 (1996) 753.
- [9] A. Yasuhara, H. Shiraishi, M. Nishikawa, T. Yamamoto, T. Uehiro, O. Nakasugi, T. Okumura, K. Kenmotsu, H. Fukui, M. Nagase, Y. Ono, Y. Kawagoshi, K. Baba, Y. Noma, J. Chromatogr. A, 774 (1997) 321.
- [10] M. Castillo, A. Oubiña, D. Barceló, Environ. Sci. Technol., 32 (1998) 2180.
- [11] J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*, Wiley-VCH Inc., New York, 1997.
- [12] M. Möder, P. Popp, J. Pawliszyn, J. Microcol. Sep., 10 (1998) 225.
- [13] A. Peñalver, E. Pocrull, F. Borrull, R.M. Marcé, Trends in Anal. Chem., 18 (1999) 557.
- [14] M.T. Kelly, M. Larroque, J. Chromatogr. A, 841 (1999) 177.
- [15] K. Holadová, J. Poutska, J. Hajslová, G. Vladíkova, Poster presented at the 8th Symposium on Handling of Environmental and Biological Samples in Chromatography, Almería, 1997.
- [16] A. Peñalver, E. Pocrull, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Chromatogr. A, 839 (1999) 253.
- [17] C. Aguilar, S. Peñalver, E. Pocrull, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Chromatogr. A, 795 (1998) 105.
- [18] G.L. Long, J.D. Winefordner, Anal. Chem., 55 (1983) 712A.
- [19] A. Peñalver, E. Pocrull, F. Borrull, R.M. Marcé, Chromatographia, 50 (1999) 685.
- [20] J. Ai, Anal. Chem., 69 (1997) 1230.
- [21] J. Beltrán, F.J. López, O. Cepriá, F. Hernández, J. Chromatogr. A, 808 (1998) 257.
- [22] I. Valor, J.C. Moltó, D. Apraiz, G. Font, J. Chromatogr. A, 767 (1997) 195.
- [23] N.M. Fayad, S.Y. Sheikheldin, M.H. Almalack, A.H. Elmubarak, N. Khaja, J. Environ. Sci. Health, Part A: Environ. Sci. Eng. Toxic Hazard Subst. Control, 32 (1997) 1065.

**III.4. COMPARACIÓN DE DIFERENTES FIBRAS PARA MICROEXTRACCIÓN EN
FASE SÓLIDA DE UN GRUPO DE FTALATOS**

En el trabajo anterior se desarrolló un método analítico para la determinación de un grupo de ftalatos mediante SPME. La fibra utilizada para llevar a cabo la extracción fue de 85 μm de poliacrilato. Sin embargo, tal y como se ha indicado en apartados anteriores, las innovaciones en esta técnica de preconcentración hicieron que progresivamente se introdujeran nuevos tipos de recubrimientos para las fibras de forma que se pudiera aumentar el campo de aplicación de esta técnica a un mayor número de familias de compuestos [1]. Entre los sorbentes que se incorporaron en las fibras de SPME se pueden mencionar el carbowax (CW), el divinilbenceno (DVB) y el carboxen (CAR). Cuando se realizó el trabajo anterior ya estaban disponibles estos nuevos recubrimientos pero se optó por utilizar fibras de 85 μm de PA ya que la polaridad de los ftalatos hizo prever que estas fibras podían ser adecuadas.

La reciente introducción de las fibras mixtas, en el momento de realización de este estudio, había hecho que todavía hubiera poca bibliografía en la que se comparara la eficacia de las diferentes fibras comerciales para la extracción de un mismo grupo de compuestos y aún menos para los ftalatos [2-4]. En consecuencia, se propuso realizar un estudio comparativo con algunas de las fibras comerciales para la determinación del mismo grupo de ftalatos y adipato que se habían seleccionado para el estudio anterior. Además se querían comparar los resultados que se obtenían con estas nuevas fibras con los obtenidos con fibras de PDMS y PA. Las fibras que se estudiaron fueron las de 65 μm de PDMS/CW, 85 μm de PA, 75 μm de CAR/DVB y 30 μm de PDMS. Otro objetivo de este estudio fue el desarrollo de un método analítico para la determinación de ftalatos en muestras de agua con la fibra que ofreciera mejores resultados.

Se optimizaron los parámetros que afectan a la eficacia del proceso de SPME para las diferentes fibras y se compararon los resultados obtenidos con cada una de las fibras. La fibra de PDMS/DVB fue la que proporcionó mejores recuperaciones para los ftalatos. Estos resultados coincidieron con los obtenidos por Kelly *et al.* [2] que también utilizaron la fibra de

PDMS/DVB para la extracción de DEP en muestras de agua mediante SPME-HPLC.

También se estudió si la composición de la matriz afectaba al proceso de extracción cuando se utilizaban fibras de PDMS/DVB ya que algunos autores habían indicado que las fibras que extraían los analitos mayoritariamente mediante un fenómeno de adsorción se veían más afectadas por los efectos de la matriz [5]. Finalmente se procedió a la validación del método analítico en agua Milli-Q y en agua del río Ebro. El método SPME-GC-MS desarrollado en este estudio se aplicó al análisis de muestras de agua del río Ebro y de los puertos industrial y pesquero de Tarragona.

Si se comparan los resultados obtenidos en este estudio con los obtenidos en el trabajo en el que se realizaba la extracción de los mismos compuestos con fibras de PA, se puede observar que la fibra de PDMS/DVB proporciona mejores resultados. En consecuencia, se puede concluir que estas nuevas fibras, como se ha comprobado en este estudio comparativo, proporcionan mejores resultados en la extracción de ftalatos que las fibras de PDMS y PA que eran utilizadas de una forma más general en el momento de realización de este estudio.

Posteriormente a este estudio, se han realizado algunos trabajos en los que la SPME se aplica a la extracción de ftalatos [6-8]. Por ejemplo, Luks-Betlej *et al.* [6] han utilizado la SPME para la determinación de ftalatos en muestras de agua y la fibra que indican como óptima para la extracción es la de 65 μm de CW/DVB. A pesar que la fibra que utilizan estos autores no fue incluida en el presente estudio, los resultados obtenidos coinciden en parte ya que indican que, en general, todas las fibras que contienen DVB son adecuadas para la extracción de ftalatos.

A continuación se incluye un resumen de los resultados obtenidos durante la realización de este estudio y que han sido publicados en forma de artículo científico en la revista *Journal of Chromatography A*, 922 (2001) 377-384.

Bibliografía

- [1] J. Pawliszyn, *Applications of Solid Phase Microextraction*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999.
- [2] M.T. Kelly, M. Larroque, *J. Chromatogr. A*, 841 (1999) 177.
- [3] Y.Q. Liu, S.R. Cho, N.D. Daniieldson, *Anal. Bioanal. Chem.*, 373 (2002) 64.
- [4] P. Landin, M. Llompart, M. Lourido, R. Cela, *J. Microcol. Sep.*, 13 (2001) 275.
- [5] Y. Yang, S.B. Hawthorne, D.J. Miller, Y.Liu, M.L. Lee, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 1788.
- [6] K. Luks-Betlej, P. Popp, B. Janoszka, H. Paschke, *J. Chromatogr. A*, 938 (2001) 93.
- [7] G. Prokupkova, K. Holadová, J. Poutska, J. Hajslova, *Anal. Chim. Acta*, 457 (2002) 211.
- [8] K.Luks-Betlej, P. Popp, B.Janoszka, H. Paschke, *J. Chromatogr. A*, 938 (2001) 93.

COMPARISON OF DIFFERENT FIBERS FOR THE SOLID-PHASE MICROEXTRACTION OF PHTHALATE ESTERS FROM WATER**ABSTRACT**

Solid-phase microextraction (SPME) coupled to gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) has been applied to determine six phthalate esters and one adipate ester in water. The SPME parameters were optimized for several commercially available fibers. The 65 μm polydimethylsiloxane-divinylbenzene (PDMS-DVB) was the fiber selected and was applied to the analysis of water from the Ebro river and the industrial port of Tarragona. The studied compounds were found at concentrations ranging from 0.4 $\mu\text{g l}^{-1}$ for DnBP to 3.2 $\mu\text{g l}^{-1}$ for DEHP. The linear range for real samples was from 0.1 to 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ for most phthalates, and the limits of detection of the method were between 3 and 30 ng l^{-1} . Repeatability and reproducibility between days ($n=5$) for 1 $\mu\text{g l}^{-1}$ samples were below 13% and 18%, respectively.

Keywords: Solid-phase microextraction; Phthalate esters; Water analysis

INTRODUCTION

Phthalate esters and the bis(2-ethylhexyl) adipate ester (DEHA) are well-known polymer additives and are also used in formulations of pesticides, paints, cosmetics, etc. Phthalate esters can migrate from the plastic material to the environment [1], and consequently, they are often found in water, soil, air, food products, and the human body [2-4]. Some of these compounds have toxic effects in algae and some microorganisms living in marine water samples [5]; they are also thought to be carcinogenic and endocrine disrupting [6,7]. Some phthalate and adipate esters are included in the priority lists of pollutants in several countries [8,9]. For instance, the Environmental Protection Agency (EPA) has set the maximum admissible concentration (MAC) for bis(2-ethylhexyl) phthalate ester (DEHP) and bis(2-ethylhexyl) adipate ester (DEHA) at $6 \mu\text{g l}^{-1}$ and 0.4 mg l^{-1} , respectively [10].

Gas chromatography (GC) [3,8,11,12] and high performance liquid chromatography (HPLC) [2-4,13,14], preceded by different preconcentration techniques such as solid phase (SPE) [2,7,14] or liquid-liquid (LLE) extraction [8], are the usual techniques for determining these compounds in environmental samples. Solid phase microextraction (SPME) has been used to determine a wide variety of organic compounds from environmental samples [15-20], including some phthalate esters [4,12,13]. The first commercially available SPME fibers were coated with polydimethylsiloxane (PDMS) of different thicknesses (7, 30 and $100 \mu\text{m}$), for relatively apolar compounds [16,18,19], and $85 \mu\text{m}$ polyacrylate (PA) for more polar compounds [12,15-17,20]. At present, more specific coatings that contain polymers such as carbowax (CW), divinylbenzene (DVB) and carboxen (CAR) have been developed. The main aim of the present study is to compare different fibers in order to develop an optimized SPME method for the six commonly used phthalate esters and the bis(2-ethylhexyl) adipate ester, in water.

EXPERIMENTAL

Reagents and standards

The compounds studied were dimethyl- (DMP), diethyl- (DEP), di-n-butyl- (DnBP), butylbenzyl (BBP), bis(2-ethylhexyl)- (DEHP), and bis-n-octyl (BnOP) phthalate esters, and the bis(2-ethylhexyl) adipate ester (DEHA). All the phthalate esters were purchased from Riedel-de H en (Seelze-Hannover, Germany) and the adipate from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). All the compounds were more than 98% pure.

A stock standard solution of 2000 mg l⁻¹ of each compound was prepared in ethyl acetate. Working standard solutions of 100 mg l⁻¹ were prepared weekly in ethyl acetate. Stock and working standards were stored at 4 °C in the refrigerator. The aqueous solutions were prepared daily by diluting the working solution with water (Milli-Q, sea and river water).

Ethyl acetate was of Suprasolv quality (for organic trace analysis) and was supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Sodium chloride, more than 99.5% pure, was obtained from Prolabo (Fontenay S. Bois, France). Water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). Helium carrier gas (99.995% quality) was supplied by Carbueros Metálicos (Tarragona, Spain).

GC-MS

GC was performed on a Hewlett-Packard 5890 Series II gas chromatograph (Palo Alto, CA, USA) equipped with a split-splitless injector and an HP 5972 mass spectrometer. A Merlin microseal high pressure septum and an insert liner of 0.75 mm ID, both from Hewlett-Packard, were used. A Hewlett-Packard HP-5MS fused silica capillary column (cross-linked 5% methyl

silicone of 30 m x 0.25 ID mm and phase thickness of 0.25 μm), was used. The GC temperature program was as follows [13]: initial temperature, 60 °C; increased to 280 °C at 20 °C min^{-1} ; hold for 5 min. The total run time was 16 min. The injector and detector temperatures were 250 °C and 280°C, respectively. The helium flow rate was maintained at 1.2 ml min^{-1} . The samples were injected in the splitless mode and the splitter was opened after 4.5 min (delay time). The sample volume in the direct injection mode was 1 μl .

Electron ionization (EI) was used at 70 eV, the mass range scanned was 50-465 m/z and the base peak of each compound (149 for all phthalate esters except for DMP (163) and DEHA (129)) was selected for quantifying under full scan acquisition mode. The MS was tuned to m/z 69, 219 and 502 for EI corresponding to perfluorotributylamine (PFTBA). The data were acquired with the HP Chemstation equipped with the mass spectral library Wiley 138.

The response by direct injection of 1 μl of standard solutions under full scan acquisition mode was studied in the range between 0.05 and 25 mg l^{-1} and good linearity was obtained for most compounds with determination coefficients (R^2) above 0.995.

SPME

The SPME device, the 65 μm polydimethylsiloxane-divinylbenzene fibers and the other fibers tested (65 μm carbowax-divinylbenzene, 85 μm polyacrylate, 75 μm carboxen-divinylbenzene and 30 μm polydimethylsiloxane) were obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Before the initial application, fibers were conditioned in the hot port of the gas chromatograph at 260 °C, according to the supplier's instructions.

For SPME, water samples (3.5 ml) spiked with an appropriate amount of each pesticide were introduced in 4 ml vials. The concentration of NaCl in the samples was 360 g l^{-1} and the pH was not adjusted ($\text{pH} \approx 6$). In the extraction process, the $65 \mu\text{m}$ PDMS-DVB fiber was directly immersed into the sample solution for 30 min at $80 \text{ }^\circ\text{C}$. The samples were heated and continuously stirred at a constant speed of 1400 r.p.m. with a magnetic stirrer and heater unit from Selecta (Abrera, Spain). Finally, the compounds were thermally desorbed from the fiber into the GC injector, which was maintained at a temperature of $250 \text{ }^\circ\text{C}$. The fiber remained in the injector for 3 min. Desorption time was increased to 5 min when real water samples were analyzed in order to avoid carryover effects.

Sea and river water samples were filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ nylon membrane filter (Whatman, Maidstone, UK) before analysis. Moreover, all the glass material used (vials, volumetric material, etc.) to achieve the extractions was carefully cleaned to avoid contamination problems, as was observed in previous papers [3,8,21].

RESULTS AND DISCUSSION

Comparison of fibers and optimization of SPME conditions

The five commercially available fibers (see Section 2.3) were tested to extract the phthalate and the adipate esters. First experiments with $75 \mu\text{m}$ Carboxen-PDMS showed that it was not suitable for extracting phthalate and adipate esters. This fiber is recommended for extracting gases and low molecular weight compounds (<5 carbon atoms), and phthalate esters have higher molecular weights, so it was not considered for further studies [22].

The main parameters that affect the absorption and desorption processes in SPME were optimized for each fiber. Milli-Q water spiked with $2 \mu\text{g l}^{-1}$ of each compound were used.

Desorption time and temperature were the first parameters to be studied. The desorption temperature was set at $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$ because this temperature had been used for phthalate esters in a previous study [12]; additional experiments showed that it provided good results for all fibers. Fibers remained in the injector for different times at $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$, from 2 to 16 min (total run time), and some blanks were run to confirm the absence of carryover. For example, polyacrylate fiber was kept in the injector throughout the run time (16 min) but the splitter was opened at 4.5 min, so only the analytes desorbed at this time were introduced into the analytical column. All the fibers were kept in the auxiliary injector of the gas chromatograph between desorption and the following extraction to prevent contamination by the room atmosphere.

The parameters affecting the absorption process were optimized for each fiber in the following order (the ranges tested are in parentheses): absorption time (5-90 min), absorption temperature ($25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ - $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$), addition of salt to the sample (0 - 360 g l^{-1}). The initial conditions selected for the optimization were an absorption temperature of $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and no salt addition. The pH of the sample was not adjusted since it did not appear to affect the amount of analyte extracted.

Table 1 shows the optimum conditions for each fiber. The results show that absorption times were lower with polydimethylsiloxane-containing fibers and that adding NaCl increased the amount of analyte extracted, mainly for the $65 \mu\text{m}$ PDMS-DVB fiber.

Table 1. SPME optimum conditions for each fiber studied.

Fiber	Absorption process			Desorption process	
	Time (min)	Temperature (°C)	NaCl (g l ⁻¹)	Time (min)	Temperature (°C)
30 μm PDMS	30	60	25	10	250
65 μm PDMS-DVB	30	80	360	3	250
85 μm PA	90	45	180	16 ^a	250
65 μm CW-DVB	60	45	100	3	250

^a Total run time

Figure 1 shows the mean peak area of the phthalate and adipate esters for each fiber at the optimum conditions from a 2 $\mu\text{g l}^{-1}$ standard solution. Obviously, responses of all compounds studied but DnBP and BBP were higher with the PDMS-DVB fiber. It was also observed that the PA fiber, except for DEHA and DEHP, provided better responses than the apolar PDMS fiber. The more polar (DMP and DEP) compounds were not extracted by the PDMS fiber. PA fibers, in general, have a great affinity for aromatic compounds, such as the phthalate esters, probably due to π - π interactions [22]. These results agree with a previous study by Kelly et al. [13], who determined diethylphthalate (DEP) in water by SPME coupled to HPLC. They tested different fibers and reported that 65 μm PDMS-DVB was the best for extracting this phthalate.

When Milli-Q water samples were analyzed, chromatograms were cleaner with PA and PDMS fibers than with CW-DVB, PDMS-DVB and Carboxen-DVB fibers. It has recently been reported that the SPME extraction process with fibers containing carbowax and divinylbenzene polymers is achieved *via adsorption*, whereas with PDMS and PA fibers the analytes are extracted *via absorption* [23]. Some studies [24,25] show on the increase of *adsorption* contribution in the extraction step when the molecular weight of analytes increases. Adsorption is less selective than absorption, so the amount of analyte extracted by DVB and carbowax fibers may be more affected by matrix composition, especially when real water samples are analyzed.

Therefore, all fibers were evaluated in the extraction of Ebro river water spiked with $2 \mu\text{g l}^{-1}$ of the analytes at optimum conditions. The responses thus obtained were similar to those obtained with Milli-Q water. Since $65 \mu\text{m}$ PDMS-DVB fiber provided the best results for the compounds in both Milli-Q and Ebro river water, it was selected for the subsequent studies.

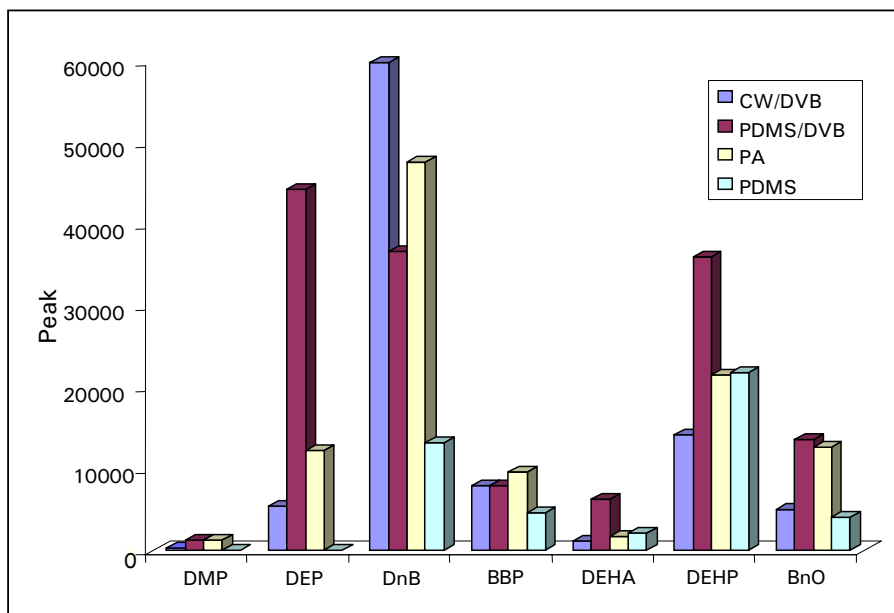


Figure 1. Peak area obtained for each fiber at optimum conditions in Milli-Q water samples spiked with $2 \mu\text{g l}^{-1}$ of phthalate and adipate esters.

Validation of the SPME-GC-MS method

The SPME-GC-MS optimized conditions for $65 \mu\text{m}$ PDMS-DVB fiber were used to validate the method in Milli-Q water samples. Results are shown in Table 2.

