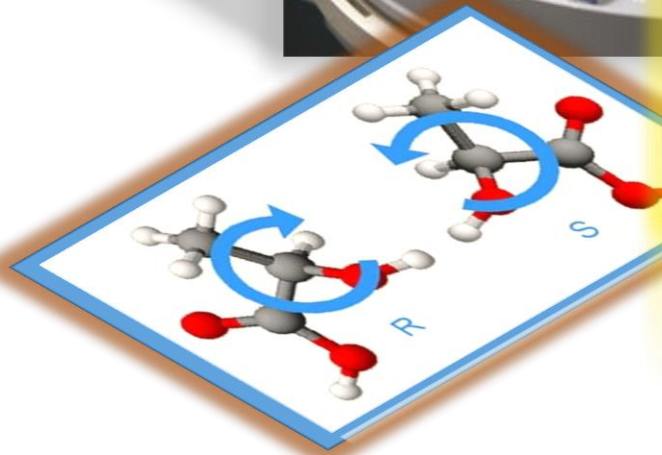
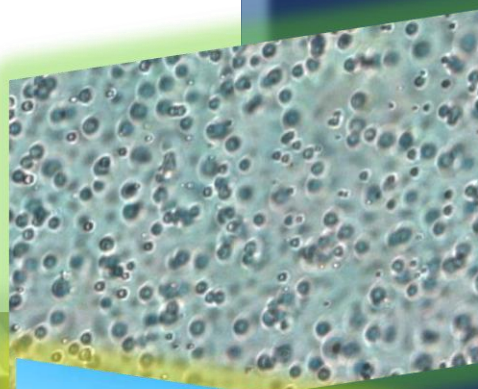


**TESIS DOCTORAL**

**DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES EN  
ANÁLISIS QUIRAL MEDIOAMBIENTAL**



**MARÍA DEL CARMEN CABALLO LINARES**

TITULO: *Disolventes supramoleculares en análisis quiral medioambiental*

AUTOR: *María del Carmen Caballo Linares*

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2015  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---





**Universidad de Córdoba**  
**Departamento de Química Analítica**

**Disolventes Supramoleculares en  
Análisis Quiral Medioambiental**

**María del Carmen Caballo Linares**





# Tesis Doctoral:

## Disolventes Supramoleculares en Análisis Quiral Medioambiental

Trabajo presentado, para optar al grado de Doctor, por  
María del Carmen Caballo Linares

que lo firma en Córdoba, 9 de diciembre de 2014



*Firmado:*

María del Carmen Caballo Linares  
Licenciada en Ciencias Ambientales

con el VºBº de las directoras,  
Soledad Rubio Bravo y María Dolores Sicilia Criado



*Firmado:*

Dra. Soledad Rubio Bravo  
Catedrática del Departamento  
de Química Analítica de la  
Universidad de Córdoba



*Firmado:*

Dra. María Dolores Sicilia Criado  
Profesora Titular del Departamento  
de Química Analítica de la  
Universidad de Córdoba



D<sup>a</sup> Soledad Rubio Bravo, Catedrática del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba, y D<sup>a</sup> María Dolores Sicilia Criado, Profesora Titular del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba, en calidad de Directoras de la Tesis Doctoral presentada por la Licenciada en Ciencias Ambientales, D<sup>a</sup>. María del Carmen Caballo Linares,

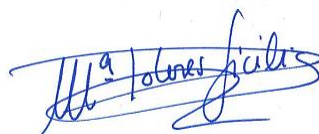
CERTIFICAN: Que la citada Tesis Doctoral *“Disolventes Supramoleculares en Análisis Quiral Medioambiental”* se ha realizado en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba y que, a nuestro juicio, reúne todos los requisitos exigidos a este tipo de trabajo.

Y para que conste y surta los efectos pertinentes, expide el presente certificado en Córdoba, 9 de diciembre de 2014.



*Firmado:*

Dra. Soledad Rubio Bravo  
Catedrática del Departamento  
de Química Analítica de la  
Universidad de Córdoba



*Firmado:*

Dra. María Dolores Sicilia Criado  
Profesora Titular del Departamento  
de Química Analítica de la  
Universidad de Córdoba





## **TITULO DE LA TESIS:**

Disolventes Supramoleculares en Análisis Quiral Medioambiental

**DOCTORANDA:** María del Carmen Caballo Linares

### **INFORME RAZONADO DE LAS DIRECTORAS DE LA TESIS**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

En esta Tesis Doctoral se ha evaluado por primera vez el uso de la técnica de microextracción con disolventes supramoleculares (MEDS) para la extracción de contaminantes quirales en muestras medioambientales y la combinación de dicha técnica con cromatografía líquida (CL) quiral acoplada a espectrometría de masas (EM) para la determinación enantioselectiva de dichos contaminantes. Los resultados obtenidos durante el desarrollo de los trabajos de investigación realizados han demostrado que la MEDS presenta excelentes prestaciones para su aplicación en el ámbito del análisis quiral medioambiental entre las que cabe destacar: versatilidad, elevada eficacia de extracción, obtención de extractos libres de macromoléculas como proteínas, polisacáridos, ácidos húmicos o fúlvicos, rapidez, simplicidad y seguridad tanto para los analistas como para el medio ambiente. Por otra parte, el uso de CL para la determinación enantioselectiva de contaminantes quirales presenta la ventaja frente a la cromatografía de gases (CG) de simplificar los procesos analíticos al evitar la etapa de derivatización de los analitos polares. Las investigaciones realizadas en esta Tesis han permitido proponer nuevos métodos basados en CL-EM que en combinación con la MEDS constituye una ventajosa alternativa a la CG-EM. Así, se han desarrollado métodos para la determinación de enantiómeros de plaguicidas y fármacos, los dos principales grupos de contaminantes quirales, en una gran variedad de muestras medioambientales (muestras acuosas, de suelos y biológicas). Finalmente, también se han propuesto métodos para la determinación de carotenoides en productos piscícolas basados en MEDS y CL-fotometría o fotometría que aventajan a los basados en el uso de disolventes orgánicos en rapidez, simplicidad, selectividad y robustez. Los resultados más relevantes de las investigaciones realizadas se han publicado en prestigiosas revistas internacionales (situadas en el primer cuartil del Journal Citation Report, JCR), con un total de 4 artículos publicados y 1 artículo enviado para su publicación, y se han presentado en congresos (6 comunicaciones orales y 4 carteles).

El trabajo de investigación realizado es original y extenso y la doctoranda ha adquirido una sólida formación como investigadora. Por todo ello, se autoriza la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, 9 de diciembre de 2014

Firma del/de los director/es

Fdo.: María Dolores Sicilia Criado

Fdo.: Soledad Rubio Bravo





## INFORME DEL FACTOR DE IMPACTO DE LAS PUBLICACIONES DE LA TESIS

**TÍTULO DE LA TESIS: DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES EN  
ANÁLISIS QUIRAL MEDIOAMBIENTAL**

**DOCTORANDO/A: MARÍA DEL CARMEN CABALLO LINARES**

PUBLICACIÓN	FACTOR DE IMPACTO (JCR 2013)	CUARTIL
Determination of supplemental feeding needs for astaxanthin and canthaxanthin in salmonids by supramolecular solvent-based microextraction and liquid chromatography–UV/VIS spectroscopy. <b>Food Chemistry</b> 134 (2012) 1244–1249.	3,259	1° Cat. Food Science & Technology
Stereoselective quantitation of mecoprop and dichlorprop in natural waters by supramolecular solvent-based microextraction, chiral liquid chromatography and tandem mass spectrometry. <b>Analytica Chimica Acta</b> 761 (2013) 102-108.	4,517	1° Cat. Analytical Chemistry
Fast, simple and efficient supramolecular solvent-based microextraction of mecoprop and dichlorprop in soils prior to their enantioselective determination by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. <b>Talanta</b> 119 (2014) 46–52.	3,511	1° Cat. Analytical Chemistry
Enantioselective determination of representative profens in wastewater by a single-step sample treatment and chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometry. <b>Talanta</b> (2014) aceptado		
Enantioselective analysis of profens in freshwater fish based on microextraction with a nanostructured liquid and chiral liquid chromatography–tandem mass spectrometry <b>Analytical and Bioanalytical Chemistry</b> (2014) enviado para su publicación	3,578	1° Cat. Analytical Chemistry





# ÍNDICE





---

<b>Objeto</b> .....	1
<b>Contenido</b> .....	7
<b>Introducción</b> .....	13
<b>1. Quiralidad</b> .....	15
<b>2. Compuestos quirales en el medio ambiente</b> .....	17
<b>3. Plaguicidas quirales</b> .....	19
3.1. Aspectos generales.....	19
3.2. Contaminación de aguas y suelos.....	20
3.3. Procesos de degradación y metabolización enantioselectivos.....	24
3.4. Toxicidad enantioselectiva.....	25
<b>4. Fármacos quirales</b> .....	26
4.1. Aspectos generales.....	26
4.2. Contaminación de aguas y biota acuática.....	28
4.3. Procesos de degradación y metabolización enantioselectivos.....	31
4.4. Toxicidad enantioselectiva.....	32
<b>5. Determinación enantioselectiva de contaminantes quirales en muestras medioambientales</b> .....	33
5.1. Pretratamiento y tratamiento de muestra.....	34
5.2. Separación quiral.....	36
5.3. Detección.....	43
<b>6. Disolventes supramoleculares en procesos analíticos de extracción</b> .....	45

6.1. Aspectos generales.....	45
6.2. Formación del disolvente supramolecular. Diagramas de fases.....	46
6.3. Solubilización en disolventes supramoleculares.....	50
6.4. Formatos de extracción.....	53
6.5. Compatibilidad de los extractos supramoleculares con técnicas cromatográficas.....	56
6.6 Aplicaciones en análisis ambiental.....	58
<b>Parte experimental: microextracción con disolventes supramoleculares de muestras medioambientales.....</b>	<b>67</b>
<b>Capítulo 1: Muestras acuosas.....</b>	<b>69</b>
▪ Stereoselective quantitation of mecoprop and dichlorprop in natural waters by supramolecular solvent-based microextraction, chiral liquid chromatography and tandem mass spectrometry.....	71
▪ Enantioselective determination of representative profens in wastewater by a single-step sample treatment and chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometry.....	93
<b>Capítulo 2: Suelos.....</b>	<b>119</b>
▪ Fast, simple and efficient supramolecular solvent-based microextraction of mecoprop and dichlorprop in soils prior to their enantioselective determination by liquid chromatography–tandem mass spectrometry.....	121
<b>Capítulo 3: Muestras biológicas.....</b>	<b>143</b>
▪ Enantioselective analysis of profens in freshwater fish based on microextraction with a nanostructured liquid and chiral liquid chromatography–tandem mass spectrometry.....	145

---

▪ Determination of supplemental feeding needs for astaxanthin and canthaxanthin in salmonids by supramolecular solvent-based microextraction and liquid chromatography–UV/VIS spectroscopy....	169
<b>Resumen y Discusión de Resultados.....</b>	<b>189</b>
<b>1. Muestras y analitos.....</b>	<b>191</b>
<b>2. Microextracción con disolventes supramoleculares.....</b>	<b>194</b>
2.1. Disolventes supramoleculares investigados.....	194
2.2. Selección del disolvente supramolecular.....	197
2.3. Procedimientos de microextracción usados.....	200
2.4. Factores que influyen en la eficacia de la extracción.....	202
2.4.1. Extracción de muestras líquidas.....	202
2.4.2. Extracción de muestras sólidas.....	207
<b>3. Separación cromatográfica y cuantificación.....</b>	<b>211</b>
3.1. Contaminantes quirales.....	211
3.2. Carotenoides.....	215
<b>4. Características analíticas de los métodos desarrollados.....</b>	<b>215</b>
4.1. Linealidad y sensibilidad.....	215
4.2. Exactitud.....	218
4.3. Precisión.....	219
4.4. Representatividad.....	221
<b>5. Análisis de Muestras.....</b>	<b>222</b>

5.1. Determinación de contaminantes quirales en muestras medioambientales.....	222
5.2. Determinación de carotenoides en salmónidos.....	277
<b>Conclusiones.....</b>	<b>229</b>
<b>Apéndice A: Publicaciones Científicas Derivadas de la Tesis Doctoral.....</b>	<b>235</b>
<b>Apéndice B: Contribuciones a Congresos.....</b>	<b>239</b>

**OBJETO**







La evaluación de los riesgos medioambientales asociados al uso de compuestos quirales necesariamente implica conocer la distribución enantiomérica de dichos compuestos en el medioambiente, ya que la degradación y toxicidad de los contaminantes quirales es enantioselectiva y por lo tanto, los enantiómeros de estos contaminantes presentan comportamientos y efectos diferenciados que hacen imprescindible el estudio individualizado de cada uno de ellos.

La monitorización de enantiómeros de contaminantes quirales en muestras medioambientales no es una tarea fácil, fundamentalmente debido a la similitud de las estructuras químicas de los compuestos a determinar, la complejidad de las muestras a analizar y la baja concentración a la que estos contaminantes se encuentran en dichas muestras. De hecho, los métodos descritos hasta el momento con prestaciones adecuadas en términos de sensibilidad, selectividad, exactitud y precisión para su uso en análisis quiral medioambiental son escasos. Estos métodos invariablemente implican laboriosos tratamientos de muestra que conllevan elevados tiempos de análisis, lo que dificulta su aplicación en monitorización medioambiental. Por otra parte, la mayor parte de estos métodos están basados en el uso de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, a pesar de que la mayoría de los contaminantes quirales son compuestos polares y por lo tanto, es imprescindible su derivatización previa a su determinación. Esto es en gran parte debido a la escasez de métodos de separación basados en cromatografía líquida quiral compatibles con espectrometría de masas, técnica de detección que proporciona la sensibilidad y selectividad requeridas en análisis medioambiental.

El objetivo general de esta Tesis ha sido simplificar el tratamiento de muestra en análisis quiral medioambiental mediante la combinación de métodos de microextracción basados en el uso de disolventes supramoleculares y cromatografía líquida quiral acoplada a espectrometría de masas. Los disolventes supramoleculares son líquidos nanoestructurados inmiscibles con agua con características que los hacen especialmente adecuados para su uso en extracciones analíticas. Estas características, derivadas de las propiedades anfífilas de las moléculas de tensioactivo integradas en los disolventes supramoleculares y de la morfología de las estructuras en las que dichas moléculas se agregan, incluyen: 1) Capacidad para

extraer eficazmente una gran variedad de analitos (desde apolares hasta muy polares) debido a que proporcionan diferentes tipos de interacciones (dispersión, dipolo-dipolo, formación de puentes de hidrógeno, etc.) y presentan un elevado número de centros de solubilización. 2) Simplicidad de los procesos de microextracción que no requieren el uso de equipos especiales ni una preparación específica de los analistas. 3) Seguridad en los laboratorios y para el medio ambiente al usar reactivos no tóxicos y evitar o reducir al mínimo el uso de disolventes orgánicos.

Los objetivos específicos de esta Tesis se concretan en:

- 1) La evaluación de la capacidad de los disolventes supramoleculares para la extracción de contaminantes quirales en muestras medioambientales.
- 2) El desarrollo de nuevos métodos de separación de enantiómeros de contaminantes quirales basados en cromatografía líquida quiral acopada a espectrometría de masas.
- 3) La validación de los métodos desarrollados para la determinación de enantiómeros de contaminantes quirales en muestras medioambientales basados en la combinación de microextracción en disolventes supramoleculares y cromatografía líquida quiral acoplada a espectrometría de masas.
- 4) El estudio de la aplicabilidad de los métodos desarrollados al análisis de diferentes tipos de muestras medioambientales.

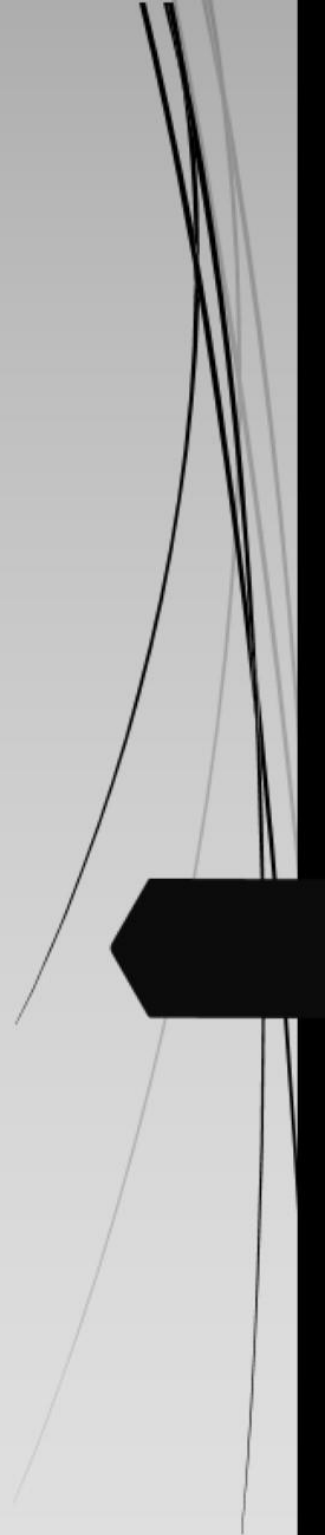
Asimismo, y dado el potencial de los disolventes supramoleculares en aplicaciones industriales, se investigó la aplicabilidad de los mismos a la determinación de carotenoides en salmónidos, un parámetro de interés para el control de la alimentación de los mismos en piscifactorías.

Finalmente, la formación de la doctoranda mediante el desarrollo de actividades directamente relacionadas con la labor investigadora, como la redacción de artículos científicos, la asistencia y presentación de comunicaciones a congresos y

la colaboración con otros investigadores en determinados estudios, también ha constituido un objetivo fundamental de esta Tesis.



# **CONTENIDO**





El contenido de la Memoria de esta Tesis Doctoral se inicia con una Introducción en la que se discuten aspectos fundamentales de los contaminantes quirales en el medioambiente como fuentes de contaminación, procesos de degradación y metabolización enantioselectivas y toxicidad enantioselectiva, centrandó la discusión en los dos principales grupos de compuestos quirales presentes en muestras medioambientales, plaguicidas y fármacos. A continuación se describen las diferentes metodologías analíticas propuestas hasta la fecha para la monitorización enantioselectiva de contaminantes quirales en el medioambiente y se resumen los aspectos más relevantes de la técnica de microextracción basada en el uso de disolventes supramoleculares, propuesta en esta Tesis Doctoral para la simplificación del tratamiento de muestra en análisis quiral medioambiental.

Los resultados de las investigaciones realizadas sobre microextracción con disolventes supramoleculares se han estructurado en tres capítulos, cada uno de ellos dedicado a un tipo de muestra, muestras acuosas, de suelo y biológicas. A continuación se resumen los contenidos de estos tres capítulos.

### **Capítulo I: Muestras acuosas.**

En este capítulo se incluyen los estudios realizados para evaluar la capacidad de los disolventes supramoleculares de agregados inversos de ácidos alquil carboxílicos para extraer contaminantes quirales de muestras acuosas medioambientales previa a su determinación enantioselectiva mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. Los analitos seleccionados para realizar este estudio han sido dos herbicidas quirales del grupo de los fenoxiácidos, mecoprop (MCP) y diclorprop (DCPP), y tres fármacos quirales del grupo de los profenos, ibuprofeno (IBP), ketoprofeno (KTP) y naproxeno (NPX). Los enantiómeros R y S de MCP y DCPP se han determinado en aguas naturales y los enantiómeros R y S de IBP, KTP y NPX en aguas residuales.

El disolvente supramolecular usado se seleccionó teniendo en cuenta su compatibilidad con la separación cromatográfica quiral. Así, la extracción de fenoxiácidos se realizó usando un disolvente de ácido dodecanoico (ADo), mientras



que la extracción de profenos se realizó usando un disolvente de ácido decanoico (ADe). En ambos casos se estudió el efecto de las diferentes variables experimentales en el proceso de extracción y se seleccionaron como óptimas aquellas condiciones en las que se obtenían los factores de concentración necesarios para determinar los analitos en muestras acuosas a concentraciones de los pocos  $\text{ng L}^{-1}$ .

En este capítulo también se incluyen los estudios realizados para desarrollar dos métodos cromatográficos, el primero para la determinación simultánea de los enantiómeros R y S de MCPP y DCPD y el segundo para la determinación simultánea de los enantiómeros R y S de IBP, KTP y NPX, ambos basados en el uso de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (CL-EM).

Una vez caracterizados, los métodos desarrollados basados en microextracción en disolvente supramolecular y LC-EM se usaron para analizar una gran variedad de muestras de aguas naturales y residuales.

## **Capítulo II: Suelos.**

La capacidad de los disolventes supramoleculares para extraer contaminantes quirales de suelos previa a su determinación enantioselectiva se estudió extrayendo R- y S-MCPP y R- y S-DCPD de suelos con diferente composición granulométrica, pH y contenido en materia orgánica. Además de las variables experimentales que influyen en el equilibrio de distribución de los analitos entre la muestra sólida y el extractante supramolecular, se estudió la influencia de la composición del disolvente supramolecular en la cantidad de sustancias húmicas extraídas de las muestras de suelo y el efecto del tiempo de contacto entre los contaminantes quirales y las partículas de suelo en la eficacia de extracción. El método desarrollado, basado en microextracción en un disolvente supramolecular de ADo y CL-EM se caracterizó y aplicó al análisis de muestras sin adición y adicionadas con concentraciones de los analitos del orden de los  $\text{ng g}^{-1}$ .

### Capítulo III: Muestras biológicas.

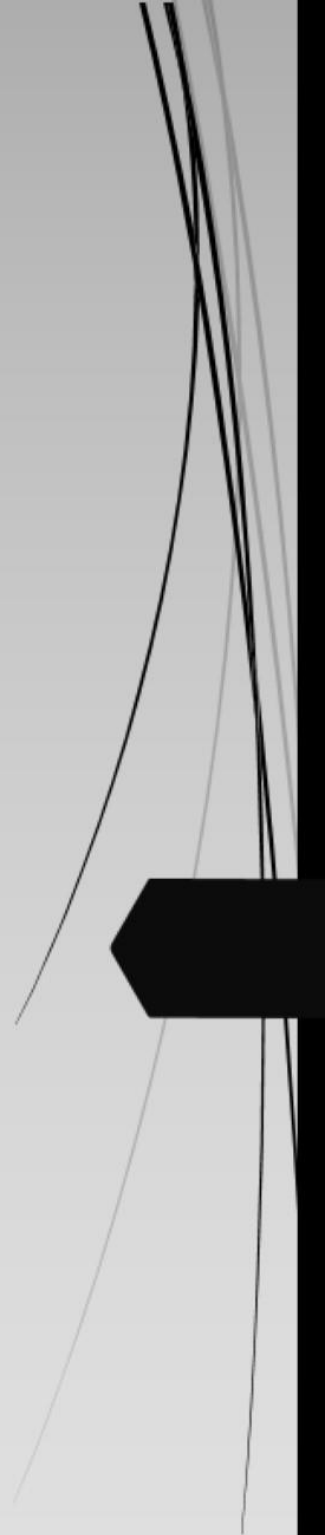
Se han realizado dos estudios para evaluar la capacidad de los disolventes supramoleculares de ácidos alquil carboxílicos para extraer compuestos orgánicos de muestras biológicas. Por una parte, se ha investigado la extracción de carotenoides en productos piscícolas con el fin de desarrollar métodos para el control de la calidad de dichos productos y por otra, la extracción de profenos en peces de agua dulce previa a su determinación enantioselectiva mediante CL-EM. El disolvente supramolecular usado en ambos casos ha sido el constituido por agregados inversos de ADe, disolvente que permite extraer cuantitativamente carotenoides de salmónidos y profenos de peces de agua dulce y es compatible con los métodos de separación cromatográfica y detección usados para llevar a cabo la determinación de los analitos en los extractos.

Las investigaciones desarrolladas han permitido proponer un método simple y rápido para la determinación de la concentración total de carotenoides en salmónidos de piscifactoría basado en medidas fotométricas y un método para la cuantificación de los dos carotenoides presentes en estos productos piscícolas, astaxantina (AST) y cantaxantina (CAN), basado en cromatografía líquida con detección fotométrica. Asimismo, se ha desarrollado un método para la determinación de los enantiómeros R y S de IBP, KTP y NPX en peces basado en la inyección directa de los extractos de disolvente supramolecular de ADe en el cromatógrafo de líquidos acoplado al espectrómetro de masas, que permite cuantificar dichos enantiómeros en peces a concentraciones del orden de los pocos  $\text{ng g}^{-1}$ . Todos los métodos desarrollados para el análisis de muestras biológicas se han caracterizado y aplicado a la determinación de los analitos investigados en diferentes especies de peces.

En esta Memoria también se incluye un apartado en el que se resumen y discuten todos los resultados obtenidos en las investigaciones realizadas en esta Tesis Doctoral de forma conjunta, destacando las aportaciones más innovadoras, y un apartado dedicado a exponer las principales conclusiones obtenidas en los trabajos de investigación desarrollados.

Finalmente, en el apéndice A se enumeran los artículos científicos publicados en revistas internacionales especializadas a los que ha dado lugar esta Tesis Doctoral indicando los objetivos abordados en cada publicación y en el Apéndice B, las comunicaciones realizadas a Congresos nacionales e internacionales.

# **INTRODUCCIÓN**





## 1. QUIRALIDAD

La quiralidad es una propiedad de las sustancias químicas generalmente asociada a la presencia de centros asimétricos en la molécula (centros estereogénicos), que con frecuencia consisten en carbonos unidos a cuatro grupos diferentes. El número de estereoisómeros de un compuesto quiral, es decir, de isómeros que difieren en la forma en la que los átomos se orientan en el espacio, varía en función del número de carbonos asimétricos en la estructura química del compuesto. Las moléculas quirales con un carbono asimétrico presentan dos estereoisómeros que son imagen especular uno del otro. Estos estereoisómeros se denominan enantiómeros y sus propiedades físico-químicas son idénticas. A modo de ejemplo en la Figura 1 se muestra la estructura química de los dos enantiómeros del bromoclorofluorometano.

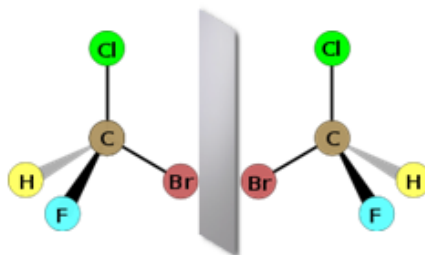


Figura 1. Enantiómeros del compuesto quiral bromoclorofluorometano

Las moléculas quirales con varios carbonos asimétricos pueden presentar hasta un total de  $2^n$  estereoisómeros, siendo  $n$  el número de carbonos asimétricos. Los estereoisómeros de moléculas con varios centros estereogénicos pueden ser enantiómeros o diastereoisómeros, que a diferencia de los enantiómeros no son imágenes especulares unos de otros y presentan características físico-químicas diferentes. Como ejemplo de compuesto quiral con varios centros estereogénicos podemos citar al 3-bromo-2-butanol. Este compuesto posee dos carbonos asimétricos y por lo tanto, cuatro estereoisómeros, dos pares de enantiómeros que a su vez son diastereoisómeros entre sí (Figura 2).

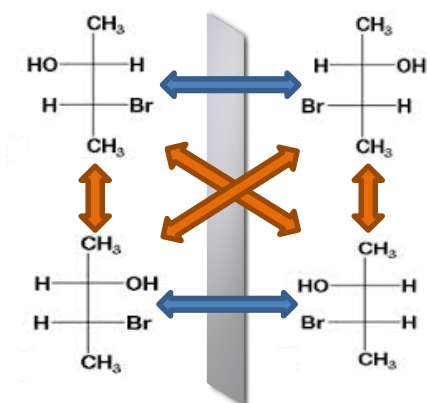


Figura 2. Estereoisómeros del 3-bromo-2-butanol. Las flechas azules indican las moléculas que son enantiómeros entre sí y las naranjas las que son diastereoisómeros.

Los enantiómeros se caracterizan por comportarse de forma diferente cuando un haz de luz polarizada plana incide sobre ellos. Cada uno de los enantiómeros gira el plano de la luz incidente con el mismo ángulo de rotación pero en direcciones opuestas. El enantiómero que hace girar el plano de luz hacia la derecha se denomina dextrógiro y el que lo hace girar hacia la izquierda levógiro. Según la IUPAC [1] se deben usar los símbolos + o *d* para indicar que una sustancia es dextrógiro y – o *l* para indicar que es levógiro. La mezcla equimolar (50/50) de dos enantiómeros de un compuesto quiral recibe el nombre de mezcla racémica o racemato. Esta mezcla no presenta ninguna actividad óptica y se designa como ( $\pm$ ) o (*d,l*).

No obstante, el signo de rotación óptica no proporciona ningún tipo de información sobre la ordenación espacial de los sustituyentes alrededor del centro asimétrico y por tanto, no permite identificar la estructura espacial del enantiómero. Esta información se puede obtener usando el sistema de Cahn, Ingold y Prelog [2], sistema aceptado por la IUPAC [1] que se basa en establecer un orden de prioridad en los sustituyentes del centro asimétrico y determinar si la secuencia de prioridad decrece en sentido horario, en cuyo caso se trata del enantiómero con configuración

[1] L.C. Cros, W. Klyne, *Pure & Apl. Chem.* 45 (1976) 1.

[2] R.S. Cahn, C.K. Ingold, V. Prelog. *Experientia.* 12 (1956) 81.

R, o en sentido antihorario, en cuyo caso la configuración es S. La mezcla racémica se designa R,S. Cada enantiómero independientemente de cuál sea su organización puede girar la luz polarizada hacia la derecha, y en este caso se denominaría R(+) o S(+) o hacia la izquierda, denominándose R(-) o S(-).

## 2. COMPUESTOS QUIRALES EN EL MEDIO AMBIENTE

Numerosos compuestos químicos, la mayoría de ellos usados como plaguicidas o fármacos, son quirales. Estos compuestos se comercializan generalmente como mezclas racémicas debido a la complejidad y el elevado coste de la producción de enantiómeros puros. En los últimos años se ha producido un importante aumento del número de compuestos enantioméricamente puros comercializados, ya que son más eficaces que las mezclas racémicas y tienen menos efectos adversos [3]. Ello se debe a que en la mayoría de los casos solo uno de los enantiómeros presenta la actividad biológica buscada (eutómero) mientras que el otro (distómero) es inactivo, menos activo o tóxico.

Los plaguicidas y fármacos quirales más usados se encuentran con frecuencia como contaminantes en el medio ambiente donde sufren procesos de transformación abióticos (fotólisis, hidrólisis, adsorción, volatilización, etc.) y bióticos (biodegradación, metabolización, etc.). Los enantiómeros de un compuesto quiral poseen las mismas características fisicoquímicas y por lo tanto, presentan el mismo comportamiento en procesos abióticos. Sin embargo, los procesos bióticos son enantioselectivos. Los enantiómeros de un compuesto quiral pueden interactuar de forma diferente con enzimas y receptores biológicos dando lugar a procesos de biodegradación y metabolización enantioselectivos y procesos de interconversión de un enantiómero en otro, lo que origina cambios en su relación enantiomérica (RE) o fracción enantiomérica (FE). La RE se define como el cociente de concentraciones molares de los dos enantiómeros del compuesto quiral

---

[3] H. Murakami, Novel Optical Resolution Technologies 269 (2007) 273



([enantiómero 1]/[enantiómero 2]); y la FE se define como el cociente  $(RE/(RE+1))$ , o lo que es lo mismo  $([enantiómero 1]/[enantiómero 1]+[enantiómero 2])$ .

La interacción de un enantiómero con un receptor biológico enantioselectivo es fuerte si esta se produce a través de tres grupos diferentes en el enantiómero y el receptor (Figura 3) y débil si no se produce dicha interacción triple [4] (Figura 3).

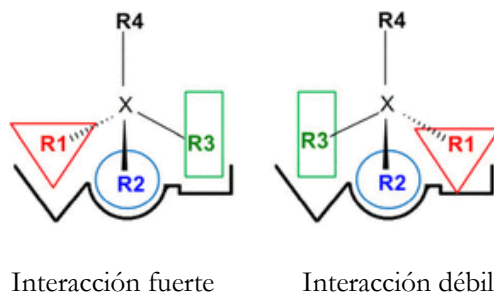


Figura 3. El esquema muestra la interacción triple de dos enantiómeros con un receptor estereoespecífico.

Por otra parte, los enantiómeros de los contaminantes quirales pueden presentar diferente toxicidad, carcinogenicidad o mutagenicidad, pudiendo ser uno de los enantiómeros hasta 160 veces más tóxico que el otro [5]. Por lo tanto, para evaluar correctamente los riesgos medioambientales de los compuestos quirales es fundamental evaluar el riesgo asociado a cada uno de los enantiómeros independientemente, ya que el comportamiento de cada uno de estos enantiómeros en el medio ambiente es diferente. Así, si el enantiómero con mayor toxicidad sufre un proceso de degradación más rápido que el menos tóxico, un análisis aquiral del riesgo medioambiental sobreestimaría la ecotoxicidad del compuesto, mientras que si fuera el menos tóxico el que se degradara más rápidamente se subestimaría.

[4] A.R. Ribiero, P.M.L. Castro, Environ. Chem. Lett. 10 (2012) 239.

[5] J.K. Stanley, B.W. Brooks Integrated Environmental Assessment and Management 5 (2009) 364.

### 3. PLAGUICIDAS QUIRALES

#### 3.1. ASPECTOS GENERALES

Los plaguicidas son sustancias o mezclas de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar plagas de hongos, bacterias, plantas y animales que interfieren en la producción, procesado, almacenamiento, transporte o comercialización de los alimentos, el forraje, los piensos, la madera y las plantas ornamentales. Estas sustancias también se utilizan para proteger a los animales domésticos, al hombre y al entorno en el que éste desarrolla sus actividades de insectos, parásitos y otros organismos nocivos. Desde que comenzaron a usarse en la década de los cuarenta su consumo no ha dejado de aumentar, siendo su producción actual de aproximadamente 2,5 millones de toneladas al año [6], la mayor parte consumidos en Europa y Estados Unidos.

**Tabla 1:**

Plaguicidas quirales con mayor volumen de ventas

<b>Herbicidas</b>	<b>Insecticidas</b>	<b>Fungicidas</b>
<b>Fenoxiácidos</b>	<b>Piretroides</b>	<b>Triazoles</b>
Diclorprop	Cialotrina	Flutriafol
Mecoprop	Cipermetrina	Propiconazole
<b>Organofosforado</b>	Deltametrina	Tebuconazole
Glufosinato	Fenvalerato	Triadimefon
<b>Ariloxifenoxipropionatos</b>	<b>Organofosforados</b>	<b>Morfolinas</b>
Fluazifop	Malatión	Fenpropimorf
Haloxifop		
<b>Ciclohexanodionas</b>		
Setoxydim		
<b>Imidazolinonas</b>		
Imazametabenz		
Imazetapir		
<b>Cloroacetanilida</b>		
Metolacoloro		

[6] Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples, Ed. J.L. Tadeo, CRC Press, Boca Raton, (2008).

El 25% de los plaguicidas utilizados a escala mundial son compuestos quirales, que se comercializan fundamentalmente como mezclas racémicas; solo el 7% del volumen total de ventas de plaguicidas quirales corresponden a enantiómeros puros. En la Tabla 1 se muestran los plaguicidas quirales más importantes desde el punto de vista comercial (volumen de ventas  $\geq$  100 millones de dólares USA/año) donde se incluyen herbicidas, insecticidas y fungicidas pertenecientes a diferentes grupos estructurales [7].

### 3.2. CONTAMINACIÓN DE AGUAS Y SUELOS

El método de aplicación de los plaguicidas a los cultivos y al suelo más utilizado es la pulverización desde avionetas o barras acopladas a la maquinaria agrícola, aunque también se usan fórmulas granuladas, dependiendo la elección del método de aplicación de factores como, el objetivo perseguido, plaguicida utilizado, etapa de crecimiento del cultivo y condiciones climáticas. El método menos recomendable desde el punto de vista medioambiental es la aplicación desde avionetas, ya que hasta un 50% del aerosol aplicado puede desviarse de la zona a tratar contaminando zonas adyacentes [8]. Cuando se utilizan barras de pulverización el plaguicida desplazado a otras zonas varía entre el 10 y el 30% [8,9]. Los plaguicidas que se encuentran en el suelo y en la materia vegetal pueden pasar a la atmósfera por volatilización y a las aguas superficiales y subterráneas por escorrentía o lixiviación (Figura 4).

---

[7] A. Willians, *Pestic. Sci.* 43 (1996) 1.

[8] D. Pimentel, L. Levitan, *Bioscience* 36 (1986) 86.

[9] H.J.B. Emans, M.A. Beek, J.B.H.J. Linders. Evaluation system for pesticides (ESPE) I. Agricultural pesticides. Rep. No. 679101004, National Institute of Public Health and Environmental Protection (RIVM), Bilthoven, Netherlands (1992).

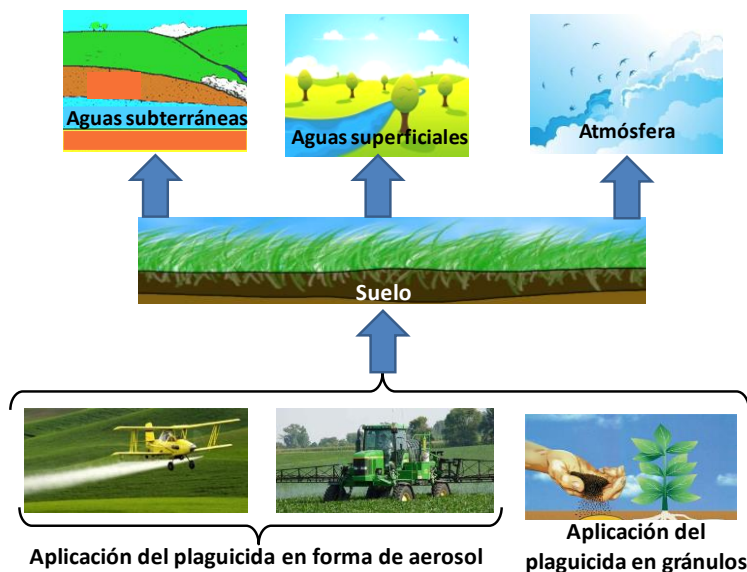


Figura 4. Distribución de los plaguicidas en el medio ambiente.

La movilidad de los plaguicidas en el medio ambiente está gobernada por una gran variedad de procesos físicos, químicos y biológicos, y por lo tanto, depende de numerosos factores. Los más importantes son:

- Plaguicida: estructura química, volatilidad y solubilidad en agua.
- Aplicación: método, frecuencia y cantidad aplicada.
- Suelo: composición granulométrica, pH y contenido de materia orgánica e iones minerales.
- Terreno: localización geográfica, elevación, cubierta vegetal y población microbiana.
- Condiciones climáticas: viento, temperatura, índice de radiación solar, precipitaciones y humedad relativa.

En lo que se refiere a los plaguicidas quirales, las arcillas y la materia orgánica del suelo pueden establecer enlaces estereoespecíficos con estos compuestos

reteniendo más fuertemente a uno de los enantiómeros que al otro [10-12]. Así, los estudios realizados sobre mecoprop y diclorpop en tres suelos calcáreos de diferente composición demostraron que los enantiómeros S se retienen más que los enantiómeros R en suelos limosos y franco arenosos, mientras que en suelos arcillosos ocurre lo contrario. Además, el contenido de materia orgánica en el suelo arcilloso también influye en la velocidad de movilización de los enantiómeros [11].

La presencia de plaguicidas en aguas naturales constituye un importante problema medioambiental y de salud pública. Un estudio realizado en Estados Unidos en 1999 sobre la presencia de plaguicidas en aguas superficiales y subterráneas puso de manifiesto que el 95% de las muestras de agua de río y casi el 50% de las muestras de aguas subterráneas analizadas contenían plaguicidas [13].

En Europa, se han realizado importantes esfuerzos legislativos con el objetivo de reducir al mínimo los riesgos derivados del uso de plaguicidas. En el año 2000 se estableció la estructura marco de la Unión Europea (UE) en política de aguas, mediante la directiva 2000/60/EC [14], con el fin de mantener y mejorar la calidad de las aguas naturales mediante la reducción progresiva de los vertidos de sustancias peligrosas y la monitorización de la evolución del contenido de contaminantes. En el anexo VIII de esta directiva se establecen los principales grupos de contaminantes, entre los que se incluyen los plaguicidas. Paralelamente se ha elaborado la normativa para la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación (Directiva 2006/118/CE [15]) en la que se establecen concentraciones máximas admisibles de plaguicidas en aguas subterráneas iguales a las reguladas para aguas de bebida (Directiva 98/83/CE [16]), es decir  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  para plaguicidas individuales y  $0,5 \mu\text{g}$

---

[10] B. Siffert, A. Naidja, Clay Miner. 27 (1992) 109.

[11] E. Romero, M.B. Matallo, A. Peña, F. Sánchez-Rasero, Ph. Schmitt-Kopplin, G. Dios, Environ. Pollut. 111 (2001) 209.

[12] M. Oravec, Z. Šimek, I. Holoubek, Colloids Surf. A 359 (2010) 60.

[13] J.G. Robert, J.E. Barbash, D.W. Kolpin, S.J. Larson, Environ. Sci. Technol. 33 (1999) 164 A.

[14] Directiva 2000/60/CE por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. Diario Oficial de la Unión Europea L 327 de 22.23.2000.

[15] Directiva 2006/118/CE relativa a la protección de las aguas contra la contaminación y el deterioro. Diario Oficial de la Unión Europea L 372 de 27/12/2006, p. 19.

[16] Directiva 98/83/CE relativa a las aguas destinadas al consumo humano. Diario Oficial de las Comunidades Europeas L330 de 5/12/98, p. 32.

$L^{-1}$  para la suma de todos los plaguicidas, y se han regulado los requisitos de los métodos de análisis utilizados en el seguimiento del estado de las aguas (Directiva 2009/60/CE [17]). Estos métodos deben proporcionar resultados con una incertidumbre igual o inferior al 50% estimada al nivel del estándar de calidad medioambiental establecido y poseer un límite de cuantificación igual o inferior al 30% de dicho estándar de calidad. Finalmente, la Directiva 2009/128/CE [18] establece el marco de actuación comunitaria para el uso sostenible de los plaguicidas y el Reglamento (CE) n° 1107/2009 establece criterios para la autorización del uso de nuevos plaguicidas tras la realización de una estricta evaluación de riesgos. En el Anexo II de este reglamento se indica que en el caso de plaguicidas quirales, los productos fitosanitarios que contengan una proporción significativa de esteroisómero inactivo deben sustituirse por productos que sólo contengan el esteroisómero activo, siempre que éste esté disponible.

Hasta la fecha no existe legislación específica para plaguicidas quirales. Tan solo existe un programa de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) cuyo objetivo es evaluar el riesgo medioambiental y para la salud humana asociado al uso de mezclas enriquecidas enantioméricamente en comparación con el empleo de mezclas racémicas de plaguicidas quirales [19].

---

[17] Directiva 2009/60/CE por la que se establecen, de conformidad con la Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las especificaciones técnicas del análisis químico y del seguimiento del estado de las aguas. Diario Oficial de la Unión Europea L 201 de 1/8/2009, p. 36.

[18] Directiva 2009/128/CE por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas. Diario Oficial de la Unión Europea L 309 de 24/11/2009, p. 71.

[19] U.S. EPA: EFED Interim Policy for Stereoisomeric Pesticides.

<http://www.epa.gov/oppefed1/ecorisk-ders/stereoisomer-policy.htm>, 2000.

### 3.3. PROCESOS DE DEGRADACIÓN Y METABOLIZACIÓN ENANTIOSELECTIVOS

La transformación enantioselectiva de los plaguicidas en el suelo está influenciada por su población microbiológica y la cubierta vegetal [20]. Así diferentes estudios sobre mecoprop y diclorprop [21,22] han demostrado que la bacteria *Alcaligenes denitrificans* degrada preferencialmente a los enantiómeros R de estos plaguicidas quirales, mientras que la bacteria *Sphingomonas herbicidovorans* degrada preferencialmente a los enantiómeros S. Por otra parte, los microorganismos implicados en los procesos de degradación pueden variar en función del pH y la humedad del suelo, pudiendo por tanto estos factores influir en la degradación enantioselectiva de los plaguicidas quirales [23-26]. Un estudio sobre el fungicida metalaxil demostró que en suelos aerobios con pH>5 el enantiómero R se degrada en mayor proporción que el S, en suelos aerobios con pH 4-5 ambos enantiómeros se degradan en la misma proporción y en suelos anaerobios y aerobios con pH<4 el enantiómero S se degrada en mayor proporción que el R [23].

En cuanto a la influencia de la cubierta vegetal, los plaguicidas quirales sufren procesos de metabolización enantioselectivos en las plantas. Así, se ha comprobado que en plantas de girasol el enantiómero S del fungicida metalaxil se metaboliza más rápidamente que el R [27] y en plantas de col tratadas con el insecticida cis-cipermetrina y trans-cipermetrina se producen procesos de conversión entre enantiómeros, transformándose el enantiómero R en S. [28].

---

[20] T. Katagi, J. Pestic. Sci. 2012 (37) 1.

[21] V.A. Tett, A.J. Willets, H.M. Lappin-Scott, FEMS Microbiol. Ecol. 14 (1994) 191.

[22] C. Zipper, K. Nickel, W. Angst, H-P.E. Kohler, Appl. Environ. Microbiol. 62 (1996) 4318.

[23] I.J. Buerge, T. Poiger, M.D. Müller, H-R. Buser, Environ. Sci. Technol. 37 (2003) 2668.

[24] G. Heron, T.H. Christensen., Chemosphere 24 (1992) 547.

[25] G.M. Williams, I. Harrison, C.A. Carlick, O. Crowley, J. Contam. Hydrol. 64 (2003) 253.

[26] C. Zipper, C. Bolliger, T. Fleischmann, M.J-F. Suter, W. Angst, M.D. Müller, H-P.E. Kohler, Biodegradation 10 (1999) 271.

[27] C. Marucchini, C. Zadra, Chirality 14 (2002) 32.

[28] K. Furuzawa, N. Mikami, H. Yamada, J. Miyamoto: J. Pestic. Sci. 11 (1986) 253.

### 3.4. TOXICIDAD ENANTIOSELECTIVA

La mayoría de los estudios evalúan la toxicidad enantioselectiva de los plaguicidas quirales usando el invertebrado de agua dulce *Daphnia magna*, ya que este crustáceo plactónico sirve como alimento a un gran número de peces, aunque también existen estudios que evalúan la toxicidad de vertebrados acuáticos, como peces cebra o trucha arcoíris. Se distinguen dos tipos de estudios toxicológicos, los estudios de toxicidad aguda, que determinan los efectos de una dosis única y muy elevada de una sustancia y se expresa como la dosis letal 50 (LD50), es decir la dosis de sustancia a la que se produce la muerte del 50% de los organismos, y los estudios de toxicidad crónica, en los que el compuesto se administra durante un largo periodo de tiempo y se estudian los efectos sobre el crecimiento o reproducción del organismo.

La mayoría de las investigaciones realizadas sobre plaguicidas quirales se han centrado en el estudio de la toxicidad enantioselectiva aguda de plaguicidas organofosforados. Como ejemplo podemos citar el estudio sobre el insecticida fonofós en el que se determinó que la toxicidad del enantiómero S para *Daphnia magna* es 15 veces mayor que la del enantiómero R [29]. También se han realizado estudios sobre toxicidad enantioselectiva aguda de piretroides, plaguicidas que presentan mayor toxicidad que los compuestos organofosforados. Así, el enantiómero R de la trans-permetrina presenta una toxicidad 30 veces mayor a la del enantiómero S [29] y la toxicidad de la (-)-lambdacialotrina es 162 veces mayor a la de la (+)-lambdacialotrina [30].

En cuanto a la toxicidad enantioselectiva crónica de plaguicidas, los datos disponibles son muy limitados. Estudios realizados para el herbicida metolacloro usando *Daphnia magna* [31] demostraron que la longevidad y la reproducción del invertebrado disminuía en mayor proporción en presencia de S-metolacloro que en

---

[29] W. Liu, J. Gan, D. Schlenk, W.A. Jury, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 2005 (102) 701.

[30] C. Xu, J.J. Wang, W.P. Liu, G.D. Sheng, Y.J. Tu, Y. Ma, Environ. Toxicol. Chem. 2008a (27) 174.

[31] H.J. Liu, W.H. Ye, X.M. Zhan and W.P. Liu, Ecotoxicol. Environ. Saf. 2006 (63) 451.



presencia de R-metolacloro. Por otra parte, el enantiómero R del fungicida metalaxil es dos veces más tóxico que el compuesto en su forma racémica, originando una mayor disminución del crecimiento y del número de crías por hembra de *Daphnia magna* [32]. Finalmente, un estudio realizado con el piretroide cis-bisfenetrín demostró que la toxicidad del enantiómero R para *Daphnia magna* es superior a la del enantiómero S [33].

## 4. FÁRMACOS QUIRALES

### 4.1. ASPECTOS GENERALES

Los fármacos son sustancias químicas naturales o sintéticas utilizadas para el tratamiento, cura, prevención o diagnóstico de enfermedades. En los últimos años se ha producido un aumento en el consumo de estas sustancias [34], que ha sido especialmente importante en los países occidentales fundamentalmente como consecuencia del envejecimiento de la población. España es uno de los países europeos con mayor consumo de medicamentos, entre otros motivos por su bajo precio, significativamente inferior a los de la mayoría de los países europeos [35]. Según datos del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, el gasto farmacéutico público fue de más de 9000 millones de euros entre mayo de 2013 y abril de 2014 [36].

De los más de 3.000 fármacos utilizados, el 56% son quirales. Los enantiómeros de estos fármacos quirales pueden interaccionar de forma diferente con los receptores biológicos y por lo tanto, presentar actividades terapéuticas o

---

[32] S.W. Chen, W.P. Liu, Bull. Environ. Contam. Toxicol, 2008 (81) 531.

[33] M.R. Zhao, C. Wang, K.K. Liu, L.W. Sun, L. Li, W.P. Liu, Environ. Toxicol. Chem, 2009 (28) 1475.

[34] [http://www.imshealth.com/deployedfiles/imshealth/Global/Content/Corporate/Press%20Room/Total\\_World\\_Pharma\\_Market\\_Topline\\_metrics\\_2012.pdf](http://www.imshealth.com/deployedfiles/imshealth/Global/Content/Corporate/Press%20Room/Total_World_Pharma_Market_Topline_metrics_2012.pdf)

[35] J. Simó Miñana, Aten. Primaria 44 (2012) 335.

[36] Boletín de Coyuntura nº 109 Mayo 2014.

producir efectos secundarios indeseables diferentes [37]. Según la actividad terapéutica de sus enantiómeros se distinguen dos tipos de fármacos [38]:

- Fármacos en los que un enantiómero presenta actividad terapéutica (eutámero), mientras que el otro es inactivo o menos activo (diastómero). La Tabla 2 recoge ejemplos de fármacos quirales cuyos enantiómeros presentan diferente actividad terapéutica.
- Fármacos en los que los dos enantiómeros presentan la misma actividad. Representan una minoría de los fármacos comercializados. Como ejemplo podemos nombrar a la flecaínida (antirítmico) y la flouxetina (antidepresivo).

Por otra parte, determinados fármacos pueden sufrir inversión quiral en el organismo, es decir transformación de un enantiómero en otro. Se distinguen dos tipos de inversión quiral: unidireccional y bidireccional [39]. Un ejemplo de inversión unidireccional lo encontramos en fármacos con acción analgésica y antiinflamatoria derivados del ácido propiónico (NSAID) como ibuprofeno, ketoprofeno y fenoprofeno. En el organismo, las enzimas hepáticas transforman al enantiómero R en el S que es el enantiómero más activo (ej. S-ibuprofeno es 100 veces más activo que R-ibuprofeno). La inversión bidireccional, es decir, transformación del enantiómero R en el S y viceversa, se produce en determinados ansiolíticos como el oxazepam, lorazepam y termazepam.

Aunque la mayoría de los fármacos quirales se comercializan como mezclas racémicas (aproximadamente el 88%), en los últimos años se han realizado importantes esfuerzos para desarrollar fármacos enantioméricamente puros con el fin de mejorar la eficacia de los medicamentos y reducir sus efectos secundarios. Así, el número de nuevos fármacos quirales comercializados como mezclas racémicas se ha reducido del 50% en 1990 al 10% en 2002, mientras que el número de fármacos enantioméricamente puros ha aumentado del 50% al 90% [3].

---

[37] B. Kasprzyk-Hordern, Chem. Soc. Rev. 39 (2010) 4466.

[38] A. Nguyen, H. He, C. Pham-Huy, Int. J. Biomed. Sci. 2 (2006) 85.

[39] A. Marzo, E. Heftman, J. Biomed. Biophys. Methods 54 (2002) 57.

**Tabla 2:**

Actividad de los enantiómeros de fármacos quirales pertenecientes a diferentes grupos terapéuticos

<b>Grupo terapéutico</b>	<b>Actividad terapéutica de los enantiómeros</b>
<b>B-bloqueantes:</b> propanolol, acebutolol, atenolol, alprenolol, betaxolol, carvedilol, metoprolol, labetalol, pindolol, sotanol, ect	$l > d$ Ej: S(-)-propanolol > R(+)-propanolol
<b>Antirrítmicos:</b> verapamilo, nircadipino, nimodipino, nisoldipino, felodipino, mandipino, ect.	$l > d$ Ej: S(-)-verapamilo > R(+)-verapamilo
<b>Broncodilatadores:</b> albutelol, salmeterol y terbutalina	$l > d$ Ej: R(-)-albuterol > S(+)-albuterol
<b>Hipnóticos, sedativos:</b> hexobarbital, secobarbital, mefobarbital, pentobarbital, thiopental, tiohexital	$l > d$ Ej: S(-)-secobarbital > R(+)-secobarbital
<b>Anestésicos:</b> ketamina, isoflurano	$d > l$ Ej: S(+)-ketamina > R(-)-ketamina
<b>Analgésico narcótico:</b> metadona	Ej: R(-)-metadona > S(+)-metadona
<b>Analgésicos, antiinflamatorios: (NSAID):</b> ibuprofeno, ketoprofeno, fenoprofeno, ect.	$d > l$ Ej: S(+)-ibuprofeno > R(-)-ibuprofeno
<b>Tranquilizantes:</b> oxazepan, lorazepan, temazepan	$d > l$ Ej: S(+)-oxazepam > R(-)-oxazepam

( $l$ =levógiro,  $d$ = dextrógiro)

## 4.2. CONTAMINACIÓN DE AGUAS Y BIOTA ACUÁTICA

El elevado consumo de fármacos a escala mundial ha dado lugar a un importante problema de contaminación medioambiental. Los fármacos más consumidos se encuentran en la práctica totalidad de las aguas naturales a

concentraciones del orden de los  $\text{ng L}^{-1}$  a los  $\mu\text{g L}^{-1}$  [40-42]. Los residuos de fármacos también se encuentran en los suelos y en la fauna acuática que vive en los ecosistemas contaminados. En la Figura 5 se muestran las vías de entrada de estos contaminantes en el medio ambiente.

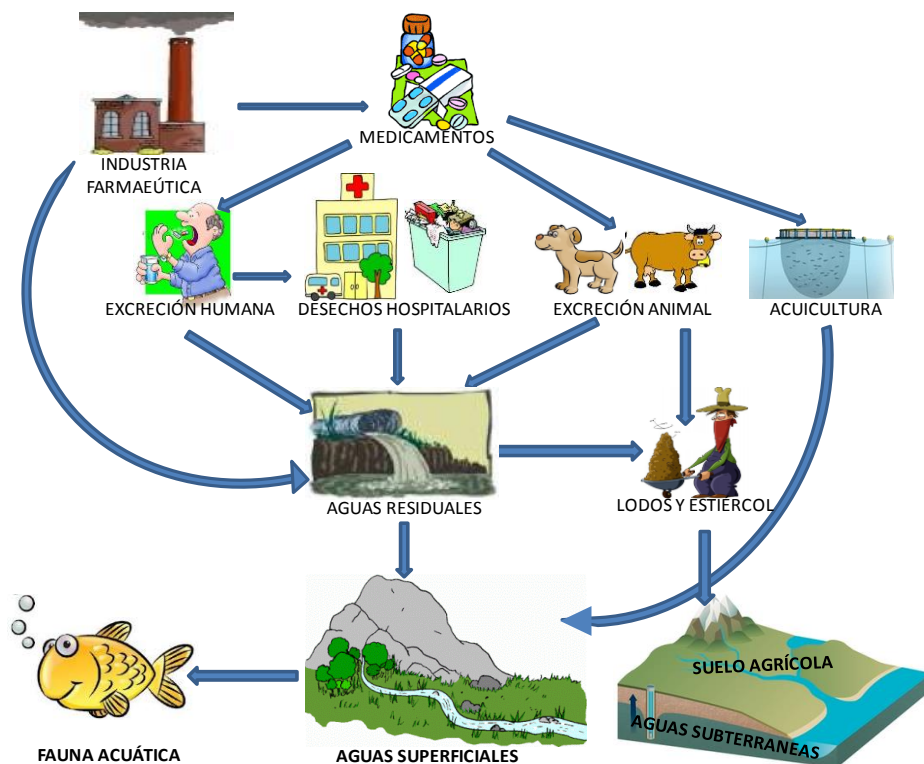


Figura 5. Principales vías de entrada de los fármacos en el medio ambiente.

Los medicamentos consumidos por la población y los usados en explotaciones ganaderas son excretados en parte sin metabolizar y llegan a las aguas residuales. Estos contaminantes no se eliminan completamente en las plantas de tratamiento de aguas residuales, y por lo tanto, el vertido de efluentes de depuradora en los ríos constituye una de las principales vías de entrada de residuos de fármacos

[40] M. Gros, M. Petrovic, D. Barceló, Talanta 70(2006) 678.

[41] D.J. Lapworth, N. Baran, M.E. Stuart, R.S. Ward, Environ. Pollut. 163 (2012) 287.

[42] K. Fent, A.A. Weston, D. Caminada, Aquat. Toxicol. 76 (2006) 122.

en las aguas naturales. El vertido incontrolado de medicamentos no usados o caducados, fundamentalmente procedentes de desechos hospitalarios, y el vertido de aguas residuales de la industria farmacéutica son también importantes fuentes de contaminación. Por otra parte, la contaminación del suelo se produce fundamentalmente mediante el uso de lodos de depuradora y estiércol contaminado como fertilizantes. La escorrentía y la filtración del agua de lluvia en suelos contaminados constituyen otra vía de entrada de los fármacos en las aguas naturales superficiales y subterráneas. Finalmente, el uso de fármacos en acuicultura es también una importante fuente de contaminantes farmacéuticos en sistemas acuáticos [43].

Los fármacos presentes en las aguas naturales pueden bioacumularse en la fauna acuática, pasando de esta forma a la cadena trófica [44]. Además, pueden contaminar las aguas de bebida, lo que es especialmente preocupante, pero hasta el momento, no existe regulación en la UE sobre residuos de medicamentos en las aguas de consumo.

La velocidad de entrada de los fármacos en el medio acuático es mayor que su velocidad de degradación (contaminantes pseudopersistentes) y por lo tanto, es fundamental evaluar los riesgos medioambientales asociados a su uso. La Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) de Estados Unidos han establecido la obligatoriedad de realizar una evaluación de riesgos ambientales (ERA) antes de comercializar un nuevo fármaco. Esta evaluación supone la estimación de la concentración de fármaco que se puede encontrar en las aguas naturales (PEC, “predicted environmental concentration”) y si este valor no supera los  $0,01 \text{ kg L}^{-1}$  no es necesario realizar ninguna evaluación adicional. Sin embargo, si el PEC es superior a  $0,01 \text{ kg L}^{-1}$ , se determina a partir de qué concentración de fármaco se producen efectos adversos usando el test de ecotoxicidad aguda con algas (EMA) o *Daphnia* y peces (FDA). Con estos datos se calculan los valores de concentración media efectiva (EC50), dosis letal (LC50) y la concentración máxima para la que no se observan

---

[43] A. Pal, K.Y.-H. Gin, A.Y.-C. Lin, M. Reinhard, *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 6062.

[44] B. Huerta, S. Rodríguez-Mozaz, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 2611.

efectos nocivos (NOEC, “no observed effect concentration”). El que los resultados de los estudios realizados indiquen que existe un riesgo medioambiental inaceptable no implica la prohibición del nuevo medicamento, pero si la limitación de su uso a casos de extrema necesidad y su inclusión en programas de monitorización medioambiental. La concentración medida en el medioambiente (MEC) para un determinado fármaco permite realizar una evaluación de riesgos más realista que el PEC, pero esta concentración se desconoce en la mayoría de los casos.

#### 4.3. PROCESOS DE METABOLIZACIÓN Y DEGRADACIÓN ENANTIOSELECTIVOS

Los procesos de transformación enantioselectiva de los fármacos comienzan en el organismo, donde sufren procesos de metabolización enantioselectiva. Los enantiómeros de un fármaco quiral pueden ser metabolizados por los organismos vivos a diferente velocidad y siguiendo diferentes rutas metabólicas [45,46] y por lo tanto, la fracción enantiomérica del fármaco excretado sin metabolizar con frecuencia es diferente a la del ingerido. La fracción enantiomérica de los residuos de fármacos presentes en las aguas residuales vuelve a cambiar en las estaciones de tratamiento de aguas residuales (ETAR), debido a que los procesos de biodegradación utilizados para la eliminación de la materia orgánica en estas estaciones también son enantioselectivos. La velocidad a la que se degrada cada enantiómero y los procesos de inversión quiral que se producen dependen del tipo de tratamiento usado (aerobios o anaerobios) y de las bacterias utilizadas [43,47] y por lo tanto, la FE es un indicador del tratamiento al que ha sido sometida un agua residual. Además, determinando la EF de determinados fármacos en un agua natural es posible obtener información acerca de los vertidos de aguas tratadas que se han realizado y a qué tipo de tratamiento se han sometido dichas aguas. Los fármacos

---

[45] B.K. Patel, A.J. Hutt, *Stereoselectivity in drug action and disposition: an overview in Chirality in drug action and development*, eds. I.K. Reddy and R. Mehvar, Mercel Dekker, (2004).

[46] K.M. Rentsch, J. *Biochem. Biophys. Methods* 54 (2002) 1.

[47] S.L. MacLeod, C.S. Wong. *Water. Res.* 44 (2010) 533.

más utilizados con este fin son ibuprofeno, naproxeno y propranolol, ya que dichos fármacos se encuentran a concentraciones relativamente elevadas en las aguas residuales (del orden de los  $\mu\text{g L}^{-1}$  [48]).

Los fármacos quirales que llegan al suelo y a las aguas subterráneas y superficiales continúan siendo biodegradados enantioselectivamente por los microorganismos presentes en estos ecosistemas y por lo tanto, su fracción enantiomérica sigue cambiando [49,50]. Así pues, los seres vivos que habitan en ecosistemas contaminados con fármacos quirales están expuestos a concentraciones diferentes de cada uno de los enantiómeros. Sin embargo, hasta la fecha no existen estudios que determinen la distribución enantiomérica de fármacos quirales en estos organismos. Solo se disponen de algunos estudios en los que se determinan concentraciones totales de residuos de fármacos [51,52].

#### 4.4. TOXICIDAD ENANTIOSELECTIVA

Los residuos de fármacos son contaminantes muy tóxicos, debido a que actúan de forma muy específica en determinadas células o tejidos con importantes efectos nocivos incluso a muy bajas concentraciones. Además, permanecen en el medio ambiente durante largos periodos de tiempo (meses o incluso años). Los organismos con mayor exposición a la contaminación por fármacos son los que habitan en aguas dulces, ya que estas aguas reciben elevadas cantidades de fármacos procedentes de los efluentes de las ETAR. Entre los efectos nocivos de los fármacos en los organismos acuáticos cabe destacar la disminución del crecimiento y de la capacidad de reproducción. Pero los fármacos también causan efectos nocivos en los animales terrestres, de hecho uno de los mayores desastres ecológicos que se ha producido debido a la presencia de fármacos en el medio ambiente ha sido la muerte

---

[48] L.J. Fono, D.L. Sedlak, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 9244.

[49] H.R. Buser, T. Poiger, M.D. Muller, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 2529.

[50] L.J. Fono, E.P. Kolodziej, D.L. Sedlak, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 7257.

[51] B.W. Brooks, C.K. Chambliss, J.K. Stanley, A. Ramirez, K.E. Banks, R.D. Johnson, R.J. Lewis, *Environ. Toxicol. Chem.* 24 (2005) 464.

[52] A.J. Ramirez, M.A. Mottaleb, B.W. Brooks, C.K. Chambliss, *Anal. Chem.* 79 (2007) 3155.

de millones de buitres en Asia, causada por los efectos tóxicos de un compuesto usado como antiinflamatorio, el diclofenac. Recientemente, la Comisión de Medio Ambiente del Parlamento Europeo ha incluido este fármaco en la lista de sustancias prioritarias, es decir se ha considerado que es una sustancia para la que deben preverse medidas de carácter prioritario que reduzcan los riesgos para la salud y el medio ambiente [53].

Existen muy pocos estudios sobre la ecotoxicidad de fármacos y generalmente, en estos estudios se utilizan concentraciones de estos compuestos mayores a las que pueden encontrarse en el medio ambiente. Además, aunque es bien sabido que la ecotoxicidad de los enantiómeros de compuestos quirales puede ser muy diferente, apenas existen estudios que evalúen la toxicidad de enantiómeros de fármacos de forma individual. Hasta la fecha, solo existen dos estudios en los que se ha evaluado la toxicidad del antidepresivo fluoxetina [54] y del  $\beta$ -bloqueante propranolol [55] en invertebrados y vertebrados acuáticos que han puesto de manifiesto la diferente toxicidad de los enantiómeros de dichos fármacos.

## **5. DETERMINACIÓN ENANTIOSELECTIVA DE CONTAMINANTES QUIRALES EN MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES**

A pesar de la importancia que la monitorización individualizada de enantiómeros de compuestos quirales tiene para la correcta evaluación de los riesgos medioambientales asociados al uso de estos compuestos, apenas existen métodos enantioselectivos que cumplan los requisitos de sensibilidad, selectividad, exactitud, precisión y rapidez, requeridos en análisis ambiental quiral. Esto es fundamentalmente debido a la complejidad de este tipo de análisis, ya que se trata de determinar compuestos con estructura química muy similar a baja concentración en

---

[53] Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de agosto de 2013 relativas a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas

[54] J.K. Stanley, A.J. Ramirez, C.K. Chambliss, B.W. Brooks, *Chemosphere* 69 (2007) 9.