Table 2. Linear range, determination coefficients and limits of detection (LOD) of phthalates in Milli-Q water by SPME-GC-MS (65 μm PDMS-DVB).

Compound	Linear range ($\mu\text{g l}^{-1}$)	R ²	LOD (ng l^{-1}) ^a
DMP	0.1-10	0.997	26
DEP	0.05-10	0.994	20 ^b
DnBP	0.05-10	1.000	15 ^b
BBP	0.01-10	0.999	2
DEHA	0.05-10	0.999	6
DEHP	0.05-10	0.993	15 ^b
BnOP	0.1-10	0.994	27

^a Calculated using Winefordner and Long criterion (ref. [26])

^b Estimated value (see text).

Repeatability, RSD(%) (spiking level (n = 5): 1 $\mu\text{g l}^{-1}$): 4-11%

Reproducibility, RSD(%) (spiking level (n = 5): 1 $\mu\text{g l}^{-1}$): 7-15%

Some small peaks appeared at the same retention time as DEP, DnBP and DEHP in the Milli-Q water blank chromatograms so their limits of detection were estimated by using the calibration curves and the Winefordner and Long criterion [26]. The mass spectra of these peaks corresponded to the three phthalate esters.

Application to real samples

The performance of the method was tested with Ebro river water. Analysis of Ebro river water showed the presence of different peaks at the same retention time as the compounds studied. Some peaks were observed at the retention time of DEP, DnBP and DEHP and the spectra of these peaks corresponded to those of the three phthalates. For this reason, the linearity of the method was calculated by the standard addition method, in which Ebro river water spiked with 0.01-10 $\mu\text{g l}^{-1}$ of the phthalate and the adipate esters were analyzed. Linearity was good for most compounds in the range between 0.1-10 $\mu\text{g l}^{-1}$ with determination coefficients above 0.984. Limits of detection were not calculated for DEP, DnBP and DEHP because of their

presence in the sample. For the other compounds, they ranged between 3 and 30 $\mu\text{g l}^{-1}$. Repeatability and reproducibility between days, expressed as relative standard deviation, RSD(%) ($n=5$), were calculated for the sample spiked with 1 $\mu\text{g l}^{-1}$. The results were also similar to those for Milli-Q water and they were below 13% and 18% for repeatability and reproducibility, respectively. To determine whether the calibration curves for Milli-Q water can be used to analyze Ebro river water, the calibration curves for the phthalate and adipate esters in Ebro river water were statistically compared to those for Milli-Q water samples. They were no significant differences between them at a confidence level (α) of 0.05.

The concentrations of DEP, DnBP and DEHP in Ebro river water were therefore calculated by the calibration curves for Milli-Q water and are shown in Table 3. DEHP, the most often used phthalate ester, had the highest concentration, 1.1 $\mu\text{g l}^{-1}$. Figure 2 shows chromatograms obtained for unspiked Ebro river water and river water spiked with 2 $\mu\text{g l}^{-1}$ of each compound.

Table 3. Concentration ($\mu\text{g l}^{-1}$) of phthalate and adipate esters found in Ebro river and Tarragona industrial and fishing ports.

Compound	Ebro river	Tarragona fishing port	Tarragona industrial port
DMP	-	1.6	2.1
DEP	0.6	1.4	1.8
DnBP	0.4	1.3	1.9
BBP	-	0.5	1.1
DEHA	-	0.7	1.6
DEHP	1.1	2.1	3.2
BnOP	-	0.8	1.5

Table 3 includes data of water from Tarragona industrial and fishing ports. Firstly, it was confirmed that calibration curves for Milli-Q water could be

used. DEHP was also the phthalate ester with the highest concentration (2.1 and $3.2 \mu\text{g l}^{-1}$). A similar concentration has already been found in a previous study [12], in which a $85 \mu\text{m}$ PA fiber was used. Figure 3 shows a typical full scan GC-MS chromatogram and the mass spectra recorded for BBP.

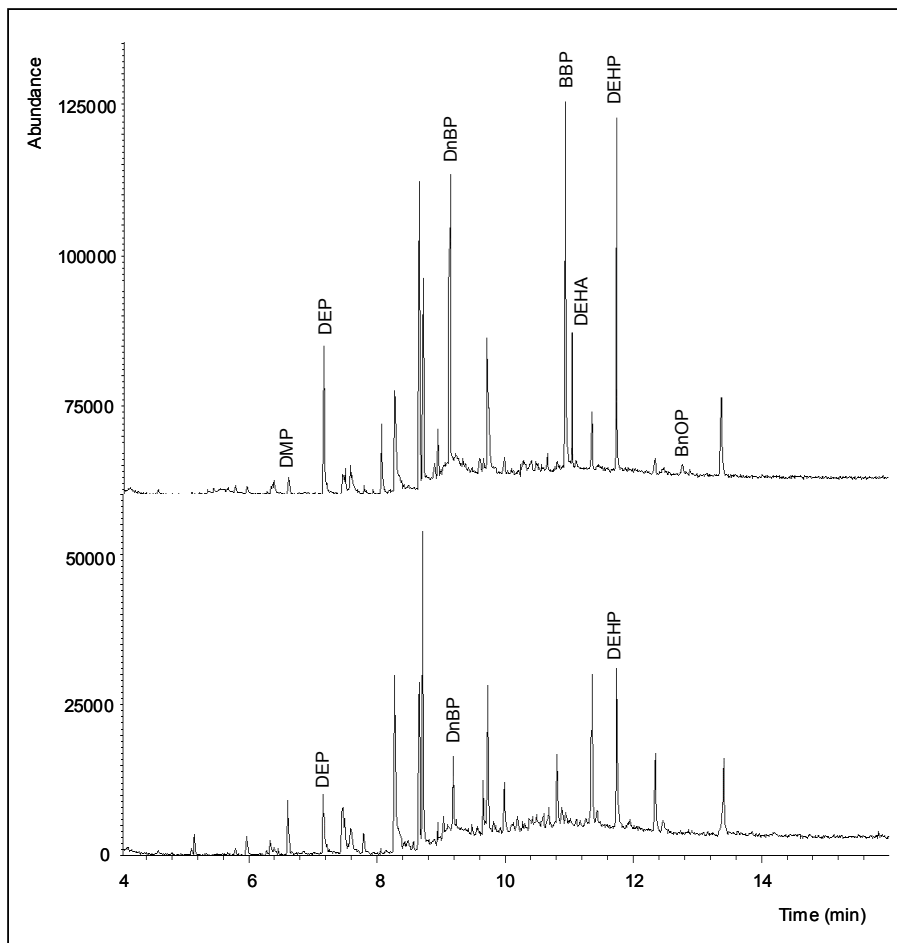


Figure 2. Total ion chromatograms obtained by SPME-GC-MS of: (a) unspiked Ebro river water and, (b) Ebro river water spiked with $2 \mu\text{g l}^{-1}$ of each compound.

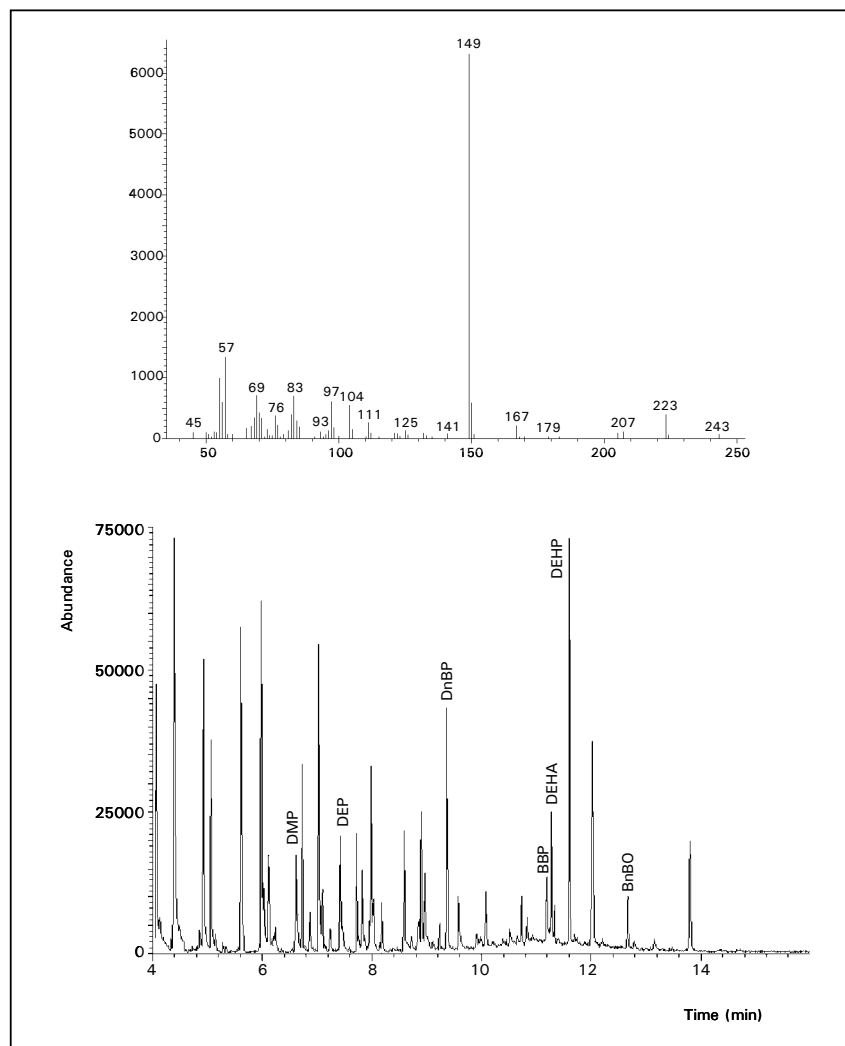


Figure 3. Total ion chromatogram, obtained by SPME-GC-MS, of a water sample from Tarragona industrial port. The insert shows the mass spectrum of BBP.

CONCLUSIONS

Important differences were observed in the amount of phthalate esters extracted by different SPME fibers. 65 μm PDMS-DVB provided the best results. An absorption time of 30 min was sufficient to extract the analytes from the samples. The absorption temperature was 80 °C and the samples were NaCl-saturated to increase the efficiency of the extraction process. Desorption was performed at 250 °C for 3 minutes. SPME combined with GC-MS enables the compounds to be determined at low $\mu\text{g l}^{-1}$ levels in surface water.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported financially by CICYT (AMB99-0875). A. Peñalver would like to thank the Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica for a predoctoral grant.

REFERENCES

- [1] M-C. Yin, K-H. Su, J. Food and Drug Anal., 4 (1996) 313.
- [2] M. Castillo, A. Oubiña, D. Barceló, Environ. Sci. Technol., 32 (1998) 2180.
- [3] T. Hyötyläinen, K. Grob, M. Biedermann, M.L. Riekkola, J. High Resol. Chromatogr., 20 (1997) 410.
- [4] M. Möder, P. Popp, J. Pawliszyn, J. Microcol. Sep., 10 (1998) 225.
- [5] C.A. Staples, W.J. Adams, T.F. Parkerton, J.W. Gorsuch, GR. Biddinger, K.H. Reinert, Env. Toxicol. Chem., 16 (1997) 875.
- [6] P.T.C. Harrison, P. Holmes, C.D.N. Humfrey, The Science of The Total Environment, 205 (1997) 97.

- [7] S. Jobling, T. Reynolds, R. White, M.G. Parker, J.P. Sumpter, *Environ. Health Persp.*, 103 (1995) 582.
- [8] K. Holadová, J. Hajslová, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 59 (1995) 43.
- [9] R. Lega, G. Ladwig, O. Meresz, R.E. Clement, G. Crawford, R. Salemi, Y. Jones, *Chemosphere*, 34 (1997) 1705.
- [10] *National Primary Drinking Water Regulations, Federal register; Part 12, 40 CFR Part 141, pp. 395; US Environmental Protect Agency, July 1st 1991, Washington DC, USA.*
- [11] B. Tienpont, F. David, P. Sandra, F. Vanwalleghem, *J. Microcol. Sep.*, 4 (2000) 194.
- [12] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, 872 (2000) 191.
- [13] M.T. Kelly, M. Larroque, *J. Chromatogr. A*, 841 (1999) 177.
- [14] S. Jara, C. Lysebo, T. Greinbrokk, E. Lundanes, *Anal. Chim. Acta*, 407 (2000) 165.
- [15] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *Chromatographia*, 50 (1999) 685.
- [16] I. Valor, J.C. Moltó, D. Apraiz, G. Font, *J. Chromatogr. A*, 767 (1997) 195.
- [17] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, 839 (1999) 253.
- [18] H. Daimon, J. Pawliszyn, *Anal. Comm.*, 34 (1997) 365.
- [19] M.R. Negrao, M.F. Alpendurada, *J. Chromatogr. A*, 823 (1998) 211.
- [20] C.W. Whang, J. Pawliszyn, *Anal. Comm.*, 35 (1998) 353.
- [21] R.Ritsema, W.P. Cofino, P.C.M. Frintrop, U.A.Th. Brinkman, *Chemosphere*, 18 (1989) 2161.
- [22] R.E. Shirey, R.F. Mindrup, *"SPME adsorption versus absorption: which fiber type is best for your application"* Presentation at Pittcon, New Orleans, 2000.
- [23] T. Górecki, X. Yu, J. Pawliszyn, *Analyst*, 124 (1999) 643.
- [24] Y. Yang, S.B. Hawthorne, D.J. Miller, Y.Liu, M.L. Lee, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 1788.

- [25] W.H.J. Vaes, P. Mayer, A.G. Oomen, J.L.M. Hermens, J. Tolls, Anal. Chem., 72 (2000) 639.
- [26] G.L. Long, J.D. Winefordner, Anal. Chem., 55 (1983) 712A.

III.5. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA ACOPLADA A CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES EN AGUA

En todos los trabajos desarrollados hasta el momento en la presente Tesis Doctoral, se ha estudiado la aplicación de la SPME combinada con la GC para la determinación de diferentes familias de contaminantes medioambientales como plaguicidas y ftalatos ya que, como se ha comentado anteriormente, la SPME fue inicialmente diseñada para su combinación con la GC [1,2]. Con el paso del tiempo, surgió la necesidad de extender el campo de aplicación de la SPME a compuestos que son térmicamente inestables o no volátiles, y cuya determinación mediante la GC es problemática. Para ello, se han desarrollado algunas interfases que permiten realizar la desorción en línea con HPLC, mediante el uso de un disolvente orgánico o la propia fase móvil cromatográfica. Algunas de estas interfases fueron fabricadas por los propios autores [3] pero a partir de 1996 se comercializó una interfase SPME/HPLC con este propósito. El esquema de esta interfase, que permite la desorción en modo dinámico o estático, se ha presentado en el apartado I.1.2.1.

De acuerdo con estas premisas, se planteó un estudio en el que la SPME se combinó con la HPLC utilizando la interfase comercial para la determinación de un grupo de fenoles en muestras de agua. Los fenoles son compuestos que se forman en muchos procesos industriales y que se caracterizan por su toxicidad y persistencia en el medioambiente. La mayoría de ellos se encuentran incluidos en las listas de contaminantes prioritarios de muchos países y su concentración en aguas de consumo está sujeta a normativas. Por ejemplo, la Unión Europea fija una concentración máxima de $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ para el contenido total y $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ para el individual [4].

Los fenoles ya habían sido determinados mediante SPME-GC en varios estudios referenciados en la bibliografía [1,2,5,6] y, en algunos de ellos [3,6], se introdujo una etapa de derivatización en el método analítico para poder determinarlos mediante GC, como por ejemplo en el trabajo de Llompart *et al.* [3], o incrementar la retención de los analitos en la fibra [6]. En la mayoría de estos estudios el tipo de fibra que proporcionó mejores

resultados fue el de 85 μm de PA y por esta razón, ésta fue la fibra seleccionada para este estudio.

Otro objetivo de este trabajo fue la aplicación de un cromatógrafo de líquidos con un diseño ligeramente modificado en su combinación con la interfase de SPME/HPLC ya que con el diseño de cromatógrafo de líquidos convencional se pudo observar que los picos presentaban cola. Esto limitaba considerablemente el uso de la SPME conectada en línea con la HPLC. Otros autores también habían observado este problema al utilizar la interfase comercial [7]. Los picos con cola son debidos a que, en muchas ocasiones, la fuerza de la fase móvil no es suficiente para producir una desorción rápida de los compuestos retenidos en la fibra lo que provoca el ensanchamiento de los picos con la consiguiente pérdida de resolución y sensibilidad [7].

En el cromatógrafo de líquidos modificado que se utilizó en este estudio, la cámara de mezcla está situada tras la cámara de desorción de la interfase SPME/HPLC de forma que únicamente el componente orgánico de la fase móvil produce la desorción de los analitos. Este sistema ya había proporcionado muy buenos resultados en trabajos anteriores [8,9] de nuestro grupo de investigación en la reducción del ensanchamiento de los picos en el acoplamiento en línea de la SPE-HPLC cuando se utilizaban sorbentes que presentaban elevada capacidad de retención.

También se determinó cuál de los dos modos de desorción posibles con la interfase SPME/HPLC (dinámico o estático) proporcionaba mejores resultados en la determinación de los 11 fenoles considerados prioritarios por la EPA. En modo dinámico, la desorción de los analitos se realiza con la propia fase móvil cromatográfica. En modo estático, ésta se lleva a cabo introduciendo un solvente orgánico o la propia fase móvil en la cámara de desorción y después de un tiempo determinado, la fase móvil arrastra los analitos desorbidos hacía la columna cromatográfica para su separación y cuantificación. La comparación de los dos diseños de cromatógrafo de líquidos se realizó para los dos modos de desorción. En ambos casos (modos

dinámico y estático), el cromatógrafo de líquidos modificado proporcionó mejores resultados que el convencional, sobre todo para los compuestos más apolares y, de los dos modos de desorción, el modo estático proporcionó mejores resultados.

Los compuestos fenólicos son generalmente determinados mediante HPLC con detección UV o ED. El detector ED es bastante más sensible que el UV en las condiciones de trabajo para muchos de estos compuestos con la excepción de los nitrofenoles. Estos compuestos presentan una mayor respuesta en el detector UV. En consecuencia, se conectaron en serie estos dos detectores de forma que los nitrofenoles se determinaron con el detector UV y el resto de los compuestos mediante el detector ED.

Una vez seleccionado el diseño de cromatógrafo modificado como el más adecuado en modo de desorción estático, se procedió a la optimización de los parámetros que afectan a la etapa de absorción y desorción en SPME y finalmente se validó el método analítico con muestras reales de agua del río Ebro. Finalmente, se utilizó el método SPME-HPLC-UV-ED para analizar varias muestras de agua del río Ebro y de plantas de tratamiento de aguas residuales y en una de ellas se pudo cuantificar la presencia de fenol y 4-cloro-3-metilfenol.

De los resultados obtenidos en este trabajo se pudo afirmar que la SPME combinada con la HPLC, utilizando un diseño de cromatógrafo de líquidos modificado, permitió obtener mejores resultados, en lo que se refiere a recuperaciones y forma de los picos, que los que proporcionó un cromatógrafo de líquidos convencional acoplado a la misma interfase SPME/HPLC. Sin embargo, se debe indicar que la interfase comercial para SPME/HPLC no es muy robusta y durante su utilización se deben tomar muchas precauciones, de lo contrario, se pueden dañar muy fácilmente el recubrimiento de las fibras o las férrulas utilizadas para el sellado de la cámara de desorción.

Otros autores han publicado estudios en los que la SPME se combina con la HPLC para la determinación de estos compuestos en muestras de agua [10,11] y madera [11]. En estos trabajos las fibras utilizadas son diferentes de la utilizada en este trabajo. En el estudio realizado por Sarrión *et al.* [11], la desorción de los clorofenoles se realiza fuera de línea con el cromatógrafo de líquidos y se utiliza también detección electroquímica. Los límites de detección obtenidos por estos autores son aproximadamente unas 10 veces inferiores a los obtenidos en el presente trabajo (3-8 ng l⁻¹). Esta diferencia en los límites de detección puede ser debida a que los compuestos fenólicos presenten una mayor retención en las fibras de CW-TPR, que son las que han utilizado estos autores. En el trabajo realizado en la presente Tesis Doctoral, aunque los límites de detección no son tan bajos, se han determinado la mayoría de los fenoles estudiados por debajo de las concentraciones dictadas por las normativas y además la SPME se acopla en línea con la HPLC por lo que la manipulación de la muestra es menor.

A continuación se adjunta el artículo científico que se ha publicado en la revista *Journal of Chromatography A*, 953 (2002) 79-87 y que resume los resultados obtenidos en la realización de este trabajo.

Bibliografía

- [1] M. Möder, S. Schrader, U. Franck, P. Popp, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 357 (1997) 326.
- [2] L. S. dos Santos, M.G. Rodríguez Vale, M.B. Campos de Araujo, E. Bastos Caramao, E.C. Oliveira, *J. Sep. Sci.*, 24 (2001) 309.
- [3] M. Llompарт, M. Lourido, P. Landín, C. García-Jares, R. Cela, *Anal. Chem.*, 963 (2002) 137.
- [4] *Drinking Water Directive 98/83/EEC*, Commission of the European Communities, Brussels, 1998.
- [5] P. Barták, L. Cáp, *J. Chromatogr. A*, 767 (1997) 171.
- [6] K.D. Buchholz, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 160.

- [7] L. Wu, J.R: Almirall, K.G. Furton, J. High Resol. Chromatogr., 22 (1999) 279
- [8] E. Pocurull, R.M. Marcé, F. Borrull, Chromatographia, 41 (1995) 521.
- [9] N. Masqué, M. Galià, R.M. Marcé, F. Borrull, J. Chromatogr. A, 771 (1997) 55.
- [10] E. González-Toledo, M.D. Prat, M.F. Alpendurada, J. Chromatogr. A, 923 (2001) 45.
- [11] M.N. Sarrión, F.J. Santos, M.T. Galcerán, J. Chromatogr. A, 947 (2002) 155.

SOLID-PHASE MICROEXTRACTION COUPLED TO HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY TO DETERMINE PHENOLIC COMPOUNDS IN WATER SAMPLES

ABSTRACT

Solid-phase microextraction (SPME) coupled to high-performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) and electrochemical detection (ED) has been applied to determine 11 phenolic compounds considered priority pollutants by the US Environmental Protection Agency. 85 μm -polyacrylate fibers were used to extract the analytes from the aqueous samples. Two different designs of the liquid chromatograph were compared in combination with SPME. Dynamic and static modes of desorption in both HPLC designs were compared and the variables affecting both absorption and desorption processes in SPME-HPLC were optimized. Static desorption in both HPLC systems showed better recoveries for the phenolic compounds. The performance of the SPME-HPLC-UV-ED method was evaluated with river water and wastewater samples. The method enabled the determination of phenolic compounds at low levels in these water samples.

Keywords: Water analysis; Environmental analysis; Solid-phase microextraction; Phenols; Chlorophenols; Nitrophenols.

INTRODUCTION

Phenolic compounds, which are used in several industrial processes, are some of the most important contaminants present in the environment [1]. They are used to manufacture chemicals such as pesticides, in pulp processing, and as preservatives for woods, textiles and leather [1,2]. As a result, they are often found in waters [3,4], soils [5] and sediments [5,6]. Phenolic compounds, especially chlorophenols, are known for their toxicity and persistence in the environment [1-3]. For this reason, some of them have been included in the lists of priority pollutants of several countries and they are subject to legislation [3]. European Union, for example, has set the maximum total and individual phenol permitted concentrations in water used for human consumption at $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$, and $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$, respectively [7].

High-performance liquid chromatography (HPLC) [8-10] is frequently used for the determination of phenolic compounds because, unlike in gas chromatography (GC) no derivatization of compounds is needed [4-6,11-15]. In HPLC, electrochemical detectors (ED) can be used to determine phenols at lower concentrations than ultraviolet absorbance detectors, although UV detection is more sensitive for some nitrophenols [8]. To reach the concentration levels required by legislation, conventional methods of determining phenolic compounds involve preconcentration. Solid-phase extraction (SPE) is the most frequently used preconcentration technique for phenolic compounds [8-10,16].

A more recent extraction technique, solid-phase microextraction (SPME), was introduced by Pawliszyn [17]. SPME consists of an absorption and a desorption step. In the absorption step, a coated fused silica fiber extracts the analytes from the sample matrix. In the desorption step, the analytes are desorbed from the fiber and introduced into the analytical column for separation. Usually, SPME is combined with GC, placing the fiber in the hot injector of the gas chromatograph, where the analytes are thermally desorbed. SPME and HPLC were first coupled in 1995 [18]; the system has

been commercially available since 1996. An organic solvent (static desorption) or the mobile phase (dynamic desorption) is used to desorb the analytes from the SPME fiber. To date, SPME has been successfully used to determine phenols and nitrophenols in water [4,12,13,15] and soil [6,14,19,20] samples. Some of these papers have included a derivatization step in the analytical method to enable the GC determination of some of the compounds [12,13].

The aim of this paper is to develop an SPME-HPLC method using 85 μ m-polyacrylate fibers to determine in water samples 11 phenols that the US Environmental Protection Agency (EPA) listed as priority pollutants. It is also an objective of this paper to compare two liquid chromatograph designs and the dynamic and static modes of desorption. These designs differ in the elution of the compounds retained in the SPME fiber. In one of the designs, the mobile phase desorbs the analyte. In the other, only the organic solvent of the mobile phase acts as the desorbing agent. The method developed has been applied for the analysis of real water samples from the Ebro river and from wastewater treatment plants.

EXPERIMENTAL

Reagents and standards

The compounds studied were the 11 phenolic EPA priority pollutants: phenol (Ph), 4-nitrophenol (4-NP), 2,4-dinitrophenol (2,4-DNP), 2-chlorophenol (2-CP), 2-nitrophenol (2-NP), 2,4-dimethylphenol (2,4-DMP), 2-methyl-4,6-dinitrophenol (2-M-4,6-DNP), 4-chloro-3-methylphenol (4-C-3-MP), 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP), 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP) and pentachlorophenol (PCP). All compounds were purchased from Aldrich (Steinheim, Germany), except PCP, which was purchased from Jansen

Chemie (Geel, Belgium). A stock standard solution of 2000 mg l⁻¹ of each compound was prepared in methanol. Working standard solutions of 100 mg l⁻¹ were prepared weekly in methanol. Stock and working standards were stored at 4 °C in the refrigerator. The aqueous solutions were prepared daily by diluting the working solution with water (Milli-Q and real water samples).

Sodium chloride (over 99.5% pure), was obtained from Riedel-de H en (Seelze-Hannover, Germany), and hydrochloric acid from Probus (Badalona, Spain).

HPLC-grade methanol from SDS (Peypin, France) and Milli-Q quality water (Millipore, Bedford, MA, USA), adjusted to pH 2.8 with acetic acid from Probus (Badalona, Spain), were used in the preparation of the mobile phase. To adjust the ionic strength of the mobile phase, potassium chloride, supplied by BDH (Poole, UK), was added.

Instrumentation

The SPME device, the 85 μ m-polyacrylate fibers and the SPME-HPLC interface were purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Two chromatographic systems were used. The first was a Hewlett-Packard 1050 liquid chromatograph (Palo Alto, CA, USA) with a UV spectrophotometric detector, the second was assembled of two LC-10AD_{VP} pumps, a DGU-14A degasser and a CTO-6AS oven from Shimadzu (Tokyo, Japan) with two detectors connected in series, an HP-1100 UV detector and an HP-1049A electrochemical detector, both from Hewlett-Packard. The Shimadzu HPLC system was a modification of a conventional liquid chromatograph in which the mixing chamber was placed after the injection valve to ensure that only the organic solvent of mobile phase passes through the injection valve. Chromatographic data were collected and recorded by an HP-3365 Series II Chemstation. The separation was performed in an 25 x 0.4 cm I.D.

Spherisorb ODS2 column packed with 5 μm particles size (Teknokroma, Barcelona, Spain), in both chromatographic systems.

SPME procedure

Before their first use, the 85 μm -polyacrylate fibers were conditioned in the desorption chamber of the SPME-HPLC interface for 30 min, according to the supplier's instructions. After conditioning, a fiber blank was run. SPME was carried out by introducing 3.5 ml of aqueous samples into 4 ml vials. The samples were saturated with NaCl (360 g l⁻¹) and their pH was adjusted with HCl to 2.5 [4,20]. The 85 μm -polyacrylate fiber was then immersed in the sample for 30 min at 50 °C. The samples were heated and stirred with a magnetic stirrer and heater unit from Selecta (Abrera, Spain) at a constant speed of 1400 rpm. The analytes were desorbed from the fiber and introduced into the chromatographic system by the commercial SPME-HPLC interface. The fiber was cleaned with Milli-Q water after each analysis to avoid damage due to crystallization of NaCl. At least 20 samples were analyzed by the same fiber before it was damaged by the double-tapered ferrule.

Real samples (from river and wastewater treatment plant) were filtered through a 0.45 μm nylon membrane filter (Whatman, Maidstone, UK) before analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Chromatographic separation

The separation conditions were taken from a previous paper from our group [21] and were the same for both chromatographic systems. The mobile phase consisted of Milli-Q water (containing 1% (v/v) acetic acid and 0.5 g l^{-1} of KCl) as solvent A, and methanol as solvent B. The flow rate of the mobile phase was 1 ml min^{-1} ; the gradient profile was 25% B at 0 min, 50% B at 25 min, 100% B at 30 min, followed by isocratic elution for 5 min. The mobile phase was returned to its initial composition in 5 min. The oven temperature was set at $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

In the UV spectrophotometric detector, all compounds were detected at 280 nm, except PCP, which was detected at 302 nm. The potential used in the electrochemical detector was 1.0 V [21]. This detector worked in amperometric mode, so the eluent had to contain KCl (0.5 g l^{-1}). A glassy carbon electrode and a solid state Ag/AgCl reference electrode were used. The surface of the electrode was electrochemically cleaned once a day by applying a cyclic treatment with alternate potentials. The working electrode was polished in the conventional way once a week.

Optimization of desorption process

Polyacrylate-coated fibers were selected for the SPME because good results were obtained with them previously for phenolic compounds [4,5,11-13]. Two modes of desorption are possible in SPME-HPLC: dynamic desorption and static desorption. In the dynamic mode, analytes are desorbed from the fiber by the moving stream of the mobile phase. In the static mode, the fiber is kept in the desorption chamber, filled with an organic solvent or the mobile phase, for a period of time.

The SPME-HPLC interface connected to the two HPLC systems (Shimadzu and Hewlett-Packard) were evaluated in both dynamic and static modes of desorption with water samples containing the phenolic compounds at 0.14 mg l⁻¹. An absorption time of 20 minutes and a temperature of 45 °C were initially selected for the SPME absorption process [4].

In the conventional HPLC design (HP-1050), the mixing chamber was placed before the SPME desorption chamber (see Figure 1a). First, the dynamic desorption mode was tested. The fiber, loaded with the analytes, was introduced into the desorption chamber, the valve was immediately switched from the load to the inject position and mobile phase at 1 ml min⁻¹ was passed through the desorption chamber for 5 minutes to effect complete desorption. The valve was then returned to the load position and the fiber was removed from the desorption chamber. The recoveries for the phenolic compounds in dynamic mode are shown in Table 1. Although these values are low, they are typical in SPME. Phenol was not recovered under these conditions. In the static mode, the fiber was also placed in the desorption chamber but the valve was switched from the load position to the inject position only after 5 minutes.

Several experiments were carried out in static mode. First, the desorption chamber was filled with the initial composition of the mobile phase (MeOH/Milli-Q water, 25:75). Five minutes were enough to desorb all the phenolic compounds. Phenol was not recovered in the static mode either, but the peak areas for the other phenolic compounds increased. We also evaluated static desorption using methanol and acetonitrile. They were introduced into the desorption chamber with a conventional HPLC syringe (see Figure 1a).

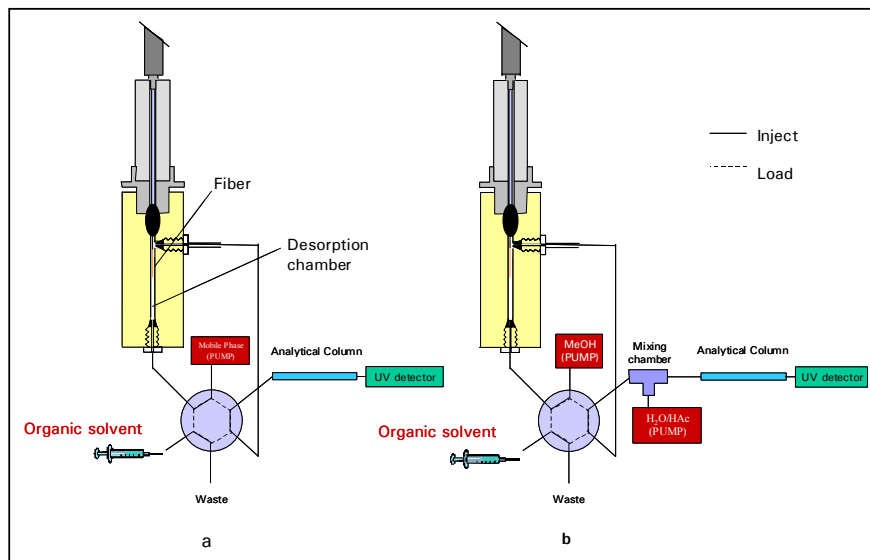


Figure 1. Experimental set-up of the SPME-HPLC designs: (a) SPME interface connected to the HP-1050 HPLC system; (b) SPME interface connected to the Shimadzu HPLC system.

Table 1. Recoveries (%) obtained by extraction of 3.5 ml of Milli-Q water samples spiked with 0.14 mg l⁻¹ for the two liquid chromatographs designs.

Compounds	HP-1050				SHIMADZU		
	Dynamic	Static	100% Methanol	100% Acetonitrile	Dynamic	Static	100% Acetonitrile
Ph	-	-	-	-	0.2	0.9	1.8
4-NP	0.8	1.0	1.7	1.2	0.7	1.8	2.2
2,4-DNP	0.6	0.9	1.6	1.4	1.4	2.1	2.2
2-CP	1.4	2.5	4.1	3.8	2.6	4.1	3.7
2-NP	0.7	0.6	2.2	2.3	1.7	2.3	2.1
2,4-DMP	2.1	2.8	5.7	6.7	4.7	5.7	5.4
2-M-4,6-DNP	*	0.8	4.9	*	3.1	5.9	5.3
4-C-3-MP	*	2.6	4.0	*	7.1	7.5	6.6
2,4-DCP	2.2	3.3	8.6	10.3	10.1	10.2	9.1
2,4,6-TCP	2.8	4.2	12.6	12.4	12.3	18.3	18.3
PCP	3.1	5.1	14.3	16.9	21.9	29.9	29.5

^a Initial composition of mobile phase (Methanol-Milli-Q water, 25:75)

* Coelution of peaks

Table 1 shows that the results in static desorption mode were best when an organic solvent was used: methanol and acetonitrile provided similar results and, in both cases, fronting peaks were obtained. This was probably due to an inefficient mixing between the mobile phase and the organic solvent introduced into the desorption chamber, because there were no fronting peaks when desorption chamber was full of mobile phase.

In the second HPLC design tested (Figure 1b), the mixing chamber was placed after the desorption chamber so only the organic solvent (methanol) of the mobile phase passed through the desorption chamber. The peaks were not distorted. Again, desorption was studied in both the static and dynamic modes using methanol at a flow rate of $0.250 \text{ ml min}^{-1}$ [mobile phase flow rate (25% aqueous methanol): 1 ml min^{-1}] in both modes. An additional experiment was carried out with acetonitrile in the desorption chamber to compare with the results from the HP-1050 liquid chromatograph. Peaks were not distorted. Table 1 shows that the second HPLC design was better than the HP 1050-SPME system in both the static and dynamic modes for the more apolar compounds. Recoveries were better in the static mode than in the dynamic mode.

Since methanol and acetonitrile provided similar results, methanol, the organic solvent of the mobile phase, was selected for further experiments. Desorption times ranging from 1 to 5 min were tested. The results are shown in Figure 2. A desorption time of 2 min was selected because after this time recoveries did not increase significantly and in a subsequent analysis no peaks appeared at the retention time of the phenolic compounds. After 2 min, the fiber could be removed from the SPME-HPLC interface and prepared for a new run.

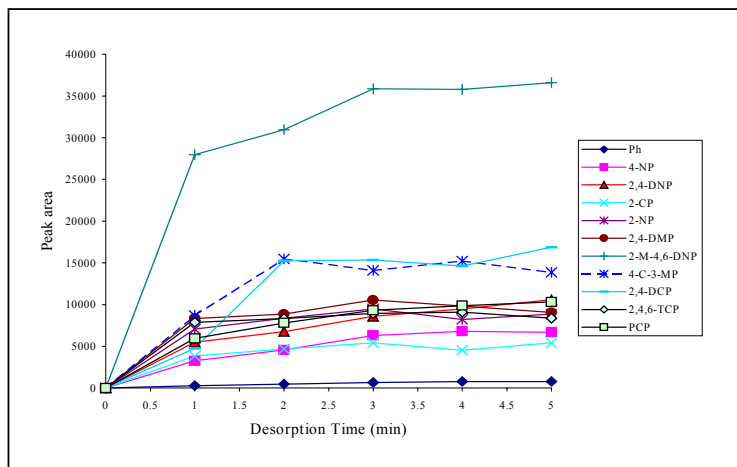


Figure 2. Optimization of desorption time in static mode for the Shimadzu HPLC design.

Optimization of the absorption process

The factors affecting the SPME absorption process were optimized: i.e. the time (5-40 min) and temperature of absorption (25-60 °C), the addition of NaCl to the sample (0-360 g l⁻¹) and the pH of the sample (0.5-5). The concentration of phenolic compounds in Milli-Q water samples was maintained at 0.14 mg l⁻¹ and the desorption parameters were fixed at the previously optimized values. The best results were obtained at 30 min; 50 °C, 360 g l⁻¹ (saturated solution) and pH 2.5, allowing the analysis of a new sample every 47 min.

Performance of the SPME-HPLC method

Once the SPME parameters had been optimized, the method was checked by analyzing 3.5 ml Milli-Q water samples spiked with the compounds. An electrochemical detector was connected in series to the ultraviolet detector

to enable low levels of some phenolic compounds to be determined [8]. However, some nitrophenols (2,4-DNP and 2-M-4,6-DNP) showed better responses with the ultraviolet detector, and so the two detectors connected in series were used. Also, the ratio of the responses from the two detectors was used to confirm the presence of these compounds in real water samples.

The linearity of the response was checked in the 0.005 to 30 mg l⁻¹ range in the ultraviolet detector, and in the 0.05 to 100 µg l⁻¹ range of standard solutions in the electrochemical detector. The linearity in both cases was good ($R^2 > 0.9925$) for most compounds, except phenol, for which it was 0.1-30 mg l⁻¹ when UV was used, and 2,4-DNP and 2-M-4,6-DNP, for which it was 10-100 µg l⁻¹ when ED was used. The limits of detection of the method, calculated by the Winefordner and Long criterion with a K of 6 [22], were between 1.0 and 18 µg l⁻¹ for UV detection, and between 0.01 and 12 µg l⁻¹ for ED. The repeatability and the reproducibility between days, calculated as relative standard deviation [RSD(%) (n=5)], were determined with Milli-Q water spiked with 1 µg l⁻¹ for ED and with 0.1 mg l⁻¹ for UV detection. In ED, the RSDs were under 21.1% and 25.3% for repeatability and reproducibility, respectively. In UV detection, the RSDs were under 23.6% and 30.6%, respectively.

Application to real samples

The method was validated with Ebro river water samples. The maximum content of humic and fulvic acids in these waters is 10 mg l⁻¹ [23]. First, a blank of the Ebro river water was run to verify the absence of peaks at the retention time of phenolic compounds and no interference was found as shown in Figure 3.