[55] J.K. Stanley, A.J. Ramirez, M. Mottaleb, C.K. Chambliss, B.W. Brooks, *Environ. Toxicol. Chem.* 25 (2006) 1780.



muestras muy complejas. Los métodos analíticos disponibles implican laboriosos tratamientos de muestra que incluyen etapas de extracción, limpieza y concentración de los extractos, previas a la separación de los analitos usando cromatografía y electroforesis capilar quiral y detección de los mismos mediante fotometría, fluorimetría o espectrometría de masas. En todos los casos es fundamental realizar etapas de pretratamiento de la muestra para evitar que se produzcan procesos de degradación o transformación enantioselectivos desde la toma de muestra, hasta el análisis en el laboratorio.

## 5.1. PRETRATAMIENTO Y TRATAMIENTO DE MUESTRA

El pretratamiento de muestras acuosas medioambientales generalmente consiste en la filtración del agua para eliminar la materia sólida en suspensión, la acidificación de la muestra (pH 2-3) o la adicción de azida sódica para detener la acción microbiana y su conservación a baja temperatura (4-2 °C) [56]. En cuanto al proceso de extracción, la técnica más usada es la extracción en fase sólida (solid phase extraction, SPE) [57], aunque también se ha usado la extracción líquido-líquido, por ejemplo para la extracción de plaguicidas quirales del grupo de los fenoxiácidos y cloroacetanilidas en aguas naturales [58,59]. La elección del adsorbente usado en SPE y el disolvente utilizado para la elución de los analitos es clave, ya que el uso del adsorbente adecuado permite eliminar especies interferentes [60] y determinados disolventes pueden influir en la resolución obtenida en cromatografía líquida quiral. Los adsorbentes más utilizados han sido copolímeros de divinilbenceno/N-vinilpirrolidona (nombre comercial: Oasis HLB) [57] y la elución de los analitos generalmente se realiza con metanol, disolvente que no afecta a la resolución de los enantiómeros. En alguno de los métodos propuestos, se realiza una segunda SPE

---

[56] D.R. Baker, B. Kasprzyk-Hordern, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 8036.

[57] S.E. Evans, B. Kasprzyk-Hordern, Trends Environ. Anal. Chem. 1 (2014) e34.

[58] C. Zipper, M.J.-F. Suter, S.B. Haderlein, M. Gruhl, H.P.-E. Kohler, Environ. Sci. Technol. 32 (1998) 2070.

[59] P.B. Kurt-Karakus, T.F. Bidleman, D.C.G. Muir, S.J. Cagampan, J. Struger, E. Sverko, J.M. Small, L.M. Jantunen, Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 8452.

[60] B. Kasprzyk-Hordern, V.V.R. Kondakal, D.R. Baker, J. Chromatogr. A 27 (2010) 4575.

para eliminar las sustancias húmicas usando columnas de acceso restringido [61,62]. Finalmente debido a los elevados volúmenes de disolventes orgánicos usados en la elución de los analitos, generalmente es necesario concentrar los extractos mediante la evaporación del disolvente.

En cuanto a las muestras de suelo, sedimento y lodo, éstas se secan o liofilizan para eliminar el agua, se criban para eliminar las partículas más gruesas y se conservan a baja temperatura. Los compuestos quirales se extraen de las muestras utilizando disolventes orgánicos como metanol [63], mezclas de acetona y hexano [64] o de metanol, acetonitrilo y ácido acético [65-68]. Generalmente se realiza la extracción repetitiva con agitación magnética [23,64,65,69] o extracción asistida por ultrasonidos [66,67]. La limpieza de los extractos se realiza mediante reextracción en diclorometano [23,70], cloruro de metileno [65-67,69], o etilacetato [68,27] y su concentración mediante la evaporación del disolvente.

Finalmente, los métodos disponibles para el análisis enantioselectivo de muestras biológicas son muy escasos. Las muestras se conservan a baja temperatura y las extracciones se realizan usando metanol [69], etil acetato [71], diclorometano [72] o mezclas de diclorometano: hexano (1:1 v/v) [73]. Es frecuente el uso de

- 
- [61] J.C. Barreiro, K.L. Vanzolini, Q.B. Cass, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2865.  
[62] J.C. Barreiro, K.L. Vanzolini, T.V. Madureira, M.E. Tiritan, Q.B. Cass, *Talanta* 82 (2010) 384.  
[63] Y.-Z. Wen, H. Chen, Y.-L. Yuan, D.-M. Xu, S.-D. Kang, *J. Environ. Monit.* 13 (2011) 879.  
[64] S. Qin, R. Budd, S. Bondarenko, W. Liu, J. Gan, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 5040.  
[65] F. Sánchez-Rasero, M.B. Matallo, G. Dios, E. Romero, A. Peña, *J. Chromatogr. A* 799 (1998)355.  
[66] J.M. Schneiderheinze, D.W. Armstrong, A. Berthod, *Chirality* 11 (1999) 330.  
[67] A.W. Garrison, P. Schmitt, D. Martens, A. Kettrup, *Environ. Sci. Technol.* 30 (1996) 2449.  
[68] M.D. Müller, H.-R. Buser, *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 2031.  
[69] H-R. Buser, M.D. Müller, T. Poiger, M.E. Balmer, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 221.  
[70] W. Lao, J. Gan, *Chirality* 24 (2012) 54.  
[71] R. Köppen, R. Becker, S. Esslinger, I. Nehls, *Chemosphere* 80 (2010) 1241.  
[72] C.S. Wong, F. Lau, M. Clark, D.G. Muir, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 1257.  
[73] J.K. Staley, A.J. Ramirez, M. Mottaleb, C.K. Chambliss, B.W. Brooks, *Environ. Toxicol. Chem.* 25 (2006) 1780.

extracción Soxhlet [72,73] y extracción acelerada por disolvente [74-76]. Los métodos generalmente incluyen una etapa de eliminación de lípidos mediante cromatografía de permeación en gel y una etapa de evaporación del disolvente para preconcentrar el extracto antes de realizar la determinación enantioselectiva.

## 5.2. SEPARACIÓN QUIRAL

La separación de los enantiómeros de un compuesto quiral se puede realizar usando métodos directos o indirectos que implican el uso de selectores quirales y la derivatización de los analitos, respectivamente. En los métodos indirectos los enantiómeros se transforman en diastereoisómeros mediante reacción con una sustancia enantioméricamente pura y los diastereoisómeros formados se separan mediante cromatografía líquida [77,78] o de gases [50,79] usando columnas convencionales. Estos métodos presentan los inconvenientes típicos de la derivatización, entre los que caben destacar un evado tiempo de análisis y el riesgo de derivatización incompleta. Además, los reactivos derivatizantes enantioméricamente puros no siempre se encuentran disponibles comercialmente, lo que limita su aplicabilidad.

Los métodos directos de separación quiral se basan en la interacción diferencial de un selector quiral con cada uno de los enantiómeros del compuesto quiral para dar lugar a la formación de complejos transitorios, con diferente constante de estabilidad. En cromatografía de gases, el selector quiral forma parte de la fase estacionaria y en cromatografía líquida existen dos alternativas: el uso de columnas quirales y la adicción de selectores quirales a la fase móvil, aunque esta es una práctica poco frecuente. Finalmente, la separación de compuestos quirales en electroforesis

---

[74] G.T. Tomy, W. Budakowski, T. Halldorson, D.M. Whittle, M.J. Keir, C. Marvin, G. Macinnis, M. Alae, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2004) 2298.

[75] G.T. Tomy, K. Pleskach, R. Oswald, T. Halldorson, P.A. Helm, G. Macinnis, C.H. Marvin, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 3634.

[76] J. Moisey, A.T. Fisk, K.A. Hobson, R.J. Norstrom, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 1920.

[77] E. Yang, S. Wang, J. Kratz, M.J. Cyronak, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 609.

[78] S. Batra, R. Bhushan, *Biomed. Chromatogr.* 28 (2014) 815.

[79] N.H. Hashim, S.J. Khan, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4746.

capilar generalmente se lleva a cabo adicionando un selector quiral a la disolución de electrolito en electroforesis de zona o a la disolución de tensioactivo en cromatografía micelar electrocinética (micellar electrokinetic chromatography, MECK), aunque también se ha propuesto el uso de disoluciones micelares de tensioactivos quirales [80].

Los selectores quirales utilizados en técnicas cromatográficas y electroforéticas son:

- **Ciclodextrinas:** Son oligosacáridos cíclicos constituidos por unidades de D-glucosa unidas entre sí mediante enlaces 1,4-glicosídicos que se orientan en el espacio formando un toroide hueco truncado (Figura 6). Existen tres ciclodextrinas nativas,  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ - ciclodextrina que se diferencian en el número de unidades glucosa que las constituyen (6, 7 y 8 unidades glucosa, respectivamente), lo que determina el tamaño de su cavidad interior [81].

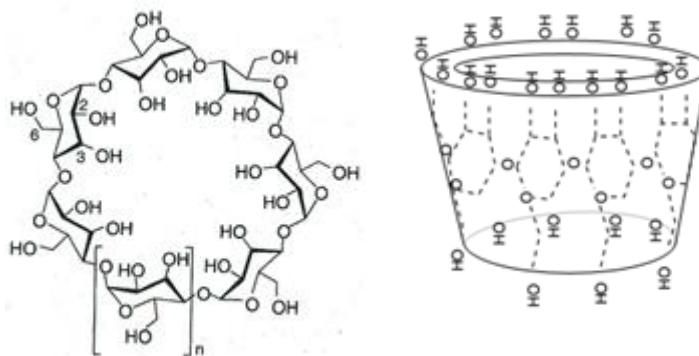


Figura 6: Estructura molecular y disposición espacial toroidal de las ciclodextrinas nativas:  $\alpha$ -ciclodextrina ( $n=0$ ),  $\beta$ -ciclodextrina ( $n=1$ ) y  $\gamma$ -ciclodextrina ( $n=2$ )

Las ciclodextrinas forman complejos de inclusión con numerosos compuestos incluidos compuestos apolares (ej. hidrocarburos aromáticos) dado el carácter hidrofóbico del interior de la cavidad. El tamaño de esta cavidad

[80] K. Otsuka, S. Terabe, J. Chromatogr. A 875 (2000) 163.

[81] J. Szejtli, T. Osa, Comprehensive Supramolecular Chemistry, Vol 3 Cyclodextrin, Pergamon, Oxford, UK, (1997).

determina el tamaño de los compuestos con los que cada ciclodextrina puede formar complejos de inclusión. Así, la  $\alpha$ -ciclodextrina es la que forma complejos de inclusión con compuestos de menor tamaño y la  $\gamma$ -ciclodextrina con compuestos de mayor tamaño [82]. Por otra parte, las ciclodextrinas se pueden derivatizar fácilmente modificando sus grupos OH. Los sustituyentes usados en la síntesis de ciclodextrinas derivadas son sustituyentes alquilo, hidroxialquilo, carboxialquilo, amino, tiol, etc. Los sustituyente se introducen con el fin de aumentar la afinidad de la ciclodextrina por determinados sustratos, aumentar su solubilidad en agua o permitir su enlace a un soporte sólido para su uso en fases estacionarias cromatográficas.

- Antibióticos macrocíclicos: Su uso como selectores quirales fue propuesto por primera vez en 1994 por Armstrong [83]. Su estructura molecular es muy compleja. Están constituidos por 3 o 4 anillos fusionados que adoptan forma de cesta y grupos carbohidrato situados en la parte exterior de la cesta que pueden rotar adaptando diferentes configuraciones. El antibiótico macrocíclico más usado es la vancomicina. Son selectores eficaces tanto en su forma ionizada como neutra y exhiben una elevada enantioselectividad para una gran variedad de analitos, con los que forman complejos de inclusión mediante interacciones iónicas,  $\pi$ - $\pi$ , de dispersión, dipolo-dipolo y formación de puentes de hidrógeno [84].
- Éteres corona: Son poliéteres cíclicos generalmente constituidos por unidades de óxido de etileno (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-) (Figura 7 A). Los átomos de carbonos del anillo se dirigen hacia el exterior, mientras que los oxígenos se dirigen hacia el interior. Por lo tanto, la zona exterior de los éteres corona es apolar y la zona interior polar. Los éteres corona forman complejos de inclusión con cationes metálicos y con compuestos orgánicos ionizables con carga positiva, como es el caso de las aminas

---

[82] L.R. Snyder, J.J. Kirland, J.L. Glajch, "Practical HPLC Method Development", 2nd Edition, Chapter 12 Chiral Separation Ed. John Wiley & Sons New York (1997).

[83] Chirobiotic Handbook Guide to Using Macrocyclic Glycopeptide Bonded Phases for Chiral LC Separation, 2nd, Advanced Separation Tech Inc, Whippany, N.J. USA (1999).

[84] J.T. Lee, T.E. Beesley (2001) 13th International Symposium of Chirality 2001 Orlando, USA Abstract No: 62, 225.

[85]. Los átomos de oxígeno pueden ser remplazados por átomos de nitrógeno o azufre para obtener un aza o tio éter corona (Figura 7 B).

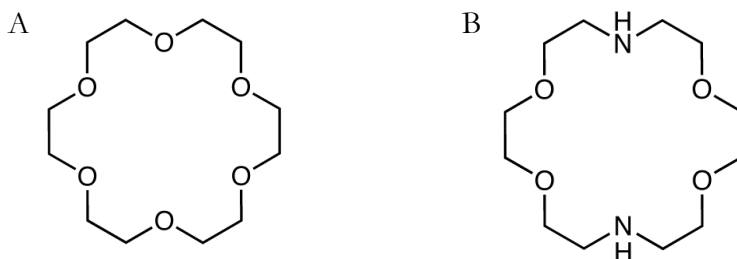


Figura 7. Estructura molecular del A) éter corona 18-corona-6 y el B) diaza éter corona diaza-18-corona-6

- **Polisacáridos:** Los derivados de la celulosa y la amilosa del tipo éster y carbamato han sido los polisacáridos más ampliamente usados como selectores quirales. Están constituidos por una cadena lineal de unidades  $\beta$ -D-glucopiranososa (derivados de la celulosa) o  $\alpha$ -D-glucopiranososa (derivados de la amilosa) unidas mediante enlaces 1,4-glicosídicos que se disponen en el espacio en una estructura helicoidal [86]. Su capacidad de reconocimiento quiral se atribuye a tres tipos de quiralidad: 1) quiralidad molecular asociada a la presencia de centros estereogénicos en las unidades de glucopiranososa, 2) quiralidad conformacional debida a la estructura helicoidal de la cadena glucosídica y 3) quiralidad supramolecular debida al alineamiento de cadenas poliméricas adyacentes que forman cavidades quirales.
- **Proteínas:** Se utilizan como selectores quirales la albúmina de suero humano y bovino, la  $\alpha$ -glicoproteína, la pepsina etc. [82]. Son muy sensibles a cambios de pH, concentración de tampón (generalmente fosfato) y porcentaje de disolvente orgánico, ya que este último puede causar la desnaturalización de las proteínas. Las principales interacciones que se establecen entre las proteínas y los enantiómeros de compuestos quirales son interacciones electrostáticas y de dispersión, aunque también pueden contribuir a la selectividad quiral interacciones de transferencia de carga y formación de puentes de hidrógeno.

[85] R.J. Steffek, Y. Zelechok, K.H. Gahm, J. Chromatogr. A 947 (2002) 301.

[86] C. Yamamoto, E. Yashima, Y. Okamoto, J. Am. Chem. Soc., 124 (2002) 12583.

- Selectores tipo Pirkle (aceptor/dador): Son selectores de peso molecular relativamente bajo que se caracterizan por tener cerca del centro quiral grupos con más de una de las siguientes características: a) grupos aromáticos capaces de actuar como aceptores o dadores de electrones en interacciones  $\pi$ - $\pi$ , b) grupos dadores o aceptores de hidrógeno que pueden formar enlaces por puentes de hidrógeno, c) grupos polares que pueden dar lugar a interacciones dipolo-dipolo y d) grupos no polares voluminosos que dan lugar a interacciones de dispersión. La separación en este tipo de selectores quirales se produce mediante dos interacciones atractivas y una tercera que puede ser atractiva o repulsiva (impedimento estérico). Se han utilizado para separar alcoholes, dioles poliaromáticos, diacilgliceroles y compuestos heterocíclicos aromáticos de interés farmacéutico [87].
- Ligandos quirales: Como selector quiral se utiliza un ligando que forma complejos mixtos con un metal [Cu (II), Zn (II) o Ni (II)] y como segundo ligando, cada uno de los enantiómeros a separar, presentando los complejos formados con ambos enantiómeros diferente constante de formación. La separación se basa en una reacción de intercambio de ligando entre los analitos que forman parte del complejo mixto y un tercer ligando (ej. agua o amoníaco), reacción que estará más favorecida para el enantiómero que forme el complejo mixto con menor constante de estabilidad. Los ligandos quirales más utilizados han sido aminoácidos cíclicos como la prolina y la hidroxiprolina y entre los analitos separados usando estos selectores quirales se incluyen  $\alpha$ - aminoácidos, aminoalcoholes y  $\alpha$ - hidroxíácidos [88].

Los selectores quirales más usados tanto en técnicas cromatográficas como electroforéticas han sido las ciclodextrinas debido a su versatilidad y estabilidad. La gran variedad de ciclodextrinas derivadas disponibles permite seleccionar la más

---

[87] A. Braithwaite, F.J. Smith, *Chromatographic Methods*, 5th Edition, Kluwer Academic Publishers (1996), The Netherlands, 1.

[88] M.Lämmerhofer, N.M. Maier, W. Lindner en L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.W. Dolan (eds) *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3th Edition (2010) 666.

adecuada en función de la solubilidad y capacidad de formación de enlaces analito-selector quirales requeridas en cada caso.

En CG los selectores quirales más utilizados son ciclodextrinas derivadas solubles en los disolventes orgánicos usados en la preparación de las fases estacionarias (ej. ciclodextrinas peralquiladas). La selección del selector quirale más adecuada para cada analito se puede realizar usando la base de datos Chirbase/GC [89] que contiene aproximadamente 2400 aplicaciones de separaciones enantioméricas, la mayor parte de ellas con fases estacionarias de ciclodextrinas (fases estacionarias Chirasil – Dex).

En cromatografía líquida quirale, además de ciclodextrinas, se han utilizado polisacáridos, éteres corona, proteínas, antibióticos macrocíclicos, ligandos quirales y selectores tipo Pirkle (dador-aceptor), generalmente formando parte de fases estacionarias quirales obtenidas inmovilizando el selector quirale en un sólido soporte (con frecuencia partículas de sílice porosa, mediante enlace covalente o con menor frecuencia mediante adsorción sobre un material adecuado (ej. material polimérico). En la tabla 3 se muestran algunas de las fases estacionarias quirales comercialmente disponibles más usadas en cromatografía líquida.

Por último, las ciclodextrinas que proporcionan mejores resultados en CE son las ciclodextrinas derivadas iónicas con carga opuesta a la de los analitos a separar. Así por ejemplo, se han utilizado  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -ciclodextrina sulfatadas para separar los enantiómeros de 5 fármacos básicos y 2 anfóteros [90].

---

[89] <http://Chirbase.u-3mrs.fr>

[90] M. Zandkarimia, A. Shafaatia, S.M. Foroutana, *Irn J. of Pharm. Res.* 7 (2008) 275.



**Tabla 3:**

Fases estacionarias quirales para cromatografía líquida comercialmente disponibles

Tipo	Nombre	Selector Quiral	Fase móvil	Distribuidor
Pirkle (dador-aceptor)	Bakerbond	S-DNB-leucina	Hexano/ isopropanol	Baker
	Chiral			
	Spherisorb Chiral 2	R-naftiletilurea	Hexano/ isopropanol	PhaseSep
Ligando quiral	Chiralpak WM	Histidina-Cu(II)	Tampón acuoso	Daicel
Polisacáridos	Chiralcel CA-1	Triacetato de celulosa	Tampón acuoso	Daicel
	Chiralcel OD	Carbamato de trifenilcelulosa	Tampón acuoso	Daicel
Éter corona	ChiroSil	Ácido (18-corona- 6) tetracarboxílico	Disolventes comunes	Regis Technologies
Ciclodextrina	Nucleodex- $\beta$ - PM	$\beta$ -Ciclodextrinas permetilada	Tampón acuoso- disolvente orgánico	Macherey- Nagel
Proteína	Chiral-AGP	$\alpha$ -glicoproteína	Tampón acuoso	Baker
Antibióticos macrocíclicos	Chirobiotic V	Vancomicina	Tampón acuoso- disolvente orgánico	Astec

DNB: nitrobenzoilo

La cromatografía de gases quiral ha sido la técnica de separación más utilizada en análisis quiral medioambiental [91], a pesar de que muchos contaminantes quirales, como es el caso de numerosos plaguicidas y fármacos, son polares y deben someterse a procesos de derivatización para transformarlos en compuestos volátiles y/o térmicamente estables. Esto es debido a su fácil acoplamiento a espectrometría de masas, técnica de detección que proporciona elevada sensibilidad y selectividad, y a la incompatibilidad de la mayoría de las fases móviles usadas en CL quiral con las interfases a presión atmosférica (APCI y ESI) usadas en CL-EM. La CG no es aplicable en aquellos casos en los que se produce degradación o interconversión entre enantiómeros a las temperaturas usadas en esta técnica de separación, como por

[91] A.R. Ribeiro, A.S. Maia, Q.B. Cass, M.E. Tiritan, J. Chromatogr. B 968 (2014) 8.

ejemplo sucede para el hexabromociclododecano (HBCD) [92,93]. En estos casos la separación generalmente se realiza usando cromatografía líquida quiral. Finalmente, la principal ventaja de la electroforesis capilar quiral frente a las técnicas cromatográficas estriba en la pequeña cantidad de selector quiral usada lo que reduce considerablemente el coste del análisis, pero presenta el inconveniente de proporcionar baja sensibilidad para la determinación de los enantiómeros.

Finalmente la cromatografía de fluidos supercríticos (CFS) también se ha utilizado para realizar separaciones quirales usando dióxido de carbono supercrítico con modificadores orgánicos como fase móvil y columnas quirales iguales a las utilizadas en LC. Esta técnica permite obtener mejor resolución en menos tiempo, aunque presenta el inconveniente de un elevado coste. No obstante, hasta el momento esta técnica no se ha utilizado para la determinación de contaminantes quirales en muestras medioambientales.

### 5.3. DETECCIÓN

La detección de los enantiómeros separados mediante técnicas cromatográficas generalmente se realizan usando espectrometría de masas (EM), técnica que proporciona la selectividad y sensibilidad necesarias para la determinación de contaminantes a baja concentración en muestras medioambientales [57]. Aunque también se han propuesto métodos que hacen uso de detección ultravioleta (UV) [94-97] o fluorescente (FL) [70,98], los límites de

---

[92] A. Ribeiro, P. Castro, M. Tiritan, Environmental fate of chiral pharmaceuticals: determination, degradation and toxicity, E. Lichtfouse, J. Schwarzbauer, D. Robert (Eds.), Environmental Chemistry for a Sustainable World, Springer, Netherlands, (2012) pp. 3.

[93] E. Eljarrat, P. Gerra, D. Barceló, Trends Anal. Chem. 27 (2008) 847.

[94] S. Morante-Zarcero, I. Sierra, Chirality 24 (2012) 860.

[95] C. García-Ruiz, G. Álvarez-Llamas, A. Puerta, E. Blanco, A. Sanz-Medel, M.L. Marina, Anal. Chim. Acta 6 (2005) 77.

[96] J.L. Jarman, W.J. Jones, L.A. Howell, A.W. Garrison, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 6175.

[97] A. Monkiedje, M. Spiteller, K. Bester Environ. Sci. Technol. 37 (2003) 707.

[98] A.R. Ribeiro, C.M. Afonso, P.M.L. Castro, M.E. Tiritan, Ecotoxicol. Environ. Saf. 87 (2013) 108.

detección obtenidos no son adecuados para su uso en monitorización medioambiental y estos métodos generalmente solo se utilizan en estudios de degradación enantioselectiva [96,97,70].

Dado el carácter polar de la mayoría de los contaminantes quirales, la interfase más utilizada para el acoplamiento de espectrometría de masas a cromatografía líquida quiral es la fuente de ionización por electroespray (Electrospray ionization, ESI). El principal problema que se presenta cuando se utiliza esta interfase es el aumento, o con más frecuencia, la disminución de la ionización de los analitos debida a la coelución de compuestos de la matriz de la muestra (supresión iónica). Generalmente es necesario realizar varias etapas de limpieza de los extractos y/o dilución de los mismos para disminuir el efecto matriz, aunque generalmente no es posible eliminarlo completamente, siendo necesario el uso del método de calibración de adición estándar o de patrones internos marcados isotópicamente para corregirlo.

En cuanto a los analizadores de masas, el triple cuadrupolo (QqQ) es el más usado debido a su elevada sensibilidad y selectividad [99-101], aunque también se han utilizado analizadores de trampa iónica (IT) [56,61] y de tiempo de vuelo (TOF). Estos últimos son especialmente adecuados para la identificación de contaminantes, metabolitos y productos de degradación de contaminantes en muestras medioambientales [62,102].

---

[99] A.A.M. Stolker, W. Niesing, E.A. Hogendoorn, J.F.M. Versteegh, R. Fuchs, U.A.Th. Brinkman, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 955

[100] A.A.M. Stolker, W. Niesing, R. Fuchs, R.J. Vreeken, W.M.A. Niessen, U.A.Th. Brinkman, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 1754.

[101] S. Marchese, A. Gentili, D. Perret, G. D'Ascenzo, F. Pastori, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 879.

[102] J.P. Bagnall, S.E. Evans, M.T. Wort, A.T. Lubben, B. Kasprzyk-Hordern, *J. Chromatogr. A*, 1249 (2012) 115.

## 6. DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES EN PROCESOS ANALÍTICOS DE EXTRACCIÓN

### 6.1. ASPECTOS GENERALES

Los disolventes supramoleculares (supramolecular solvents, SUPRAS) son líquidos nanoestructurados constituidos por agregados de moléculas anfifílicas, que se generan espontáneamente en disoluciones acuosas o hidroorgánicas mediante un proceso de autoensamblaje denominado coacervación. Este proceso se produce en determinadas condiciones de temperatura, pH, concentración de sales o proporción de un disolvente en el que el anfifilo es poco soluble [103].

Las moléculas anfifílicas que forman los SUPRAS descritos hasta la fecha son tensioactivos naturales o sintéticos, con grupos polares no iónicos, anfóteros, catiónicos o aniónicos. En las condiciones experimentales adecuadas las moléculas de tensioactivo en disolución se unen entre sí formando pequeñas gotas que floculan o sedimentan dando lugar a dos fases líquidas, una, el SUPRAS, en la que existe una elevada concentración de tensioactivo ( $0,1-1 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$ ), y la otra, con muy baja concentración en este componente, denominada fase en equilibrio. Las fotografías de la Figura 8 muestran las gotas de un coacervado (A) y las dos fases líquidas formadas tras su separación de la fase en equilibrio (B).

Existen dos propiedades que hacen que los SUPRAS constituyan una buena alternativa a los disolventes orgánicos en procesos analíticos de extracción: la presencia de regiones de diferente polaridad en los agregados supramoleculares en las que los analitos pueden solubilizarse mediante diferentes tipos de interacciones y el elevado número de centros de solubilización que poseen. Además, su síntesis es sencilla, con bajo coste y al alcance de cualquier laboratorio, y no son volátiles ni inflamables, lo que permite desarrollar procesos de extracción seguros y respetuosos con el medio ambiente.

---

[103] A. Ballesteros-Gomez, M.D. Sicilia, S. Rubio, *Anal. Chim. Acta* 677 (2010) 108.

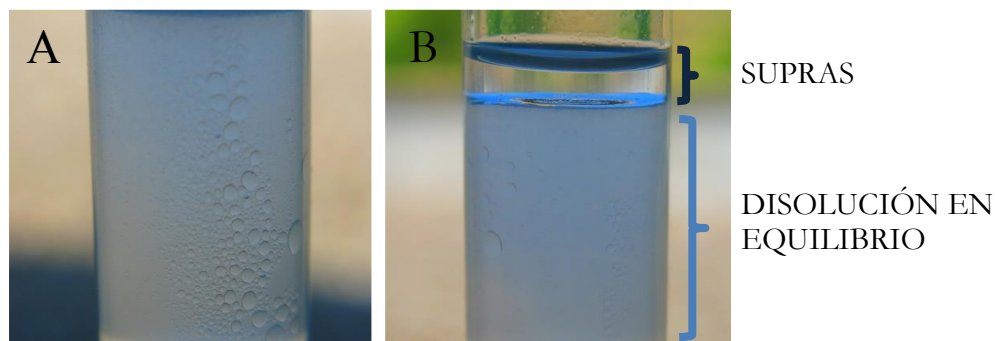


Figura 8. Fotografías de (A) las gotas de un coacervado y (B) las dos fases líquidas separadas tras un proceso de coacervación.

## 6.2. FORMACIÓN DEL DISOLVENTE SUPRAMOLECULAR. DIAGRAMAS DE FASES

En los procesos de autoensamblaje que dan lugar a la formación del disolvente supramolecular las moléculas de tensioactivo interactúan entre sí organizándose en estructuras ordenadas, siendo dichas interacciones generalmente débiles (ej. interacciones de dispersión, electrostáticas, dipolo-dipolo, ect.). Las fuerzas de los enlaces establecidos entre las moléculas de tensioactivo en los agregados son similares a las fuerzas que originan la desagregación de dichas moléculas y por lo tanto, los procesos de autoensamblaje son reversibles y sensibles a cambios en las condiciones experimentales, de forma que la modificación de dichas condiciones puede originar la reordenación de las moléculas dentro de los agregados.

Las interacciones atractivas entre las moléculas de tensioactivo (interacciones de dispersión entre sus cadenas hidrocarbonadas) favorecen la agregación, mientras que las repulsivas la desfavorecen. Esto hace que la formación de agregados de tensioactivos no iónicos esté más favorecida que la de tensioactivos iónicos, debido a las fuertes interacciones electrostáticas repulsivas que se producen entre los grupos cargados de las moléculas que forman el agregado.

Una forma efectiva de promover la formación de SUPRAS en disoluciones de tensioactivos no iónicos y anfóteros es favorecer la desolvatación de los grupos polares del tensioactivo. Los grupos cabeza desolvatados presentan menor área, lo que permite que aumenten las interacciones atractivas entre las cadenas hidrocarbonadas del tensioactivo y a su vez origina un aumento del tamaño de los agregados y favorece su separación en una segunda fase líquida. La desolvatación de los grupos polares se puede favorecer modificando la temperatura de la disolución o adicionando un disolvente con baja capacidad solvatante, así, los tensioactivos no iónicos alquilpolietoxilados y alquilfenolpolietoxilados forman SUPRAS en disolución acuosa aumentando la temperatura por encima de su punto de nube (“cloud point, CP” en terminología anglosajona). El valor de CP depende de la estructura química y concentración del tensioactivo [104], de la fuerza iónica de la disolución [105,106] y de la presencia de compuestos orgánicos.

El aumento de la temperatura también da lugar a la formación de SUPRAS en disoluciones que contienen mezclas de tensioactivos no iónicos y mezclas de tensioactivos no iónicos e iónicos. El valor de CP al que se produce la coacervación en mezclas acuosas de dos tensioactivos no iónicos es el valor medio de las temperaturas a las que coacervan los dos tensioactivos individualmente [107]. Los valores de CP para mezclas de tensioactivos iónicos y no iónicos son mayores que los necesarios para coacervar el tensioactivo no iónico, debido a que las fuerzas repulsivas entre los grupos cargados de las moléculas de tensioactivo iónico desfavorecen la agregación [108].

La formación de disolventes supramoleculares de tensioactivos anfóteros se produce cuando la temperatura de la disolución disminuye por debajo de un valor

---

[104] P. Taechangam, J.F. Scamehorn, S. Osuwan, T. Rirkomboon, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 347 (2009) 200.

[105] H. Akbaş, C. Batigöç, *Fluid Phase Equilib.* 279 (2009) 115.

[106] M.J. Rosen, *Surfactants and Interfacial Phenomena*, 3rd edition. John Wiley & Sons Ltd. (2004) Hoboken, p. 197.

[107] T. Inoue, H.J. Ohmura, *J. Colloid Interf. Sci.* 258 (2003) 374.

[108] T. Gu, P.A. Galera-Gómez, *Colloids Surf. A: Physicochem Eng. Aspects* 104 (1995) 307.

crítico que depende de la estructura y concentración del tensioactivo, el pH y la fuerza iónica [109].

Como ejemplo de SUPRAS formados mediante la adicción de un disolvente con baja capacidad solvatante podemos nombrar a los disolventes de ácidos alquilcarboxílicos y de alcoholes [110,111]. Estos SUPRAS se forman mediante la adicción de agua a disoluciones de tensioactivo en disolventes orgánicos. Para que se produzca la coacervación, el tensioactivo debe encontrarse en su forma neutra, por lo tanto, en el caso de ácidos alquilcarboxílicos ( $pK_a = 4.8 \pm 0.2$ ), la disolución acuosa adicionada a la disolución de tensioactivo debe mantenerse a un pH igual o inferior a 4 [110], mientras que los disolventes de alcoholes ( $pK_a \sim 15$ ) se generan con independencia de cuál sea el pH de la disolución acuosa [111]. Por otra parte, los disolventes orgánicos usados deben ser miscibles con agua (p. ej. dioxano, tetrahydrofurano, acetona, metanol, etanol, propanol, acetonitrilo, trietilenglicol y dimetilformamida) y el porcentaje mínimo de disolvente orgánico necesario para que se produzca la coacervación varía en función de su constante dieléctrica [110]; si ésta es inferior a 25 (p. ej. tetrahydrofurano, THF), el porcentaje de disolvente orgánico a partir del cual se produce la coacervación es inferior al 5%, dicho porcentaje aumentando exponencialmente a medida que la constante dieléctrica del disolvente orgánico aumenta por encima de este valor [110]. Los porcentajes de disolvente orgánico a los que se genera el disolvente supramolecular también varían en función de la estructura química del tensioactivo y su concentración [110,111].