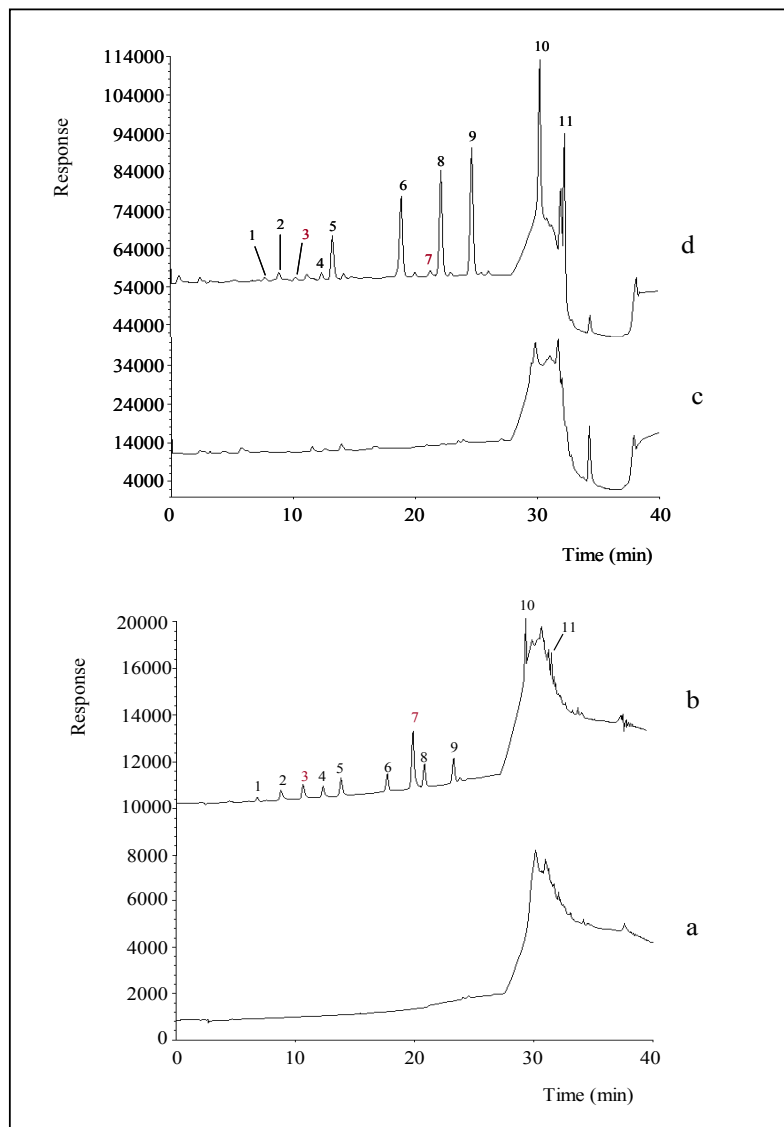


Figure 3. Chromatograms obtained by SPME-HPLC-UV-ED of 3.5 ml of Ebro river water using (a,b) UV detection and (c,d) ED in static mode of desorption. (a,c) unspiked Ebro river water; (b) Ebro river water spiked with 0.1 mg l⁻¹; (d) Ebro river water spiked with 1 μg l⁻¹ of each compound. Peaks: (1) Ph; (2) 4-NP; (3) 2,4-DNP; (4) 2-CP; (5) 2-NP; (6) 2,4-DMP; (7) 2-M-4,6-DNP; (8) 4-C-3-MP; (9) 2,4-DCP; (10) 2,4,6-TCP; (11) PCP.

The linear range, the limits of detection, and the repeatability and reproducibility of the method were also determined with Ebro river water, in the same way as with Milli-Q water. The results, shown in Table 2, were similar to those for Milli-Q water samples indicating that the presence of matrix components, such as humic and fulvic acids, did not interfere in the extraction of phenolic compounds. Figure 3 also shows the chromatograms for the Ebro river water sample spiked with $1 \mu\text{g l}^{-1}$ for ED, and 0.1 mg l^{-1} for UV detection.

Several wastewater samples were also analyzed. Figure 4 shows the chromatogram of one of these samples. Phenol and 4-chloro-3-methylphenol were quantified using the calibration curves for the ED because, for UV detection, the responses were between the limit of quantification and the limit of detection. The concentrations were $87 \mu\text{g l}^{-1}$ for the phenol and $7.4 \mu\text{g l}^{-1}$ for the 4-chloro-3-methylphenol.

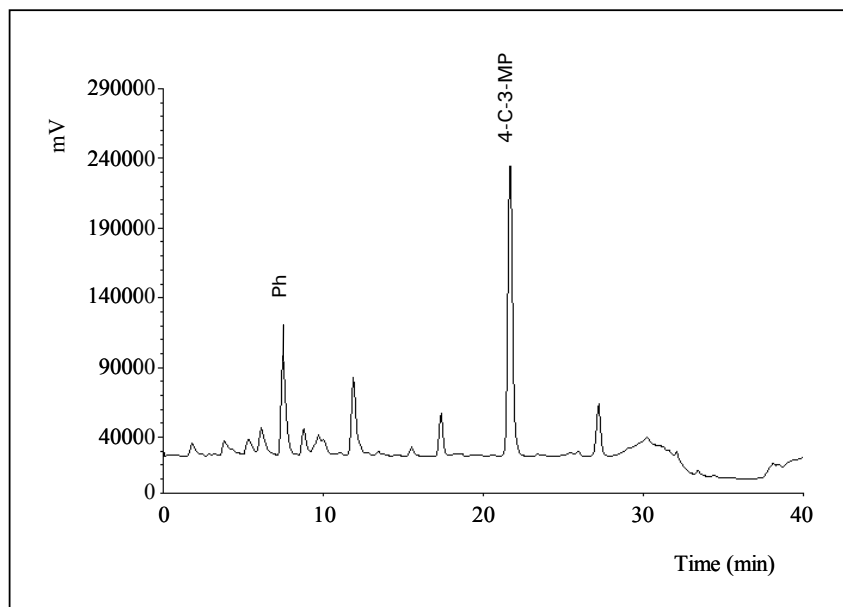


Figure 4. Chromatograms obtained by the SPME-HPLC-ED method by extracting 3.5 ml of a wastewater sample.

Table 2. Linear range, determination coefficients, limits of detection and repeatability and reproducibility for Ebro river water by SPME-HPLC-UV-ED.

Compounds	UV detection					ED detection				
	Linear range (mg l ⁻¹)	R ²	LOD (μg l ⁻¹)	RSD(%) ^a	RSD(%) ^b	Linear range (μg l ⁻¹)	R ²	LOD (μg l ⁻¹)	RSD(%) ^a	RSD(%) ^b
Ph	0.1-30	0.9982	23	9.9	20.1	0.5-100	0.9982	0.1	13.2	14.2
4-NP	0.01-30	0.9961	3.6	8.9	9.9	0.2-100	0.9991	0.05	9.1	11.9
2,4-DNP	0.01-30	0.9979	4.1	14.0	14.4	50-100	0.9982	15	15.3	17.2
2-CP	0.01-30	0.9947	3.9	14.5	14.8	0.2-100	0.9956	0.06	6.8	9.3
2-NP	0.005-30	0.9933	1.6	11.3	12.2	0.05-100	0.9967	0.03	11.6	11.9
2,4-DMP	0.005-30	0.9966	1.8	11.9	12.3	0.05-100	0.9994	0.015	7.5	9.1
2-M-4,6-DNP	0.002-30	0.9981	0.4	12.7	14.6	10-100	0.9960	4.5	13.1	14.6
4-C-3-MP	0.01-30	0.9956	2.7	14.3	15.7	0.05-100	0.9985	0.013	6.4	11.2
2,4-DCP	0.01-30	0.9981	3.8	15.1	15.5	0.05-100	0.9929	0.02	7.1	13.4
2,4,6-TCP	0.005-30	0.9902	2.0	14.7	14.9	0.05-100	0.9936	0.017	9.6	11.9
PCP	0.01-30	0.9977	2.9	18.1	20.3	0.1-100	0.9967	0.05	4.2	8.1

^a In repeatability conditions (n=5)

^b In reproducibility between days conditions (n=5)

CONCLUSIONS

11 EPA phenolic priority pollutants were successfully analyzed of SPME-HPLC in real water samples. One sample could be analyzed every 47 min.

The modified HPLC-design, in which the desorption chamber for SPME was placed before the mixing chamber of the mobile phase, provided better results than coupling the SPME interface to the conventional HPLC design. With this system, recoveries were higher and the peaks were not distorted.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported financially by CICYT (AMB99-0875). A. P. would like to thank the Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica for a predoctoral grant.

REFERENCES

- [1] A.H. Nielson, A.S. Allard, P.A. Hynning, M. Rememberger, *Toxicol. Environ. Chem.*, 30 (1991) 3.
- [2] G. Ohlenbusch, M.U. Kumke, F.H. Frimmel, *Sci. Total Environ.*, 253 (2000) 63.
- [3] D. Puig, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.*, 15 (1996) 362.
- [4] M. Möder, S. Schrader, U. Franck, P. Popp, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 357 (1997) 326.
- [5] M-R. Lee, Y-C Yeh, W-S. Hsiang, B-H. Hwan, *J. Chromatogr. A*, 806 (1998) 317.
- [6] L. Wennrich, P. Popp, M. Möder, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 546.

- [7] Drinking Water Directive 98/83/EEC, Commission of the European Communities, Brussels, 1998.
- [8] E. Pocurull, G. Sánchez, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Chromatogr. A, 696 (1995) 31.
- [9] E. Pocurull, R.M. Marcé, F. Borrull, Chromatographia, 40 (1995) 85.
- [10] N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull, Chromatographia, 50 (1999) 21.
- [11] B. Schäfer, W. Engewald, Fresenius J. Anal. Chem., 352 (1995) 535.
- [12] P. Barták, L. Cáp, J. Chromatogr. A, 767 (1997) 171.
- [13] K.D. Buchholz, J. Pawliszyn, Anal. Chem., 66 (1994) 160.
- [14] F.J. Santos, M.N. Sarrión, M.T. Galcerán, J. Chromatogr. A, 771 (1997) 181.
- [15] Z. Takáts, K. Torkos, Chromatographia, 48 (1998) 74.
- [16] D. Martínez, E. Pocurull, R.M. Marcé, F. Borrull, M. Calull, Chromatographia, 43 (1996) 619.
- [17] J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*, Wiley-VCH, New York, 1997.
- [18] J.P. Chen, J. Pawliszyn, Anal. Chem., 67 (1995) 2530.
- [19] M.N. Sarrión, F.J. Santos, M.T. Galcerán, J. Chromatogr. A, 819 (1998) 197.
- [20] M.F. Alpendurada, J. Chromatogr. A, 889 (2000) 3.
- [21] E. Pocurull, R.M. Marcé, F. Borrull, J. Chromatogr. A, 738 (1996) 1.
- [22] G.L. Long, J.D. Winefordner, Anal. Chem., 55 (1983) 712A.
- [23] N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull, Chromatographia, 48 (1998) 231.

III.6. DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO BASADO EN MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE ESTRÓGENOS EN MUESTRAS DE AGUA

A consecuencia de los buenos resultados obtenidos en el trabajo anterior, en el siguiente trabajo se ha estudiado el mismo acoplamiento SPME-HPLC para la determinación de otro grupo de compuestos de interés medioambiental, los estrógenos. Recientemente, el interés en el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de estos compuestos se ha visto incrementado [1] ya que algunos estudios han indicado que su presencia en bajas concentraciones en los seres vivos puede modificar el funcionamiento normal de las hormonas y provocar la aparición de alteraciones en el organismo.

Estos compuestos pueden ser introducidos en el medioambiente a través de los residuos urbanos o industriales [2,3] y entre ellos se encuentran plaguicidas, hormonas esteroidales y compuestos derivados, plastificantes como el bisfenol A o los ftalatos y los alquilfenoles [3]. Algunos estudios ya han mostrado que estos compuestos se encuentran a bajas concentraciones en aguas de diferente procedencia (mar, río, depuradora, etc.), lo que confirma la necesidad de desarrollar métodos analíticos que permitan el control de estos compuestos. Algunos de ellos, como por ejemplo los plaguicidas, ya se encuentran regulados debido a sus conocidas propiedades tóxicas pero, actualmente, diferentes organismos internacionales, como la UE, están revisando las normativas para disminuir las concentraciones máximas permitidas en aguas para estos compuestos o incluirlos en las normativas en el caso de que aún no estén todavía regulados [4].

Para este estudio se han seleccionado un conjunto de hormonas esteroidales y derivados sintéticos, tres alquilfenoles y el bisfenol A. Estos compuestos son generalmente determinados mediante GC o HPLC combinadas con LLE o SPE [5,6]. Cuando se propuso la realización de este estudio se habían realizado pocos estudios [2,7] en los que se utilizara la SPME para la preconcentración de alguno de los compuestos seleccionados para este trabajo y en ninguno de ellos se determinaban todos estos compuestos simultáneamente.

Así pues, el objetivo de este trabajo consistió en el desarrollo de un método analítico basado en el acoplamiento de la SPME con la HPLC para la

determinación de un grupo de compuestos estrogénicos en aguas. Para la detección de los estrógenos se utilizaron dos detectores conectados en serie, UV y ED, ya que todos los compuestos incluidos en este estudio presentaban un grupo fenólico y el detector ED es más sensible que el UV para este tipo de compuestos.

El estradiol y sus derivados presentan una estructura muy similar y sólo se diferencian entre ellos por pequeños cambios en los sustituyentes (ver Anexo I). En consecuencia, se observó que sus tiempos de retención eran muy similares por lo que su separación fue problemática. Se evaluaron varias columnas y finalmente se escogió la columna Lichrospher 100 RP-18 para llevar a cabo la separación ya que proporcionó una buena resolución para todos los compuestos, incluso al acoplar la interfase SPME/HPLC.

La fibra seleccionada para este trabajo fue la de 85 μm poliacrilato ya que había proporcionado muy buenos resultados en el trabajo anterior y debido a que los compuestos estudiados en este trabajo presentan una estructura fenólica, era de esperar que también se obtuvieran. Para llevar a cabo el acoplamiento de la SPME con la HPLC se utilizó la interfase SPME/HPLC comercial y el cromatógrafo de líquidos modificado ya que en el trabajo anterior proporcionó mejores resultados que un cromatógrafo de líquidos convencional.

Así, se seleccionó el modo de desorción (dinámico y estático) más adecuado para los compuestos estudiados y se optimizaron los parámetros de la etapa de absorción. Una vez optimizados todos los parámetros de la SPME, se procedió a la validación del método analítico en agua Milli-Q y agua del río Ebro y, finalmente, se analizaron diferentes muestras de agua de plantas de tratamiento de aguas residuales y de varios puntos a lo largo del río Ebro. La deriva observada al utilizar el detector electroquímico impidió la determinación de los tres compuestos que eluían en último lugar por lo que para ellos se tuvo que utilizar detección ultravioleta. Con el método desarrollado se consiguió determinar algunos de los compuestos estudiados a bajas concentraciones, del

orden de pocos $\mu\text{g l}^{-1}$, en muestras de agua utilizando detección electroquímica. Sin embargo, para los compuestos que se determinaron con el detector UV, los límites de detección fueron más elevados, lo que limita la utilización de este método analítico.

El artículo, que se adjunta a continuación, en el que se resumen los resultados obtenidos de la realización de este estudio ha sido publicado en la revista *Journal of Chromatography A*, 964 (2002) 153-160.

Bibliografía

- [1] M.D. Shelby, R.R. Newbold, D.B. Tully, K. Chae, V.L. Davis, *Environ. Health Perspect.*, 104 (1996) 1296.
- [2] M. Moeder, S. Schrader, M. Winkler, P. Popp, *J. Chromatogr. A*, 873 (2000) 95.
- [3] M. Castillo, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.*, 16 (1997) 574.
- [4] Comunicación de la Comisión de las Comunidades Europeas, COM (2001) 262, Bruselas, 14/0/2001.
- [5] J.L. Vílchez, A. Zafra, A. González-Casado, E. Hontoria, M. Del Olmo, *Anal. Chim. Acta*, 431 (2001) 31.
- [6] M.I.H. Helaleh, Y. Takabayashi, S. Fujii, T. Korenaga, *Anal. Chim. Acta*, 428 (2001) 227.
- [7] Y. Takao, H.C. Lee, Y. Ishibashi, S. Kohra, N. Tominaga, K. Arizono, *J. Health Sci.*, 45 (1999) 39.

METHOD BASED ON SOLID-PHASE MICROEXTRACTION-HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH UV AND ELECTROCHEMICAL DETECTION TO DETERMINE ESTROGENIC COMPOUNDS IN WATER SAMPLES

ABSTRACT

We determined a group estrogenic compounds by solid-phase microextraction (SPME) coupled to high-resolution liquid chromatography (HPLC) with both ultraviolet (UV) and electrochemical detection (ED). A modified liquid chromatograph was used. Polyacrylate fibers (85 μm) were used to extract the analytes from the aqueous samples. Dynamic and static modes of desorption were compared and the variables affecting both absorption and desorption processes in SPME-HPLC were optimized. Static desorption gave the best recoveries and peak shapes. The performance of the SPME-HPLC-UV-ED method was checked with river water and wastewater. The method enabled estrogenic compounds to be determined at low $\mu\text{g l}^{-1}$ levels in real water samples. Limits of detection were between 0.06 and 0.08 $\mu\text{g l}^{-1}$ using ED. β -estradiol was found in samples from a wastewater treatment plant at concentrations between 1.9 and 2.2 $\mu\text{g l}^{-1}$.

Keywords: Water analysis; Environmental analysis; Endocrine disruptors; Estrogenic compounds

INTRODUCTION

Several studies have reported that estrogenic compounds can adversely affect humans and animals [1,2]. These compounds may interact with the organism's endocrine system and disturb or inhibit the natural hormone action. As a consequence, reversible or irreversible alterations in the hormone-regulated processes may appear even at low concentrations [1,2]. A wide range of commonly used compounds are suspected of having these adverse effects on the endocrine system: some pesticides, steroid hormones and their related synthetic compounds, some plasticisers, such as bisphenol A and phthalate esters, and alkyl phenols [2,3]. Urban or industrial discharges [3,4] introduce these compounds into the environment and their presence in wastewaters, municipal sewage treatment plants and river waters has recently been reported [3–7]. Nowadays, there is considerable interest in developing analytical methods for determining these compounds in environmental samples at low levels [8].

Common methods for determining such compounds in aqueous samples involve using preconcentration techniques to decrease limits of detection. Liquid–liquid extraction (LLE) or solid-phase extraction (SPE) followed by gas chromatography with mass spectrometric detection (GC–MS) are some of the most common techniques [4,9,10]. However, some of these compounds cannot be determined by GC without derivatization because they are thermally unstable, polar or ionic [5,9,10]. High-performance liquid chromatography (HPLC) combined with conventional preconcentration techniques such as LLE or SPE is a good alternative for determining these compounds in aqueous samples [3,5,7,11,12].

Solid-phase microextraction (SPME) is a preconcentration technique that has been successfully applied to determine environmental pollutants in aqueous samples [13–16] and some estrogenic compounds [4,17–19]. Desorption is usually carried out in a gas chromatograph [4,17,19], although Boyd-Boland and Pawliszyn determined alkyl phenol ethoxylate surfactants in water by

SPME–HPLC [18]. A SPME–HPLC interface has been developed to desorb analytes in a liquid chromatograph and some studies have been published to date [15,16,18]. Desorption in HPLC can be performed by placing an organic solvent in the desorption chamber of the SPME–HPLC interface (static desorption) during the desorption time, or by passing mobile phase through the desorption chamber (dynamic desorption).

The main objective of this study is to use SPME coupled to HPLC to determine a group of estrogens (steroid hormones and related synthetic compounds alkylphenols and bisphenol A) by using an 85 μm polyacrylate fiber. To our knowledge, this is the first study in which SPME–HPLC coupling has been used to determine this group of endocrine disruptors. We optimised the absorption conditions and compared dynamic and static desorption modes. After optimizing the absorption and desorption procedures we used the SPME–HPLC method to determine these compounds in real water samples by using both ultraviolet (UV) and electrochemical detection (ED).

EXPERIMENTAL

Reagents and standards

The compounds studied were a group of estrogenic compounds: bisphenol A (BA), β -estradiol, α -estradiol, 17α -ethynylestradiol, estrone, diethylstilbestrol, mestranol, 4-nonylphenol, 4-*tert*-octyl-phenol and 4-*tert*-butylphenol. Bisphenol A, 4-nonylphenol, 4-*tert*-octylphenol and 4-*tert*-butylphenol were purchased from Aldrich (Steinheim, Germany); β -estradiol, α -estradiol, 17α -ethynylestradiol, estrone and diethylstilbestrol were purchased from Sigma (Madrid, Spain); and mestranol was purchased from Riedel-de Haen (Seelze-Hannover, Germany). A stock standard solution of

2000 mg l⁻¹ of each compound was prepared in methanol. Working standard solutions of 100 mg l⁻¹ were prepared weekly in methanol. Stock and working standards were stored at 4 °C in the refrigerator. The aqueous solutions were prepared daily by diluting the working solution with water (Milli-Q and real water samples). Sodium chloride (over 99.5% pure), which was added to the aqueous samples, was obtained from Riedel-de H en. The pH of the aqueous samples was also adjusted with hydrochloric acid from Probus (Badalona, Spain).

HPLC-grade acetonitrile from SDS (Peypin, France) and Milli-Q quality water (Millipore, Bedford, MA, USA) adjusted to pH 2.8 with acetic acid from Probus were used to prepare the mobile phase. To adjust the ionic strength of the mobile phase, we added potassium chloride, supplied by BDH (Poole, UK).

Instrumentation

The SPME device, the 85 µm polyacrylate fibers and the SPME–HPLC interface were purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA). The chromatographic system consisted of two LC-10AD pumps, a DGU-14A degasser and a CTO-6AS oven from Shimadzu (Tokyo, Japan) with two detectors connected in series, a HP-1100 UV detector and a HP-1049A electrochemical detector, both from Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA). This HPLC system was a modification of a conventional liquid chromatograph in which the mixing chamber was placed after the injection valve, allowing only the organic solvent of the mobile phase to pass through the injection valve. Chromatographic data were collected and recorded by an HP-3365 Series II Chemstation. The separation was performed using an 25 X 0.46 cm I.D. Lichrospher 100 RP-18 column with a particle size of 5 µm, supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Other analytical columns tested were Kromasil 100 C₁₈ (25 0.46 cm I.D., 5 µm) (Technokroma, Barcelona,

Spain), a Spherisorb ODS-2 (25 x 0.4 cm ID, 5 μm) (Technokroma) and a Superspher 100 RP-C₁₈ (7.5 x 0.4 cm ID, 4 μm) (Merck).

Chromatographic separation

The separation conditions for the estrogens studied were optimized. The mobile phase consisted of Milli-Q water [containing 1% (v/v) acetic acid 0.5 g l⁻¹ of KCl] as solvent A, and acetonitrile as solvent B. The flow-rate of the mobile phase was 1 ml min⁻¹ and the gradient profile was 35% B at 0 min, 47.5% B at 10 min (held for 8 min), 100% B at 30 min and then isocratic elution for 5 min. The mobile phase was returned to its initial composition in 5 min. The oven temperature was set at 35 °C. In the UV spectrophotometric detector, all compounds were detected at 280 nm. The potential used in the electrochemical detector was 1.0 V and the temperature 40 °C. A glassy carbon electrode and a solid state Ag/AgCl reference electrode were used. The electrochemical cleaning technique was used once a day by applying a cyclic treatment with alternate potentials to correct the electrodeposition on the surface of the electrode. The working electrode was polished in the conventional way once a week.

SPME procedure

Before they were first applied, the 85 μm polyacrylate fibers were conditioned in the desorption chamber of the SPME–HPLC interface for 30 min, according to the supplier's instructions. A fiber blank was run after the conditioning process to confirm that resolution between the analytes was good. Firstly, there were no peaks that could be assigned to compounds introduced during the manufacture of the fiber. The SPME process was carried out by introducing 3.5 ml of aqueous samples into 4-ml vials. The pH of the samples was adjusted with hydrochloric acid to pH 3.0 and the samples were half-saturated with NaCl (180 g l⁻¹). The 85 μm polyacrylate fiber was then immersed in the sample for 45 min at 65 °C. The samples

were heated and stirred with a magnetic stirrer and heater unit from Selecta (Abrera, Spain) at a constant speed of 1400 rpm. To desorb the analytes from the fiber and introduce them into the chromatographic system, a commercial SPME–HPLC interface was connected to a modified HPLC system. The chromatographic system was a modification of a conventional HPLC in which the mixing chamber was placed after desorption chamber. For this reason, the analytes were desorbed from the fiber by the organic solvent of the mobile phase. Desorption was performed in static mode: the fiber was placed in the desorption chamber filled with acetonitrile for 2 min. Then, the acetonitrile from mobile phase ($0.250 \text{ ml min}^{-1}$) was passed through the desorption chamber and the analytes were introduced into the analytical column by switching the valve from the load to the inject position. After 5 min, the valve was returned to its initial position. Milli-Q water was then introduced into the desorption chamber for 5 min with a syringe so as not to damage the fiber coating when the fiber was removed from the SPME–HPLC interface. Organic solvents can swell the coating and precipitate NaCl on the coating. Consequently, the fiber changes its diameter and the coating may remain inside the interface when the fiber is removed.

Real samples (from river and wastewater treatment plants) were filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ nylon membrane filter (Whatman, Maidstone, UK) before analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of chromatographic separation and detection

We tested various analytical columns so that the resolution between the analytes was good. Firstly, we used a conventional Spherisorb ODS-2 (25 x

0.4 cm, 5 μm) column but we could not separate peaks corresponding to β -estradiol, α -estradiol, 17 α -ethynylestradiol and estrone. Secondly, we tested a Kromasil 100 C₁₈ (25 x 0.46 cm, 5 μm) column but resolution between the peaks did not improve. Thirdly, we used a Superspher 100 RP-C (7.5 x 0.4 cm, 4 μm) column, whose dimensions are quite different from the other two columns. Resolution was quite good for all the analytes in a short time when injection was direct but it decreased when we used the on-line SPME-HPLC system. Finally, resolution was good for all compounds, even with the on-line system, when we used the LiChrospher 100 RP-18 (25 x 0.46 cm, 5 μm) column. Thus, we used the LiChrospher column for further experiments.

The responses obtained with the electrochemical detector were at least five times higher than those obtained with the UV detector. However, the baseline obtained with the electrochemical detector drifted as the percentage of acetonitrile in the mobile phase increased and, consequently, the percentage of KCl decreased. The drift was more important from minute 21, when the percentage of the organic solvent in the mobile phase had to be increased from about 50 to 100% to separate the last three eluted compounds. Consequently, the responses for these compounds, mestranol, 4-*tert*-octylphenol and 4-nonylphenol, decreased considerably and they were difficult to integrate. In order to quantify all the compounds studied in the same analysis, we used both UV and electrochemical detectors connected in series. The UV detector was used to determine the three compounds eluted last and the electrochemical detector was used to determine the seven eluted first. Both signals were also used to confirm the presence of the analytes in real samples.

Optimization of the desorption process

We selected polyacrylate-coated fibers for the SPME because they had provided good results in a previous study, in which we determined phenolic compounds [16], and the compounds studied here also had a phenolic

group. We also used the same HPLC design as in this previous study because it gave us better results. Figure 1 shows the HPLC design used, which allowed only the organic solvent of the mobile phase to pass through the desorption chamber at a flow-rate of $0.250 \text{ ml min}^{-1}$ [mobile phase flow-rate (25% acetonitrile): 1 ml min^{-1}].

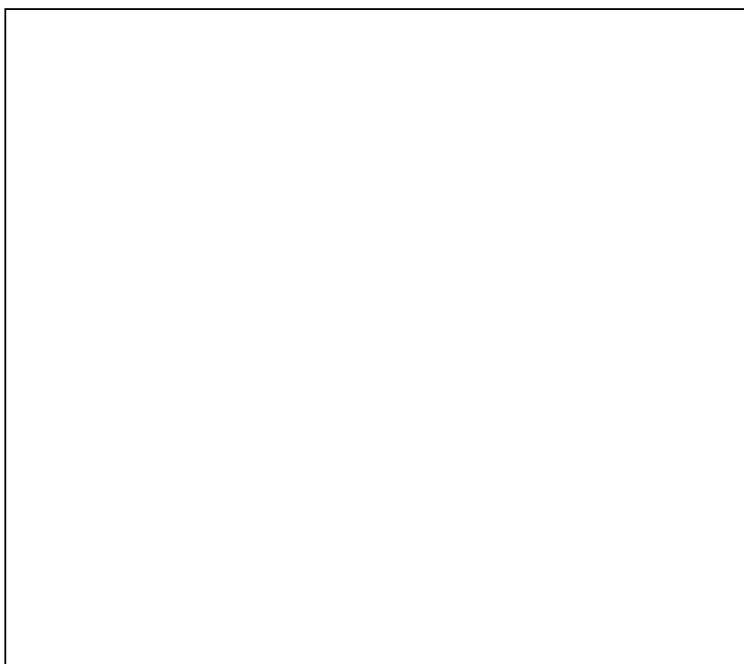


Figure 1. Experimental set-up of the SPME-HPLC design.

To compare both the dynamic and static modes of desorption, we used aqueous samples with a concentration of 0.14 mg l^{-1} of the estrogenic compounds. Initially, all these samples were NaCl-saturated and acidified to pH 2.5. Absorption time was 30 min and the temperature was set at $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for the SPME absorption process.

In the dynamic mode, the fiber was placed in the desorption chamber and the valve was immediately switched from the load to the inject position. After 5 min, the valve returned to the load position and the fiber was removed from the SPME–HPLC interface. In the static mode, the fiber was placed in the desorption chamber full of acetonitrile for 5 min. Then, the valve was switched from the load to the inject position and the analytes were transferred to the chromatographic column. Figure 2 shows the peak areas obtained with both desorption modes. Results were best in the static mode for all the compounds, so this was the mode of desorption used in further experiments. These results agree with those obtained in a previous study on phenolic compounds [16].

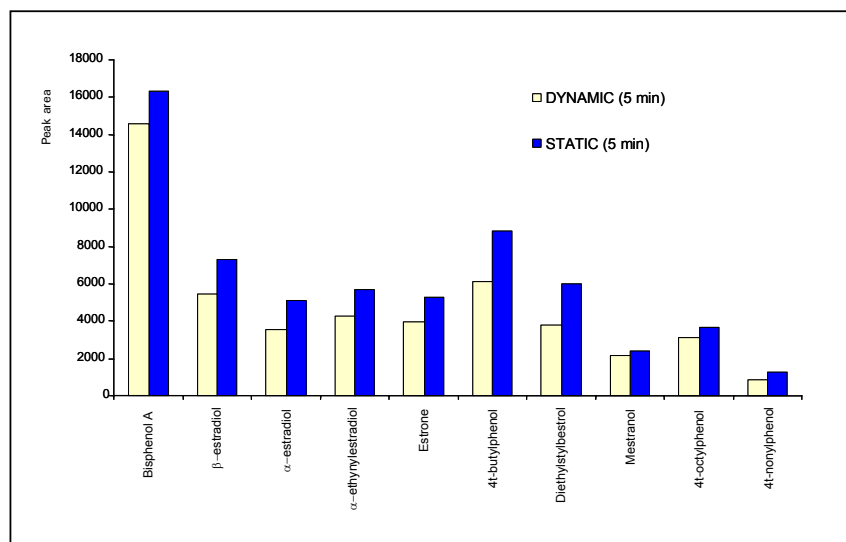


Figure 2. Comparison of peak areas obtained in both dynamic and static absorption for Milli-Q water samples containing estrogenic compounds studied at 0.14 mg l^{-1} .

Then, we optimized the desorption time for the static mode by testing times between 1 and 7 min. Figure 3 shows the results obtained. A desorption time of 2 min was selected because after this time the recoveries did not

increase significantly and no peaks appeared at the retention time of the estrogenic compounds in subsequent analyses.

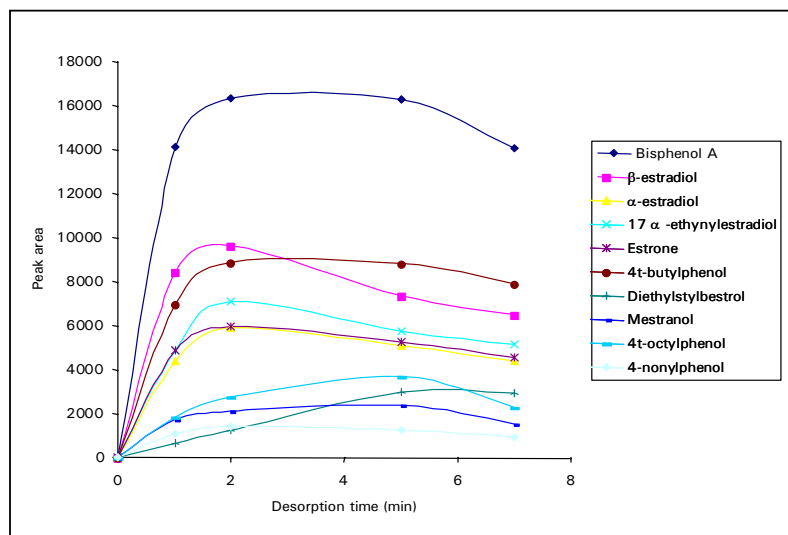


Figure 3. Optimization of desorption time in static mode.

Optimization of the absorption process

The factors affecting the SPME absorption process that we optimized were: time (5–60 min) and temperature of absorption (25–75 °C), the addition of NaCl to the sample (0–360 g l⁻¹) and the pH of the sample (2–8). The concentration of estrogenic compounds in Milli-Q water samples was 0.14 mg l⁻¹. We set the desorption parameters at the previously optimized values (static desorption and 5 min of desorption time) and initially set the absorption parameters at the values used in the optimization of the desorption process.

After 60 min of absorption, some estrogens did not reach equilibrium (bisphenol A, diethylstilbestrol, estrone and β-estradiol) but we selected an

absorption time of 45 min because it was a good compromise between response and time of analysis. Then, we tested various temperatures between 25 °C (room temperature) and 75 °C. Responses were higher at 65 °C for most compounds, except for mestranol, which showed an optimum temperature of 75 °C, so we selected 65 °C for further experiments. The next step optimized was NaCl concentration in the range between 0 and 360 g l⁻¹ (NaCl saturated solution).

The amount extracted of the most apolar compounds (diethylstilbestrol, mestranol, 4-*tert*-octylphenol and 4-nonylphenol) decreased when the NaCl concentration in the aqueous sample increased. The most polar estrogens (bisphenol A, α -estradiol, β -estradiol, 17 α -ethynylestradiol and estrone) behaved in the opposite way. We selected a concentration of 180 g l⁻¹, which corresponds to a half-saturated solution, for the next experiments because it gave good results for all the compounds studied. The amount extracted of most of the estrogens did not show a dependence on the pH except for bisphenol A, the recovery of which decreased when the pH was higher than 3.5. For this reason, the pH of the samples was adjusted to 3 in further experiments.

Performance of the SPME–HPLC method

We initially validated the SPME–HPLC–UV–ED method with Milli-Q water samples. Linear range was good, between 0.2 and 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ for all compounds under ED and between 1 and 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ for most compounds under UV detection. Limits of detection, repeatability and reproducibility were also determined. The limits of detection of the method, calculated by the Winefordner and Long criterion with a K of 6 [20], were between 0.2 and 1.1 $\mu\text{g l}^{-1}$ for UV detection, and between 58 and 72 ng l⁻¹ for ED. The repeatability and the reproducibility between days, calculated as the relative standard deviation (RSD(%), $n=3$), were determined with Milli-Q water spiked with 3 $\mu\text{g l}^{-1}$. In ED, the RSDs were under 11 and 15% for

repeatability and reproducibility, respectively. In UV detection, the RSDs were under 10 and 18%, respectively.

Application to real samples

We tested the performance of the method with Ebro river water samples. First, a blank of the Ebro river water was run to verify the absence of various peaks at the retention time of compounds studied. No interfering peaks appeared in the chromatogram. Figure 4 shows the chromatograms of the blank analysis with both ED and UV detection. The linear range, limits of detection, and the repeatability and reproducibility of the method were also determined with Ebro river water, in the same way as with Milli-Q water. Table 1 shows that the results were similar to those obtained for Milli-Q water samples. Figure 4 shows the chromatograms for Ebro river water and Ebro river water spiked with $3 \mu\text{g l}^{-1}$ of estrogenic compounds and analyzed by the SPME–HPLC–UV– ED method.

We analyzed several samples taken from several points along the river Ebro and from a wastewater treatment plant. We found no compounds in the Ebro river water but we found one peak at the retention time of β -estradiol in a water sample from the wastewater treatment plant. This peak was identified as β -estradiol by retention time matching and comparing the signal in both UV and electrochemical detectors. Two peaks at the retention time of 4-*tert*-octylphenol and 4-nonylphenol also appeared in this sample but they were under the quantification limit. Three replicates of this sample were performed and the mean concentration of the compound was $1.9 \mu\text{g l}^{-1}$ (RSD 14%) for β -estradiol in UV detection and $2.2 \mu\text{g l}^{-1}$ (RSD 11%) in ED. Figure 5 shows the chromatograms of the sample from the wastewater treatment plant for both ED and UV detection.

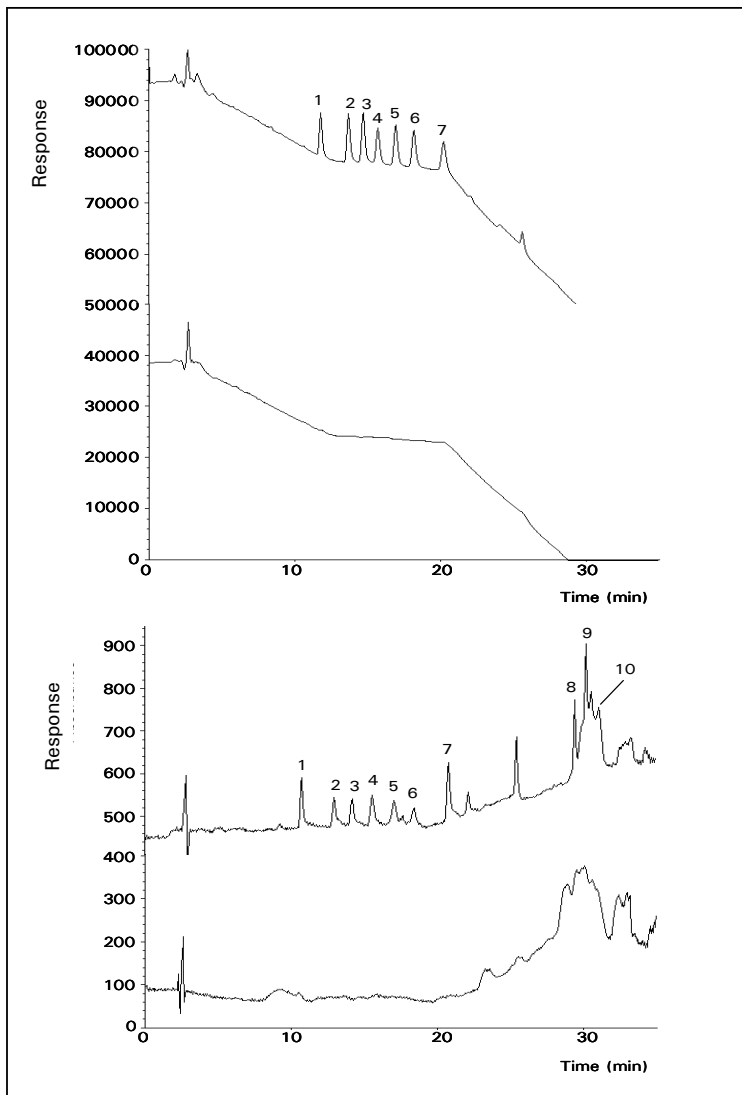


Figure 4. Chromatograms obtained by SPME-HPLC-UV-ED of 3.5 ml of Ebro river water using (a,b) UV detection and (c,d) ED in static mode of desorption. (a,c) unspiked Ebro river water; (b,d) Ebro river water spiked with $3 \mu\text{g l}^{-1}$ of each compound. Peaks: (1) bisphenol A; (2) β -estradiol; (3) α -estradiol; (4) 17α -ethynylestradiol; (5) estrone; (6) 4-t-butylphenol; (7) diethylstilbestrol; (8) mestranol; (9) 4t-octylphenol; (10) 4-nonylphenol.

Table 1. Linear range, determination coefficients, limits of detection and repeatability and reproducibility for Ebro river water by SPME-HPLC-UV-ED.