La formación de SUPRAS de tensioactivos iónicos necesariamente implica la reducción de las interacciones electrostáticas repulsivas entre sus grupos cargados. Las estrategias que se han utilizado para reducir dichas interacciones han sido la adición de sales, contraiones anfífilicos o ácidos. Las sales NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> inducen la formación de agregados de cetrimida [112] y de aliquat-336 [113], respectivamente.

---

[109] T. Saitoh, W.L. Hinze, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2520.

[110] F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7473.

[111] A. Ballesteros, S. Rubio, *Anal. Chem.* 84 (2012) 342.

[112] X. Jin, M. Zhu, E.D. Conte, *Anal. Chem.* 71 (1999) 514.

[113] B.K. W. Man, M.H.W. Lam, P.K.S. Lam, R.S.S. Wu, G. Shaw, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 3985.

En el primer caso, es además imprescindible la adición de un tensioactivo no iónico con un grupo cabeza de reducido tamaño, el 1-octanol, para que se produzca la coacervación. Por otra parte, los contraiones de tetralkilamonio se utilizan para generar SUPRAS en disoluciones acuosas que contienen mezclas equimolares de ácidos alquilcarboxílicos (HAC) y alquilcarboxilatos ( $AC^-$ ) [114]. El contraión, generalmente tetrabutilamonio ( $Bu_4N^+$ ), neutraliza las cargas negativas de las moléculas de  $AC^-$  en la superficie de las vesículas constituidas por HAC y  $AC^-$ , favoreciendo la formación de agregados vesiculares de gran tamaño. Las interacciones que intervienen en la formación de estos agregados son: formación de puentes de hidrógeno entre los grupos carboxílico y carboxilato de las moléculas de tensioactivo en su forma neutra y cargada, e interacciones de dispersión entre sus cadenas hidrocarbonadas.

En lo que se refiere a la formación de disolventes supramoleculares en presencia de ácidos, son los tensioactivos aniónicos de alquil sulfato, alquil sulfonato, alquilbenceno sulfonato y alquil sulfosucinato con longitudes de cadena comprendidas entre 4 y 14 átomos de C [115] los que forman este tipo de SUPRAS. La concentración de ácido requerida para la coacervación varía con la estructura molecular y concentración del tensioactivo [116-118]. En cualquier caso, el pH de la disolución debe encontrarse por debajo del pKa del tensioactivo y por lo tanto, las concentraciones de ácido usadas son muy elevadas (3- 4 M).

En la Figura 9 se muestran los diagramas de fases para SUPRAS de tensioactivos no iónicos y anfóteros inducidos por temperatura, no iónicos inducidos por la adición de disolvente y tensioactivos iónicos inducidos por la adición de sales, contraiones anfífilicos y ácidos.

---

[114] F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 78 (2006) 7229.

[115] D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 460 (2002) 13.

[116] A. Santalad, S. Srijaranai, R. Burakham, T. Sakai, R.L. Deming, *Microchem. J.* 90 (2008) 50

[117] I.Y. Goryacheva, S.N. Shtykov, A.S. Loginov, I.V. Panteleeva, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1413

[118] G. Jia, L. Li, J. Qiu, X. wang, W. Zhu, Y. Sun, Z. Zhou, *Spectrochim. Acta Part A* 67 (2007) 460.



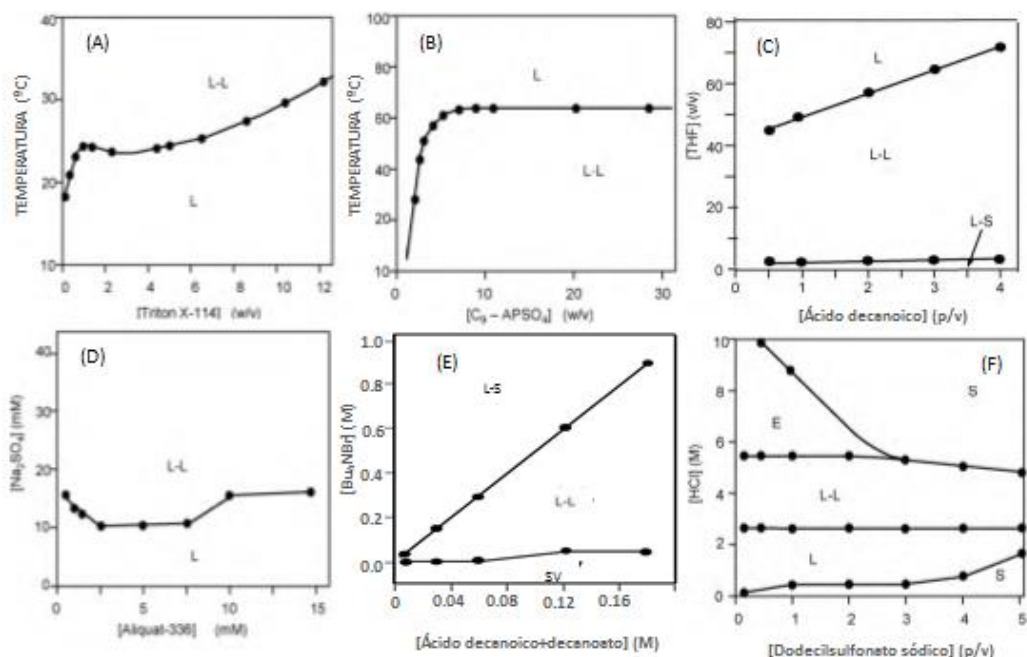


Figura 9. Diagramas de fases para disolventes supramoleculares inducidos por (A,B) temperatura y adición de (C) disolvente, (D) sal, (E) contraíón anfifílico y (F) ácido. Regiones: L-L: líquido-líquido (correspondiente a la formación del disolvente supramolecular), L: líquido; L-S: líquido-sólido, E: emulsión y SV: suspensión vesicular.

### 6.3. SOLUBILIZACIÓN EN DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES

La capacidad de un disolvente supramolecular para solubilizar un determinado analito depende fundamentalmente de la fuerza de los enlaces intermoleculares analito-tensioactivo que se establecen en los agregados que constituyen el SUPRAS y del número de centros de solubilización existentes en el mismo. Los enlaces más fuertes son los que se producen mediante interacciones electrostáticas, seguidos de los enlaces por puentes de hidrógeno, del mismo orden que los enlaces  $\pi$ -catión, seguidos de los establecidos mediante interacciones dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido e interacciones de dispersión. Las interacciones

establecidas con compuestos apolares son fundamentalmente de dispersión y dipolo-dipolo inducido, y con compuestos polares, además de las interacciones de dispersión se pueden producir interacciones dipolo-dipolo y formación de puentes de hidrógeno. Cuando se utilizan SUPRAS constituidos por tensioactivos iónicos, los analitos con grupos cargados se pueden solubilizar mediante interacciones electrostáticas y si la carga del tensioactivo es positiva y en el analito existen anillos aromáticos, mediante interacciones  $\pi$ -catión. Por último, si tanto el analito como el tensioactivo poseen anillos aromáticos se pueden producir interacciones  $\pi$ - $\pi$ .

Como ya hemos comentado, la capacidad de solubilización del SUPRAS también depende del número de centros de unión disponibles, o lo que es lo mismo, de la concentración de tensioactivo en el disolvente, que a su vez viene determinada por la estructura molecular del tensioactivo y las condiciones experimentales en las que se produce la coacervación. Se obtienen concentraciones de tensioactivo de 0,09 y 0,2 mg  $\mu\text{L}^{-1}$  para SUPRAS constituidos por agregados de Triton X-114 [119] y dodecilsulfato sódico (SDS) [120] respectivamente, concentraciones en el intervalo 0,25-0,75 mg  $\mu\text{L}^{-1}$  para los constituidos por agregados inversos de ácidos alquilcarboxílicos formados en mezclas ternarias de tensioactivo-tetrahidrofurano y agua [110] y de 1 mg  $\mu\text{L}^{-1}$  para SUPRAS de agregados vesiculares de ácido alquilcarboxílico-alquilcarboxilato [114].

---

[119] B. Yao, L. Yang, J. Colloid Interface Sci. 319 (2008) 316.

[120] I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Anal. Chem. 71 (1999) 4519.

**Tabla 4**

Factores de concentración teóricos (FCT) obtenidos para disolventes supramoleculares de tensioactivos pertenecientes a diferentes grupos estructurales en distintas condiciones experimentales

Tensioactivo	Condiciones experimentales	Concentración de tensioactivo (%w/v)	FCT	Ref
<b>Alquil etoxilados</b>				
C <sub>12</sub> E <sub>5</sub>	0,8 M NaCl, 80°C	2,9 (70 mM)	31	104
C <sub>12</sub> E <sub>8</sub>		3,9	12	
C <sub>10</sub> E <sub>6</sub>		3,0	24	
C <sub>16</sub> E <sub>6</sub>		3,6	5	
<b>Alquilfenol etoxilados</b>				
Triton X-114	35 °C	0,05	60	119
		0,2	20	
	65 °C	0,5	500	121
<b>Alquil amonio sulfatos</b>				
C <sub>9</sub> -APSO <sub>4</sub>	35 °C	2,0	35	122
<b>Alcoholes</b>				
Decanol	95:5 (%v/v) THF:H <sub>2</sub> O	0,25	274	111
	70:30 (%v/v) THF:H <sub>2</sub> O		83	
<b>Ácidos alquilcarboxílicos</b>				
Ácido decanoico	95:5 (%v/v) THF:H <sub>2</sub> O	0,1	700	110
	[Bu <sub>4</sub> NOH]/[tensioactivo]=0.5	0,1	400	114
<b>Sales de alquiltrimetilamonio</b>				
Cetrimida	6,8 M NaCl, 0,05 (%v/v) 1-octanol	0,5	5	112
	6,8 M NaCl, 0,08 (%v/v) 1-octanol	0,5	35	
<b>Alquilsulfatos</b>				
Dodecil sulfato sódico	4,0 M HCl	0,25	30	120
	5,0 M HCl	0,25	14	
<b>Alquilsulfonatos</b>				
Dodecilsulfonato sódico	3,0 M HCl	0,25	50	120
	4,0 M HCl	0,25	117	

Como regla general, la concentración de tensioactivo en el SUPRAS disminuye al aumentar la longitud de su cadena hidrocarbonada. Por ejemplo, en SUPRAS constituidos por vesículas de ácido alquilcarboxílico-alquilcarboxilato la concentración aumenta en el orden: ácido decanoico > dodecanoico > tetradecanoico

[114]. Para tensioactivos alquil etoxilados, un aumento en el número de grupos oxietileno también causa una disminución de la concentración de tensioactivo en el SUPRAS [104].

En lo que se refiere a las condiciones experimentales en las que se produce la coacervación, éstas pueden influir tanto en la composición del SUPRAS como en el volumen de disolvente formado. El volumen de SUPRAS producido aumenta linealmente con la cantidad de tensioactivo en disolución y por lo tanto, esta variable no influye en la composición del SUPRAS. Para disolventes de tensioactivos no iónicos polioxietilados, un aumento de la diferencia entre la temperatura usada en la extracción y la temperatura crítica para la formación del SUPRAS origina una disminución del volumen de SUPRAS formado y un aumento de la concentración de tensioactivo en el disolvente. Este mismo efecto se observa cuando se aumenta la concentración de ácido, en el caso de SUPRAS de tensioactivos aniónicos. Finalmente, en los disolventes de ácidos carboxílicos y alcoholes inducidos por agua, a medida que aumenta el porcentaje de disolvente orgánico usado en la síntesis aumenta las cantidades de disolvente orgánico y agua que se incorporan al SUPRAS y por lo tanto, aumenta el volumen de disolvente formado y disminuye la concentración de tensioactivo en el mismo.

La tabla 4 muestra los factores de concentración teóricos (FCT) (Volumen muestra/volumen SUPRAS) obtenidos para disolventes supramoleculares de tensioactivos con distintos grupos estructurales sintetizados en diferentes condiciones experimentales. Los datos se han seleccionado para ilustrar la influencia de los factores discutidos anteriormente.

#### **6.4. FORMATOS DE EXTRACCIÓN**

Los disolventes supramoleculares se han utilizado para la extracción de analitos de muy diferente naturaleza tanto en muestras líquidas como sólidas. En la Figura 10 se muestra un esquema del procedimiento seguido para la extracción de muestras líquidas. El disolvente supramolecular se forma en presencia de la propia

muestra mediante la adición del tensioactivo y el establecimiento de las condiciones experimentales requeridas para la coacervación. Los volúmenes de muestra utilizados generalmente varían entre 10 y 100 mL y la concentración de tensioactivo en la muestra entre el 0,1 y 2%.

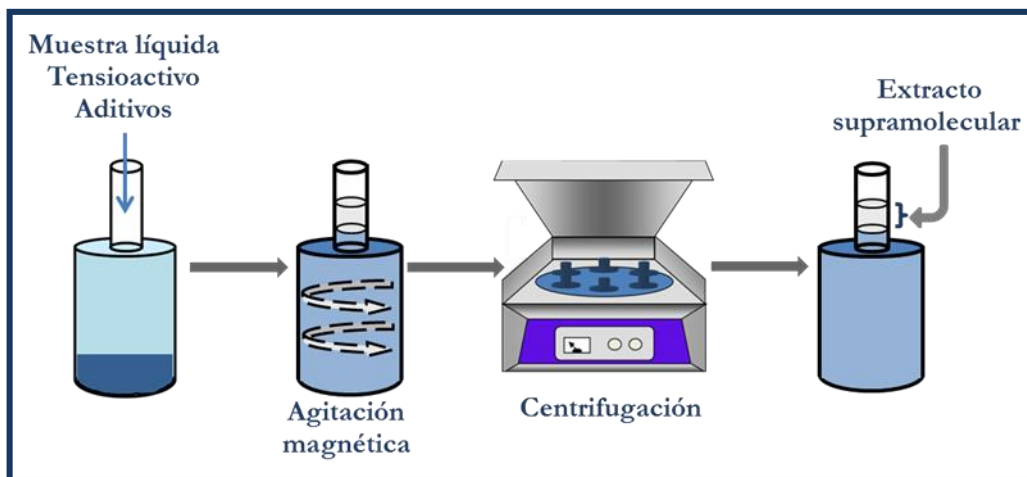


Figura 10. Extracción de muestras líquidas con el uso de SUPRAS.

La extracción de los analitos en el disolvente supramolecular se favorece mediante agitación y la separación del extracto supramolecular del seno de la disolución se acelera mediante centrifugación. El SUPRAS formado puede ser más o menos denso que la disolución en equilibrio, de forma que el extracto supramolecular se encuentra en la parte inferior o superior del tubo, respectivamente. Los extractos más densos se recuperan enfriando el tubo después de la centrifugación para aumentar la viscosidad del disolvente que se adhiere a las paredes del tubo, facilitando de esta forma la retirada de la disolución de equilibrio por decantación [122-124]. Para eliminar completamente la disolución de equilibrio del extracto se utiliza una corriente de nitrógeno. La mayoría de los tensioactivos no iónicos y anfóteros dan lugar a SUPRAS densos y viscosos que deben ser diluidos con disolventes orgánicos antes de introducirlos en el sistema cromatográfico. Los SUPRASs de tensioactivos iónicos, alcoholes y ácidos alquilcarboxílicos son menos

[123] A. Niazi, T. Momeni-Isfahani, Z. Ahmari, J. Hazard. Mater.165 (2009) 1200.

[124] N. Pourreza, S. Rastegarzadeh, A. Larki, Talanta 77 (2008) 733.

densos que la disolución en equilibrio y pocos viscosos [110-112,114,120], por lo que pueden retirarse fácilmente usando una microjeringa e introducirse directamente en el sistema cromatográfico.

Cuando se extraen muestras líquidas es fundamental conocer el volumen de disolvente supramolecular generado para determinar la recuperación obtenida. El volumen de disolvente generado se puede medir recogiendo el SUPRAS con una jeringa graduada, pero este procedimiento no es adecuado para los SUPRAS viscosos. La medida también se puede realizar de forma indirecta a partir de la expresión que proporciona el volumen contenido en un recipiente cilíndrico:  $v = \pi r^2 h$ , siendo  $r$  el radio del cilindro y  $h$  su altura. En el caso de SUPRAS menos densos que su disolución en equilibrio, se pueden realizar medidas más exactas utilizando tubos como los que se muestran en la Figura 10, en los que el diámetro del tubo se reduce en su parte superior, donde se ubicará el SUPRAS, lo que permite medir de forma más precisa la altura del cilindro ocupado.

En la extracción de muestras sólidas generalmente se utilizan cantidades de muestra entre 0,1 y 1 gramo. La extracción se puede realizar añadiendo la muestra sólida a la disolución en la se formará el disolvente supramolecular, con lo que se obtienen tres fases, la disolución en equilibrio, el SUPRAS y los componentes insolubles de la matriz de la muestra. Este formato es adecuado para la extracción de compuestos apolares pero no para los polares, ya que estos se solubilizan en la disolución en el equilibrio disminuyendo el rendimiento de la extracción. Recientemente se ha propuesto un nuevo formato de extracción basado en la formación previa del SUPRAS. En la Figura 11 se muestra el procedimiento de extracción que hace uso de SUPRAS previamente sintetizados. Los analitos presentes en la muestra sólida se extraen en un pequeño volumen de disolvente supramolecular (del orden de los microlitros) usando un agitador vortex y el extracto se separa de la muestra sólida en una ultracentrífuga. Utilizando este procedimiento se han extraído residuos de fármacos de uso veterinario en peces de piscifactoría

[125] y en carnes [126] con recuperaciones en los intervalos 99-102% y 98-109%, respectivamente.

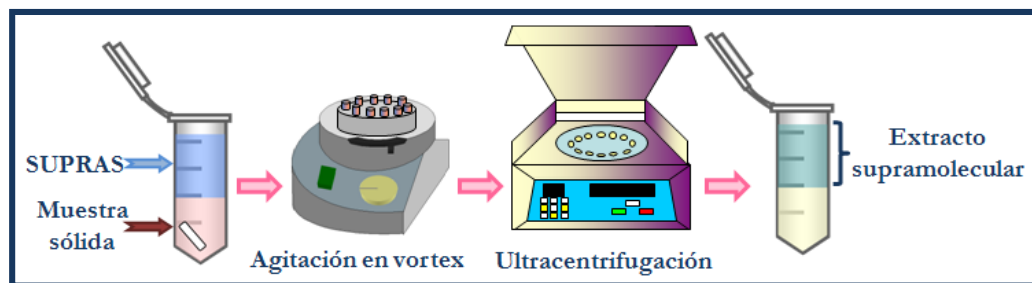


Figura 11. Extracción de muestras sólidas con SUPRAS previamente sintetizados

## 6.5. COMPATIBILIDAD DE LOS EXTRACTOS SUPRAMOLECULARES CON TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

La compatibilidad de los extractos supramoleculares con las técnicas de separación y detección usadas para la determinación de los analitos es clave para el uso de estos disolventes en extracciones analíticas. Los extractos obtenidos son compatibles con las fases móviles utilizadas en cromatografía líquida, pero no pueden ser inyectados directamente en los equipos de cromatografía de gases debido a su baja volatilidad. Por lo tanto, la cromatografía de líquidos ha sido la técnica más usada para analizar los extractos supramoleculares, generalmente acoplada a detectores ultravioleta (UV)-Visible, fluorimétricos [103,127,128] o de espectrometría de masas [103,128,129]. Los extractos supramoleculares pueden inyectarse directamente en el sistema cromatográfico siempre que la fase móvil contenga un elevado porcentaje de disolvente orgánico (>60%), ya que en estas condiciones se produce la ruptura de los agregados que constituyen el SUPRAS y la separación de los analitos no se ve

[125] E.M. Costi, M.D. Sicilia, S. Rubio, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 1447.

[126] E.M. Costi, M.D. Sicilia, S. Rubio, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 6250.

[127] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, C. García-Pinto, E. Fernández-Laespada, J. Chromatogr. A 902 (2000) 251.

[128] S. Xie, M.C. Paau, C.F. Li, D. Xiao, M.M.F. Choi, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 2306.

[129] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, J. Sep. Sci. 28 (2005) 1613.

afectada. Sin embargo, cuando el porcentaje de disolvente orgánico en la fase móvil es inferior al 60% no se produce la desagregación del tensioactivo y por lo tanto, en el sistema cromatográfico existe una nueva fase en la que los analitos pueden distribuirse. La existencia de agregados en la fase móvil puede favorecer la separación de los analitos, pero generalmente su efecto es negativo. Para evitar que la presencia del SUPRAS afecte a la resolución cromatográfica los extractos se diluyen con disolvente orgánico antes de su introducción en el sistema cromatográfico.

La estructura y propiedades físico-químicas de los tensioactivos que constituyen el SUPRAS son factores muy a tener en cuenta cuando se analizan los extractos supramoleculares usando cromatografía líquida. Tensioactivos no iónicos polioxietilados con anillos aromáticos en su estructura como Triton X-114 y Polioxietilen-10-lauril éter no son adecuados para la determinación de compuestos de polaridad media/alta debido a que la probabilidad de que coeluyan con los analitos es elevada, ya que dichos tensioactivos están constituidos por mezclas de homólogos y oligómeros y proporcionan señales elevadas en los detectores fotométricos y fluorimétricos. Los SUPRAS de tensioactivos iónicos o anfóteros no aromáticos no presentan este problema, ya que sus tiempos de retención son bajos y sus máximos de absorción se encuentran por debajo de los 210 nm. Cuando se utiliza espectrometría de masas como sistema de detección, la elución del tensioactivo se debe producir por una parte, a un tiempo de retención diferente al de los analitos para evitar por una parte, que la supresión de la ionización de los analitos con la consiguiente pérdida de sensibilidad, y por otra, que la elevada concentración de tensioactivo presente en el extracto contamine la fuente de ionización.

Cuando se utiliza cromatografía de gases para analizar extractos supramoleculares, el tensioactivo debe eliminarse del extracto antes de su introducción en el sistema cromatográfico. Con este fin se han utilizado columnas de intercambio catiónico o dos columnas consecutivas, una de gel de sílice y otra de fluorisil, lo que ha permitido determinar fenotriazinas [130] y plaguicidas [131],

---

[130] A. Ohashi, M. Ogiwara, R. Ikeda, H. Okada, K. Ohashi, *Anal. Sci.* 20 (2004) 1353.

[131] A.M. Faria, R.P. Dardengo, C.F. Lima, A.A. Neves, M.E.L.R. Queiroz, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 87 (2007) 249.



respectivamente. También se ha propuesto la re-extracción de los analitos en un disolvente inmiscible con agua asistida por microondas o ultrasonidos, siendo los analitos determinados en este caso PAHs [132], plaguicidas [133] y alcaloides [134]. Recientemente, se ha propuesto la derivatización del tensioactivo previa a su introducción en el sistema cromatográfico. El tensioactivo Triton X-114 derivatizado con *N,O*-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida se transforma en un compuesto volátil que proporciona un pico estrecho que no interfiere en la determinación cromatográfica de PAHs, herbicidas y profenos [135].

## 6.6. APLICACIONES EN ANÁLISIS AMBIENTAL

En los últimos años se han desarrollado numerosas aplicaciones para la extracción de compuestos orgánicos y metales en muestras de alimentos, biológicas y medioambientales con el uso de disolventes supramoleculares. Puesto que esta Tesis se encuadra en el ámbito de la determinación de compuestos orgánicos en muestras medioambientales, nos centraremos en las aplicaciones desarrolladas para los SUPRAS en este ámbito. En la Tabla 5 se muestran las aplicaciones desarrolladas con diferentes tipos de disolventes supramoleculares. A continuación comentaremos los aspectos más relevantes de estas aplicaciones.

- **SUPRAS inducidos por temperatura**

Los SUPRAS de tensioactivos no iónico polioxietilados han sido los más utilizados en extracciones analíticas. La mayoría de las aplicaciones descritas para muestras líquidas hacen uso de concentraciones de tensioactivo no iónico próximas al 1% [136,137], por lo que los factores de concentración obtenidos son relativamente bajos, ya que estos vienen determinados por la relación volumen de

---

[132] T.I. Sikalos, E.K. Paleologos, *Anal. Chem.* 77 (2005) 2544.

[133] G.F. Jia, C.G. Lv, W.T. Zhu, J. Qiu, X. Wang, Z.Q. Zhou *J. Hazard. Mater.* 159 (2008) 300.

[134] J. Shen, X. Shao, *Anal. Chim. Acta* 561 (2006) 83.

[135] Y. Takagai, W.L. Hinze, *Anal. Chem.* 81 (2009) 7113.

[136] H. Abdollahi, L. Bagheri, *Anal. Chim. Acta* 514 (2004) 211

[137] C.F. Li, J.W.C. Wong, C.W. Huie, M.W.F. Choi, *J. Chromatogr. A* 1214 (2008) 11.

muestra/volumen de SUPRAS y el volumen de SUPRAS formado aumenta a medida que lo hace la cantidad de tensioactivo usada en su síntesis. Como consecuencia los límites de detección obtenidos (del orden de los  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) no son suficientemente bajos para determinar contaminantes orgánicos a las concentraciones a las que con frecuencia se encuentran en muestras acuosas medioambientales (del orden de los  $\text{ng L}^{-1}$ ). Es posible aumentar los factores de concentración obtenidos aumentando la temperatura por encima del CP, ya que en estas condiciones se obtienen volúmenes más bajos de SUPRAS con una mayor concentración de tensioactivo. Por otra parte, también se pueden obtener factores de concentración más elevados a temperaturas más bajas mediante la adición de sales que reduce el valor de CP. Algunas de las sales utilizadas con este fin han sido  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  y  $\text{NaCl}$  [138-141].

Para favorecer la extracción de compuestos iónicos se han utilizado disolventes supramoleculares constituidos por micelas mixtas de tensioactivos no iónicos e iónicos. El tensioactivo no iónico Triton X-114 ha sido el más usado junto con los tensioactivos iónicos bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) [142,143] y dodecil sulfato sódico (SDS) [144] para la extracción de analitos aniónicos y catiónicos, respectivamente. Usando esta estrategia se han determinado plaguicidas [144], compuestos bioactivos [144], colorantes [145], ácidos húmicos y fúlvicos [143] y explosivos [142] de muestras medioambientales.

Entre los SUPRAS de tensioactivos no iónicos inducidos por temperatura solo aquellos con bajo CP pueden ser utilizados para la extracción de compuestos termolábiles. También se han utilizado SUPRAS de tensioactivos anfóteros con este

---

[138] L. Wang, Y.-Q. Cai, B. He, C.-G. Yuan, D.-Z. Shen, J. Shao, G.-B. Jiang, *Talanta* 70 (2006) 47.

[139] J. Zhou, J. Chen, Y. Cheng, D. Li, F. Hu, H. Li, *Talanta* 79 (2009) 189.

[140] D.L. Giokas, V.A. Sakkas, T.A. Albanis, D.A. Lampropoulou, *J. Chromatogr. A* 1077 (2005) 19.

[141] C. Mahugo Santana, Z. Sosa Ferrera, J.J. Rodríguez Santana *Analyst* 127 (2002) 1031.

[142] S. Babae, A. Beiraghi, *Anal. Chim. Acta* 662 (2010) 9.

[143] J.C.A. de Wuilloud, R.G. Wuilloud, B.B.M. Sadi, J.A. Caruso, *Analyst*, 1510 (2003) 453.

[144] A.R. Zarei, *Anal. Biochem.* 369 (2007) 161.

[145] N. Pourreza; M. Zareian, *J. Hazard. Mater.* 2009, 165, 1124-1127.

fin [146], ya que estos se forman a temperaturas inferiores a un valor crítico, si bien su uso está limitado por su falta de disponibilidad comercial.

- **SUPRAS inducidos por disolvente**

A pesar de haber sido descritos muy recientemente, los disolventes de ácidos alquilcarboxílicos inducidos por agua han sido utilizados para la extracción de una gran variedad de compuestos en matrices ambientales [147,148]. Los disolventes de alcoholes también inducidos por este disolvente y descritos en el año 2012 [111] se han utilizado para extraer clorofenoles en aguas naturales [111] y disruptores endocrinos en sedimentos [149]. La elevada eficacia de extracción de estos disolventes se debe al elevado número de centros de solubilización que poseen y su capacidad para establecer con los analitos diferentes tipos de interacciones (dispersión, dipolo-dipolo y enlaces por puentes de hidrógeno). Además, se ha comprobado que los SUPRASs de alcoholes pueden actuar como materiales de acceso restringido, realizándose en la misma etapa la extracción de los analitos y la limpieza del extracto [111].

- **SUPRAS inducidos por sales**

Los disolventes supramoleculares inducidos por sales inorgánicas apenas se han usado en extracciones analíticas debido a que generalmente se requieren concentraciones de sales muy elevadas para que se produzca la coacervación y en ocasiones, también es necesaria la adicción de un cotensioactivo [112]. Han sido utilizados para la extracción de fenoles, clorofenoles [112] y toxinas [150] en aguas naturales.

---

[146] T. Saitoh; W.L. Hinze. Anal. Chem. 63 (1991) 2520

[147] A. Balleteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, J. Chromatogr. A 1203 (2008) 168.

[148] A. Moral, C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio. Anal. Chim. Acta 709 (2012) 59.

[149] F.J. López-Jiménez, M. Rosales-Marcano, S. Rubio. J. Chromatogr. A 1303 (2013) 1.

[150] B.K.W. Man, M.H. Lam, P.K.S. Lam, R.S.S. Wu, G. Shaw, Environ. Sci. Technol. 36 (2002) 3985.

Tabla 5

Aplicaciones de la extracción con disolventes supramoleculares en análisis medioambiental

Tensioactivo	Concentración de tensioactivo	Condiciones experimentales	Análito	Muestra	Ref
<b>SUPRAS inducidos por temperatura</b>					
Polioxietilén-10-lauril éter (POLE)	1% (p/v)	90°C	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)	Agua de mar	136
Triton X-114	0,25 % (p/v)	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,4 M a 45°C	Disruptores endocrinos	Aguas residuales	138
	0,5% (p/v)	18% (p/v) NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> , 3% (p/v) NaCl a 50°C	Plaguicidas	Aguas naturales y suelos	139
	0,1 % (p/v)	NaCl 0,2 M a 60°C	Residuos de filtros UV	Aguas naturales de baño	140
Genapol X-080	3% (v/v)	5 % (p/v) NaCl a 85 °C	Fenoles y clorofenoles	Agua de mar y residual	141
Triton X-114 y bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB)	0,15% (v/v) de Triton X-114 y 0,1mM de CTAB	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,2M a 40°C	Explosivos	Aguas naturales	142
	0,2 % (p/p) de Triton X-114 y 0,012% (p/p) de CTAB	Tampón tris(hidroximetil) aminometano 0,05M a 85 °C	Ácidos húmicos y fúlvicos	Aguas naturales	143
Triton X-114 y dodecil sulfato sódico (SDS)	0,2 % (p/v) Triton X-114 y 0,2% (p/v) SDS	5 % (p/v) NaCl	Plaguicidas	Agua potable	144

Tabla 5. Continuación

Tensioactivo	Concentración de tensioactivo	Condiciones experimentales	Análito	Muestra	Ref
<b>SUPRAS inducidos por un disolvente</b>					
Ácido decanoico	0,18 % (p/v)	10% THF y 90% H <sub>2</sub> O a pH 2	Hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH)	Aguas superficiales y residuales	147
Alcanoles	1% (p/v)	10% THF y 90% H <sub>2</sub> O a pH 1.5	Plaguicidas	Aguas naturales	148
1-Decanol	0,25 % (p/v)	7,5-15%THF y 92,5-85%H <sub>2</sub> O	Clorofenoles cancerígenos	Aguas naturales	111
	3,75% (v/v)	10% THF y 86,25% H <sub>2</sub> O	Disruptores endocrinos	Sedimentos	149
<b>SUPRAS inducidos por sales</b>					
Aliquat 336	2,5 mM	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 75 mM	Toxinas	Aguas naturales	150
Cetrimida	0,46% (p/v)	0,06% (p/v) de 1-octanol y 4 g NaCl	Fenoles y clorofenoles	Aguas naturales	112
<b>SUPRAS inducidos por un contraión anfifílico</b>					
Ácido decanoico:	0,5 % (p/v)	0,37 % (p/v) Bu <sub>4</sub> NOH y Bu <sub>4</sub> NCl 50 mM	Pesticidas	Aguas de río y subterráneas	151
Decanoato 1:1	2,57% (p/v)	1,95% (p/v) Bu <sub>4</sub> NOH	Fenoles	Aguas superficiales, subterráneas y residuales	152
	5,8 mM	Bu <sub>4</sub> NOH 2,9 mM, Bu <sub>4</sub> NBr 2,9 mM	Disruptores endocrinos	Aguas de río y residuales	153

Tabla 5. Continuación

Tensioactivo	Concentración de tensioactivo	Condiciones experimentales	Analito	Muestra	Ref
Ácido octanoico:	0,03 M	Terabutylamonio (TBA <sup>+</sup> ) 0,015 M (pH5)	Tensioactivos noiónicos y alcoholes etoxilados	Aguas de río, pozo y efluentes de aguas residuales	114
Octanoato 1:1					
<b>SUPRAS inducidos por ácido</b>					
Dodecil sulfonato sódico (SDoS)	0,1% (p/v)	HCl 4 M	Hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs)	Aguas naturales	154
	2% (p/v)	HCl 4 M	Hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs)	Suelo, sedimentos y lodo	155
	0,9% (p/v)	HCl 5,4 M	Plaguicidas	Agua potable y de lago	156
	2 % (p/v)	HCl 4 M	Alquilfenoles polietoxietilados (C8-C13) y alcoholes etoxietilados (C12-C16)	Lodo, suelo y sedimento	157
	1 % (p/v)	HCl 4,2 M	Vitamina E	Agua	112
Dodecil sulfato sódico (SDS)	2 % (p/v)	HCl 5,4 M	Plaguicidas	Agua potable, lago y nieve	118

- **SUPRAS inducidos por un contraión anfifílico**

Los SUPRAS constituidos por vesículas de ácido alquilcarboxílico-alquilcarboxilato, inducidos por tetrabutilamonio, solubilizan a los analitos mediante interacciones de dispersión, iónicas,  $\pi$ -catión y formación de puentes de hidrógeno. Su capacidad para establecer diferentes tipos de interacciones y la elevada concentración de tensioactivo presente en el SUPRAS ( $\sim 1 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$ ) hacen que la eficacia de extracción y por consiguiente los factores de concentración obtenidos sean elevados. Estos SUPRAS se han utilizado para extraer plaguicidas [151], fenoles [152] y disruptores endocrinos [153] de aguas de río y subterráneas.