Compounds	UV detector					ED detector				
	Linear range ($\mu\text{g l}^{-1}$)	r^2	LOD ($\mu\text{g l}^{-1}$)	RSD(%) ^a	RSD(%) ^b	Linear range ($\mu\text{g l}^{-1}$)	r^2	LOD (ng l^{-1})	RSD(%) ^a	RSD(%) ^b
Bisphenol A	1-50	0.9949	0.3	11	17	0.2-50	0.9983	62	16	19
β -estradiol	1-50	0.9951	0.4	13	22	0.2-50	0.9925	75	9	12
α -estradiol	1-50	0.9928	0.3	16	24	0.2-50	0.9921	72	11	15
17 α -ethynylestradiol	1-50	0.9906	0.3	9	18	0.2-50	0.9906	76	9	12
Estrone	2-50	0.9957	0.6	6	16	0.2-50	0.9960	73	10	12
4t-butylphenol	2-50	0.9960	0.7	16	16	0.2-50	0.9998	72	15	18
Diethylstilbestrol	1-50	0.9917	0.3	3	17	0.2-50	0.9960	68	21	25
Mestranol	2-50	0.9913	0.7	18	22	-	-	-	-	-
4t-octylphenol	2-50	0.9961	0.7	14	24	-	-	-	-	-
4-nonylphenol	3-50	0.9953	1.1	24	31	-	-	-	-	-

^a In repeatability conditions (n=3)

^b In reproducibility between days conditions (n=3)

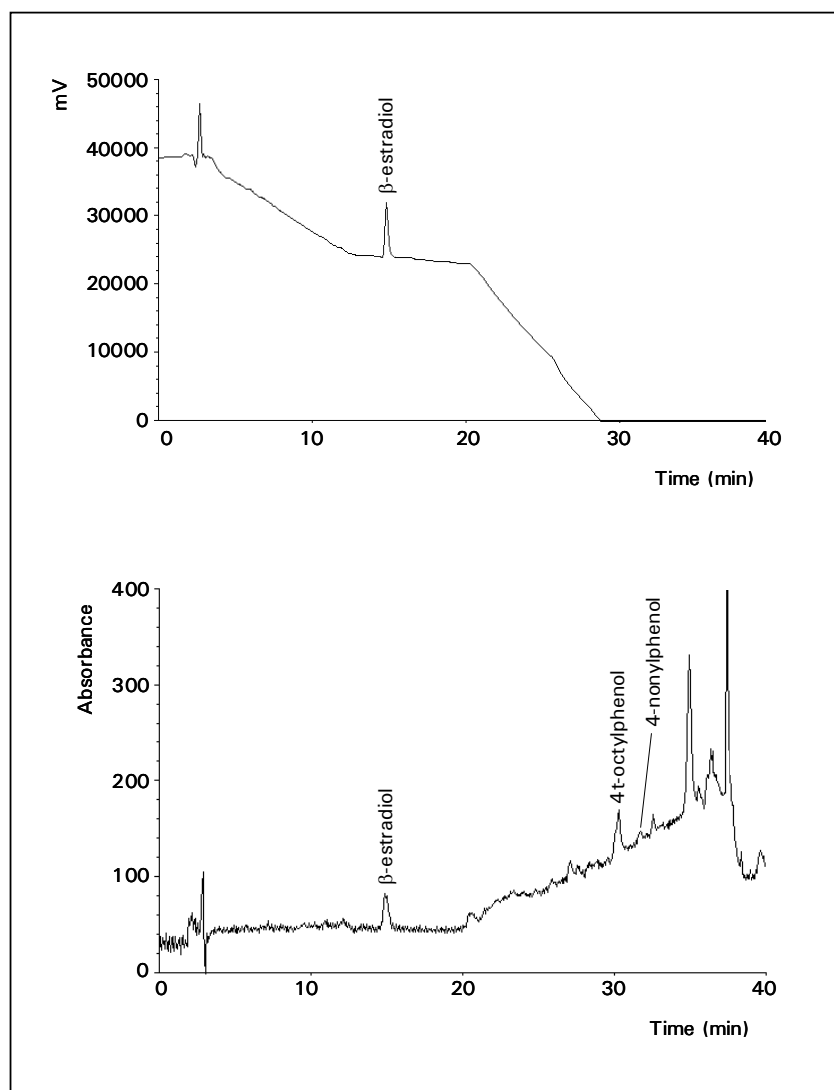


Figure 5. Chromatograms obtained by SPME-HPLC of a sample from a wastewater treatment plant by: (a) ED; (b) UV detection.

CONCLUSIONS

SPME coupled to HPLC–UV–ED was successfully applied to determine a group of estrogenic compounds in water samples at low $\mu\text{g l}^{-1}$ levels. The various parameters that affect both absorption and desorption in SPME–HPLC were optimized.

The static desorption mode gave better results than the dynamic mode for all the compounds. Although electrochemical detection showed a higher response than UV detection for the compounds studied, UV detection made it possible to determine the three compounds eluted last. These could not be determined by the electrochemical detector because of the baseline drift observed when the acetonitrile (mobile phase) increased.

We identified β -estradiol, 4-*tert*-octylphenol and 4-nonylphenol by retention time matching in a sample from a wastewater treatment plant. We also quantified β -estradiol in this sample by using data from both detectors. Concentrations were 1.9 and 2.2 $\mu\text{g l}^{-1}$ with UV and electrochemical detection, respectively.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported financially by CICYT (AMB99-0875). A.P. would like to thank the Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica for a predoctoral grant.

REFERENCES

- [1] M.D. Shelby, R.R. Newbold, D.B. Tully, K. Chae, V.L. Davis, *Environ. Health Perspect.*, 104 (1996) 1296.
- [2] J. Miyamoto, W. Klein, *Pure Appl. Chem.*, 70 (1998) 1829.
- [3] M. Castillo, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.*, 16 (1997) 574.
- [4] M. Moeder, S. Schrader, M. Winkler, P. Popp, *J. Chromatogr. A*, 873 (2000) 95.
- [5] M.J. López de Alda, D. Barceló, *J. Chromatogr. A*, 892 (2000) 391.
- [6] A.C. Belfroid, A. Van der Horst, A.D. Vethaak, A.J. Schafer, G.B.J. Rijs, J. Wegener, W.P. Cofino, *Sci. Total Environ.*, 225 (1999) 101.
- [7] M. Solé, M.J. López de Alda, M. Castillo, C. Porte, K. Ladegaard-Pedersen, D. Barceló, *Environ. Sci. Technol.*, 34 (2000) 5076.
- [8] T. Jones-Leep, C.L. Gerlach, E.J. Cooter, *Trends Anal. Chem.*, 19 (2000) 286.
- [9] J.L. Vilchez, A. Zafra, A. González-Casado, E. Hontoria, M. Del Olmo, *Anal. Chim. Acta*, 431 (2001) 31.
- [10] M.I.H. Helaleh, Y. Takabayashi, S. Fujii, T. Korenaga, *Anal. Chim. Acta*, 428 (2001) 227.
- [11] M.J. López de Alda, D. Barceló, *J. Chromatogr. A*, 911 (2001) 203.
- [12] P.L. Ferguson, C.R. Iden, A.E. McElroy, B.J. Brownawell, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 3890.
- [13] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, 872 (2000) 191.
- [14] I. Valor, J.C. Moltó, D. Apraiz, G. Font, *J. Chromatogr. A*, 767 (1997) 195.
- [15] J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*, Wiley-VCH, New York, 1997.
- [16] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, 953 (2002) 79.
- [17] P.D. Okeyo, N.H. Snow, *J. Microcol. Sep.*, 10 (1998) 551.
- [18] A.A. Boyd-Boland, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 1521.

- [19] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Chromatogr. A, 922 (2001) 377.
- [20] G.L. Long, J.D. Winefordner, Anal. Chem., 55 (1983) 712A.

**III.7. EXTRACCIÓN POR SORCIÓN CON BARRAS MAGNÉTICAS
AGITADORAS Y INYECCIÓN DE GRANDES VOLÚMENES EN
CROMATOGRFÍA DE GASES PARA LA DETERMINACIÓN DE UN
GRUPO DE DISRUPTORES ENDOCRINOS**

En todos los estudios realizados hasta ahora la técnica utilizada para la preconcentración de los analitos ha sido la SPME utilizando fibras. Sin embargo, recientemente ha aparecido una técnica de preconcentración que se basa en los mismos principios que la SPME, la extracción por sorción con barras magnéticas agitadoras o *stir bar sorptive extraction* (SBSE) [1]. Como se ha comentado en apartados anteriores, en SBSE el sorbente está depositado sobre la superficie de una barra magnética agitadora en lugar de una fibra como en SPME. De esta forma, la cantidad de sorbente en estas barras magnéticas agitadoras es mayor que la que se encuentra en las fibras por lo que, en principio, la cantidad de analito extraída es mayor [1]. Actualmente sólo están comercializadas barras agitadoras magnéticas con fase de PDMS y, en consecuencia, sólo se pueden comparar estas dos técnicas de preconcentración con fibras de PDMS [1,2].

El objetivo del trabajo fue determinar la viabilidad de la SBSE para la extracción de un grupo de contaminantes orgánicos en muestras de agua ya que esta técnica ha sido muy poco aplicada al análisis medioambiental. Los compuestos seleccionados para llevar a cabo este estudio han sido otro grupo de disruptores endocrinos. Como se ha indicado en el anterior estudio, es muy importante desarrollar métodos analíticos que permitan la determinación de estos compuestos por los problemas que pueden causar en el medio ambiente [3]. En este trabajo se han seleccionado un grupo de plaguicidas que ya han sido extensamente estudiados por sus efectos adversos en el medio ambiente y para los que se han desarrollado métodos analíticos para su determinación. Sin embargo, el hecho de que a algunos de ellos se les considere ahora también disruptores endocrinos, ha propiciado que en estos momentos se estén revisando las normativas que indican sus concentraciones máximas permitidas en aguas [4].

Para llevar a cabo la aplicación de la SBSE a la determinación de un grupo de disruptores endocrinos, se optó por realizar la desorción con un solvente orgánico ya que se disponía de un cromatógrafo de gases que permitía la inyección de grandes volúmenes y de esta forma también se estudiaría si la

SBSE con desorción por solvente combinada con la inyección de grandes volúmenes en GC-MS podía ser considerada una buena alternativa a la desorción térmica. Para la inyección de grandes volúmenes en el cromatógrafo de gases se utilizó un inyector vaporizador de temperatura programada (PTV) que ya había sido utilizado en estudios previos del grupo de investigación para el acoplamiento de la SPE con la GC [5].

En primer lugar se escogió el solvente de desorción y se optimizaron una serie de parámetros que afectan al proceso de absorción y desorción en SBSE. También se optimizaron las condiciones de trabajo para la inyección de grandes volúmenes en el cromatógrafo de gases con el PTV y a continuación se validó el método analítico SBSE/LVI-GC-MS con muestras de agua Milli-Q y agua del río Ebro. Finalmente el método desarrollado fue aplicado al análisis de muestras reales de agua de diferentes puntos a lo largo del río Ebro y de canales de riego del delta del río Ebro.

Los resultados obtenidos en este trabajo se compararon con los obtenidos en un trabajo previo mediante SPME-GC-MS [6] en el que se determinaron algunos de los plaguicidas incluidos en este estudio de forma que se observó que los límites de detección obtenidos en ambos casos eran muy similares (del orden de pocos $\mu\text{g l}^{-1}$). Se debe tener en cuenta que en SPME se introdujeron en el cromatógrafo de gases la totalidad de los analitos absorbidos (desorción térmica) mientras que en SBSE con desorción con solvente orgánico sólo se introdujo una quinta parte.

A continuación, se incluye un resumen de los resultados obtenidos durante la realización de este estudio y que ha sido enviado para su publicación en la revista científica *Journal of Chromatography A*.

Bibliografía

- [1] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, J. Microcol. Sep., 11

- (1999) 737.
- [2] Nota de aplicación n. 8, (2001).
 - [3] M. Petrovic, E. Eljarrat, M. J. López de Alda, D. Barceló, Trends Anal. Chem., 20 (2001) 637.
 - [4] Comunicación de la Comisión de las Comunidades Europeas, COM (2001) 262, Bruselas, 14/0/2001.
 - [5] L. Brossa, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Chromatogr. A, 2002, pendiente de aceptación.
 - [6] C. Aguilar, S. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Chromatogr. A, 795 (1998) 105.

STIR BAR SORPTIVE EXTRACTION AND LARGE VOLUME INJECTION-GAS CHROMATOGRAPHY TO DETERMINE A GROUP OF ENDOCRINE DISRUPTERS IN WATER SAMPLES

ABSTRACT

Stir bar sorptive extraction (SBSE) combined to gas chromatography (GC) with mass spectrometric detection (MS) was applied to determine a group of suspected endocrine disrupters in water samples. One-cm stir bars coated with PDMS were used to extract the analytes and then solvent desorption was performed. The absorption and desorption parameters in SBSE were optimized and large volume injection was used with a programmed temperature vaporizer injector (PTV) in GC to enhance the sensitivity of the method. The linear range of some endocrine disrupters was between 0.05 and 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ and the limits of detection were at low $\mu\text{g l}^{-1}$ levels. The repeatability and reproducibility of the method ($n=5$) for Ebro river water samples spiked at a level of 0.5 $\mu\text{g l}^{-1}$ were below 13% and 23%, respectively. The method was applied to analyze real water samples from the Ebro River and irrigation streams of the Ebro Delta and some of the compounds studied (aldrin, dieldrin, 4'4'-DDE and 4'4'-DDT) were found in some of them.

Keywords: Stir bar sorptive extraction; Large volume injection; PTV-GC-MS; Endocrine disrupters; Organochlorine; Water samples.

INTRODUCTION

Interest in developing analytical methods for determining endocrine disrupting chemicals (EDCs) in the environment has increased considerably in recent years [1-4] because these compounds are suspected of disturbing the normal endocrine and reproductive functions of animals and humans [5]. A broad range of compounds including some pesticides, alkylphenol polyethoxylates (PAEs) and their metabolites, polychlorinated biphenyls (PCBs), some phthalate esters, bisphenol A, and such some synthetic estrogens as diethylstilbestrol, mestranol or 17 α -ethynylestradiol have been reported to have endocrine disrupting effects [3-5]. The interest in the determination of pesticides is well known due to their adverse effects in the environment but now some of them are also considered endocrine disrupters [3-5].

Gas chromatography (GC) coupled to mass spectrometry (MS) [6-8] and high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to MS [3] or to ultraviolet detection (UV) [1,2] are the analytical techniques most frequently used. In some cases, biological techniques have also been applied to determine these compounds [9,10]. The analytical methods usually include a preconcentration technique for determining these compounds at the very low concentrations at which endocrine disrupters have adverse effects in the environment [1]. Solid-phase extraction (SPE) [1,3,7,8] is the most commonly used technique but solid-phase microextraction (SPME) has also been applied to determine these compounds [2,6]. Recently, P. Sandra and co-workers developed a new extraction technique based on the same extraction principles as SPME [11] but the sorbent, which is polydimethylsiloxane (PDMS), is placed on a stir bar. This technique is known as stir bar sorptive extraction (SBSE) and the coated stir bars are commercialized under the name of Twister. The amount of PDMS on the stir bar is higher than the amount on a SPME fiber so higher recoveries and therefore sensitivities are expected when SBSE is used. The stir bar is immersed in the sample or placed in the headspace (HS-SBSE) for a period

of time at a fixed temperature and the analytes are extracted. SBSE can be used with both GC and HPLC but it is more frequently combined with GC because the desorption step is straightforward. In this case, the coated stir bar is usually introduced in a glass thermal desorption tube after extraction and it is placed in a commercialized thermal desorption unit mounted on the GC [11-14]. Another option is to use an organic solvent for desorption, usually when SBSE is followed by HPLC. Some studies have used SBSE with HPLC [15,16]. For example, Popp *et al.* [16] developed an off-line SBSE/HPLC method with solvent desorption for determining polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water samples. To our knowledge, no applications of SBSE to determine the group of endocrine disrupters studied in the present paper have been published to date.

The main objective of this paper is to study the possibilities of SBSE and GC-MS for the determination of a group of compounds suspected to be endocrine disrupters in water samples. Another objective of our work is to determine whether solvent desorption in SBSE combined with large volume injection in gas chromatography could be an alternative to the more commonly used SBSE with thermal desorption.

EXPERIMENTAL

Reagents and standards

The endocrine disrupters studied were: hexachlorobenzene (HCB), atrazine, lindane, vinclozolin, malathion, aldrin, α -endosulfan, 4'4'-DDE, dieldrin, endrin and 4'4'-DDT. All the compounds except HCB were supplied by Riedel-de Haen (Seelze-Hannover, Germany) and the purity was higher than 99%. HCB was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland) with a purity of 99%. The internal standard used was 1-chlorooctadecane and it was

supplied by Aldrich (Steinheim, Germany) with a purity of 96%. A stock standard solution of 1000 mg l⁻¹ of each compound was prepared in ethyl acetate from Merck (Darmstadt, Germany). Working standard solutions of 50 mg l⁻¹ were prepared weekly in the same organic solvent. Stock and working standards were stored at 4 °C in the refrigerator. The aqueous solutions were prepared daily by diluting the working solution with Milli-Q water (Millipore, Bedford, MA, USA) or real water samples. The sodium chloride (over 99.5% pure) added to the aqueous samples, was obtained from Riedel-de Hën. The pH of the aqueous samples was also adjusted with hydrochloric acid from Probus (Badalona, Spain). Isooctane from Merck was the organic solvent used to desorb the endocrine disrupters in the SBSE procedure.

Instrumentation

An Agilent 6890 gas chromatograph (Palo Alto, CA, USA) equipped with a split/splitless injector and a PTV injector was used. Detection was carried out in an Agilent 5973 mass spectrometer. The column used was an Agilent HP-5MS fused-silica capillary column (cross-linked 5% methyl silicone) of 30 m x 0.25 mm i.d. with a phase thickness of 0.25 μ m. A PTV injector using solvent vent mode and a liner of 7 cm x 2 mm ID, packed with 0.014 g of Tenax from Supelco (Bellefonte, PA, USA), was used. Two six-port Valco valves (Houston, TX, USA) automatically controlled by the GC-MS software were used for the large volume injection in the gas chromatograph.

The stir bars (10 mm long x 3.2 mm o.d.), coated with an extracting phase of PDMS (63 μ l), are commercialized by Gerstel (Melheim an der Ruhr, Germany). A stirrer and heater unit from Selecta (Abrera, Spain) was used to perform the SBSE process.

Optimum conditions

Chromatographic separation and detection

In the optimization of the SBSE process, 2 μl of standard solutions of endocrine disrupters in isooctane were injected in the split/splitless injector. The injector temperature was set at 250 °C and the optimized temperature program was as follows: the initial temperature was set at 60 °C, this temperature was held for 2 min and then increased to 270 °C at 30 °C min^{-1} . This temperature was held for 3 min. The total run time was 12 min and the solvent delay 5 min. The detector was set at 280 °C. The helium carrier gas was maintained at a flow rate of 1.2 ml min^{-1} .

In large volume injection, 200 μl of standard solutions of endocrine disrupters in isooctane were introduced in the PTV injector, which was at a temperature of 65 °C, at 47 $\mu\text{l min}^{-1}$. The split valve stayed open at 50 ml min^{-1} for 2 min to remove the isooctane. After this time the split valve was closed and the analytes retained in the Tenax were desorbed by increasing the temperature of the injector from 65 °C to 300 °C at 720 °C min^{-1} . The temperature was held for 3 min to ensure the analytes had been totally desorbed from Tenax and they had been introduced in the column. The split valve was then opened. The optimized temperature program used for large volume injection was the same as in split/splitless injection with the exception of the solvent delay time and the time the oven was maintained at 270 °C. These values were increased to enable large volume injection and they were 7 min and 14 min, respectively.

The ion energy used for electron impact ionization (EI) in the mass spectrometer was 70 eV and the mass range scanned was 50-350 m/z. The MS was tuned to m/z 69, 219 and 502 for EI corresponding to perfluorobutylamine (PFBA). Full-scan acquisition mode was used and the base peak of each pesticide (284 for HCB, 200 for atrazine, 181 for lindane, 212 for vinclozolin, 125 for malation, 263 for aldrin and endrin, 79 for

dieldrin, 195 for α -endosulfan, 246 for 4'4'-DDE and 235, 4'4'-DDT and 85 for chlorooctadecane, the internal standard) was selected for quantification.

SBSE procedure

Stir bars were conditioned by placing them in the split/splitless injector of the Agilent 6890 GC under He flow (1.2 ml min^{-1}) for 4h at $300 \text{ }^\circ\text{C}$. A blank run was performed after the conditioning process to check that the sorbent had not caused any strange peaks in the chromatogram.

10 ml of an aqueous sample containing the endocrine disrupters was placed in a vial. The concentration of NaCl in the aqueous sample was 10 g l^{-1} and the pH was not modified. The stir bar was immersed in the vial and stirred in the sample for 60 min at $50 \text{ }^\circ\text{C}$ at 1200 rpm. After this time, the stir bar was removed from the vial and the water remaining on the surface was dried with a lint-free tissue from Agilent Technologies. The analytes were desorbed by introducing the stir bar in a 4 ml vial, containing 1 ml of isooctane, in the stirrer unit (1200 rpm) for 30 min at room temperature. The internal standard, 1-chlorooctadecane, was added to the 1 ml of isooctane containing the endocrine disrupters to a concentration of $25 \mu\text{g l}^{-1}$. When real samples were analyzed, an aliquot of $200 \mu\text{l}$ of the samples were then injected in the PTV injector of the gas chromatograph.