- **SUPRASs inducidos por ácidos**

Los SUPRAS de tensioactivos aniónicos formados en disoluciones acuosas ácidas se han usado para extraer una gran variedad de compuestos orgánicos en diferentes matrices. La mayoría de los tensioactivos aniónicos se encuentran comercialmente disponibles siendo los más utilizados para formar el SUPRAS el dodecil sulfonato sódico (SDoS) [112,154-158] y el dodecil sulfato sódico (SDS) [118]. Al no poseer grupos cromóforos en su estructura no absorben en el ultravioleta ni en, el visible y por lo tanto, no interfieren en la detección fotométrica de los analitos separados mediante cromatografía líquida. Además, sus picos cromatográficos son estrechos lo que permite enviarlos a desecho sin afectar a la detección de los analitos cuando se utiliza la espectrometría de masas como técnica de detección [157,158]. La principal desventaja de los SUPRAS de tensioactivos aniónicos es que requieren elevadas concentraciones de ácido para su formación (3-4 M HCl), aunque estas condiciones experimentales pueden ser favorables en

---

[151] A. Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 3740.

[152] F.J. López-Jiménez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, J. Chromatogr. A 1195 (2008) 25.

[153] F.J. Ruiz, S. Rubio and D. Pérez-Bendito, J. Chromatogr. A 1163 (2007) 269.

[154] D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, N. Maniasso, E. A. G. Zagatto, Anal. Chim. Acta 392 (1999) 29.

[155] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, J. Chromatogr. A 962 (2002) 1.

[156] G. Jia, C. Bi, Q. Wang, J. Qiu, W. Zhou, Z. Zhou, Anal. Bioanal. Chem. 384 (2006) 1423.

[157] M. Cantero, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, J. Chromatogr. A 1046 (2004) 147.

determinadas aplicaciones como es el caso de la extracción de tensioactivos catiónicos en muestras de suelo, lodo y sedimento [158].

---

[158] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, J. Chromatogr. A 998 (2003)143.





**PARTE EXPERIMENTAL:**  
**MICROEXTRACCIÓN CON DISOLVENTES**  
**SUPRAMOLECULARES DE MUESTRAS**  
**MEDIOAMBIENTALES**





# **CAPÍTULO 1:**

## **MUESTRAS ACUOSAS**







## STEREOSELECTIVE QUANTITATION OF MECOPROP AND DICHLORPROP IN NATURAL WATERS BY SUPRAMOLECULAR SOLVENT-BASED MICROEXTRACTION, CHIRAL LIQUID CHROMATOGRAPHY AND TANDEM MASS SPECTROMETRY

C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio

### ABSTRACT

Liquid chromatography (LC)/tandem mass spectrometry (MS/MS) after supramolecular solvent-based microextraction (SUSME) was firstly used in this work for the enantioselective determination of chiral pesticides in natural waters. The method developed for the quantitation of the R- and S-enantiomers of mecoprop (MCPP) and dichlorprop (DCPP) involved the extraction of the herbicides in a supramolecular solvent (SUPRAS) made up of reverse aggregates of dodecanoic acid (DoA), analyte re-extraction in acetate buffer (pH = 5.0), separation of the target enantiomers on a chiral column of permethylated  $\alpha$ -cyclodextrin under isocratic conditions, and detection of the daughter ions ( $m/z = 140.9$  and  $160.6$  for MCPP and DCPP, respectively) using a hybrid triple quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray source operating in the negative ion mode. Similar recoveries (c.a. 75%) and actual concentration factors (c.a. 94) were obtained for both phenoxypropanoic acids (PPAs). The quantitation limits were  $1 \text{ ng L}^{-1}$  for R- and S-MCPP, and  $4 \text{ ng L}^{-1}$  for R- and S-DCPP, and the precision, expressed as relative standard deviation ( $n=6$ ) was in the ranges 2.4–2.7% ( $[\text{R-MCPP}] = [\text{S-MCPP}] = 5 \text{ ng L}^{-1}$  and  $[\text{R-DCPP}] = [\text{S-DCPP}] = 15 \text{ ng L}^{-1}$ ) and 1.6–1.8% ( $100 \text{ ng L}^{-1}$  of each enantiomer). The SUSME-LC-MS/MS method was successfully applied to the determination of the enantiomers of MCPP and DCPP in river and underground

waters, fortified at concentrations between 15 and 180 ng L<sup>-1</sup> at variable enantiomeric ratios (ER=1-9).

*Keywords:* Chiral analysis, supramolecular solvent, microextraction, liquid chromatography/tandem mass spectrometry, phenoxypropanoic acid herbicides, natural waters.

## 1. INTRODUCTION

Many pesticides in current use are chiral [1], and although their pesticidal activity is only or mainly associated to one enantiomer, they are frequently marketed and employed as racemic mixtures for economical reasons [2]. Pesticide enantiomers undergo degradation at different rates and/or interconversion in the environment, so the enantiomeric ratio (ER, defined as the molar ratio of R to S enantiomers) progressively deviates from the original value [3]. Since enantiomers of the same agrochemical frequently show different toxicity, mutagenicity, carcinogenicity, and endocrine disruption activity [4], a more comprehensive understanding of the fate of enantiomers in the environment would be very helpful in improving risk assessment and regulation of chiral pesticides.

To date, very few methods able to quantify pesticide enantiomers at the low concentration levels present in environmental samples have been reported [5-8]. They combine extraction/concentration approaches with chiral separation techniques coupled to mass spectrometry (MS) to achieve the required sensitivity and selectivity. Chiral gas chromatography (GC) is the separation technique most extensively used for this application. Chiral stationary phases are also available for the separation of pesticide enantiomers by liquid chromatography [1,2,9], however most mobile phases used are incompatible with MS. Lack of robustness of the capillary electrophoresis (CE)-MS interface and low compatibility between the chiral selector and the ionization source are the main limitations of chiral CE-MS [10].

- 
- [1] J. Ye, J. Wu, W. Liu, *Trends in Anal. Chem.* 28 (2009) 1148.
  - [2] V. Pérez-Fernández, M. A. García, M.L. Marina. *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6561.
  - [3] W. Liu, J. Gan, D. Schlenk, W.A. Jury, *PNAS*, 102 (2005) 701.
  - [4] L. Jin, W. Gao, L. Li, J. Ye, C. Li, W. Liu, in: S. Soloneski and M. L. Larramendy (Eds.), *Herbicides, Theory and Applications*, InTech, Rijeka, 2011, Chap. 14.
  - [5] C.S. Wong, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 544.
  - [6] C. Zipper, M.J.-F. Suter, S.B. Haderlein, M. Gruhl, H. P- E. Kohler, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 2070.
  - [7] P. B. Kurt-Karakus, T.F. Bidleman, D.C.G. Muir, S.J. Cagampan, J. Struger, E. Sverko, J.M. Small, L.M. Jantunen, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 8452.
  - [8] H.-R. Buser, M.D. Müller, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 626.
  - [9] V. Pérez-Fernández, M. A. García, M.L. Marina. *J. Chromatogr. A* 1271 (2010) 968.
  - [10] C. Simó, V. García-Cañas, A. Cifuentes, *Electrophoresis* 31 (2010) 1442.



Extraction/concentration methods used prior to chiral GC-MS are laborious and consume large volumes of organic solvents and, as polar pesticides are determined, long times for analyte derivatization are spent [6-8].

This research was intended to simplify the determination of polar chiral pesticides in natural waters by the combination of a simple and rapid sample treatment with the separation/quantitation of the enantiomers by chiral LC/MS. Mecoprop (MCCP) and dichlorprop (DCPP), two polar phenoxypropanoic acid (PPA) herbicides, were selected as model analytes in this study (molecular structures in Fig. 1). Microextraction with a supramolecular solvent (SUPRAS) was selected for sample treatment on the basis of the mixed interaction mechanisms and multiple binding sites they offer to the solubilisation of polar analytes. The use of LC avoided the need for enantiomer derivatization.

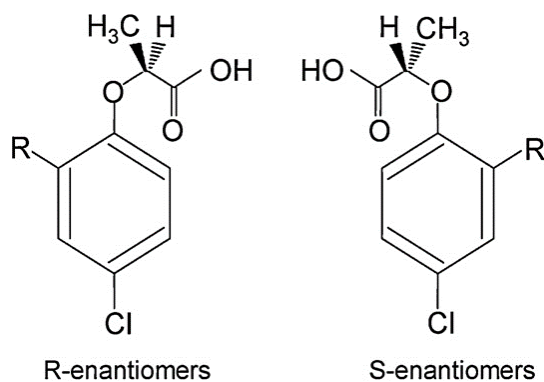


Fig. 1. Stereochemical structures of the R and S-enantiomers of MCCP (R: -CH<sub>3</sub>) and DCPP (R: -Cl). Bold wedges and wedges of parallel lines correspond to groups above and below the drawing plane, respectively.

MCCP and DCPP frequently contaminate surface and underground waters [5] owing to their wide use, high water-solubility and soil mobility. Although the R-enantiomers of PPAs are herbicidally active and their S-enantiomers are not [4], both MCCP and DCPP are frequently employed as racemates. They can suffer exclusive or preferential degradation of one enantiomer and formation of the R-enantiomer from the S-one or vice-versa, the mechanism and rate of biodegradation depending on factors such as the microbial population, temperature, pH, redox conditions, etc.

[4-8,11]. Different toxicological effects of the R- and S-enantiomers of PPAs on aquatic organisms [12] and plants [13] have been also reported. So, quantitation of individual enantiomers will provide a more adequate basis for assessing the risk of MCPP and DCPP in the environment.

Reported methods for the stereoselective determination of MCPP and DCPP in aqueous environmental samples are based on GC-MS [6-8], LC-UV [14,15] or CE-UV [16]. To our knowledge, no methods based on LC-MS have been described so far. Analytes are extracted from samples by repetitive ( $n=3$ ) liquid-liquid extraction with dichloromethane [6,7] or solid phase extraction (SPE) on polymeric sorbents [8,14-16] and the extracts are concentrated by solvent evaporation. If GC-MS is used, analytes in the extracts are subjected to derivatization to obtain methyl [8] or pentafluorobenzyl esters [6,7], followed by clean-up of the derivatized extracts by liquid-liquid back-extraction [6] or SPE on silica [7,8], and solvent evaporation. Methods based on GC-MS are those providing the lower detection limits (at the low  $\text{ng L}^{-1}$  level).

Supramolecular solvents (SUPRAS) are water-immiscible nanostructured liquids consisting of three-dimensional amphiphilic aggregates [17]. Two characteristics render them very attractive to extract polar analytes; first, the polar microenvironment provided by the amphiphile head groups which can be selected to give the more adequate interactions for the target analytes and second, the high concentration of amphiphiles in the solvent ( $0.1\text{-}1\text{ mg L}^{-1}$ ) and, consequently, of polar groups which is an ideal platform for amplification of solute binding. In addition, they are synthesized through self-assembly procedures that are within everyone's reach and they are non-volatile and non-flammable which permit the

- 
- [11] S.R. Buss, J. Trasher, . Morgan, J.W.N. Smith, Q. J. Eng. Geol. Hydrogeol. 39 (2006) 283.  
[12] Y.-Z. Wen, H. Chen, Y.-L. Yuan, D.-M. Xu, S.-D. Kang, J. Environ. Monit. 13 (2011) 879-885.  
[13] T. Wu, S. Li, H. Huang, S. Zhang, J. Agric. Food Chem. 57 (2009) 4315-4320  
[14] G.M. Williams, I. Harrison, C.A. Carlick, O. Crowley, J. Contant Hydrol. 64 (2003) 253-267.  
[15] K. Rügge, R.J. Juhler, M.M. Broholm, P.L. Bjerg, Water Res.36 (2002) 4160-4164.  
[16] C.M. Polcaro, C. Marra, C. Desiderio, S. Fanali, Electrophoresis 20 (1999) 2420-2424.  
[17] A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 530-536.

implementation of safer processes. Non-ionic [18], zwitterionic [19] and ionic [20,21] surfactant-based SUPRASs are generated from aqueous surfactant solutions at certain temperatures, salt concentrations or pH values, whereas alkyl carboxylic acid-based SUPRASs are produced from ternary mixtures of biosurfactant, water and organic solvent [22] or tetraalkylammonium hydroxide [23] at appropriate proportions. Theoretical and practical aspects of SUPRAS in analytical extractions, and the type of applications developed have been compiled in various published reviews [24-27].

In this work, the feasibility of using the supramolecular solvent-based microextraction (SUSME) technique to treat water samples in chiral analysis was firstly investigated. The SUPRAS used for the microextraction of MCCP and DCPD was made up of reverse aggregates of dodecanoic acid (DoA) because of its capability to efficiently extract PPAs in aqueous samples [28]. The optimal conditions for extracting the R- and S- enantiomers of MCCP and DCPD in natural waters, and separating and quantifying them by chiral LC-MS/MS were established and the analytical features of the developed method and its applicability to river and underground water analysis were evaluated.

- 
- [18] H. Watanabe, H. Tanaka, *Talanta* 25 (1978) 585.  
[19] T. Saitoh, W. Hinze, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2520.  
[20] I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4519.  
[21] X. Jin, M. Zhu, E.D. Conte, *Anal. Chem.* 71 (1999) 514.  
[22] F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7473.  
[23] F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 78 (2006) 7229.  
[24] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-González, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, C. García Pinto, E. Fernández Laespada, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 251.  
[25] E. K. Paleologos, D.L. Giokas, M.I. Karayannis, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 426.  
[26] A. Ballesteros-Gómez, M.D. Sicilia, S. Rubio, *Anal. Chim. Acta* 677 (2010) 108.  
[27] C. Bosch, F. Sánchez, *Anal. Bional. Chem.* 394 (2009) 759.  
[28] A. Moral, C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio, *Anal. Chim. Acta* 709 (2012) 59.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1 CHEMICALS

All chemicals were of analytical reagent-grade and were used as supplied. Dodecanoic acid (DoA), racemic mecoprop (R/S-MCPP) and dichlorprop (R/S-DCPP), and the pure enantiomers R-MCPP and R-DCPP were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Standard solutions ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) of R/S-MCPP and R/S-DCPP were prepared in methanol and stored under dark conditions at  $4^{\circ}\text{C}$ . They were stable at least 2 months. Deuterated R/S-MCPP ( $\text{D}_6$ , ring  $\text{D}_3$ , methyl  $\text{D}_3$ ) and R/S-DCPP ( $\text{D}_6$ , ring  $\text{D}_3$ , 3,3,3- $\text{D}_3$ ), used as internal standard (IS), were supplied by Dr Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) as racemic solutions of  $100 \text{ mg L}^{-1}$  ( $\text{D}_6$ -R/S-MCPP in acetonitrile and  $\text{D}_6$ -R/S-DCPP in acetone). Working solutions containing mixtures of the target analytes ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  of each enantiomer) and mixtures of the ISs ( $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  of each enantiomer) were prepared weekly in  $100 \text{ mM}$  acetate buffer at pH 5.0. Tetrahydrofuran (THF), formic acid, ammonia, hydrochloric and acetic acid, sodium acetate and LC-grade methanol were obtained from Panreac (Barcelona, Spain) and ultra-high-quality water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Madrid, Spain).

### 2.2 APPARATUS

The LC-MS system used was a hybrid triple quadrupole/linear ion trap Applied Biosystems MSD Sciex 4000QTRAP (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) coupled to a liquid chromatograph Agilent HP 1200 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) with a TurboIonSpray (TIS) interface. All data were acquired and processed using the Analyst 1.5.1 Software. The separation of MCPP and DCPP enantiomers was performed on a chiral column Nucleodex  $\alpha$ -PM ( $200 \text{ mm} \times 4.0 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ) from Macherey-Nagel (Düren, Germany). A multi-position magnetic stirrer RO 10 power IKAMAG<sup>®</sup> from IKA<sup>®</sup>-Werke GmbH & Co. KG. (Staufen, Germany), a digitally regulated centrifuge Mixtasel equipped with an angle rotor  $4 \times 100 \text{ mL}$  (cat. 7001326) from JP-Selecta (Abrera, Spain), a vortex-shaker

REAX Top equipped with an attachment (cat. 549-01000-00) for 10 microtubes from Heidolph (Schwabach, Germany) and a high speed brushless centrifuge MPW-350 R equipped with an angle rotor 36x2.2/1.5 mL (cat. 11462) from MPW Med-Instruments (Warszaw, Poland), were used for sample treatment. The volume of supramolecular solvent was measured with a digital caliper from Medid Precision, S.A. (Barcelona). Centrifuge tubes with narrow necks (Fig. 2) were designed by authors in order to make easier the measurement and collection of the solvent after extraction. Pobel S.A. (Madrid, Spain, web page: [www.pobel.com](http://www.pobel.com)) constructed them from commercial heavy-duty glass cylindrical centrifuge tubes with round-bottom (cat. 159080) by keeping their basic structure at the bottom (44 mm of outside diameter) but reducing the diameter from a specified height.

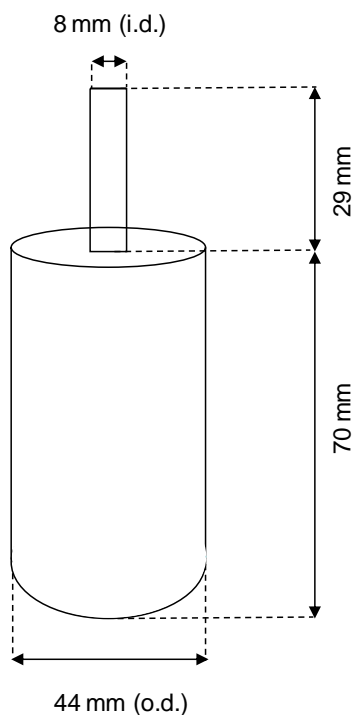


Fig 2. Schematic picture of the glass centrifuge tube used for the extraction of MCPP and DCP.

## **2.3. STEREOSELECTIVE DETERMINATION OF MCPP AND DCPD IN RIVER AND UNDERGROUND WATERS**

### **2.3.1. Sample collection and preservation**

All water samples were collected in the South of Spain. River water was taken from three different streams, two of them (Guadalquivir and Rabanales) flowing by Córdoba city and the third (Mata) by Andújar city. Underground water was collected in three wells located in Córdoba, Trassierra and Andújar cities. All samples were collected in dark glass containers in September 2011 and filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  cellulose acetate filters (Millipore HNWP, Bedford, MA, USA) in order to remove suspended particles. Then, they were adjusted to pH 1.5 by the addition of concentrated hydrochloric acid and stored at 4 °C under light protection until analysis.

### **2.3.2. SUPRAS-based microextraction**

A water sample aliquot of 67 mL was transferred to a centrifugation tube (Fig. 2), which contained 150 mg of DoA dissolved in 9 mL of THF. After sealing the tube with parafilm to avoid THF evaporation, the mixture was magnetically stirred for 5 min at 900 rpm to favor analyte extraction and then, centrifuged at 3500 rpm (2400 $\times$ g) for 5 min to accelerate phase separation. The supramolecular extract obtained after centrifugation (about 270  $\mu\text{L}$ ) was standing at the top of the solution in the narrow neck of the tube. An aliquot of 200  $\mu\text{L}$  of this extract was withdrawn using a microsyringe and transferred to a 2 mL-microtube Safe-Lock from Eppendorf Iberia (Madrid, Spain).

### **2.3.3. Back-extraction in acetate buffer**

Supramolecular extracts were dried under nitrogen stream and magnetic stirring. The use of a multi-position magnetic stirrer and a glass manifold with six outlets (cat. 256860, Pobel, Madrid, Spain) connected to the nitrogen supply permitted to simultaneously dry six extracts. After drying, 400  $\mu\text{L}$  of 100 mM acetate buffer at pH 5.0 were added to the microtube, and the mixture was vortex-shaken

for 5 min at 2.500 rpm to guarantee the total dissolution of the target analytes. Water-insoluble sample matrix components and solid DoA were separated from the aqueous extract containing the analytes by centrifugation at 15.000 rpm (16.720xg) for 15 min. An aliquot of about 100  $\mu\text{L}$  of the supernatant was withdrawn with a microsyringe, filtered through a 0.5  $\mu\text{m}$  PTFE filter and transferred to an autosampler vial. Finally, 40  $\mu\text{L}$  of the aqueous extract was injected in the liquid chromatographic system.

#### **2.3.4. Stereoselective quantitation of MCPP and DCPD by LC(TIS)QqQ-MS/MS**

Separation and quantification of the R- and S-enantiomers of both MCPP and DCPD were performed by LC coupled through a TurboIonSpray (TIS, a variant of electrospray) interface to hybrid triple quadrupole tandem mass spectrometry (QqQ-MS/MS). The mobile phase consisted of 65% methanol and 35% 100 mM formic acid/ammonium formate (pH 4.0) at a flow rate of 0.5 mL min<sup>-1</sup>. The temperature of the stationary-phase column was kept constant at 25°C. The diversion valve was programmed to send the eluted components to the ionization source, operating in the negative mode, at run times in the interval 6.5-12.0 min. Out of this interval, the mobile phase was sent to waste.

Identification and quantitation of MCPP and DCPD enantiomers were performed operating in the selected reaction monitoring (SRM) mode by recording the transitions (m/z) 213→141 (quantifier ion) and 213→71 (qualifier ion) for MCPP, and 233→161 (quantifier ion) and 233→125 (qualifier ion) for DCPD. Deuterated MCPP and DCPD used as ISs were monitored at the m/z 219→147 and 239→164 transitions, respectively. The TIS source and analyzer conditions were optimized to obtain the highest relative intensity. The TIS source values were as follows: curtain gas, 30 psi; nebulizer gas, 40 psi; turbo gas, 50 psi; temperature of the turbo gas, 600 °C; ion spray voltage, -2.000 V; entrance potential, -10 V; and declustering potential, -50 V for the target analytes, and -60 V and -30 V for deuterated MCPP and DCPD, respectively. The analyzer settings were as follows: 1.0 unit resolution for the first and third quadrupoles; collision gas, 3.0x10<sup>-5</sup> Torr;

collision energy, -18, -16, -16, -40, -18 and -20 V; and collision cell exit potential, -11, -3, -7, -9, -9, and -1 V for the transitions 213→141, 213→71, 233→161, 233→125, 219→147 and 234→164, respectively. Calibration curves were constructed from standard solutions in 100 mM acetate buffer at pH 5.0 containing the target analytes over the ranges stated in Table 1 and constant concentrations of ISs (10  $\mu\text{g L}^{-1}$  of each enantiomer). The concentrations of the target analytes in the extract were calculated from the calibration curves obtained by plotting peak area ratios ( $A/A_{\text{IS}}$ ;  $A$  = peak area of individual enantiomers and  $A_{\text{IS}}$  = peak area of the corresponding IS) versus the concentration of herbicide injected.

**Table 1**  
Analytical performance of the method.

Herbicide enantiomer	Calibration parameters					Method LOQ <sup>d</sup> (ng L <sup>-1</sup> )	Method LOD <sup>e</sup> (ng L <sup>-1</sup> )
	Linear range ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Slope $\pm$ s (L $\mu\text{g}^{-1}$ )	Intercept $\pm$ s	$r^b$	$S_{x/y}^c$		
R-MCPP	0.1 <sup>a</sup> -500	0.159 $\pm$ 0.003	0.02 $\pm$ 0.02	0.9992	0.039	1.0	0.3
S-MCPP	0.1 <sup>a</sup> -500	0.161 $\pm$ 0.004	0.02 $\pm$ 0.02	0.998	0.062	1.0	0.3
R-DCPP	0.3 <sup>a</sup> -500	0.330 $\pm$ 0.005	0.03 $\pm$ 0.03	0.9993	0.076	4.0	1.2
S-DCPP	0.3 <sup>a</sup> -500	0.327 $\pm$ 0.006	0.04 $\pm$ 0.04	0.9990	0.092	4.0	1.2

<sup>a</sup>Instrumental quantitation limit calculated by using a signal-to-noise ratio of 10

<sup>b</sup>Correlation coefficient, n=7

<sup>c</sup>Standard error of the estimate

<sup>d</sup>Estimated quantitation limits of the method

<sup>e</sup>Estimated detection limits of the method

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. MICROEXTRACTION OF MCPP AND DCPD

##### 3.1.1. The DoA-based SUPRAS: Description and binding-capability

The SUPRAS selected was synthesized by adding the river or underground water sample to a solution containing DoA in THF. Water promoted the self-assembly of DoA and caused the spontaneous formation of oily droplets (i.e., coacervate droplets) that flocculated through the formation of conglomerates of individual droplets. The overall density of such conglomerates was slightly lower



than that of the solution in which they formed, which facilitated creaming and phase separation (coacervate phase or SUPRAS) from the bulk solution. The process only occurred from protonated DoA ( $pK_a = 4.8 \pm 0.8$ ) and, consequently, at pH values below 4. Fig. 3 shows the region at which the SUPRAS was produced as a function of the relative concentrations of DoA, THF and water. Below and above the boundaries of this region, DoA precipitated or solubilized in the THF-water phase, respectively.

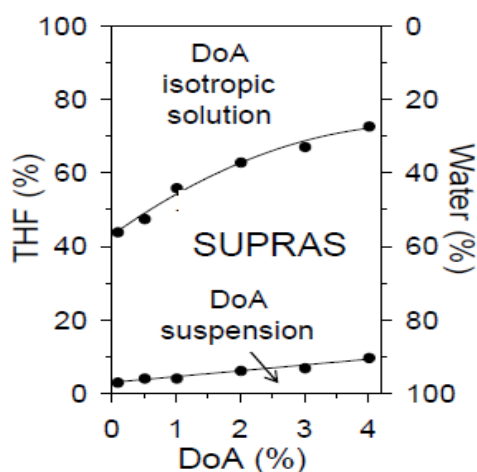


Fig. 3. Diagram of phase boundaries for ternary mixtures of DoA, THF and water obtained at pH = 1.5 and room temperature.

The SUPRAS produced consisted of three-dimensional aggregates of the biosurfactant, with the hydrocarbon chains extended into and surrounding by THF and interacting between them through dispersive forces, and their carboxylic groups linked by hydrogen bonds and solvated by water in the interior of the assemblies. The most probable driving forces for the extraction of MCP and DCP in the SUPRAS were dispersive interactions between the hydrophobic moieties of PAs and DoA, and hydrogen bonds between the hydrogen donor (OH) and acceptor (O) groups in the analytes (Fig. 1) and the carboxylic groups in DoA.

### 3.1.2. Optimization

Optimal conditions for microextraction were determined by extracting MCPP and DCPD at a racemate concentration of 200 ng L<sup>-1</sup> in ultra-high-quality water and quantifying their R- and S-enantiomers by LC-MS/MS. The variables studied were the amount of DoA, percentage of THF, pH, ionic strength, temperature and time of extraction. Their influence on the extraction efficiency for the target analytes was investigated by changing them in turn while keeping the others constant. All experiments were performed using a total volume (volume of water + volume of THF) of 76 mL. Actual concentration factors (P) were used as a criterion for optimization. They were calculated from the equation:  $P = (R/100) VR_1 VR_2$ , where R is the recovery obtained in the SUPRAS-based microextraction, VR<sub>1</sub> the sample volume/SUPRAS volume ratio and VR<sub>2</sub> the acetate buffer volume/SUPRAS volume ratio used in the back-extraction step (see Section 2.3.3). Conditions giving maximal P were selected provided that recoveries were above 70%, as it has been recommended for the extraction of pollutants from environmental samples [29-31].

The amount of DoA and percentage of THF used to synthesize the SUPRAS were varied over the intervals 50-300 mg and 10-25%, respectively. The volume of SUPRAS generated increased linearly with the first variable and exponentially with the second one. From experimental data (n=50), a general equation that permits to predict the volume of SUPRAS as a function of both variables was obtained:  $V = (1.07 \pm 0.02) a e^{(0.044 \pm 0.01)b}$  ( $r^2 = 0.993$ ), where V was the volume of SUPRAS in  $\mu$ L, a the amount of DoA in mg and b the percentage of THF. The composition of the SUPRAS did not varied with the amount of DoA but it was inversely dependent on the percentage of THF (e.g. the concentration of

---

[29] Guidelines for Single-Laboratory Validation of Analytical Methods for Trace-level Concentrations of Organic Chemicals, AOAC/FAO/IAEA/IUPAC, 1999.

[30] SANCO/10232/2006, Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis, 2006.

[31] D. Barceló, Environmental Analysis : Techniques, Applications and Quality Assurance, Elsevier, Amsterdam, 1993, pp. 149.

DoA in the SUPRAS decreased from 0.63 to 0.42 mg  $\mu\text{L}^{-1}$  when the concentration of THF in the bulk solution increased from 10 to 20%).

Recoveries and actual concentration factors obtained by using SUPRAS synthesized at increasing amounts of DoA and percentages of THF are summarized in Table 2. Extraction efficiencies for MCPP and DCPD were practically the same in the different conditions investigated owing to their similar polarity ( $\log K_{o/w}$ , 3.1 and 3.4, respectively) and capability to form hydrogen bonds [both contain the same number of hydrogen donors (1) and acceptors (3)]. Although a steady increase in recoveries was obtained as a function of the amount of DoA, actual concentration factors gradually decreased owing to the lineal dependence of the volume of SUPRAS with this variable. Variations of recoveries and actual concentration factors with the percentage of THF were probably due to changes in both the SUPRAS composition and the sample volume/SUPRAS volume ratio. A DoA amount of 150 mg and a THF concentration of 12% were selected as optimal because they provided the best actual concentration factors (94 for both MCPP and DCPD) for recoveries higher than 70%.

The effect of the pH, adjusted with hydrochloric acid, was studied within the interval 1-4. Recoveries for enantiomers kept constant at pH values lower than about 2. Above this value, recoveries diminished owing to the ionization of MCPP and DCPD ( $\text{p}K_a=3.1$ ) and, since the volume of SUPRAS did not vary with the pH, actual concentration factors decreased. The addition of salt (NaCl 1M) slightly increased recoveries (from c.a. 76% to 86%) and the volume of SUPRAS generated (from c.a. 270 to 340  $\mu\text{L}$ ) and, as a result, the actual concentration factors decreased (from 94 to 85). Since the total inorganic salt concentration in river and underground waters is generally lower than about  $1.5 \times 10^{-2}$  M (conductivity  $< 1000 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) and it rarely surpass  $4 \times 10^{-2}$  M (conductivity  $< 3000 \mu\text{S cm}^{-1}$ ), electrolytes are not expected to interfere in the microextraction of MCPP and DCPD.

**Table 2**

Mean percent recoveries and actual concentration factors obtained for R- and S-MCPP, and R- and S-DCPP as a function of the amount of dodecanoic acid and the percentage of THF.

Variable	Recovery $\pm$ s <sup>a</sup> (%)				Actual concentration factor			
	R-MCPP	S-MCPP	R-DCPP	S-DCPP	R-MCPP	S-MCPP	R-DCPP	S-DCPP
DoA amount <sup>b</sup> (mg)								
50	55 $\pm$ 3	55 $\pm$ 1	56 $\pm$ 3	56 $\pm$ 1	203	203	207	207
75	60 $\pm$ 1	63 $\pm$ 1	59.5 $\pm$ 0.5	60 $\pm$ 1	148	155	147	148
100	67.5 $\pm$ 0.5	68 $\pm$ 1	68.5 $\pm$ 0.5	67.5 $\pm$ 0.5	125	126	127	125
150	76 $\pm$ 1	77 $\pm$ 2	76 $\pm$ 2	76 $\pm$ 2	94	94	94	94
200	80 $\pm$ 1	78.5 $\pm$ 0.5	82.5 $\pm$ 0.5	81 $\pm$ 1	74	72	76	75
250	86 $\pm$ 2	84.5 $\pm$ 0.5	86.5 $\pm$ 0.5	86 $\pm$ 1	64	62	64	64
300	88.5 $\pm$ 0.5	90 $\pm$ 1	88 $\pm$ 4	90 $\pm$ 1	54	55	54	55
THF <sup>c</sup> (%)								
10	57.8 $\pm$ 0.1	60 $\pm$ 3	55 $\pm$ 3	57 $\pm$ 2	79	82	75	78
12	76 $\pm$ 1	77 $\pm$ 2	76 $\pm$ 2	76 $\pm$ 2	94	94	94	94
15	75 $\pm$ 1	74 $\pm$ 1	75 $\pm$ 2	74 $\pm$ 2	78	77	78	77
20	72 $\pm$ 1	71 $\pm$ 1	72 $\pm$ 1	73 $\pm$ 1	57	56	57	57
25	65 $\pm$ 4	67 $\pm$ 1	66 $\pm$ 1	65 $\pm$ 2	38	40	39	38

<sup>a</sup>n=3; <sup>b</sup>THF=12%; <sup>c</sup>DoA amount = 150 mg; pH=1.5

No effect of the temperature on either recoveries or actual concentration factors was observed over the whole interval tested (25-50°C). Extraction equilibrium conditions were reached after 5 min of stirring the samples at a rate of 900 rpm. Recoveries kept constant at higher extraction times and decreased at lower ones (they diminished from c.a. 76% to 55% when the stirring time was decreased from 5 to 2 min).

### 3.2. DoA REMOVAL

The DoA making up the SUPRAS (c.a. 0.6 mg  $\mu\text{L}^{-1}$ ) was removed from extracts before their injection in the chromatographic system because it coeluted with the target analytes from the chiral column of permethylated  $\alpha$ -cyclodextrin. In

this way, DoA effects on analyte ionization and ion-source contamination were avoided. DoA removal was investigated by drying the extracts with nitrogen and back-extracting the analytes with buffer solutions where DoA was sparingly soluble. The buffers tested were acetate and ammonium formate (100 mM) at pH 5 and 4, respectively. Both MCPP and DCPD enantiomers were quantitatively extracted from 200  $\mu$ L-extracts using 400  $\mu$ L of acetate buffer while recoveries decreased to about 90% when the same volume of ammonium formate buffer was used. Buffer volumes lower than 400  $\mu$ L could not be used because the volume of aqueous extract obtained after wetting the residue was very low which made impossible the LC-MS/MS determination of the target analytes. The back-extraction was aided by vortex-shaking. About 5 min of vortex shaking-assisted extraction (vibration motion = 2.500 rpm) were required to quantitatively extract the target herbicides. Lower times resulted in decreased back-extraction recoveries (e.g. 80% for 1 min). Finally, separation of aqueous extracts from solid DoA was performed by ultracentrifugation.

### **3.3. QUANTITATION OF MCPP AND DCPD ENANTIOMERS BY CHIRAL LIQUID CHROMATOGRAPHY AND TANDEM MASS SPECTROMETRY**

Permethylated  $\alpha$ -cyclodextrin has been the stationary phase most extensively used in chiral LC to separate the R- and S-enantiomers of both MCPP and DCPD prior to their UV detection [14,15]. The mobile phase invariably consisted of methanol/phosphate buffer (25-50 mM, pH 3) at the proportions 70/30 or 60/40. In this work, we used ammonium formate buffer at pH 4 to make the mobile phase compatible with MS and help the ionization of analytes before them entering the ion source. As previously reported [32], the pH and the concentration of buffer in the mobile phase affected enantiomer resolution. Buffer concentrations of 100 mM and pH values of 4 (methanol/buffer 65/35) were required to separate R- and S-DCPD

---

[32] T. Michishita, P. Franco, T. Zhang, J. Sep. Sci. 33 (2010) 3627.

(retention times= 7.0 and 8.6 min, respectively; resolution=1.9). The enantiomers R- and S-MCPP were well resolved at lower buffer concentrations (e.g. resolution=2.0 for 50 mM). At pH values higher than 4, enantiomer resolution decreased for both MCPP and DCPP.

The order of elution of enantiomers from the permethylated  $\alpha$ -cyclodextrin column was established using racemic and pure R-enantiomer standards. Quantitation was performed from calibration curves run using the standard solutions in 100 mM acetate buffer at pH 5. To correct for ionization enhancements ISS [deuterated R/S-MCPP (D<sub>6</sub>, ring D<sub>3</sub>, methyl D<sub>3</sub>) and R/S-DCPP (D<sub>6</sub>, ring D<sub>3</sub>, 3,3,3-D<sub>3</sub>)] were added to both standard solutions and sample extracts. The analytical figures of merit of the method for the determination of the R- and S-enantiomers of MCPP and DCPP are shown in Table 1. The linear range for calibration curves was confirmed by visual inspection of the plot residuals versus analyte amount [33]; the number of positive residuals was approximately equal to that of negative ones and both positive and negative residuals were randomly scattered around the average residual value. The quantitation (LOQs) and detection (LODs) limits of the method were estimated from calibration curves using peak areas 10 and 3 times higher than noise, respectively. The noise at the retention time of each analyte was measured from six independent complete analyses (experimental procedure in Section 2.3) of 67-mL river and underground water samples containing no PPAs at detectable concentration levels. Since no significant differences in the noise measured for river and underground water were observed, the same method LOQs and LODs were obtained for both types of samples. Sensitivities and method LOQs and LODs for the two enantiomers of each herbicide were similar. The higher noise measured at the 233→161 transition (m/z) compared to that in the 213→141 one resulted in greater LOQ and LOD values for DCPP.

---

[33] Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. de Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A. Data Handling in Science and Technology Series*, Vol. 20A. Elsevier, Amsterdam, 1997, p. 179.

The accuracy of the method was assessed by comparison of the slopes of the calibration curves obtained for the target enantiomers from standards in acetate buffer with those obtained from river and underground water samples fortified with known amounts of racemic MCPP and DCP (0.01-3.0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), and run using the whole procedure. No statistically significant differences between the slopes obtained from standards and those obtained from the samples were observed by applying a Student t test [34]. For example, the slopes and correlation coefficients ( $n=7$ ) obtained from the Andújar underground water sample for R-MCP, S-MCP, R-DCP and S-DCP were  $0.159\pm 0.003 \text{ L } \mu\text{g}^{-1}$ , 0.9992;  $0.160\pm 0.004 \text{ L } \mu\text{g}^{-1}$ , 0.998;  $0.330\pm 0.006 \text{ L } \mu\text{g}^{-1}$ , 0.9993 and  $0.328\pm 0.006 \text{ L } \mu\text{g}^{-1}$ , 0.9994, respectively and those obtained for standard in acetate buffer  $0.159\pm 0.003 \text{ L } \mu\text{g}^{-1}$ ;  $0.161\pm 0.004 \text{ L } \mu\text{g}^{-1}$ ;  $0.330\pm 0.005 \text{ L } \mu\text{g}^{-1}$  and  $0.327\pm 0.006 \text{ L } \mu\text{g}^{-1}$ . The experimental t-values were in the interval 0.17-2.99 and were below the critical t-value (3.25, significant level = 0.01).

The precision of the method was assessed by determining the R- and S-enantiomers of the target PAs in river and underground water samples spiked with racemic MCP and DCP at two concentration levels: 1) 10  $\text{ng L}^{-1}$  of MCP and 30  $\text{ng L}^{-1}$  of DCP and 2) 200  $\text{ng L}^{-1}$  of MCP and DCP (concentrations in samples before extraction). The relative standard deviations ( $n=6$ ) obtained varied within the intervals 2.4-2.7% and 1.6-1.8%, respectively.

### 3.4. ANALYSIS OF NATURAL WATER

The feasibility of the proposed method to quantify PA enantiomers in natural waters was demonstrated by analysing both non-fortified and fortified samples from three rivers and three underground waters. All samples were filtered to remove particulate matter before spiking and/or analyzing them. The presence

---

[34] L. Cuadros, A.M. García, F. Alés, C. Jiménez, M. Román J AOAC Int 78 (1995) 471.

**Table 3**  
Recovery and enantiomeric ratio of MCPP and DCPP from spiked river and underground water samples

Sample	Concentration added (ng L <sup>-1</sup> )						ER calculated			Recovery <sup>a</sup> ± s <sup>b</sup> (%)				ER determined <sup>a</sup> ± s <sup>b</sup>		
	R-MCPP		S-MCPP		R-DCPP		S-DCPP		MCPP	DCPP	R-MCPP	S-MCPP	R-DCPP	S-DCPP	MCPP	DCPP
River water																
Rabanales	15	15	15	15	1	1	1	1	1	1	77.2 ± 0.8	76 ± 2	77 ± 2	75 ± 3	1.01 ± 0.03	1.03 ± 0.04
	100	100	100	100	1	1	1	1	1	1	76 ± 1	78 ± 1	75 ± 1	75 ± 3	0.98 ± 0.02	1.00 ± 0.02
	150	50	150	50	3	3	3	3	3	3	77.1 ± 0.6	77 ± 2	76.4 ± 0.9	76 ± 1	3.01 ± 0.09	3.03 ± 0.06
	180	20	180	20	9	9	9	9	9	9	78 ± 1	78 ± 1	78 ± 1	77 ± 2	9.0 ± 0.2	9.2 ± 0.2
Guadalquivir	15	15	15	15	1	1	1	1	1	1	79 ± 2	79 ± 2	77 ± 2	76 ± 2	0.99 ± 0.04	1.01 ± 0.04
	100	100	100	100	1	1	1	1	1	1	76 ± 1	78 ± 1	77 ± 1	76 ± 1	0.98 ± 0.02	1.03 ± 0.02
Andújar	15	15	15	15	1	1	1	1	1	1	76 ± 1	76 ± 2	76 ± 1	76 ± 2	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.03
	100	100	100	100	1	1	1	1	1	1	74.8 ± 0.7	75.8 ± 0.8	74.3 ± 0.4	75 ± 1	0.99 ± 0.01	0.99 ± 0.02
Underground water sample																
Córdoba	15	15	15	15	1	1	1	1	1	1	76 ± 2	77 ± 2	77 ± 2	76 ± 3	0.99 ± 0.04	1.01 ± 0.04
	100	100	100	100	1	1	1	1	1	1	78.7 ± 0.8	79 ± 1	78.4 ± 0.8	78.1 ± 0.4	0.99 ± 0.02	0.99 ± 0.01
	150	50	150	50	3	3	3	3	3	3	74 ± 1	75 ± 2	73 ± 1	73 ± 2	2.95 ± 0.09	3.0 ± 0.1
	180	20	180	20	9	9	9	9	9	9	76.8 ± 0.5	78 ± 2	77 ± 1	78 ± 2	8.9 ± 0.3	8.9 ± 0.3
Trassierra	15	15	15	15	1	1	1	1	1	1	75 ± 1	77 ± 2	75 ± 2	75 ± 2	0.98 ± 0.03	1.01 ± 0.04
	100	100	100	100	1	1	1	1	1	1	78 ± 1	77 ± 1	78.0 ± 0.8	76.7 ± 0.4	1.01 ± 0.04	1.01 ± 0.01
Andújar	15	15	15	15	1	1	1	1	1	1	80 ± 2	78 ± 2	78 ± 1	77 ± 2	1.02 ± 0.04	1.01 ± 0.03
	100	100	100	100	1	1	1	1	1	1	76.3 ± 0.9	75 ± 1	74 ± 1	74 ± 1	1.02 ± 0.02	1.01 ± 0.03



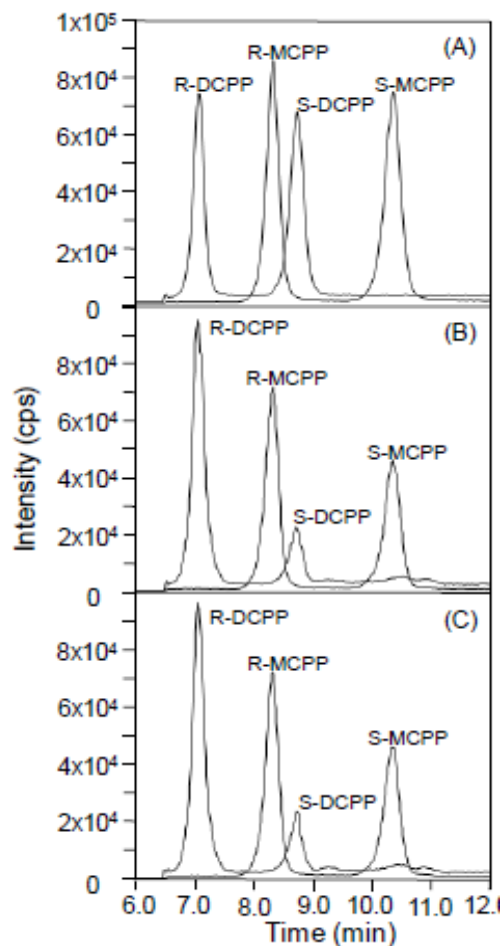


Fig. 4 LC(TIS)QQ-MS/MS selected ion chromatograms obtained from (A) a standard solution containing  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  of R/S-MCPP and R/S-DCPP and (B) Córdoba underground and (C) Rabanales river water samples spiked with  $150 \text{ ng L}^{-1}$  of R-MCPP and R-DCPP and  $50 \text{ ng L}^{-1}$  of S-MCPP and S-DCPP. Transitions ( $m/z$ ):  $213 \rightarrow 141$  for R- and S-MCPP, and  $233 \rightarrow 161$  for R- and S-DCPP.

of the target analytes on the solid fraction of samples was not investigated. Racemic MCPP and DCPP, and both racemic and pure R-PPAs were added to filtered samples to obtain concentrations of the S- and R-enantiomers of the herbicides within the interval  $15\text{-}100 \text{ ng L}^{-1}$  and  $15\text{-}180 \text{ ng L}^{-1}$ , respectively, and ERs of 1, 3 and 9. No PPAs were detected in the non-fortified samples analysed. The recoveries and ERs obtained from the analysis of fortified samples are shown in Table 3. Recoveries

obtained were similar to those found for spiked ultra-high-quality water samples; they ranged from 73 to 80, with standard deviations of the percent recovery varying between 0.4 and 3%. No significant differences between calculated and determined ERs were observed. Fig. 4 shows the chromatograms obtained from a standard solution (A) and fortified Córdoba underground (B) and Rabanales river (C) water samples.

#### 4. CONCLUSION

Determination of pesticide enantiomers in the environment is becoming a need for a thorough environmental risk assessment. Enantiomer quantitation at the low concentration present in natural waters is a challenge mainly faced so far using strategies based on extensive and laborious sample treatments combined with GC/MS. In this research, a simplified sample treatment prior to LC/tandem MS is proposed for the determination of polar pesticide enantiomers. The approach is demonstrated by application to the quantitation of MCPP and DCPD enantiomers in natural waters. It is based on a rapid and single microextraction with a SUPRAS made up of reverse aggregates of dodecanoic acid and a back microextraction with acetate buffer. A mixed interaction mechanism involving dispersive and hydrogen bond forces ensures high extraction yields of the target analytes into the SUPRAS. Recoveries higher than 75%, independent of analyte concentration (range tested 0.01-3  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) and sample matrix composition, were obtained for both herbicides using a very low volume of SUPRAS (about 4  $\mu\text{L}$  per mL of water sample). The high extraction efficiency afforded by the SUPRAS and the sensitivity and selectivity obtained by LC-MS/MS permitted to reach quantitation limits of 1 and 4  $\text{ng L}^{-1}$  for the R- and S-enantiomers of MCPP and DCPD, concentrations low enough to quantify the residues of these herbicides in river and underground waters.

## **Acknowledgments**

The authors gratefully acknowledge financial support from Spanish MICINN (Project CTQ2011-23849) and from the Andalusian Government (Junta de Andalucía, Spain, Project P09-FQM-5151). FEDER also provided additional funding. C. Caballo acknowledges the Andalusian CICyE for a postgraduate fellowship.

TALANTA, 2014, accepted



**ENANTIOSELECTIVE DETERMINATION OF REPRESENTATIVE  
PROFENS IN WASTEWATER BY A SINGLE-STEP SAMPLE  
TREATMENT AND CHIRAL LIQUID CHROMATOGRAPHY-  
TÁNDEM MASS SPECTROMETRY**

C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio

**ABSTRACT**

This manuscript describes, for the first time, the simultaneous enantioselective determination of ibuprofen, naproxen and ketoprofen in wastewater based on liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The method uses a single-step sample treatment based on microextraction with a supramolecular solvent made up of hexagonal inverted aggregates of decanoic acid, formed in situ in the wastewater sample through a spontaneous self-assembly process. Microextraction of profens was optimized and the analytical method validated. Isotopically labeled internal standards were used to compensate for both matrix interferences and recoveries. Apparent recoveries for the six enantiomers in influent and effluent wastewater samples were in the interval 97–103%. Low method detection limits (MDLs) were obtained (0.5–1.2 ng L<sup>-1</sup>) as a result of the high concentration factors achieved in the microextraction process (i.e. actual concentration factors 469–736). No analyte derivatization or evaporation of extracts, as it is required with GC-MS, was necessary. Relative standard deviations for enantiomers in wastewater were always below 8%. The method was applied to the determination of the concentrations and enantiomeric fractions of the targeted analytes in influents and effluents from three wastewater treatment plants. All the values found for profen enantiomers were consistent with those previously reported and confirmed again the suitability of using the enantiomeric fraction of ibuprofen

as an indicator of the discharge of untreated or poorly treated wastewaters. Both the analytical and operational features of this method make it applicable to the assessment of the enantiomeric fate of profens in the environment.

*Keywords:* Chiral analysis; Liquid chromatography/tandem mass spectrometry; Supramolecular solvent; Microextraction; Profens; Sewage.

## 1. INTRODUCCIÓN

Enantioselective environmental analysis of pharmaceuticals is an emerging area with important gaps in knowledge [1,2]. The importance of enantiomeric analysis of pharmaceuticals for proper environmental risk assessment is easy to understand if we consider that (a) approximately 56% of the drugs currently in use for human and veterinary treatment are chiral, (b) many of them reach the environment owing to inefficient removal in wastewater treatment plants, and (c) enantiomers usually differ in their biological properties and consequently their toxicity [3]. More novel applications of enantioselective analysis of chiral drugs include the use of enantiomeric ratios as markers of biologically-mediated degradation during wastewater treatment, water contamination with sewage, environmental biotransformation and sewage epidemiology [1,4].

Among chiral pharmaceuticals, profens are non-steroidal anti-inflammatory drugs prescribed in high quantities over the world (e.g. ibuprofen is one of the top-ten drugs sold worldwide [5]). Because of their insufficient removal rates during wastewater treatment, profens such as ibuprofen, naproxen and ketoprofen (Table 1) are frequently detected at the  $\text{ng L}^{-1}$  level in both treated wastewater and surface water [2]. They have scarce tendency to adsorb on sludge and sediments because they are present in the ionized form in the environment ( $\text{pK}_a$  3-5). Ibuprofen and ketoprofen are marketed as racemic mixtures, although their therapeutic effect resides almost exclusively in the S-enantiomers [6], whereas naproxen is only distributed as S-enantiomer since R-naproxen is hepatotoxic.

Despite the frequent occurrence of profens in water bodies and significantly different pharmacological activity of their enantiomers, only limited research has

- 
- [1] S.E. Evans, B. Kasprzyk-Hordern, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 1 (2014) e34.
  - [2] B. Kasprzyk-Hordern, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 4466.
  - [3] A. Nguyen, H. He, C. Pham-Huy, *Int. J. Biomed. Sci.* 2 (2006) 85.
  - [4] N.H. Hashim, S. Shafie, S.J. Khan, *Environ. Technol.* 31 (2010) 1349.
  - [5] S.K. Khetan, T.J. Collins, *Chem. Rev.* 107 (2007) 2319.
  - [6] S.S. Adams, P. Bresloff, C.G. Mason, *J. Pharm. Pharmacol* 28 (1976) 256.

been undertaken on their enantioselective fate in the environment [7-9]. Enantiomeric composition of profens can be altered after their administration owing to human or animal metabolism, biological wastewater treatment and biological degradation processes in the environment. Results available to date reveal that the principal enantiomer for ibuprofen in the environment is S-ibuprofen, which is around 110 times more potent than R-ibuprofen to humans and probably to other vertebrates and invertebrates [2]. Thus determination of enantiomeric composition of profens in wastewater treatment plants (WWTPs) and the environment is essential to understand and predict the mechanisms governing their fate, toxicity and environmental risk.

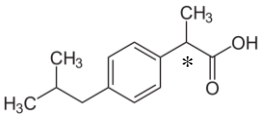
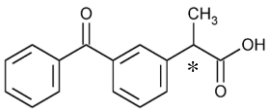
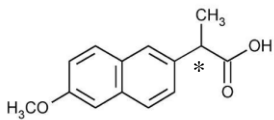
Only a few methods are available for the determination of the enantiomeric composition of profens, mainly ibuprofen and naproxen, in WWTPs and surface waters. All of these methods are based on the solid-phase extraction (SPE) of the aqueous samples, derivatization of the polar enantiomers, cleanup by a second SPE, and determination by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS)[7-12] or tandem mass spectrometry (CG-MS/MS) [13-15]. The main drawback of these GC-based methods is the need for complex and time-consuming steps that may lead to analyte losses and reduced sample throughput [4]. To the best of our knowledge, only a few methods have been reported to analyze polar chiral drugs in the environment by LC-MS (e.g.  $\beta$ -blockers and drugs of abuse [16-

- 
- [7] V. Matamoros, M. Hijosa, J.M. Bayona, *Chemosphere* 75 (2009) 200.  
[8] H.R. Buser, T. Poiger, M.D. Müller, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 2529.  
[9] M. Winkler, J.R. Lawrence, T.R. Neu, *Water Res.* 35 (2001) 3197.  
[10] S.L. Macleod, E.L. McClure, C.S. Wong, *Environm. Toxicol. Chem.* 26 (2007) 2517.  
[11] V.K.H. Barclay, N.L. Tyrefors, I.M. Johansson, C. E. Pettersson, *J. Chromatogr. A* 1269 (2012) 208.  
[12] K. Maskaoui, J.L. Zhou, *Environm. Sci. Pollut. Res.* 17 (2010) 898.  
[13] N.H. Hashim, L.D. Nghiem, R.M. Stuetz, S.J. Khan, *Water Res.* 45 (2011) 6249  
[14] L.J. Fono, E.P. Kolodziej, D.L. Sedlak, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 7257.  
[15] N.H. Hashim, S.J. Khan, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4746.  
[16] L.N. Nikolai, E.L. McClure, S.L. MacLeod, C.S.Wong, *J. Chromatogr. A* 1131 (2006) 103.

21]) but none of them included profens. Recently, an interesting method for multi-residue enantiomeric separation of chiral drugs on a Chirobiotic V stationary phase has been reported, however because of the acidity of profens ( $pK_a < 5$ , Table 1), this column failed in their enantiomeric resolution [22].

**Table 1**

Chemical structures, octanol-water partition coefficients ( $\log K_{ow}$ ) and ionization constants ( $pK_a$ ) for profens.

Profens	Chemical structure <sup>a</sup>	Log $K_{ow}$ <sup>b</sup>	$pK_a$ <sup>b</sup>
(R)/(S)-Ibuprofen		3.97	4.91
(R)/(S)-Ketoprofen		3.12	4.45
(R)/(S)-Naproxen		3.18	4.15

<sup>a</sup>The asterisks denote the chiral center.

<sup>b</sup>Source: <http://toxnet.nlm.nih.gov>

This paper presents the development of a method for the determination of the enantiomeric composition of ibuprofen, ketoprofen and naproxen in wastewater based on supramolecular solvent (SUPRAS) microextraction and chiral LC-MS/MS

[17] S.L. MacLeod, P. Sudhir, C.S. Wong, J. Chromatogr. A 1170 (2007) 23.

[18] B. Kasprzyk-Hordern, V.V.R. Kondakal, D.R.J. Baker, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 4575.

[19] V.K.H. Barclay, N.L. Tyrefors, I.M. Johansson, C.E. Pettersson, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 5587.

[20] B. Kasprzyk-Hordern, D.R. Baker, Environ. Sci. Technol. 46 (2012) 1681.

[21] J.P. Bagnall, S.E. Evans, M.T. Wort, A.T. Lubben, B. Kasprzyk-Hordern, J. Chromatogr. A 1249 (2012) 115.

[22] R. López-Serna, B. Kasprzyk-Hordern, M. Petrović, D. Barceló, Anal. Bioanal. Chem. 18 (2013) 5859.



on a (R)-1-naphthylglycine 3,5-dinitrobenzoic acid stationary phase. Selection of these profens was based on their occurrence and ubiquity in the environment as well as their high human consumption. To the authors' knowledge, this is the first reported LC-MS method for the determination of enantiomers of profens in wastewater.

A SUPRAS made up of nanostructured aggregates of decanoic acid, spontaneously formed in wastewater samples under addition of the amphiphile and THF [23], was used for isolating and concentrating profens. Figure 1 shows a scheme of the structure of this solvent. It consists of aqueous cavities surrounded by the carboxylic groups with the hydrocarbon chains dissolved in THF and packed in a hexagonal arrangement. Since profens contain donor (OH) and acceptor (O) groups in their structures (see chemical structures of profens in Table 1), it is expected that their solubilisation in the decanoic acid-based nanostructures occurs through a mixed-mode mechanism (viz hydrogen bonding in the surfactant polar group and hydration water, and dispersion forces in the surfactant hydrocarbon chain). On the other hand, the size of the aqueous cavities can be tailored by controlling the THF:water ratio in the wastewater where decanoic acid self-assembles and, consequently, this solvent has the potential to exclude the extraction of macromolecules such as proteins, humic acids, etc. So the SUPRAS can simplify sample treatment by combining both isolation and concentration of profens and sample cleanup.

The final objective of this research was to develop a straightforward, simple and rapid method for the enantiomeric analysis of profens in order to help to understand their environmental fate and risk. Below, the main results of this study are described and discussed.

---

[23] F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7473.

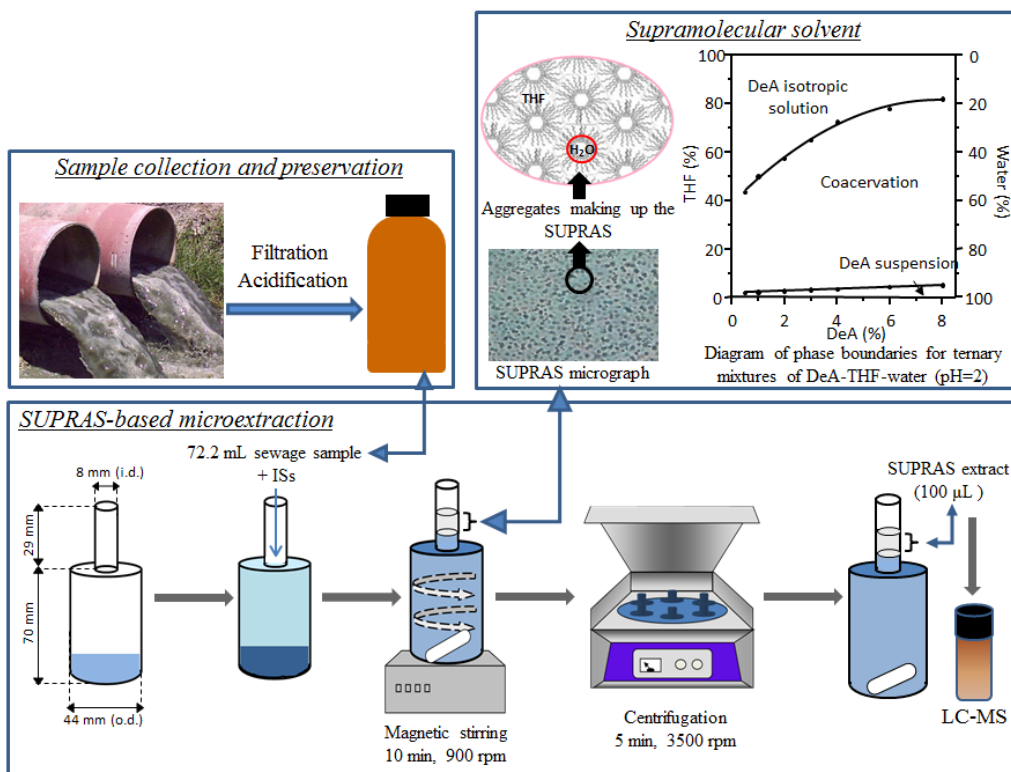


Figure 1. Scheme of the generalized sample treatment proposed for the microextraction of (R)/(S)-ibuprofen, (R)/(S)-ketoprofen and (R)/(S)-naproxen in sewage and structure and phase diagram for the supramolecular solvent used for microextraction.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1 CHEMICALS

All chemicals were of analytical reagent-grade and were used as supplied. Decanoic acid (DeA) and ammonium acetate were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland), (R)/(S)-ibuprofen ( $\geq 98\%$  purity) and (R)/(S)-ketoprofen ( $\geq 98\%$  purity) were supplied by Sigma (Saint Louis, MO, USA) whereas (R)/(S)-naproxen

( $\leq 100\%$  purity) was obtained from European Pharmacopoeia Reference Standard (Strasbourg, France). The isotopically labelled compounds (R)/(S)-ibuprofen (U-Ring- $^{13}\text{C}_6$ , 99% purity), (R)/(S)-ketoprofen ( $^{13}\text{C}_6$ , 99% purity) and (R)/(S)-naproxen ( $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}_3$ , 98% purity), acquired from  $^{13}\text{C}$ ALSA CHIM (Strasbourg, France), were used as internal standards (IS). All profen standards contained R- and S- enantiomers in a 50:50 ratio, which was confirmed by LC-UV. Both individual stock standard ( $1\text{ g L}^{-1}$ ) and isotopically labelled internal standard ( $40\text{ mg L}^{-1}$ ) solutions of racemic profens were prepared on a weight basis in methanol and stored under dark conditions at  $4^\circ\text{C}$ . They were stable for at least 2 months. Working solutions containing mixtures of profens ( $5\text{ mg L}^{-1}$  of each enantiomer) or ISs ( $0.75\text{ mg L}^{-1}$  of each enantiomer of (R)/(S)-ibuprofen and  $0.15\text{ mg L}^{-1}$  of each enantiomer of (R)/(S)-ketoprofen and (R)/(S)-naproxen) were prepared in methanol and stored at  $4^\circ\text{C}$ . Tetrahydrofuran (THF) and hydrochloric acid were purchased from Panreac (Barcelona, Spain) and LC-grade methanol and acetonitrile from HiperSolv Chromanorm (Fontenay-Sous-Bois, France). Ultra-high-quality water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Madrid, Spain).

## 2.2 APPARATUS

The LC-MS system used was a hybrid triple quadrupole/linear ion trap Applied Biosystems MSD Sciex 4000QTRAP (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) coupled to a liquid chromatograph Agilent HP 1200 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) with a TurboIonSpray (TIS) interface. All data were acquired and processed using the Analyst 1.5.1 Software. The analytical column used for separation of profen enantiomers was a Sumichiral OA-2500 (stationary phase: (R)-1-naphthylglycine and 3,5-dinitrobenzoic acid, particle size  $5\text{ }\mu\text{m}$ , i.d.  $4.6\text{ mm}$ , length  $250\text{ mm}$ ) from Sumika Chemical Analysis Service (Osaka, Japan). It was preceded by a guard column (Chirex 3005 from Phenomenex, Torrance, California) with the same chiral selector, particle size and internal diameter to those of the analytical column and  $30\text{ mm}$  length.

A multi-position magnetic stirrer RO 10 power IKAMAG® from IKA®-Werke GmbH & Co. KG. (Staufen, Germany) and a digitally regulated centrifuge Mixtasel equipped with an angle rotor 4×100 mL (cat. 7001326) from JP-Selecta (Abrera, Spain) were used for sample treatment. The volume of supramolecular solvent was measured with a digital calliper from Medid Precision, S.A. (Barcelona). Centrifuge tubes with narrow necks were designed by authors in order to make easier the measurement and collection of the solvent after extraction. Pobel S.A. (Madrid, Spain, web page: [www.pobel.com](http://www.pobel.com)) constructed them from commercial heavy-duty glass cylindrical centrifuge tubes with round-bottom (cat. 159080) but reducing the diameter from a specified height (Figure 1 shows a scheme picture and dimensions of these tubes).

## **2.3 DETERMINATION OF THE ENANTIOMERIC COMPOSITION OF PROFENS IN WASTEWATER**

### **2.3.1 Sample collection and preservation**

Grab influent and effluent wastewater samples were collected from three different sewage treatment plants in Córdoba (South of Spain) in May 2014. All of them utilize an activated sludge technology and mainly receive domestic wastewater. Samples were collected in dark glass containers and were transported to the lab and immediately filtered through 7-9 µm paper filter (Filter-lab Barcelona, Spain) and 0.45 µm nylon membranes (Millipore HNWP, Bedford, MA, USA) for removing suspended solids. The pH of the filtrated samples was adjusted to 2 by the addition of concentrated hydrochloric acid, and they were stored at 4 °C until analysis.

### **2.3.2 SUPRAS-based microextraction**

Decanoic acid (76 mg) was dissolved in THF (3.8 mL) into a 100 mL glass centrifugation tube. Then, a sewage sample (72.2 mL) spiked with 26 µL of the working solution of ISs (see Section 2.1) was added. After sealing the tube with parafilm to avoid THF evaporation, the mixture was magnetically stirred for 10 min

at 900 rpm to favor analytes extraction and then, centrifuged at 3500 rpm for 5 min to accelerate phase separation. The supramolecular extract obtained after centrifugation (about 100  $\mu\text{L}$ ) was standing at the top of the solution in the narrow neck of the tube. An aliquot of 50  $\mu\text{L}$  of the extract was withdrawn using a microsyringe and transferred to an autosampler amber glass vial with insert and it was subject to LC-MS. Fig. 1 shows a scheme of the sample treatment and microextraction procedure.