Real samples (Ebro river and irrigation streams of Ebro Delta water) were filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ membrane filter (MSI, Wetsboro, MA, USA) before analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of the SBSE procedure

The various parameters affecting the SBSE process were optimized to increase the efficiency of the extraction and decrease the limits of detection of the method. In the extraction step, the time and the temperature of extraction, the sample pH and the addition of NaCl and an organic solvent to the sample were optimized. In solvent desorption step, the volume of organic solvent, the time and the temperature were optimized.

The organic solvent used for desorption and the internal standard were selected before the absorption and desorption steps of the SBSE process were optimized. Isooctane was used as the organic solvent for desorption since it can be used with GC and it is compatible with the PDMS-coated stir bars (PDMS is not stable with most of the organic solvents commonly used for injection in GC such as ethyl acetate or hexane) [17]. We tried adding the compound selected as internal standard (1-chlorooctane) before the SBSE process but the amount of 1-chlorooctane extracted was very low. For this reason, 1-chlorooctane was added to 1 ml of isooctane after desorption to obtain a concentration of 25 mg l⁻¹ of 1-chlorooctane. The SBSE parameters were optimized using the split/splitless injector so only 2 μ l of the extract was injected while the SBSE procedure was being optimized.

Optimization of the absorption process

To optimize absorption time, 10 ml Milli-Q water spiked at 2.5 mg l⁻¹ of endocrine disruptors was used and the absorption temperature was set to 50 °C. The sample pH was not modified and NaCl was not added. Desorption was carried out in a magnetic stirrer unit (1200 rpm) by placing the stir bar with the analytes in a vial containing 1 ml of isooctane for 15

min at room temperature (25 °C). Different times between 15 min and 60 min were tested and the results showed that the amount of analyte extracted increased with the absorption time. Times higher than 60 min were not tested because of the increase in the time of analysis. An absorption time of 60 min was selected for further analysis because it was a good compromise between time of analysis and responses.

After the absorption time had been fixed, the absorption temperature was optimized by maintaining the other parameters (pH, NaCl) at the values previously used. A range of temperatures from room temperature (25 °C) to 70 °C were tested and results were best at 50 °C so this was the temperature selected for the next experiments.

The effect of modifying the pH and adding NaCl to the sample were also studied. Several pHs were tested (2, 4.8 and 6) but results were best when the pH of the sample was not modified (pH 4.8) so this was the pH selected. NaCl concentrations ranging from no salt addition to 360 g l⁻¹ (NaCl saturation conditions) were tested and Figure 1 shows how the amount extracted evolved when the salt concentration in the aqueous sample increased. As can be seen, the recoveries were higher at 10-15 g l⁻¹ of NaCl for most of the compounds studied. A NaCl concentration of 10 g l⁻¹ was selected for further experiments by taking into account the recoveries of all the analytes studied.

The effect of adding an organic solvent to the aqueous sample before extraction was also evaluated. Some authors [18,19] have observed that adding small amounts of organic solvents to the aqueous sample prevents compounds from being retained on the walls of the vials during extraction and therefore improves recovery. Various amounts of acetonitrile were added to the aqueous sample (0-5%). The recovery of compounds eluting last was not affected when the percentage of acetonitrile increased but for most compounds the recoveries slightly decreased. For this reason, acetonitrile was not added in further experiments.

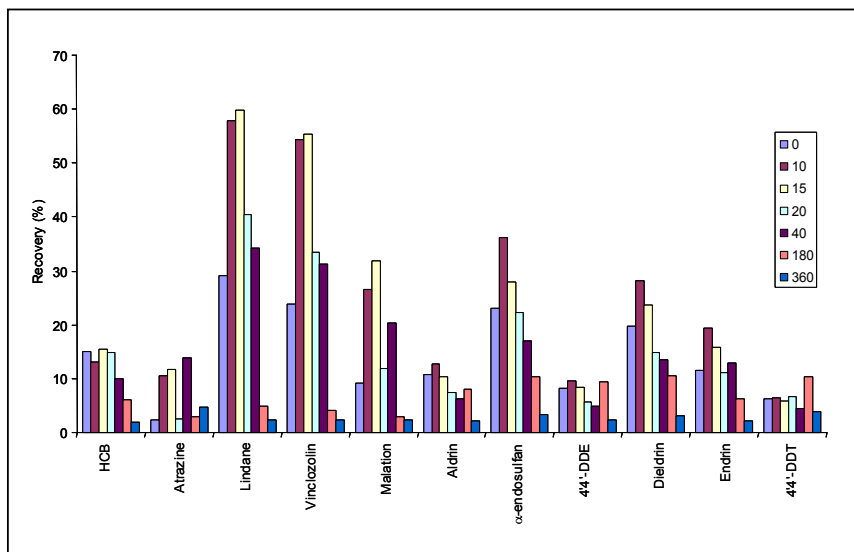


Figure 1. Recoveries of endocrine disruptors (%) at different NaCl concentrations (g l^{-1}) in the aqueous sample.

In some experiments, the sample volume was increased from 10 ml to 20 ml in order to see how the amount of analyte extracted was affected but the recoveries decreased, probably because of diffusion problems. For this reason, we continued using a sample volume of 10 ml.

Optimization of desorption process

Various periods of time (5-60 min) were tested and the amount of analytes extracted did not increase at times higher than 30 min so this desorption time was selected for further experiments.

The effect of the volume of isooctane on the desorption of analytes was also studied in a range from 0.5 ml to 5 ml. The recoveries remained

constant at volumes higher than 1 ml so we continued using this desorption volume in the SBSE/LVI-GC-MS method.

To optimize desorption temperature, we tested temperatures between room temperature (25 °C) and 50 °C. Results were best at room temperature so this was the desorption temperature used in the next experiments. In order to determine whether there was carryover in the stir bar after desorption, a second desorption was performed. No peaks corresponding to the endocrine disruptors were observed in the chromatogram so the analytes were fully desorbed under these conditions.

Sonication was also tested to see whether it was more effective than magnetic stirring and whether it could decrease the desorption time. The results obtained with sonication were worse than those obtained with magnetic stirring so magnetic stirring was used for desorption.

Performance of the SBSE/LVI-GC-MS method

Once the parameters of both the absorption and desorption processes had been optimized, the performance of the method was validated with Milli-Q water samples using SBSE/LVI-GC-MS. In this study we used solvent desorption since a gas chromatograph with a large volume programmed temperature vaporizer injector (PTV) was available. This enables large volume of solvent to be injected and improves the sensitivity of the method, so it is a good alternative to thermal desorption. We injected an aliquot of 200 μl of isooctane solution.

When Milli-Q water was spiked with different levels of endocrine disruptors under full scan acquisition mode, linearity was good for most compounds between 0.05 and 5 $\mu\text{g l}^{-1}$. The limits of detection (LODs) were calculated using the Widnefordner and Long method [20], with a K value of 6. They were between 0.01 and 0.2 $\mu\text{g l}^{-1}$. The repeatability of the method was

determined by performing five extractions of Milli-Q water with a concentration of $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ of endocrine disrupters and the relative standard deviations, RSD (%), were between 2 and 10%. The reproducibility of the method was also checked at the same concentration as repeatability and the RSD values ($n = 5$) were between 3 and 15%.

The performance of the method was also checked with Ebro River water samples. First, a blank of Ebro River water was analyzed and no peak was found at the same retention times of the compounds studied. Table 1 shows the results with the SBSE/LVI-GC-MS method for Ebro river water using Full Scan acquisition mode.

Table 1. Linear range, determination coefficients, limits of detection and repeatability and reproducibility for Ebro River water samples by SBSE/LVI-GC-MS.

Compounds	Linear range ($\mu\text{g l}^{-1}$)	r^2	LOD ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Repeatability ($n = 5$)	Reproducibility ($n = 5$)
Hexachlorobenzene	0.05-5	0.9979	0.01	13	20
Atrazine	0.2-5	0.9884	0.06	6	17
Lindane	0.1-5	0.9994	0.03	10	23
Vinchlozolin	0.05-5	0.9991	0.02	11	21
Malation	0.2-5	0.9969	0.05	2	5
Aldrin	0.1-5	0.9951	0.08	3	4
α -Endosulfan	0.05-5	0.9977	0.02	8	18
4'4'-DDE	0.5-2.5	0.9826	0.2	6	8
Dieldrin	0.05-5	0.9965	0.02	3	11
Endrin	0.1-5	0.9963	0.03	9	13
4'4'-DDT	0.5-5	0.9880	0.24	13	19

The slopes of calibration curves were statistically comparable to those obtained with Milli-Q water so matrix interference was not significant. The limits of detection of the method can be decreased if selected ion monitoring (SIM) acquisition mode is used in the mass spectrometry detector but we used Full Scan because it identifies and quantifies the

analytes in the same analysis. Figure 2 shows the chromatograms of a water sample from Ebro River unspiked and spiked with the endocrine disrupters.

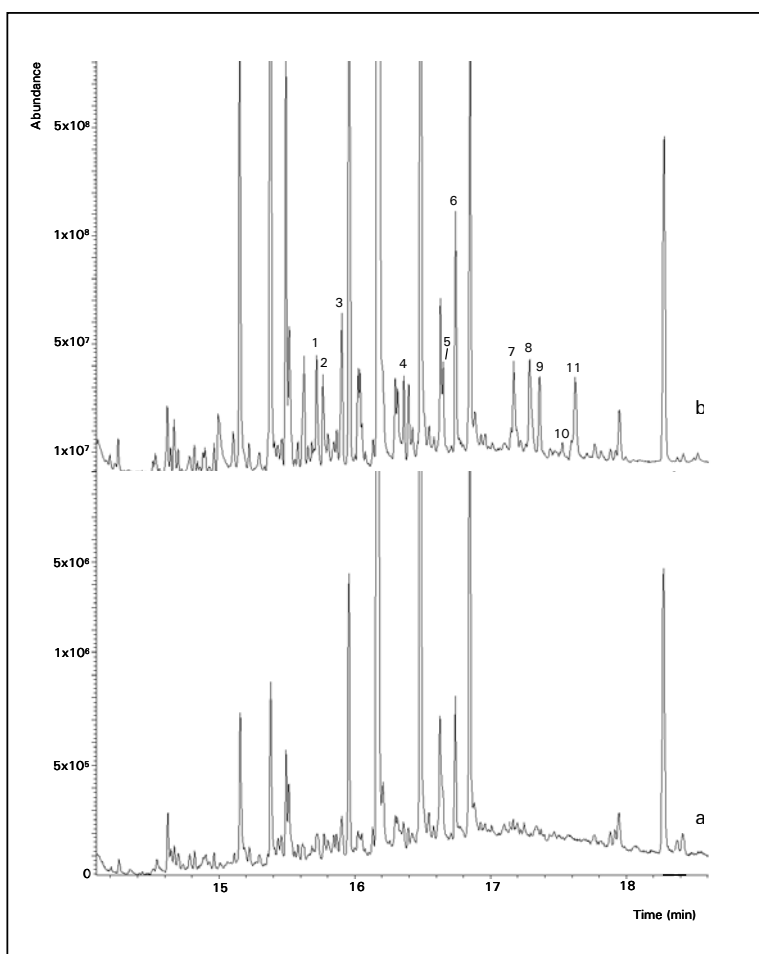


Figure 2. Chromatograms of: (a) Ebro River water; (b) Ebro River water spiked with 0.5 µg l⁻¹ of endocrine disrupters. Peak assignment: (1) Hexachlorobenzene; (2) Atrazine; (3) Lindane; (4) Vinchlozolin; (5) Malatoin; (6) Aldrin; (7) α-Endosulfan; (8) 4'4'-DDE; (9) Dieldrin; (10) Endrin; (11) 4'4'-DDT.

As can be seen in Figure 2, some peaks appeared in the blank chromatogram at the same retention time as endocrine disruptors but the spectra were different. Moreover, the ions selected to quantify them were not present in the spectra of the peaks in the blank.

Some of the compounds included in the present study were determined in a previous work by our group [21] using SPME-GC-MS. The limits of detection in full scan mode of acquisition were similar to those obtained using the SBSE/LVI-GC-MS method. It should be taken into account that in SPME all the compounds desorbed are introduced in the gas chromatograph for separation whereas in the SBSE method developed here, only 200 μ l of 1000 μ l was injected.

Analysis of real samples

Real water samples from different points along Ebro river and irrigation streams of Ebro Delta were analyzed with the SBSE/LVI-GC-MS method in full scan mode. In the chromatograms of some of the Ebro river water samples some peaks appeared at the retention time of aldrin, dieldrin, 4,4-DDT and 4,4-DDE. They were assigned by comparing the sample spectrum and the standard solution spectra. Nowadays, these compounds are banned by the EU directive [22] but the fact that they were extensively used for decades and they are persistent organic pollutants has made they can be found in water samples. For instance, Figure 3 shows the total ion chromatogram (TIC) for one of the water samples from an irrigation stream of Ebro Delta. The insert in Figure 3 shows the spectrum corresponding to the peak of 4,4-DDT (match factor: 99%). The compounds found were at concentrations between detection and quantification limits of the method so they could not be quantified.

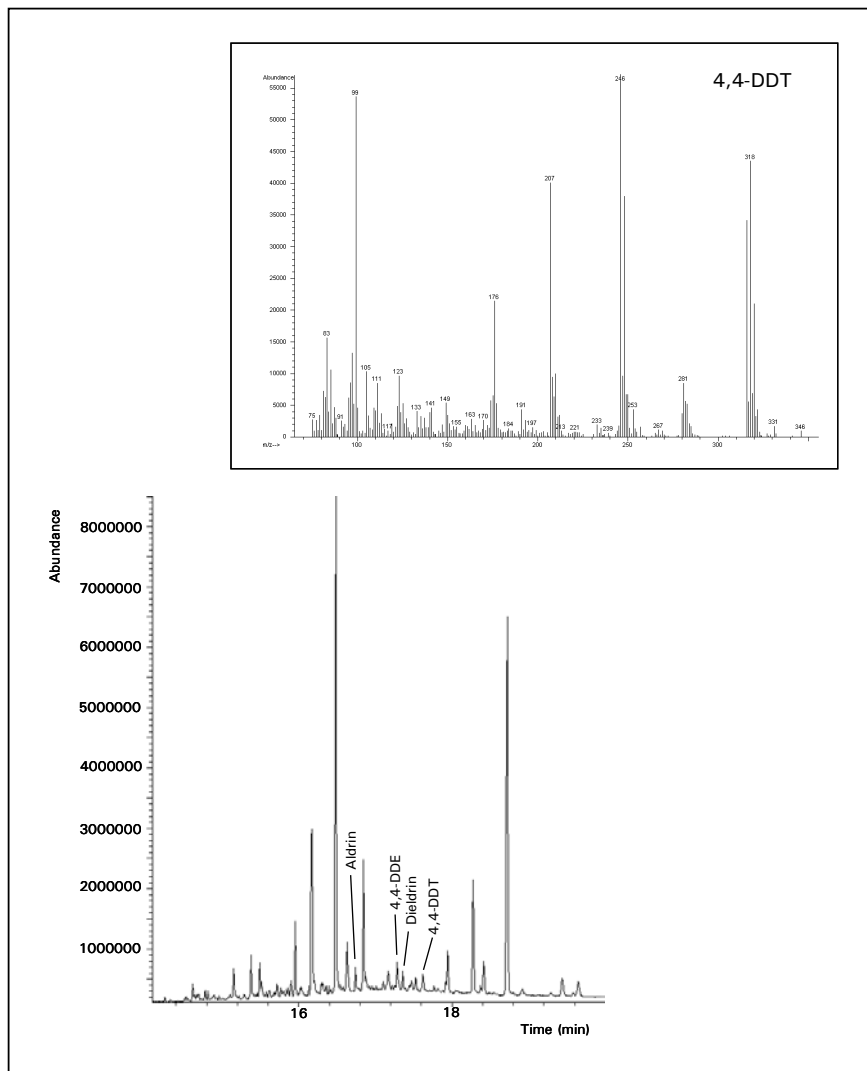


Figure 3. Chromatogram obtained by SBSE/LVI-GC-MS of 10 ml of a water sample from an irrigation stream of Ebro Delta. The insert shows the spectrum of 4,4-DDT.

CONCLUSIONS

SBSE with solvent desorption and combined with large volume injection in GC can be used to determine a group of pesticides considered to be endocrine disruptors in water samples from different origins. With the SBSE/LVI-GC-MS method developed here, the compounds studied can be determined at low $\mu\text{g l}^{-1}$ levels in real water samples. The parameters that affect both absorption and desorption procedures in SBSE must be optimized to improve the efficiency of the method.

Solvent desorption combined with large volume injection in GC has proved to be a useful alternative when thermal desorption unit is not available.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported financially by CICYT (AMB99-0875). A. P. would like to thank the Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación Científica for a predoctoral grant. We thank Dr. P. Sandra for kindly providing the stir bars.

REFERENCES

- [1] M. J. López de Alda, D. Barceló, J. Chromatogr. A, 911 (2001) 203.
- [2] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Chromatogr. A, 964 (2002) 153.
- [3] M. Castillo, D. Barceló, Trends Anal. Chem., 16 (1997) 574.
- [4] M. Petrovic, E. Eljarrat, M. J. López de Alda, D. Barceló, Trends Anal. Chem., 20 (2001) 637.
- [5] P. Preziosi, Pure & Appl. Chem., 70 (1998) 1617.

-
- [6] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, 922 (2001) 377.
- [7] L. Brossa, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, 963 (2002) 287.
- [8] H.G.J. Mol, S. Sunarto, O. Steijer, *J. Chromatogr. A*, 879 (2000) 97.
- [9] M. Seifert, S. Haindl, B. Hock, *Anal. Chim. Acta*, 386 (1999) 191.
- [10] Y. Goda, A. Kobayashi, K. Fujimoto, M. Ike, M. Fujita, *Water Sci. & Technol.*, 42 (2000) 81.
- [11] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, *J. Microcol. Sep.*, 11 (1999) 737.
- [12] Gerstel Application Note 1, (2000).
- [13] J. Vercammen, C. Pérès, C. Devos, P. Sandra, F. Vanhaecke, L. Moens, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 1509.
- [14] T. Benijts, J. Vercauteren, R. Dams, H.P. Tuan, W. Lambert, P. Sandra, *J. Chromatogr. B*, 755 (2001) 137.
- [15] P. Sandra, B. Tienpont, J. Vercammen, A. Tredoux, T. Sandra, F. David, *J. Chromatogr. A*, 928 (2001) 117.
- [16] P. Popp, C. Bauer, L. Wennrich, *Anal. Chim. Acta*, 436 (2001) 1.
- [17] P. Sandra, Plenary lecture, 30th Scientific Meeting of the Group of Chromatography and Related Techniques, Valencia, Spain (2001).
- [18] Gerstel Application Note 2, (2001).
- [19] K. Kolaghar, A. Hoffman, A.C. Heiden, *J. Chromatogr. A*, 963 (2002) 225.
- [20] G.L. Long, J.D. Winefordner, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 712A.
- [21] C. Aguilar, S. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, 795 (1998) 105.
- [22] Directive 91/414/EEC, Commission of the European Communities, Brussels, 1991.

CAPÍTULO IV

PERSPECTIVAS FUTURAS

Las ventajas que presenta la SPME como técnica de preconcentración (o para otras aplicaciones, como ya se han comentado en capítulos anteriores) la hacen una técnica muy atractiva para su utilización en diferentes ámbitos de la Química Analítica. Así, aunque el campo de aplicación de la SPME actualmente ya es muy amplio, uno de los factores que influirán en un mayor desarrollo futuro de esta técnica será la aparición de fibras que sean selectivas para la extracción de determinados analitos o que extiendan la aplicación de la SPME a otras familias de compuestos, como por ejemplo compuestos inorgánicos.

Como se ha comentado a lo largo de la presente Tesis Doctoral, ya se han publicado algunos estudios en los que se utilizan fibras recubiertas de polímeros como los MIPs para la extracción selectiva de determinados analitos y polímeros conductores para la extracción de algunos cationes metálicos y otros compuestos inorgánicos. Estas aplicaciones son todavía muy puntuales y, por ejemplo, no existe todavía ninguna fibra comercial que permita la extracción de compuestos inorgánicos. Otra posibilidad es el desarrollo de nuevos recubrimientos que sean más estables en presencia de solventes orgánicos de forma que se comercialicen más fibras que puedan ser utilizadas en combinación con la HPLC o CE.

Por otro lado, la mejora de alguna de las dificultades que presenta esta técnica como por ejemplo el acoplamiento a la cromatografía de líquidos o a la electroforesis capilar también serán posibles líneas de investigación en el futuro que hará que la SPME sea considerada una buena alternativa a las técnicas de preconcentración más tradicionales, como la LLE o la SPE, cuando se desea utilizar la HPLC para la separación de los compuestos.