### 2.3.3 LC-MS/MS analysis

Enantiomers of profens were separated and quantified by using chiral LC coupled with a TurboIonSpray source operating in the negative ion mode and a hybrid triple quadrupole/linear ion trap analyzer operating in the selected reaction monitoring (SRM) mode. The mobile phase consisted of 90% tetrahydrofuran and 10% ammonium acetate (50 mM) in methanol working at a variable flow: 0.5 mL  $\text{min}^{-1}$  from 0 to 18 min and then 1.2 mL  $\text{min}^{-1}$ . The injection volume used was 10  $\mu\text{L}$ . The temperature for the analytical and guard column was kept at 25°C. The eluates from the analytical column were diverted by the switching valve to waste from 0 to 14 min in order to prevent the mass spectrometer from the entrance of other matrix components or decanoic acid. The TIS source and analyzer conditions giving the highest relative intensity were: curtain gas ( $\text{N}_2$ ) 30 psi; nebulizer gas 65 psi; turbo gas 30 psi; temperature of the turbo gas 425°C; ion spray voltage -4500 V; entrance potential -5 V; collision gas  $3.0 \times 10^{-5}$  Torr. Unit resolution was used for both first and third quadrupoles. Table 2 shows the quantifier and qualifier ions used for each native profen and ISs. Only one SRM transition could be recorded for ibuprofen because of its poor fragmentation. Declustering potential, collision energy and collision cell exit potential parameters were optimized for each analyte (Table 2). Calibration curves were constructed from standard solutions in methanol containing the target enantiomers in the ranges 0.4-4000, 1.0-4000 and 1.2-4000  $\mu\text{g L}^{-1}$  for (R)/(S)-ibuprofen, (R)/(S)-ketoprofen and (R)/(S)-naproxen respectively, and constant concentrations of ISs (200  $\mu\text{g L}^{-1}$  of each enantiomer of (R)/(S)-ibuprofen and 40  $\mu\text{g L}^{-1}$  of each enantiomer of (R)/(S)-ketoprofen and (R)/(S)-naproxen). The concentration of the target analytes in the extract were calculated from calibration

curves obtained by plotting peak area ratios ( $A/A_{IS}$ ;  $A$  = peak area of individual enantiomers and  $A_{IS}$  = peak area of the corresponding IS) versus the concentration of analytes injected.

**Table 2**

Quantifier and qualifier ion transitions and MS parameters used to determine profens in wastewater samples.

Profen	MS parameters				
	Quantifier transition	Qualifier transition	Declustering potential (V)	Collision energy (V)	Collision cell exit potential (V)
(R)/(S)-Ibuprofen	205> 161	205> 161	-55	-10	-3
(R)/(S)-Ketoprofen	253> 209	253> 197	-35	-10	-11
(R)/(S)-Naproxen	229> 185	229> 170	-50	-10	-5
(R)/(S)- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> Ibuprofen	211> 167	211> 167	-40	-10	-13
(R)/(S)- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> Ketoprofen	259> 215	259> 199	-20	-12	-37
(R)/(S)- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>2</sup> H <sub>3</sub> Naproxen	233 > 189	233 > 170	-35	-10	-9

Profen precursor ion [M-H]<sup>-</sup>, quantifierproduct ion [M-H-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 OPTIMIZATION OF CHIRAL LC

Some studies were undertaken with the aim of obtaining the best chromatographic resolution for the simultaneous separation of the enantiomers of the three selected profens while keeping reasonable retention times and enough sensitivity in LC-MS/MS. For this purpose, a (R)-1-naphthylglycine and 3,5-dinitrobenzoic acid chiral stationary phase was used. The selection of this stationary phase was based on the good resolution that it provides for the enantiomeric separation of individual profens [e.g. (R)/(S)-ibuprofen,(R)/(S)-ketoprofen, etc.] in

chiral LC/UV detection [24-26] and the compatibility with MS of the mobile phases used (30-80 mM ammonium acetate in methanol). It was checked that ammonium acetate was essential for enantioselectivity but, unfortunately, this additive also caused ionization suppression for profens in the turbo ion spray interface (e.g. the sensitivity for(R)/(S)-naproxen decreased around 20 fold by increasing 10 times ammonium acetate concentration). Retention times for profens were also dependent on ammonium acetate concentration and unacceptable long retention times for (R)/(S)-ketoprofen and (R)/(S)-naproxen were obtained working at low additive concentrations (e.g. 5 mM).

In order to keep the concentration of ammonium acetate to the minimum required for enantioselectivity (e.g. 5 mM) while obtaining reasonable retention times, stronger mobile phases made up of THF and methanol at different solvent percentage ratios (THF:methanol from 0:100 to 90:10) and flow rates (0.5-1.2 mL min<sup>-1</sup>) were tested. Enantiomeric resolutions {R<sub>s</sub>, calculated from the equation  $R_s = (t_{R1} - t_{R2}) / [2(w_1 + w_2)]$ , where t<sub>R1</sub> and t<sub>R2</sub> are the retention times and w<sub>1</sub> and w<sub>2</sub> the peak widths for the R- and the S-enantiomers, respectively} of 1.4, 1.7 and 2.8 were obtained for (R)/(S)-ibuprofen, (R)/(S)-ketoprofen and (R)/(S)-naproxen, respectively, by using a mobile phase consisting of 90% tetrahydrofuran and 10% ammonium acetate (50 mM) in methanol, working at a variable flow: 0.5 mL min<sup>-1</sup> from 0 to 18 min and then 1.2 mL min<sup>-1</sup>. Figure 2A shows a representative chromatogram obtained from a standard solution containing racemic profens.

---

[24] J. Boisvert, G. Caillé, I.J. McGilveray, A.A. Qureshi, J. Chromatogr. B, 690 (1997) 189.

[25] J.L. Cavalcanti Cardoso, V.L. Lanchote, M.P. Marques Pereira, N. Valadares de Moraes, J.S. Lepera, J.Sep.Sci. 37 (2014) 944.

[26] [http://www.sascorp.jp/english/public\\_html/sumichiral/d0107.pdf](http://www.sascorp.jp/english/public_html/sumichiral/d0107.pdf),

[http://www.sascorp.jp/english/public\\_html/sumichiral/d0814.pdf](http://www.sascorp.jp/english/public_html/sumichiral/d0814.pdf)

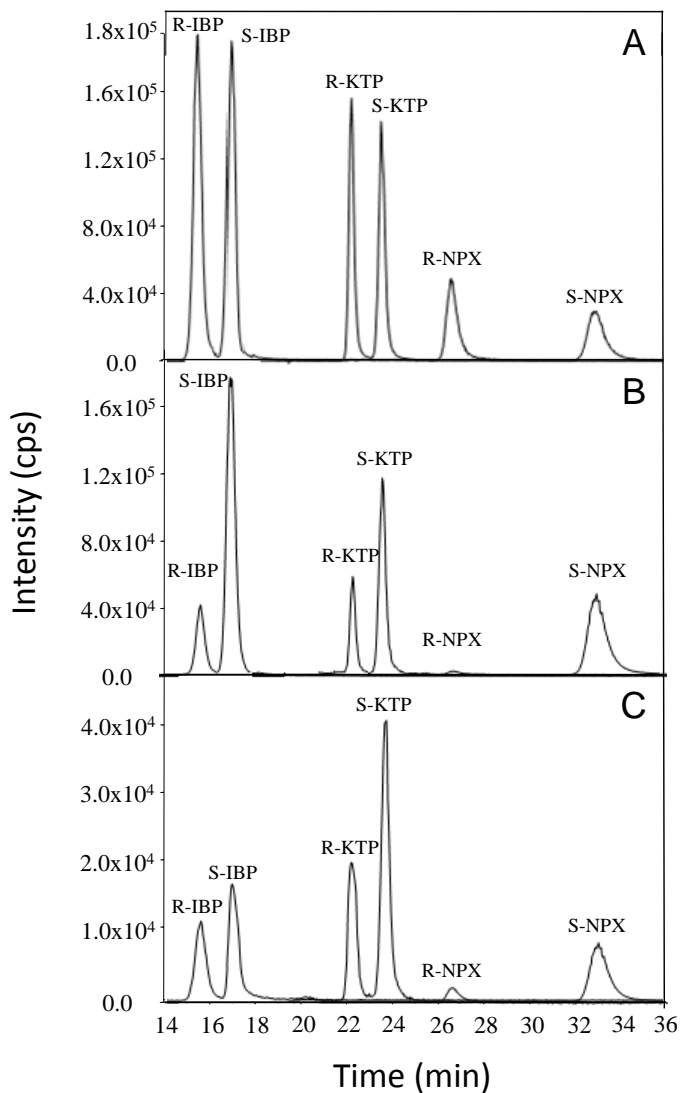


Figure 2. LC-MS/MS selected ion chromatograms obtained from (A) a standard solution containing 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  of (R)/(S)-ibuprofen (IBP), (R)/(S)-ketoprofen (KTP) and (R)/(S)-naproxen (NPX) and the (B) influent and (C) effluent samples collected in the WWTP 2.



## 3.2 MICROEXTRACTION OF PROFENS

### 3.2.1 SUPRAS description

The supramolecular solvent proposed for the microextraction of profens was synthesized *in situ* in the wastewater sample by addition of decanoic acid (DeA) in THF. Water promoted the self-assembly of DeA and caused the spontaneous formation of oily droplets (i.e. coacervates droplets) that flocculated through the formation of conglomerates of individual droplets and finally led to creaming and separation as a new liquid phase (i.e. coacervate or supramolecular solvent). The term creaming is defined as the macroscopic separation of a dilute emulsion into a highly concentrated emulsion, in which interglobular contact is important, and a continuous phase, under the action of gravity or a centrifugal field [27]. Only the protonated form of decanoic acid ( $pK_a$   $4.8 \pm 0.1$ ) was able to produce the SUPRAS, so pH values below 4 were required for its synthesis.

Figure 1 shows a micrograph of the coacervate droplets making up the SUPRAS, obtained by light microscopy, as well as a scheme of the hexagonal packaging of decanoic acid in these droplets. This figure also shows the relative concentrations of THF, water and DeA where the SUPRAS was produced (i.e. the coacervation region). Above this region, the SUPRAS and THF:water bulk solution became miscible, the boundary depending on the DeA concentration. Below the coacervation region, DeA became insoluble. Only concentrations of DeA within the range of analytical interest were investigated (i.e. below 10%).

The volume of SUPRAS obtained increased linearly with the amount of DeA and exponentially with the percentage of THF in the bulk solution. This volume can be accurately predicted from the following, previously derived, equation [28]:

---

[27] IUPAC. Compendium of Chemical Terminology (Gold Book) version 2.3.p.346, available at: <http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf>

[28] A. Ballesteros-Gómez, F.J. Ruiz, S. Rubio and D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 603 (2007) 51.

$$y = (1.04 \pm 0.02) a e^{(0.0473 \pm 0.0009) b} \quad (1)$$

where  $y$  is the volume of SUPRAS in  $\mu\text{L}$ ,  $a$  the amount of DeA in mg and  $b$  the THF percentage (v/v).

The composition of the SUPRAS was THF dependent; the higher the content of THF in the bulk solution the higher the percentages of THF and water in the SUPRAS, this leading to the synthesis of solvents progressively containing decreased concentrations of DeA. On the other hand, SUPRASs of identical composition were obtained by increasing the amount of DeA in the bulk solution although the volume of SUPRAS obtained linearly increased according to equation 1.

### 3.2.2 Optimization

Optimization of the microextraction process was carried out by extracting wastewater fortified with a racemate concentration of  $200 \text{ ng L}^{-1}$  for (R)/(S)-ibuprofen, (R)/(S)-ketoprofen and (R)/(S)-naproxen under a variety of experimental conditions: 0.1-0.5% (w/v) of DeA, 5-20% (v/v) of THF, pH 1-4, NaCl ( $10^{-3}$ -1 M), extraction temperature (20-55 °C), stirring time (2-30 min). The final volume for the solution was 76 mL. Unfortified samples were analysed for these profens and the concentration found subtracted from those of fortified samples. Extractions were carried out according to the procedure specified in Section 2.3.2 and varying each variable in turn while keeping the other constant. ISs were added just prior injection in order to correct any potential matrix effects and ensure accurate quantitation during optimization. Experiments were made in triplicate. Selection of the optimal conditions was based on the actual concentration factors (ACFs) obtained for each of the studied profens. They were calculated from the equation:  $(0.01 * R(\%) * PVR)$  where  $R$  is the recovery and  $PVR$  is the phase volume ratio (i.e. ratio of waste water volume over the SUPRAS volume). The aim was to get enough sensitivity without the need for evaporation of extracts, thus increasing sample throughput, saving time and cost and reducing analyte losses.

**Table 3**

Mean percent recoveries and actual concentration factors obtained for the racemic mixtures of ibuprofen, ketoprofen and naproxen as a function of the percentage of tetrahydrofuran (THF) and decanoic acid (DeA)

Variable	Recovery $\pm$ s <sup>a</sup> (%)			Actual concentration factor (ACF) $\pm$ s <sup>a</sup>		
	(R)/(S)-Ibuprofen	(R)/(S)-Ketoprofen	(R)/(S)-Naproxen	(R)/(S)-Ibuprofen	(R)/(S)-Ketoprofen	(R)/(S)-Naproxen
THF <sup>b</sup> (%)						
5	102 $\pm$ 3	65 $\pm$ 2	67 $\pm$ 1	740 $\pm$ 21	470 $\pm$ 18	487 $\pm$ 8
10	99 $\pm$ 2	70.1 $\pm$ 0.4	69 $\pm$ 2	530 $\pm$ 12	378 $\pm$ 2	372 $\pm$ 9
15	98 $\pm$ 2	65.3 $\pm$ 0.2	68.1 $\pm$ 0.5	392 $\pm$ 7	262 $\pm$ 1	273 $\pm$ 2
20	96 $\pm$ 1	58 $\pm$ 2	61 $\pm$ 1	287 $\pm$ 3	174 $\pm$ 5	182 $\pm$ 4
DeA <sup>c</sup> (%)						
0.15	102 $\pm$ 2	74 $\pm$ 1	74 $\pm$ 2	490 $\pm$ 12	354 $\pm$ 7	357 $\pm$ 9
0.2	101.7 $\pm$ 0.1	79.2 $\pm$ 0.7	79.1 $\pm$ 0.3	367.1 $\pm$ 0.3	286 $\pm$ 2	286 $\pm$ 1
0.3	99.6 $\pm$ 0.7	87.7 $\pm$ 0.1	84.8 $\pm$ 0.2	242 $\pm$ 2	213.3 $\pm$ 0.2	206.2 $\pm$ 0.5
0.5	101 $\pm$ 2	98 $\pm$ 2	93 $\pm$ 3	147 $\pm$ 4	143 $\pm$ 3	135 $\pm$ 4

<sup>a</sup> n = 6, pH = 2

<sup>b</sup> DeA = 0.1%

<sup>c</sup> THF = 5%

SUPRASs of different compositions were prepared from a constant concentration of DeA (0.1%, w/v) and variable percentages of THF (5-20%, v/v). The minimum concentration of DeA required to get enough volume of SUPRAS (about 100  $\mu\text{L}$ ) for profen analysis by LC-MS/MS was tested in order to obtain maximal ACFs. The concentration of DeA in the SUPRASs thus produced varied from 0.76 to 0.38  $\text{mg } \mu\text{L}^{-1}$  by increasing the percentage of THF from 5 to 20%. The influence of these SUPRASs on the extraction of racemic profens, along with the respective ACFs, is shown in Table 3. Absolute recoveries were not affected by solvent composition (i.e. % THF), the values being dependent on the polarity of the profen (Table 1). Quantitative extraction was only obtained for ibuprofen ( $\log K_{ow} = 3.97$ ). Actual concentration factors greatly decreased as the THF in the bulk solution increased as a result of the exponential dependence of the volume of SUPRAS produced with THF (eq. 1). A percentage of 5% THF was selected for further studies.

The influence of the volume of SUPRAS on the extraction of profens was investigated by increasing the amount of DeA. Table 3 shows the results obtained for percentages of DeA from 0.15 to 0.5 % (w/v). Recoveries for the more polar profens gradually increased as the volume of solvent did, but as it was expected, the ACFs progressively decreased as a result of the decrease in the respective phase volume ratios. Because of the possibility to use ISs for correcting extraction recoveries, a SUPRAS made up from DeA and THF percentage of 0.1 and 5% respectively were selected as optimal in order to get the maximal possible ACFs. In this way, ACFs of 736, 469 and 483 were obtained for (R)/(S)-ibuprofen, (R)/(S)-ketoprofen and (R)/(S)-naproxen, respectively.

As it has been previously mentioned, a value of pH below the  $\text{pK}_a$  of DeA (i.e. 4.8) is required in the bulk solution to form the SUPRAS. So, the extraction of profens will be carried out in their neutral form (see  $\text{pK}_a$  values in Table 1). In order to determine any influence of the pH on recoveries and ACFs for profens, extractions were carried out in the pH interval from 1 to 4. Recoveries kept constant in this interval for ibuprofen and ketoprofen, but decreased for naproxen (around 60%) at pH 4 owing to its stronger acidity ( $\text{pK}_a$  4.15). No meaningful influence of

the pH on ACFs was observed. So, for experimental convenience, the pH of the samples previously adjusted to 2 for their preservation, was maintained during extraction.

Ionic strength and temperature could affect the aggregation process driving SUPRAS formation and the distribution equilibria of the analytes between the two liquid phases involved in SUPRAS-based microextractions, and therefore both variables could influence on the extraction yield and concentration factors provided by SUPRASs. Electrolytes have been proved to cause a slight increase in the recoveries and a small decrease in the concentration factors obtained for mecoprop and dichlorprop when they were extracted using a dodecanoic acid-based SUPRAS [29]. Increasing the ionic strength of the wastewater sample by addition of NaCl ( $10^{-3}$ -1 M) or varying the temperature for extraction from 20 to 55 °C did not affect profens extraction efficiencies or concentration factors. The time for magnetic stirring during extraction was investigated in the interval 2-30 min at 900 rpm. Equilibrium conditions were reached after 5 min but reproducibility increased about 4-fold as the extraction time increased to 10 min, so this time was selected as optimal.

### 3.3 METHOD VALIDATION

#### 3.3.1 Recoveries and matrix effects

Three sets of calibration were prepared to evaluate method recovery (R), absence or presence of matrix effects (ME) and overall process efficiency (PE) [30]. The first set (A) consisted of eight standards in methanol at concentrations of each enantiomer in the ranges 0.4-4000, 1.0-4000 and 1.2-4000  $\mu\text{g L}^{-1}$  for (R)/(S)-ibuprofen, (R)/(S)-ketoprofen and (R)/(S)-naproxen, respectively. The second set (B) was prepared by spiking the profen enantiomers (same concentration range as used for set 1) in SUPRAS aliquots obtained after influent wastewater extraction

---

[29] C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio, *Anal. Chim. Acta* 761 (2013) 102.

[30] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019.

according to the procedure in section 2.3.2. In set 3 (C), enantiomers were spiked before extraction into the influent wastewater sample and subjected to the whole procedure. Matrix effects, absolute recoveries and process efficiency were evaluated by comparing the slopes of the calibration curves obtained by sets 1 and 2, sets 2 and 3 and sets 1 and 3, respectively, according to:

$$\text{ME (\%)} = \text{B/A} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{R (\%)} = \text{C/B} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{PE (\%)} = (\text{ME} \times \text{R})/100 = \text{C/A} \times 100 \quad (4)$$

The ME calculated in this manner may be referred to as an absolute matrix effect; percentages higher than 100 indicate ion enhancement, while percentages lower than 100 are indicative of ion suppression.

Table 4 shows the values obtained for ME, R and PE for the different profen enantiomers investigated. It was checked that recoveries were quantitative for both R- and S-Ibuprofen enantiomers and they varied in the range 65-69% for the rest of enantiomers. These values were in agreement with the results obtained during the optimization process under the selected experimental conditions (e.g. ACFs from 469 to 736 in Table 3) and confirmed both the similar behavior of enantiomers from each profen regarding extraction and the independence of recoveries of enantiomer concentration in the range evaluated. Quantitative recoveries could be obtained for (R)/(S)-ketoprofen and (R)/(S)-naproxen in samples requiring lower actual concentration factors (e.g. around 134-141, see Table 3).

Matrix effects only were observed for ibuprofen, the signal suppression observed being similar for both enantiomers (Table 4). Because of the high mobile phase strength required for enantiomeric separation [i.e. 90% tetrahydrofuran and 10% ammonium acetate (50 mM) in methanol], the most polar and medium polar matrix components were expected to elute quickly and affect mainly ibuprofen. High selectivity was obtained for both (R)/(S)-ketoprofen and (R)/(S)-naproxen. The overall process efficiency was in the range 37-68%.

**Table 4**

Matrix effect (ME), recovery (R) and process efficiency (PE) data for profen enantiomers in an influent wastewater sample.

Profen enantiomer	ME (%)	R (%)	PE (%)
(R)-Ibuprofen	36 ± 2	103 ± 6	37 ± 2
(S)-Ibuprofen	38 ± 1	100 ± 7	38 ± 2
(R)-Ketoprofen	98 ± 3	69 ± 4	68 ± 3
(S)-Ketoprofen	95 ± 3	67 ± 4	64 ± 4
(R)-Naproxen	98 ± 4	68 ± 3	67 ± 2
(S)-Naproxen	99 ± 4	65 ± 4	64 ± 3

The use of isotopically labelled standards to compensate for both matrix effects and extraction efficiencies was investigated by comparing the slopes of calibration curves obtained from standards (n=8) of native profen enantiomers (0.4-4000, 1.0-4000 and 1.2-4000  $\mu\text{g L}^{-1}$  for (R)/(S)-ibuprofen, (R)/(S)-ketoprofen and (R)/(S)-naproxen) in methanol and influent wastewater sample, the latter fortified before extraction. Both, methanol and wastewater samples were spiked with a constant concentration of IS (final concentration of 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  of each enantiomer of (R)/(S)-ibuprofen and 40  $\mu\text{g L}^{-1}$  of each enantiomer of (R)/(S)-ketoprofen and (R)/(S)-naproxen). The concentration of the target analytes in the extract were calculated from calibration curves obtained by plotting peak area ratios ( $A/A_{IS}$ ;  $A$  = peak area of individual enantiomers and  $A_{IS}$  = peak area of the corresponding IS) versus the concentration of analytes injected.

No statistically significant difference between both slopes was revealed by applying a Student's test [31]. The experimental t-values obtained for R-ibuprofen, S-ibuprofen, R-ketoprofen, S-ketoprofen, R-naproxen and S-naproxen were 0.54,

[31] L. Cuadros, A.M. García, F. Alés, C. Jiménez, M. Román, J. AOAC Int. 78 (1995) 471.

2.94, 1.55, 1.85, 2.26 and 2.84 respectively. These values were below the critical t value (3.05, significant level=0.01). So, the isotopically labelled standards proposed were able to compensate for both matrix effects and recoveries for the profens investigated.

### 3.3.2 Linearity and sensitivity

Method detection limits (MDLs) were calculated from six independent complete analyses (experimental procedure in Section 2.3) of both influent and effluent wastewater samples by using a signal-to-noise ratio of 3. Since no typical matrix low-level material could be obtained, an estimate of the background signal was made at a representative part of the readout, adjacent to the analyte signal, in the analyte-containing sample. MDLs were 0.7, 0.7, 0.9, 0.8, 1.2, 1.1 and 0.5, 0.5, 0.8, 0.7, 1.1, 1.1 ng L<sup>-1</sup> for R-ibuprofen, S-ibuprofen, R-ketoprofen, S-ketoprofen, R-naproxen and S-naproxen, in influent and effluent wastewater samples, respectively. MDLs for enantiomers were in a narrow range (0.5-1.2 ng L<sup>-1</sup>) and they were practically independent of the type of sample. High sensitivity was achieved as a result of the high concentration factors provided by the proposed method.

Quantification of profen enantiomers based on peak area was performed from standards in methanol (n=8) using the internal standard approach. Isotopically labelled enantiomers were used as internal standards (see section 2.3.3. for concentration ranges and procedure). The linear range was confirmed by visual inspection of the plot residuals versus analyte amount; the residuals were randomly scattered within a horizontal band and a random sequence of positive and negative residuals was obtained. Correlation between peak areas and enantiomer concentrations was determined by linear regression and 1/x weighted calibration. Correlation coefficients were in the range 0.9997-0.99991 for all enantiomers indicating good fits.



### 3.3.3 Precision

The precision was assessed by applying the whole analytical process to six independent unfortified influent and effluent sewage samples. The values expressed as relative standard deviations were 2.1/1.3% for (R)/(S)-ibuprofen, 3.3/1.0% for (R)/(S)-ketoprofen and 5.3/1.2% for (R)/(S)-naproxen in influent and 4.5/3.2% for (R)/(S)-ibuprofen, 3.1/2.4% for (R)/(S)-ketoprofen and 7.8/1.7% for (R)/(S)-naproxen in effluent. The concentrations found for enantiomers in the selected wastewater samples were in a wide range (i.e. 21 to 1049 ng L<sup>-1</sup> in influents and 14 to 177 ng L<sup>-1</sup> in effluents) and were always higher for S-enantiomers compared to R-enantiomers. The precision was satisfactory, with RSD values below 8% for all the enantiomers.

## 3.4 DETERMINATION OF PROFEN CONTENT AND ENANTIOMERIC FRACTION IN WASTEWATER

Unfortified and fortified influent and effluent samples from three WWTPs, all of them located in Córdoba province (South of Spain), were analysed to prove the suitability of the method to determine profen enantiomers. Table 5 shows the concentrations obtained, the enantiomeric fractions calculated and the relative recoveries found for each enantiomer. All these values were expressed as the mean of three independent determinations, besides their corresponding standard deviations. EFs were defined as [32]:

$$EF = \frac{[S\text{-enantiomer}]}{([S\text{-enantiomer}] + [R\text{-enantiomer}])} \quad (5)$$

EF equals 1 or 0 in the case of a single enantiomer form and 0.5 in the case of racemates. Fortification of wastewater with profen enantiomers was made at a different level for influents (300 ng L<sup>-1</sup>) and effluents (100 ng L<sup>-1</sup>).

---

[32] H.-J.d.Geus, P.G. Wester, J.d. Boer and U.A.Th. Brinkman, Chemosphere 41 (2000) 725.

**Table 5**  
Concentration found, apparent recoveries and enantiomeric ratios (EF) for (R)/(S)-IBP, (R)/(S)-KTP and (R)/(S)-NPX in wastewaters influents and effluents

Sample	Concentration found <sup>a,b</sup> (µg L <sup>-1</sup> )										EF				
	(R)-IBP					(S)-IBP					(R)-NPX	(S)-NPX	IBP	KTP	NPX
	(R)-IBP	(S)-IBP	(R)-KTP	(S)-KTP	(R)-NPX	(S)-KTP	(R)-NPX	(S)-NPX	(S)-NPX						
<b>WWTP 1</b>															
Influent	415 ± 3	1643 ± 50	191 ± 9	220 ± 3	29.4 ± 0.2	3172 ± 37	0.798 ± 0.006	0.54 ± 0.02	0.9908 ± 0.0002						
	100,8 ± 0,9 <sup>c</sup>	99 ± 2 <sup>c</sup>	99 ± 2 <sup>c</sup>	99 ± 2 <sup>c</sup>	101 ± 1 <sup>c</sup>	100 ± 1 <sup>c</sup>									
Effluent	83 ± 2	172 ± 8	28 ± 1	60 ± 3	22 ± 1	481 ± 17	0.67 ± 0.02	0.683 ± 0.002	0.9555 ± 0.0002						
	101,4 ± 0,7 <sup>d</sup>	103 ± 7 <sup>d</sup>	98 ± 1 <sup>d</sup>	103 ± 3 <sup>d</sup>	99 ± 3 <sup>d</sup>	103 ± 3 <sup>d</sup>									
<b>WWTP 2</b>															
Influent	257 ± 5	957 ± 12	240 ± 8	510 ± 5	21 ± 1	1049 ± 13	0.788 ± 0.003	0.680 ± 0.007	0.9808 ± 0.0008						
	101 ± 2 <sup>c</sup>	101 ± 1 <sup>c</sup>	99 ± 1 <sup>c</sup>	100 ± 1 <sup>c</sup>	99 ± 3 <sup>c</sup>	99,5 ± 0,3 <sup>c</sup>									
Effluent	42 ± 2	72 ± 2	86 ± 3	177 ± 4	14 ± 1	175 ± 3	0.629 ± 0.008	0.673 ± 0.008	0.927 ± 0.005						
	102 ± 2 <sup>d</sup>	101 ± 2 <sup>d</sup>	100 ± 2 <sup>d</sup>	99 ± 2 <sup>d</sup>	101 ± 1 <sup>d</sup>	100,6 ± 0,5 <sup>d</sup>									
<b>WWTP 3</b>															
Influent	256 ± 3	1536 ± 47	87.9 ± 0.9	121 ± 2	18 ± 1	1747 ± 3	0.857 ± 0.002	0.5797 ± 0.0003	0.9899 ± 0.0006						
	100 ± 1 <sup>c</sup>	99 ± 1 <sup>c</sup>	98 ± 2 <sup>c</sup>	99 ± 3 <sup>c</sup>	99 ± 2 <sup>c</sup>	99 ± 1 <sup>c</sup>									
Effluent	98 ± 4	210 ± 5	24 ± 2	38 ± 1	8.7 ± 0.4	241 ± 7	0.68 ± 0.02	0.61 ± 0.03	0.965 ± 0.002						
	102 ± 3 <sup>d</sup>	100 ± 2 <sup>d</sup>	104 ± 4 <sup>d</sup>	101 ± 2 <sup>d</sup>	97 ± 3 <sup>d</sup>	100 ± 2 <sup>d</sup>									

<sup>a</sup> Mean of three independent determination

<sup>b</sup> Standard deviation

<sup>c</sup> Fortified with 300 ng L<sup>-1</sup> of each enantiomer

<sup>d</sup> Fortified with 100 ng L<sup>-1</sup> of each enantiomer

Both enantiomers of all three profens were quantified in the analysed samples. The measured concentrations were all within an expected range based on previously reported non-enantioselective and enantioselective analysis of profens in wastewater [2,4,22]. Removal of profen enantiomers ranged between 65 and 92% during wastewater treatment except for S-naproxen with removal percentages varying in the interval 25-51%.

The values calculated for EF were also all consistent with previous reports [4,8,33]. Thus, as usual, ibuprofen was found at very high concentrations in influents with enantiomeric excess of the pharmacologically active (S)-enantiomer. It is known that (R)-ibuprofen undergoes chiral inversion during human metabolism that resulting in an excess of (S)-ibuprofen in urine. EF for ibuprofen in influents ranged between 0.63 and 0.68 that indicating that (S)-ibuprofen was preferentially degraded compared to (R)-ibuprofen [4]. Because of the similarity of ibuprofen EF values in effluents and surface waters and the widespread presence of this compound in the environment, ibuprofen EFs have been proposed as indicators of the discharge of untreated or poorly treated wastewater [8].

Values of EFs for ketoprofen were quite near in both influents and effluents because of their similar rate of degradation [33]. The EFs in influents confirmed that minimal enantioselectivity occurs for this drug, administered as racemate, during human metabolism [34]. Regarding naproxen, it is administered as an enantiomerically pure formulation of (S)-naproxen due to the known hepatotoxicity of (R)-naproxen and, similar to ketoprofen, minor chiral inversion occurs during human metabolism. So, EFs for naproxen in influents were near 1. Although EFs for naproxen in effluents indicated a minor preferential degradation for the (S)-enantiomer during wastewater treatment, no significant differences were found for any of the samples analyzed compared to EFs in effluents. As it has been previously

---

[33] N.H. Hashim, R.M. Stuetz and S.J. Khan, *Chirality* 25 (2013) 301.

[34] F. Jamali, D.R. Brocks, *Clin. Pharmacokinet.* 19 (1990) 197.

reported [33], EF values for each enantiomer in influents and effluents were relatively stable parameters (e.g. independent of drug concentration).

Apparent recoveries for fortified influent and effluent samples were all in the range 97–103% that proving the suitability of the internal standards proposed to compensate for both matrix effects for ibuprofen and recoveries for naproxen and ketoprofen. Relative standard deviations for both the concentrations found and the recoveries obtained were all in the interval 0.1-7%. Figure 2 depicts, as an example, the chromatograms obtained from the analysis of an (B) influent and (C) effluent sample collected in the WWTP 2.

#### 4. CONCLUSIONS

The need for enantioselective analysis of drugs in order to understand their environmental fate has been widely recognized in the last few years as an important issue [1,2,4]. In addition, enantiomeric fractions of drugs have been proposed as useful indicators in different applications [1,4]. Most drugs are polar and consequently, LC should be the technique of choice over GC for these types of analysis.

In this manuscript, LC-MS/MS has been proposed for the first time for the simultaneous enantioselective analysis of the most ubiquitous profens in wastewater. The method detection limits obtained by LC-MS were in the same range as GC-MS [15]. The sample treatment proposed allows quick and simple microextraction of profen enantiomers while delivering accurate and precise data and extends the range of eco-friendly methods in labs.

## **Acknowledgments**

The authors gratefully acknowledge financial support from Spanish MICINN (Project CTQ2011-23849) and from the Andalusian Government (Junta de Andalucía, Spain, Project P09-FQM-5151). C. Caballo acknowledges the Andalusian CEICE for a postgraduate fellowship.