Otra línea de investigación que está en fase de desarrollo es la SPME en membrana. En esta variante de la SPME, la fase estacionaria no está dispuesta en forma de fibras sino de membranas de pequeño tamaño. Éstas presentan una área superficial más grande (402 mm^2) que las fibras ($\sim 9.42 \text{ mm}^2$) por lo que la cantidad de sorbente es también mayor y, en

consecuencia, la eficacia de la extracción y la sensibilidad también se ven aumentadas.

La automatización de todo el proceso de SPME en combinación con la GC o la HPLC es también una de las líneas que presenta un mayor interés ya que posibilitará la introducción de esta técnica de preconcentración para los análisis de rutina. Como ya se ha comentado, en el caso de la SPME-GC, se han comercializado algunos equipos que permiten automatizar todo el proceso pero su uso aún no está muy extendido. Respecto a la automatización del acoplamiento SPME-HPLC, *in-tube* SPME es la alternativa a la SPME convencional con fibras que presenta más posibilidades aunque está restringida a muestras muy limpias.

Finalmente, la SBSE ya ha proporcionado muy buenos resultados para la extracción de algunas familias de compuestos como por ejemplo los PAHs. No obstante, el hecho de que, por ahora, sólo estén disponibles barras magnéticas agitadoras con recubrimiento de PDMS implica que esta variante de la SPME sólo se pueda aplicar para extraer compuestos que sean relativamente apolares. La introducción de otros tipos de recubrimientos para SBSE así como el desarrollo de alguna interfase que permita el acoplamiento a HPLC, permitirá extender la utilización de esta técnica de preconcentración a más familias de compuestos.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La microextracción en fase sólida es una alternativa válida a las técnicas utilizadas más habitualmente para la preconcentración de diferentes familias de contaminantes orgánicos en aguas.
2. La selección de la fibra más adecuada para cada aplicación es un parámetro muy importante a tener en cuenta al desarrollar un método analítico basado en SPME. Además, para mejorar la eficacia del proceso de SPME, se deben optimizar una serie de parámetros que afectan las etapas de extracción (tiempo y temperatura, pH de la muestra o adición de sal o de un solvente orgánico a la muestra) y desorción (en este caso los parámetros dependen del instrumento analítico utilizado).
3. La microextracción en fase sólida puede ser combinada muy fácilmente con la cromatografía de gases de forma que la desorción se produce térmicamente en un inyector *split/splitless*. De este modo, esta técnica de preconcentración no precisa del uso de solventes orgánicos para llevar a cabo la extracción y la desorción de los analitos.
4. La desorción en línea con HPLC no es tan sencilla como en SPME-GC ya que se debe utilizar una interfase que permita que la fase móvil o un solvente orgánico desorban los analitos de la fibra y los introduzcan en el cromatógrafo de líquidos. La interfase comercializada para llevar a cabo este acoplamiento no es muy robusta y durante su utilización se deben tomar muchas precauciones. De lo contrario, se pueden dañar el recubrimiento de las fibras o las férulas que sellan la cámara de desorción.

5. La utilización de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución que permite realizar la desorción con la fracción orgánica de la fase móvil proporciona mejores resultados ya que se elimina la distorsión de los picos y se obtienen mayores recuperaciones para alguno de los compuestos.
6. La introducción de un patrón interno en el proceso de SPME no mejora significativamente la precisión del método SPME-GC-MS en comparación con la calibración mediante patrones externos en la determinación de un grupo de plaguicidas de diferentes características en muestras de agua.
7. La SPME utilizando fibras con recubrimiento de PA permite el almacenamiento de varios plaguicidas, con la excepción del irgarol 1051, de forma que se posibilitan aplicaciones futuras de esta técnica de preconcentración al análisis de campo.
8. Las fibras de PA permiten la extracción de diferentes familias de plaguicidas, fenoles, y estrógenos en muestras de agua. Para la determinación de un grupo de ftalatos en muestras de agua, la fibra que proporciona mejores resultados es la de 65 μm PDMS/DVB.
9. La SPME combinada con GC-MS permite la determinación de plaguicidas de diferentes familias y de ftalatos a bajos niveles de concentración (del orden de pocos $\mu\text{g l}^{-1}$) en muestras de agua de diversa procedencia.
10. En la determinación de ftalatos se deben tomar muchas precauciones en la selección del material a utilizar y en su limpieza ya que de lo contrario pueden aparecer problemas de contaminación.
11. En el acoplamiento en línea SPME-HPLC, la desorción en modo estático proporciona mejores resultados que el modo dinámico en la

determinación de una serie de fenoles y estrógenos en muestras de agua.

12. En SPME-HPLC, la utilización de un detector UV conectado en serie con un detector ED permite la determinación de los 11 compuestos fenólicos considerados prioritarios por la EPA y de un grupo de estrógenos en muestras de agua a niveles de pocos $\mu\text{g l}^{-1}$. Sin embargo, la deriva debida a la composición de la fase móvil al utilizar detección electroquímica impide la determinación de algunos de los estrógenos a bajas concentraciones y su cuantificación debe realizarse con detección UV.
13. La utilización de la SBSE con desorción por solvente junto con la inyección de grandes volúmenes en GC-MS es una buena alternativa a la desorción con la unidad de desorción térmica. El método analítico SBSE/LVI-GC-MS permite la determinación de un grupo de compuestos considerados disruptores endocrinos a niveles de pocos $\mu\text{g l}^{-1}$.
14. Los análisis de agua costera utilizando los métodos desarrollados han permitido determinar la presencia de irgarol 1051 en una de las muestras analizadas a una concentración de $0.3 \mu\text{g l}^{-1}$ y la de los seis ftalatos y el adipato estudiados a concentraciones entre 0.2 y $3.2 \mu\text{g l}^{-1}$. Por otro lado, en las aguas embotelladas comerciales también se ha podido detectar la presencia de tres ftalatos (DEP, DnBP y DEHP) a niveles entre 0.2 y $1.0 \mu\text{g l}^{-1}$ pero no se ha podido determinar una relación directa entre el material de la botella y la presencia de estos contaminantes. Cuando se han analizado aguas de depuradora se han podido cuantificar la presencia de fenol y 4-cloro-3-metilfenol a 87 y $7.4 \mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente y también se detectó la presencia de β -estradiol a concentraciones entre 1.9 y $2.2 \mu\text{g l}^{-1}$ y la de 4t-octilfenol y 4-nonilfenol a concentraciones inferiores a las de los límites de cuantificación.

ANEXOS

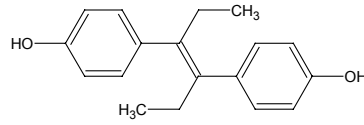
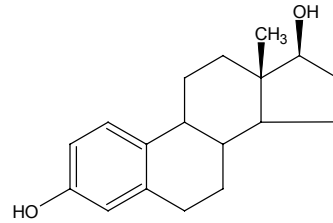
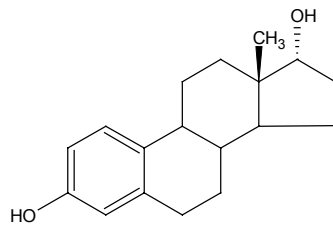
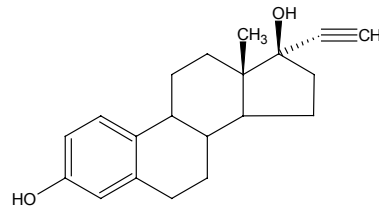
ANEXO I

Estructura química de los compuestos estudiados:

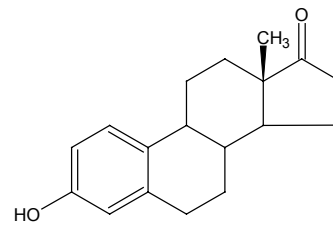
NOMBRE	FAMILIA	ESTRUCTURA
Di-(2-etilhexil)adipato (DEHA)	Adipatos (plastificante)	
4-butilfenol (4-BP)	Alquilfenoles	
4-nonilfenol (4-NP)	Alquilfenoles	
4-octilfenol (4-OP)	Alquilfenoles	
Bisfenol A (BPA)	Compuestos bisfenólicos	

(continúa)

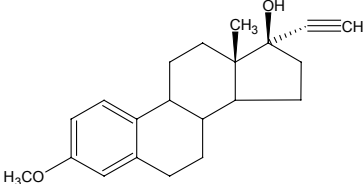
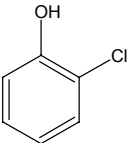
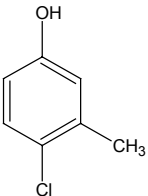
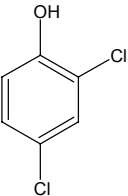
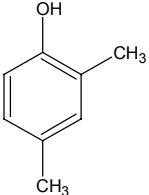
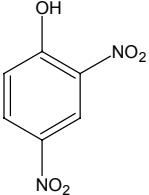
Dietilstilbestrol (DES) Estrógenos

17 α -estradiol Estrógenos17 β -estradiol Estrógenos17 α -etinilestradiol Estrógenos

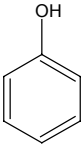
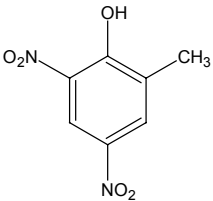
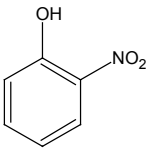
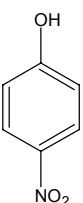
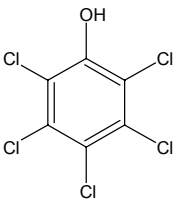
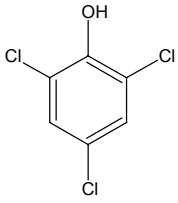
Estrona Estrógenos



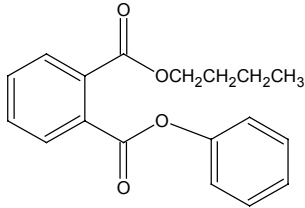
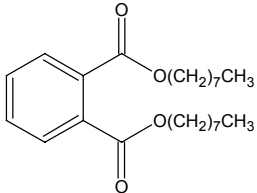
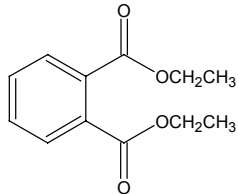
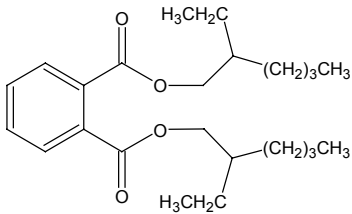
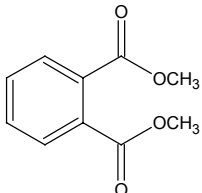
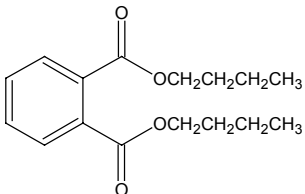
(continúa)

Mestranol	Estrógenos	
2-clorofenol (2-CP)	Fenoles	
4-cloro-3-metilfenol (4C-3-MP)	Fenoles	
2,4-diclorofenol (2,4-DCP)	Fenoles	
2,4-dimetilfenol (2,4-DMP)	Fenoles	
2,4-dinitrofenol (2,4-DNP)	Fenoles	

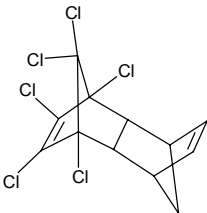
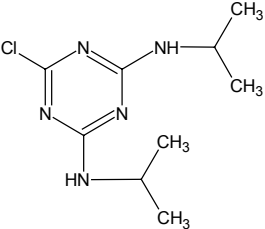
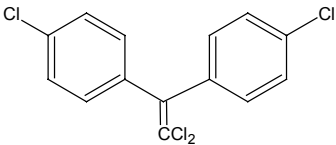
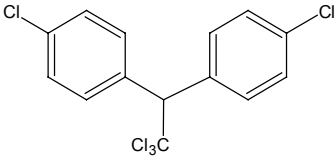
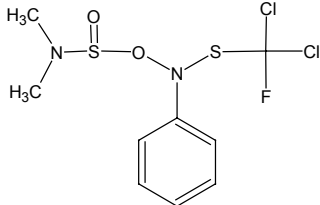
(continúa)

Fenol (Ph)	Fenoles	
2-metil-4,6-dinitrofenol (2-M-4,6-DNP)	Fenoles	
2-nitrofenol (2-NP)	Fenoles	
4-nitrofenol (4-NP)	Fenoles	
Pentaclorofenol (PCP)	Fenoles	
2,4,6-triclorofenol (2,4,6-TCP)	Fenoles	

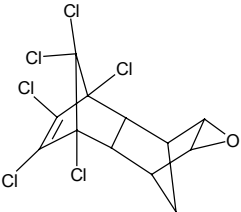
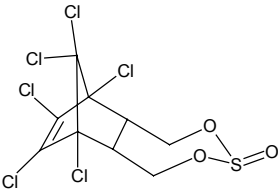
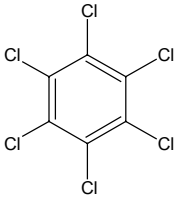
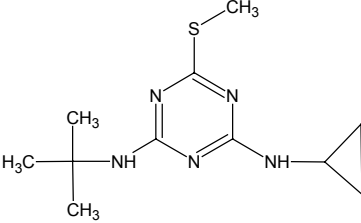
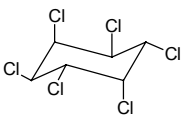
(continúa)

Bencilbutilftalato (BBP)	Ftalatos (plastificante)	
Bis-n-octilftalato (BnOP)	Ftalatos (plastificante)	
Diethylftalato (DEP)	Ftalatos (plastificante)	
Di-(2-etilhexil)ftalato (DEHP)	Ftalatos (plastificante)	
Dimetilftalato (DMP)	Ftalatos (plastificante)	
Di-n-butilftalato (DnBP)	Ftalatos (plastificante)	

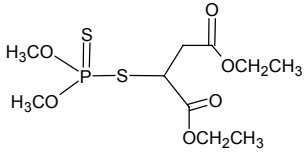
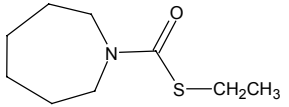
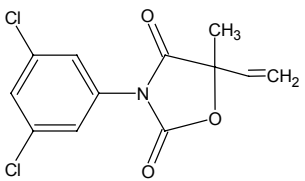
(continúa)

Aldrín	Plaguicidas organoclorados (insecticida)	
Atrazina	Plaguicidas, triazinas (herbicida)	
4,4-DDE	Plaguicidas organoclorados (degradación del DDT)	
4,4-DDT	Plaguicidas organoclorados (insecticida)	
Diclofluandid	Plaguicidas N-trihalometiltio (antialga, fungicida)	

(continúa)

Dieldrín	Plaguicidas organoclorados (insecticida)	
α -endosulfan	Plaguicidas organoclorados (insecticida, acaricida)	
Hexaclorobenceno (HCB)	Plaguicidas organoclorados (fungicida)	
Irgarol 1051	Plaguicidas, triazinas (antialga)	
Lindano	Plaguicidas organoclorados (insecticida)	

(continua)

Malatión	Plaguicidas organofosforados (acaricida)	
Molinato	Plaguicidas, tiocarbamatos (herbicida)	
Vinclozólín	Plaguicidas dicarboximidias (fungicida)	

ANEXO II

Abreviaturas utilizadas en la memoria:

2-CP:	2-clorofenol
2-M-4,6-DNP:	2-metil-4,6-dinitrofenol
2-NP:	2-nitrofenol
2,4-DMP:	2,4-dimetilfenol
2,4-DNP:	2,4-dinitrofenol
2,4,6-TCP:	2,4,6-triclorofenol
4-BP:	4-butilfenol
4-C-3-MP:	4-cloro-3-metilfenol
4-NP:	4-nitrofenol
4-OP:	4-octilfenol
ACN:	Acetonitrilo
ADS:	Alquil-diol-sílice
AED:	Detector de emisión atómica
ASE:	Extracción acelerada con solvente orgánico
APCI-MS:	Espectrometría de masas con ionización química a presión atmosférica
BBP:	Butilbencilftalato
BnOP:	Bis-n-octilftalato
BA:	Bisfenol A
BTEX:	Benceno, tolueno, xileno y etilbenceno
BuCF:	Butilcloroformiato
CE:	Electroforesis capilar
CAR:	Carboxen
CRM:	Material de referencia
CW:	Carbowax
DEHA:	Dietilhexiladipato
DEP:	Dietilftalato
DEHP:	Dietilhexilftalato
DES:	Dietilestilbestrol

DMP:	Dimetilftalato
DnBP:	Di-n-butilftalato
DnOP:	Di-n-octilftalato
DOC:	Materia orgánica disuelta
DVB:	Divinilbenceno
ECD:	Detector de captura electrónica
ED:	Detector electroquímico
ELCD:	Detector de conductividad eléctrica
ELISA:	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPA:	Agencia Americana de Protección Ambiental
GC:	Cromatografía de gases
HCB:	Hexaclorobenceno
HPLC:	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HS-SPME:	SPME de espacio de cabeza
ICP-MS:	Plasma acoplado inductivamente con detección de espectrometría de masas
ID:	Diámetro interno
IT-MS:	Espectrometría de masas con trampa de iones
LAS:	Alquilbenceno sulfonatos lineales
LLE:	Extracción líquido-líquido
LOD:	Límite de detección
MAC:	Concentración máxima permitida
MDLs:	Límites de detección del método analítico
MIPs:	Polímeros de huella molecular
MS:	Espectrometría de masas
NP:	Nonilfenol
PA:	Poliacrilato
PAEs:	Ftalatos
PAHs:	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
PCBs:	Bifenilos policlorados
PCP:	Pentaclorofenol
PDAM:	1-pirenildiazometano
PDMS:	Polidimetilsiloxano

PEEK:	Poli(eteretercetona)
PET:	Poli(etilentereftalato)
PF:	Polisilicona fullereno
PFBA:	Perfluorobutilamina
PFBHA:	O-2,3,4,5,6-(pentafluorobencil)hidroxilamina
Ph:	Fenol
PPY:	Polipirrol
PTFA:	Politetrafluoroetileno
PTV:	Vaporizador de temperatura programable
PVC:	poli(cloruro de vinilo)
P&T:	Purga y trampa
RAM:	Material de acceso restringido
RSD:	Desviación estándar relativa
SBSE:	Extracción por sorción con barras magnéticas agitadoras
SD:	Desviación estándar
SFC:	Cromatografía de fluidos supercríticos
SIM:	<i>Selected ion monitoring</i>
SPE:	Extracción en fase sólida
SPME:	Microextracción en fase sólida
TCA:	Antidepresivos tricíclicos
TEOS:	Trietoxisilano
TLC:	Cromatografía de capa fina
TMAH:	Hidróxido de tetrametilamonio
TPR:	<i>Templated Resin</i>
TWA-SPME:	SPME media ponderada en el tiempo
UE:	Unión Europea
UV:	Detector ultravioleta-visible
VOCs:	Compuestos orgánicos volátiles

ANEXO III

Los trabajos surgidos de la presente Tesis Doctoral, incluidos en los capítulos I y III, y que se han publicado o están pendientes de publicación en revistas científicas, son los siguientes:

- A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *Trends in solid-phase microextraction for determining organic pollutants in environmental samples*, Trends Anal. Chem., 18 (1999) 557-568, (apartado I.3).
- A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *Solid-phase microextraction of the antifouling irgarol 1051, dichlofluanid and 4-chloro-3-methylphenol in water samples*, J. Chromatogr. A, 839 (1999) 253-260, (apartado III.1).
- A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *Evaluation of different parameters in the solid-phase microextraction process*, Chromatographia, 50 (2000) 685-688, (apartado III.2).
- A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *Determination of phthalate esters in water samples by solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection*, J. Chromatogr. A, 872 (2000) 191-201, (apartado III.3).
- A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *Comparison of different fibers for the solid-phase microextraction of phthalate esters from water*, J. Chromatogr. A, 922 (2001) 377-384, (apartado III.4).
- A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *Solid-phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography to determine phenolic compounds in water samples*, J. Chromatogr. A, 953 (2002) 79-87, (apartado III.5).

- A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *Method based on solid-phase microextraction-high performance liquid chromatography with UV and electrochemical detection to determine estrogenic compounds in water samples*, J. Chromatogr. A, 964 (2002) 153-160, (apartado III.6).

- A. Peñalver, V. García, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *Stir bar sorptive extraction and large volume injection-gas chromatography to determine endocrine disrupters in water samples*, J. Chromatogr. A, 2002, pendiente de aceptación, (apartado III.7).