# **CAPÍTULO 2:**

## **SUELOS**







**FAST, SIMPLE AND EFFICIENT SUPRAMOLECULAR SOLVENT-BASED MICROEXTRACTION OF MECOPROP AND DICHLORPROP IN SOILS PRIOR TO THEIR ENANTIOSELECTIVE DETERMINATION BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY**

C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio

**ABSTRACT**

A simple, sensitive, rapid and economic method was developed for the quantification of enantiomers of chiral pesticides as mecoprop (MCP) and dichlorprop (DCP) in soil samples using supramolecular solvent-based microextraction (SUSME) combined with liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS). SUSME has been described for the extraction of chiral pesticides in water, but this is firstly applied to soil samples. MCP and DCP are herbicides widely used in agriculture that have two enantiomeric forms (R- and S-) differing in environmental fate and toxicity. Therefore, it is essential to have analytical methods for monitoring individual DCP and MCP enantiomers in environmental samples. MCP and DCP were extracted in a supramolecular solvent (SUPRAS) made up of dodecanoic acid aggregates, the extract was dried under a nitrogen stream, the two herbicides dissolved in acetate buffer and the aqueous extract directly injected in the LC-MS/MS system. The recoveries obtained were independent of soil composition and age of herbicide residues. The detection and quantitation limits of the developed method for the determination of R- and S-MCP and R- and S-DCP in soils were 0.03 and 0.1 ng g<sup>-1</sup>, respectively, and the precision, expressed as relative standard deviation (n=6), for enantiomer concentrations of 5 and 100 ng g<sup>-1</sup> was in the ranges 4.1-6.1% and 2.9-4.1%. Recoveries for soil samples spiked with



enantiomer concentrations within the interval 5-180 ng g<sup>-1</sup> and enantiomeric ratios (ERs) of 1, 3 and 9, ranged between 93 and 104 % with standard deviations of the percent recovery varying between 0.3 and 6.0%. Because of the SUPRAS can solubilise analytes through different type of interactions (dispersion, dipole-dipole and hydrogen bonds), it could be used to extract a great variety of pesticides (including both polar and non polar) in soils.

*Keywords:* Chiral analysis, supramolecular solvent-based microextraction, liquid chromatography/tandem mass spectrometry, mecoprop, dichlorprop, soil.

## 1. INTRODUCTION

Enantiospecificity of chiral pollutants is a key factor to consider when assessing their health and environmental risks. Pollutant enantiomers significantly differ in their environmental fate and toxicological effects [1]. They can suffer exclusive or preferential degradation and/or interconversion in the environment [2,3], and their toxicities can differ up to more than 30-fold [1,4]. Consequently, it is essential to have analytical methods able to reliably monitor individual enantiomers of chiral pollutants in the different environmental compartments.

Among chiral pollutants, pesticides are of special concern because of their widespread use and their toxicity, mutagenicity, carcinogenicity and/or endocrine disruption activity. Mecoprop (MCPP) and dichlorprop (DCPP) are chiral herbicides frequently found in environmental waters and soils [5-8]. The half-life of these pesticides in soil is from a few days to several weeks, their concentrations ranging from micrograms to nanograms per gram of soil [8]. They have harmful effects on the biotic components of soils and reduce its fertility [9], and, owing to their high water solubility, they are amenable to transport to aquatic systems by runoff and leaching of herbicide-treated soils, and therefore, there is a high risk of contaminating rivers, aquifers and other drinking water sources [8-10].

The presence of a chiral carbon atom in the aliphatic side chain of MCPP and DCPP gives two enantiomeric forms (R- and S-). Although the R-form is the

- 
- [1] J.K. Stanley, B.W. Brooks, *Integr. Environ. Assess. Manag.* 5 (2009) 364.
  - [2] C. Wong, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 544.
  - [3] T. Katagi, *J. Pestic. Sci.* 37 (2012) 1.
  - [4] Q. Zhang, C. Wang, X. Zhang, D. Jin, C. Huang, M. Zhao, *J. Environ. Monit.* 14 (2012) 465.
  - [5] P.B. Kurt-Karakus, T.F. Bidleman, D.C. Muir, J. Struger, E. Sverko, S.J. Cagampan, J.M. Small, M. Jantunen, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 1842.
  - [6] C. Díez, E. Barrado, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 1617.
  - [7] C.A. Fletcher, M.D. Scrimshaw, J.N. Lester, *Mar Pollut. Bull.* 48 (2004) 313.
  - [8] T.A. Müller, H.-P. E. Kohler, *App. Microbiol. Biotechnol.* 64 (2004) 300.
  - [9] B.K. Wadhwa, P. Singh, S. Arora, V. Sharma, in: L.M.L. Nollet, H.S. Rathore (Eds.), *Handbook of Pesticides: Methods of Pesticide Residues Analysis*, CRC Press, Boca Raton, 2010 (Chapter 22).
  - [10] J. Patsias, E.N. Papadakis, E. Papadopoulou-Mourkidou, *J. Chromatogr. A* 959 (2002) 153.

unique responsible for their herbicidal activity [11], both MCPP and DCPD are frequently produced and applied as racemic mixtures. Different degradation rates [2,8,12] and toxicities [13,14] for the R- and S-enantiomers of both herbicides have been reported.

Methods for determining MCPP and DCPD enantiomers in soils are based on gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) [15,16], liquid chromatography-ultraviolet detection (LC-UV) [17] and capillary electrophoresis-ultraviolet detection (CE-UV) [18]. A major handicap associated to the use of MS with LC or CE is the incompatibility of the mobile phases and chiral selectors commonly used in LC and CE, respectively, for chiral resolution of MCPP and DCPD. Analytes are extracted using methanol [13,17] or methanol/acetonitrile-water-acetic acid mixtures [16,18] with [17,18] or without [15,16] the assistance of ultrasounds, and extracts are cleaned-up by re-extraction in methylene chloride and concentrated by solvent evaporation. The extraction times and the volumes of organic solvent consumed for sample treatment vary within the intervals 1-2 hours and 20-150 mL, respectively, and when GC-MS is used, diazomethane [15] or boron-trifluoride [16] are employed as derivatizing reagents. So, the development of simpler sample treatment methods to speed up sample throughput and save costs is of interest.

In this article, supramolecular solvents (SUPRASS) were firstly evaluated for the microextraction of chiral pollutants in soil samples prior to their enantiomer-specific quantitation by LC-MS. SUPRASS are nanostructured liquids made up of

---

[11] L. Jin, W. Gao, I. Li, J. Ye, C. Liu, in: S. Soloneski, M.I. Larramendy (Eds.), *Herbicides, Theory and Applications*, In Tech, Rijeka, 2011 (Chapter 14).

[12] E. Romero, M.B. Matallo, A. Peña, F. Sánchez-Rasero, P. Schmitt-Kopplin, G. Dios, *Environ. Pollut.* 111 (2001) 209.

[13] Y.-Z. Wen, H. Chen, Y.-L. Yuan, D.-M. Xu, S.-D. Kang, *J. Environ. Monit.* 13 (2011) 879.

[14] T. Wu, S. Li, H. Huang, S. Zhang, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 4315.

[15] M.D. Müller, H.-R. Buser, *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997) 1953.

[16] F. Sánchez-Rasero, M.B. Matallo, G. Dios, E. Romero, A. Peña, *J. Chromatogr. A* 799 (1998) 355.

[17] J.M. Schneiderheinze, D.W. Armstrong, A. Berthod, *Chirality* 11 (1999) 330.

[18] A.W. Garrison, P. Schmitt, D. Martens, A. Kettrup, *Environ. Sci. Technol.* 30 (1996) 2449.

nanometer-sized aggregates produced through a self-assembly process [19]. They are produced from surfactant solutions by changing the temperature [20,21] or pH [22], or by addition of electrolytes [23], cosurfactants [24], amphiphilic counterions [25] or solvents [26,27]. Because of their high extraction efficiency and concentration capability, they have been largely used to extract organic compounds at low concentration levels in both liquid and solid samples [19]. In the environmental field, major applications focused on the analysis of aqueous samples [19], although methods for extracting pollutants such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) [23,28] and surfactants [29] in soils [23,28], sediments [28] and sewage sludges [28,29] has been also reported. Recently, our group has described the use of SUPRAS for the extraction of chiral herbicides in environmental waters prior to LC-MS [30].

The SUPRAS used in this work to extract MCP and DCP enantiomers in soils consisted of three-dimensional aggregates of dodecanoic acid (DoA). The effect of experimental variables used for SUPRAS synthesis on the composition of the solvent was investigated, and the factors affecting the extraction efficiency of the target analytes and the cleanliness of extracts were optimized. The quality parameters of the developed method were assessed and both fresh and aged spiked samples of soils with variable organic matter content, pH and granulometric composition were analyzed.

- 
- [19] A. Ballesteros-Gómez, M.D. Sicilia, S. Rubio, *Anal. Chim. Acta* 677 (2010) 108.  
[20] W.L. Hinze, E. Pramauro, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 24 (1993) 133.  
[21] T. Saitoh, W.L. Hinze, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2520.  
[22] I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4519.  
[23] C. F. Li, J.W.C. Wong, C.W. Huie, M.W.F. Choi, *J. Chromatogr. A* 1214 (2008) 11.  
[24] X. Jin, M. Zhu, E.D. Conte, *Anal. Chem.* 71 (1999) 514.  
[25] F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 78 (2006) 7229.  
[26] F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7473.  
[27] A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, *Anal. Chem.* 84 (2012) 342.  
[28] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatography A* 962 (2002) 1.  
[29] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatography A* 998 (2003) 143.  
[30] C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio, *Anal. Chim. Acta* 761 (2013) 102.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1 CHEMICALS

All chemical were of analytical reagent-grade and were used as supplied. Dodecanoic acid (DoA), racemic mecoprop (R/S-MCPP, 99.6% purity) and dichlorprop (R/S-DCPP, 99.9% purity), and the pure enantiomers R-MCPP (99.9% purity) and R-DCPP (99.9% purity) were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Standard solutions ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) of R/S-MCPP and R/S-DCPP were prepared in methanol and stored under dark conditions at  $4^{\circ}\text{C}$ . They were stable for at least 2 months. Deuterated R/S-MCPP ( $\text{D}_6$ , ring  $\text{D}_3$ , methyl  $\text{D}_3$ ) and R/S-DCPP ( $\text{D}_6$ , ring  $\text{D}_3$ , 3,3,3- $\text{D}_3$ ), used as internal standards (ISs), were supplied by Dr Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) as racemic solutions of  $100 \text{ mg L}^{-1}$  ( $\text{D}_6$ -R/S-MCPP in acetonitrile and  $\text{D}_6$ -R/S-DCPP in acetone; purity = 98.5%). Working solutions containing mixtures of the target analytes ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  of each enantiomer) were prepared weekly in 100 mM acetate buffer at pH 5.0 and those containing mixtures of the ISs ( $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  of each enantiomer) were prepared in both methanol and 100 mM acetate buffer at pH 5.0. Methanolic IS solutions were used to spike soils before their analysis and the aqueous ones for preparing calibration standards. Tetrahydrofuran (THF), hydrochloric and acetic acid, ammonia, formic acid and sodium acetate were purchased from Panreac (Barcelona, Spain) and LC-grade methanol from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Ultra-high-quality water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Madrid, Spain).

### 2.2. APPARATUS

The LC-MS system used was a hybrid triple quadrupole/linear ion trap Applied Biosystems MSD Sciex 4000QTRAP (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) coupled to a liquid chromatograph Agilent HP 1200 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) with a TurboIonSpray (TIS) interface. All data were acquired and processed using Analyst 1.5.1 Software. MCPP and DCPP enantiomers were separated on a chiral column Nucleodex  $\alpha$ -PM (alpha cyclodextrin

permethylated stationary-phase, 200 mm×4.0 mm, 5 µm) from Macherey-Nagel (Düren, Germany). A magnetic stirrer Basicmagmix from Ovan (Barcelona, Spain) and a digitally regulated centrifuge Mixtasel equipped with an angle rotor 4x100 mL from JP-Selecta (Abrera, Spain) were used for SUPRAS production. A multi-position magnetic stirrer RO 10 power IKAMAG<sup>®</sup> from IKA<sup>®</sup>-Werke GmbH & Co. KG. (Staufen, Germany), a vortex-shaker REAX Top equipped with an attachment for 10 microtubes from Heidolph (Schwabach, Germany) and a high speed brushless centrifuge MPW-350 R equipped with an angle rotor 36x2.2/1.5 mL from MPW Med-Instruments (Warschaw, Poland), were used for sample treatment.

### 2.3. EXTRACTION EFFICIENCY STUDIES

The effect of experimental variables on the efficiency of the microextraction of the racemic herbicides from soil was assessed by extracting 200-1.200 mg of a sandy loam soil containing 3.8% organic matter (sample A in Table 1) spiked with 100 ng g<sup>-1</sup> of racemic MCPP and DCPP, and determining the recoveries and the method quantitation limits for the R- and S-enantiomers of both pesticides. Method quantitation limits (MQLs) were calculated from the equation:  $MQL = (100/R) \text{ SSR BSR IQL}$ , where R is the recovery obtained in the SUPRAS-based microextraction, SSR the sample amount/SUPRAS volume ratio, BSR the acetate buffer volume/SUPRAS volume ratio used in the back-extraction step (see Section 2.4.3) and IQL the instrumental quantitation limit for the herbicides (0.05 ng mL<sup>-1</sup>). The variables investigated were composition and volume of SUPRAS, sample amount, temperature, time for vortex-shake and centrifugation and rotation rate. The influence of experimental variables on the amount of humic substances extracted in the SUPRAS as well as the effect of the time of contact between the analytes and the soil samples on extraction yields was also studied. Experiments were made in triplicate.

**Table 1**

Physic-chemical properties of the soils tested.

Soil sample	Organic matter (%)	pH	Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)	Textural Class <sup>a</sup>
A	3.8	6.1	73	15	12	Sandy loam
B	1.3	7.9	58	13	29	Sandy clay loam
C	1.2	7.8	18	16	66	Clay
D	0.9	6.4	68	7	25	Sandy clay loam
E	0.8	7.9	10	44	46	Silty clay
F	0.5	7.0	80	6	14	Sandy loam

<sup>a</sup>USDA/FAO classification system [United States Department of Agriculture (USDA). Soil survey manual. U.S. Dept. Agriculture Handbook No. 18 (1951) Washington, DC. Food and Agriculture Organization (FAO). Guidelines for soil description, 3<sup>rd</sup> edn. FAO/ISRIC (1990) Rome]

## 2.4. ENANTIOMER-SPECIFIC QUANTITATION OF MCPP AND DCCP IN SOILS

### 2.4.1. Collection, fortification and preservation of soil samples

Soil samples with variable organic matter content, pH and granulometric composition (Table 1) were taken from six different places in the province of Córdoba (Spain) from 0 to 20 cm in depth. After air-drying at room temperature, the samples were passed through a 2 mm sieve and stored at 4 °C under light protection until analysis.

Fortified samples were prepared by adding 50 µL per 100 mg of dried and sieved soil of a methanolic standard solution containing the racemic herbicides or a mixture of both racemic and pure R-herbicides. Enantiomer concentrations in samples were in the interval 0.1-900 ng g<sup>-1</sup> and enantiomeric ratios (ER, defined as the molar ratio of R to S enantiomers) were 1, 3 or 9. After standing at room

temperature for 24 h, fortified samples were analysed (fresh spiked samples) or stored under dark conditions at 4°C for 3 or 6 months (aged spiked samples). Analyses were made in triplicate.

#### 2.4.2. Supramolecular solvent production

The following procedure, which permits to obtain a SUPRAS volume (~ 11 mL) able to treat 18 soil samples, was routinely followed. DoA (6.4 g) was dissolved in THF (12 mL) at room temperature in a 100 mL-glass centrifuge tube. Then, 68 mL of a 10 mM hydrochloric acid aqueous solution were added. After sealing the tube with parafilm to avoid THF evaporation, the mixture was magnetically stirred for 5 min at 900 rpm, time in which the SUPRAS spontaneously formed into the bulk solution. Then, the suspension was centrifuged at 3.500 rpm for 10 min to accelerate the separation of two liquid phases; namely the SUPRAS and a DoA-poor hydroorganic solution. Next, the SUPRAS, which is less dense than the hydroorganic solution, was withdrawn using a 20 mL-glass syringe, transferred to a hermetically closed storage glass vial to avoid THF losses and stored at 4 °C. Under these conditions the solvent produced was stable for at least one month.

#### 2.4.3. Microextraction in SUPRAS

About 800 mg of dry soil sample spiked with 120 µL of a IS standard solution containing 0.2 mg L<sup>-1</sup> of racemic D<sub>6</sub>-R/S-MCPP and D<sub>6</sub>-R/S-DCPP (15 ng g<sup>-1</sup> of each IS enantiomer), and 600 µL of SUPRAS were mixed in a 2 mL-microtube Safe-Lock from Eppendorf Ibérica (Madrid, Spain). Four glass balls (3 mm diameter) were introduced in the microtube to favour sample dispersion during extraction, which was made by vortex-shaken at 2.500 rpm for 5 min. Then, the mixture, thermostated at 20 °C, was centrifuged at 7.000 rpm for 5 min. The volume of extract obtained after centrifugation was about 400 µL.

#### 2.4.4. DoA removal

Aliquots of 200 µL of extracts were withdrawn using a microsyringe, transferred to 2 mL-microtubes and dried under nitrogen stream and magnetic



stirring. The use of a multi-position magnetic stirrer and a glass manifold with six outlets (Pobel, Madrid, Spain) connected to the nitrogen supply permitted to simultaneously dry six extracts. After drying, 400  $\mu\text{L}$  of 100 mM acetate buffer at pH 5.0 were added to the microtube, and the mixture was vortex-shaken for 5 min at 2.500 rpm to guarantee the total dissolution of the target analytes. The aqueous extract containing the analytes was separated from solid DoA and water-insoluble sample matrix components by centrifugation at 15.000 rpm for 10 min. Finally, an aliquot of the supernatant was withdrawn with a microsyringe, filtered through a 0.5  $\mu\text{m}$  PTFE filter, transferred to an autosampler vial and injected (40  $\mu\text{L}$ ) in the liquid chromatographic system.

#### **2.4.5. Separation and quantitation of MCPP and DCPD enantiomers**

The R- and S-enantiomers of both MCPP and DCPD were separated by chiral LC and quantified by tandem mass spectrometry (MS/MS). The mobile phase consisted of 65% methanol and 35% 100 mM formic acid/ammonium formate (pH 4.0). The flow rate was 0.5  $\text{mL min}^{-1}$ , the stationary-phase column temperature was 25°C and the injection volume 40  $\mu\text{L}$ . The diversion valve was programmed to send the eluted components to the ionization source at run times in the interval 6.0-12.0 min. At times out of this interval, the mobile phase was sent to waste. MCPP and DCPD enantiomers were identified and quantified in a mass spectrometer equipped with a TurboIonSpray (TIS, a variant of electrospray) source operating in the negative ion mode and a hybrid triple quadrupole/linear ion trap analyzer operating in the selected reaction monitoring (SRM) mode. The transitions ( $m/z$ ) recorded were 213 $\rightarrow$ 141 (quantifier ion) and 213 $\rightarrow$ 71 (qualifier ion) for MCPP, and 233 $\rightarrow$ 161 (quantifier ion) and 233 $\rightarrow$ 125 (qualifier ion) for DCPD. Deuterated MCPP and DCPD used as ISs were monitored at the  $m/z$  219 $\rightarrow$ 147 and 239 $\rightarrow$ 164 transitions, respectively. The TIS source and analyzer conditions were optimized to obtain the highest relative intensity. The TIS source values were as follows: curtain gas, 30 psi; nebulizer gas, 40 psi; turbo gas, 50 psi; temperature of the turbo gas, 600 °C; ion spray voltage, -2.000 V; entrance potential, -10 V; and declustering potential, -50 V for the target analytes, and -60 V and -30 V for deuterated MCPP and DCPD,

respectively. The analyzer settings were as follows: 1.0 unit resolution for the first and third quadrupoles; collision gas,  $3.0 \times 10^{-5}$  Torr; collision energy, -18, -16, -16, -40, -18 and -20 V; and collision cell exit potential, -11, -3, -7, -9, -9, and -1 V for the transitions 213→141, 213→71, 233→161, 233→125, 219→147 and 234→164, respectively. Calibration curves were constructed from standard solutions in 100 mM acetate buffer at pH 5.0 containing the target analytes over the ranges stated in Table 2 and constant concentrations of ISs ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$  of each enantiomer). The concentration of the target analytes in the extract were calculated from calibration curves obtained by plotting peak area ratios ( $A/A_{\text{IS}}$ ;  $A$  = peak area of individual enantiomers and  $A_{\text{IS}}$  = peak area of the corresponding IS) versus the concentration of herbicide injected.

**Table 2**

Figures of merit obtained for the determination of MCPP and DCPP enantiomers by LC(ESI)-QQQ-MS/MS

Herbicide enantiomer	Retention time (min)	Calibration parameters				
		Linear concentration range (ng)	Slope $\pm$ s ( $\text{ng}^{-1}$ )	Intercept $\pm$ s	$r^b$	$S_{x/y}^c$
R-MCPP	8.8	0.002 <sup>a</sup> -20	$3.88 \pm 0.03$	$0.004 \pm 0.004$	0.9998	0.18
S-MCPP	11.2	0.002 <sup>a</sup> -20	$3.87 \pm 0.03$	$0.005 \pm 0.005$	0.9997	0.23
R-DCPP	7.4	0.002 <sup>a</sup> -20	$8.25 \pm 0.07$	$0.01 \pm 0.01$	0.9996	0.55
S-DCPP	9.3	0.002 <sup>a</sup> -20	$8.25 \pm 0.07$	$0.01 \pm 0.01$	0.9997	0.49

<sup>a</sup>Instrumental quantitation limit calculated by using a signal-to-noise ratio of 10

<sup>b</sup>Correlation coefficient,  $n=9$

<sup>c</sup>Standard error of the estimate

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. MICROEXTRACTION OF MCPP AND DCPD IN SOIL

##### 3.1.1. Synthesis, composition and binding capability of the DoA-based SUPRAS

The SUPRAS used to extract MCPP and DCPD in soils was synthesized by mixing DoA, THF and water at appropriate proportions (Fig. 1). The addition of water to solutions of DoA in THF caused the spontaneous formation of oily droplets that through a process of contact and adhesion form droplet conglomerates with a density lower than that of the solution in which they were generated. Droplet conglomerates separated from the bulk solution as an immiscible liquid (i.e. the SUPRAS). This coacervation process only occurred from the non-ionic form of DoA ( $pK_a = 4.8 \pm 0.8$ ), and therefore, the pH of the aqueous solution employed in the synthesis should be equal or lower than 4.

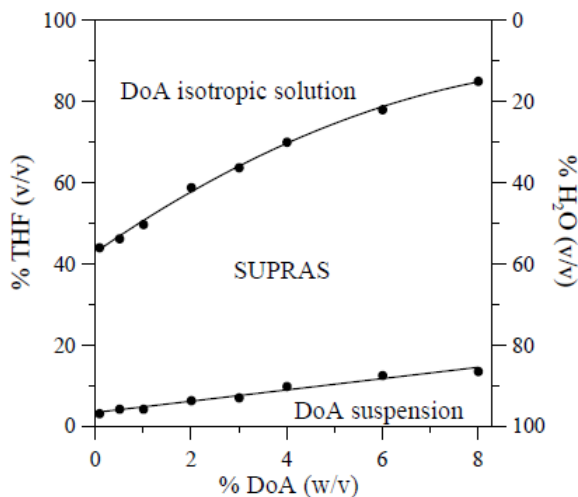


Fig. 1. Diagram of phase boundaries for ternary mixtures of dodecanoic acid, tetrahydrofuran and water obtained at pH = 2 and room temperature.

Both the volume of SUPRAS generated (Fig. 2A) and the concentration of DoA in the SUPRAS (Fig. 2B) depend on the THF and DoA concentrations used to produce it. Fig. 2 shows the results obtained at DoA concentrations of 1 and 8 %, (w/v) and THF percentages in the range 10-60% (v/v). The amount of THF and aqueous solution incorporated in the SUPRAS increased as the concentration of THF in the bulk solution did which resulted in a higher solvent volume (Fig. 2A) and a lower DoA content in the solvent (Fig. 2B). The volume of solvent also augmented with the amount of DoA employed in the synthesis (Fig. 2A), but the effect of this variable on the concentration of DoA in the SUPRAS was solely observed at THF percentages above 20% (v/v).

The pH used in the synthesis determined the concentration of hydrogen ions in the aqueous pool inside the reverse DoA aggregates making up of the SUPRAS. No changes in solvent volume or biosurfactant content were observed by varying the pH within the interval 1-4.

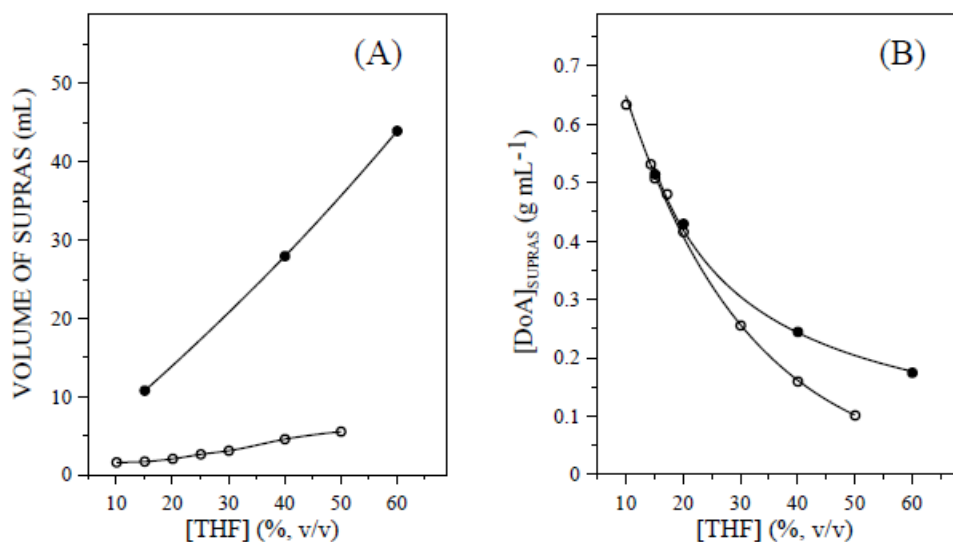


Fig. 2. Variation of (A) the volume of supramolecular solvent obtained and (B) the concentration of dodecanoic acid in the solvent as a function of the percentages of tetrahydrofuran and dodecanoic acid used to synthesize it. Percentages of dodecanoic acid: (○) 1.0 % (w/v) and (●) 8.0 % (w/v). pH = 2. Total water + THF volume = 80 mL.

The SUPRAS proposed in this study, can solubilise the target analytes through different type of interactions, namely hydrogen bonds between the oxy/carboxylic groups of MCPP and DCPD and the carboxylic groups of DoA and dispersion interactions between the hydrophobic moieties of the herbicides and the hydrocarbon chain of DoA. Taking into account the high number of solubilisation sites in the solvent provided by the high concentration of amphiphile (0.1-0.65 g mL<sup>-1</sup>, see Fig. 2B), it is reasonable to expect that the SUPRAS permits to effectively extract the target analytes from soil samples.

### **3.1.2. Factors affecting microextraction efficiency**

The influence of SUPRAS composition on both the extraction efficiency of MCPP and DCPD in soil and cleanliness of the extracts was studied using 800 mg-soil samples and 600 µL of SUPRASs generated in solutions containing different DoA (1-8%, w/v) and THF (15-60 %, v/v) concentrations, and variable pHs (1-4). Because MCPP and DCPD have similar polarity (log K<sub>o/w</sub>, 3.1 and 3.4 respectively) and hydrogen bonds formation capability [both contain the same number of hydrogen donors (1) and acceptors (3)], recoveries obtained for both herbicides were practically equal under the different conditions used for extraction. Although solvent composition did not influence the extraction yields obtained for the target analytes, it strongly affected the amount of humic substances extracted from soils. The higher the THF and water amounts in the solvent, the higher the organic matter amount in extracts. This behaviour was similar to that previously reported for alkanol-based SUPRASs [27], which was explained on the basis of the different aqueous core size of the reverse aggregates making up the SUPRAS as a function of the THF/water ratio in the bulk solution where the SUPRAS was synthesized. The dodecanoic acid-based SUPRAS providing the extract with the lowest humic substance content was that produced from solutions containing 15% (v/v) THF, independent of the percentage of DoA and the pH employed in its synthesis; so, it was selected for further studies.

**Table 3**  
 Mean recoveries and method quantitation limits obtained for MCPP and DCPD enantiomers as a function of the volume of SUPRAS and the amount of sample used for analysis

Variable	SUPRAS volumen/ amount ratio (µL/mg)	Recovery ± s <sup>a</sup> (%)				MQL (ng g <sup>-1</sup> )			
		R-MCPP	S-MCPP	R-DCPP	S-DCPP	R-MCPP	S-MCPP	R-DCPP	S-DCPP
SUPRAS volume (µL)									
400	0.5	73 ± 1	69 ± 1	70 ± 1	72 ± 1	0.07	0.07	0.07	0.07
600	0.75	80 ± 2	78 ± 2	80 ± 2	81 ± 3	0.09	0.10	0.09	0.09
800	1	80 ± 1	81 ± 1	80 ± 1	81 ± 1	0.13	0.12	0.13	0.12
1000	1.25	81 ± 2	79 ± 1	81 ± 1	81 ± 2	0.15	0.16	0.15	0.15
1200	1.5	80 ± 3	80 ± 3	82 ± 2	83 ± 3	0.19	0.19	0.18	0.18
Sample amount (mg)									
(600 µL of SUPRAS)									
1200	0.5	69 ± 3	68 ± 3	66 ± 2	69 ± 1	0.07	0.07	0.08	0.07
800	0.75	80 ± 2	78 ± 2	80 ± 2	81 ± 3	0.09	0.10	0.09	0.09
600	1	78 ± 2	79 ± 3	77 ± 2	76 ± 2	0.13	0.13	0.13	0.13
400	1.5	80 ± 2	81 ± 2	77 ± 1	80 ± 1	0.19	0.19	0.19	0.19
200	3.0	80 ± 2	78 ± 1	79 ± 1	80 ± 1	0.38	0.38	0.38	0.38

<sup>a</sup> Standard deviation, n=3

Table 3 shows the recoveries and MQLs obtained for the target analytes employing variable volumes of SUPRAS and sample amounts. Recoveries nearly 80% and independent of both solvent volume and sample amount were obtained at solvent volume/sample amount ratios equal and higher than 0.75. To obtain maximum recoveries and minimum MQLs, it is recommended to extract 800-mg samples with 600  $\mu$ L of SUPRAS.

Extractions at a controlled temperature were performed using a shaking incubator VorTemp™ 1550 (Labnet, Edison, NJ, USA) at 900 rpm (extraction time = 10 min). No effect of the temperature on recoveries was observed over the interval 25-60 °C, probably because these experimental conditions were not intensive enough to extract the herbicide fraction more strongly adsorbed on soil particles (bound residues [31]). At temperatures higher than the boiling point of THF (66°C), DoA precipitated as a result of the reduction of the amount of organic solvent in the SUPRAS. To our knowledge, microwave assisted solvent extraction (MASE) at 80°C has been the only approach reported to quantitatively extract phenoxyacid herbicides in soils [10], recoveries decreasing to 80-87% when conventional methods as repetitive or Soxhlet extraction were employed [16,32].

By using vortex shaking-assisted extraction (vibration motion= 2.500 rpm), a time of 5 min was required to reach equilibrium conditions. Recoveries diminished at lower extraction times (e.g. they were  $68\pm 3$ ,  $67\pm 4$ ,  $68\pm 4$  and  $65\pm 4\%$  for R-MCPP, S-MCPP, R-DCPP and S-DCPP, respectively after 2 min of extraction). Effective separation of sample particles from SUPRAS extracts was reached after centrifugation at 7.000 rpm for 5 min.

Increasing the time of contact between the target herbicides and soil has been reported to decrease extraction efficiencies [10, 32,33] owing to an increase in the pesticide-soil bond strength, this effect being more pronounced for organic matter rich soils [10,33]. For instance, extraction yields obtained for MCPP by MASE

---

[31] B. Gevao, K.T. Semple, K.C. Jones, *Environ. Poll.* 108 (2000) 3.

[32] P. Parrilla, P. Kaim, E.A. Hogendoorn, *Fresenius J. Anal. Chem.* 363 (1999) 77.

[33] E.A. Hogendoorn, R. Huls, E. Dijkman, R. Hoogerbrugge, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 23.

in samples stored 120 days at 4°C decreased around 12% and 44% for soils with low (i.e. 0.3%) and high (i.e. 10.4%) organic matter content, respectively [33]. Also recoveries for DCPD in soils containing 3.5% of organic matter were reduced by 8% in 30 days [10]. To check whether ageing the fortified soils influenced extraction yields obtained by SUSME, soil samples containing 1.2 and 3.8% organic matter (samples C and A in Table 1, respectively) were spiked at three concentration levels (10, 100 and 500 ng g<sup>-1</sup> of racemic MCPD and DCPD) and the fortified samples were stored in the refrigerator until analysis in order to inhibit soil microbial action and thus prevent herbicide degradation. Aliquots of these samples were analysed 1, 90 and 180 days after the spiking following the procedure specified in Section 2.4.1. No effect of the time of contact on the extraction yields obtained was observed (e.g. the recoveries obtained by extracting the 3.8% organic matter soil spiked with 250 ng g<sup>-1</sup> of each enantiomer after 1, 90 and 180 days were 80±2, 77±3 and 80±1 for R-MCPD, 78±2, 78±1 and 79±2 for S-MCPD, 80±2, 78±1 and 78±3 for R-DCPD, and 81±3, 78±2 and 78±2 for S-DCPD).

## 3.2. ANALYTICAL PERFORMANCE

### 3.2.1. Sample representativity

To evaluate the representativity of the amount of soil sample used for analysis, the variances obtained for the measurement of R- and S-MCPD and R- and S-DCPD in 800-mg soil subsamples fortified with 100 ng g<sup>-1</sup> of each analyte were compared with those obtained from the measurement of 800-mg aliquots taken from a 50 g soil sample spiked at the same concentration level. No statistically significant differences between both variances were observed by applying a Fisher test [34]. The experimental F-values were in the interval 1.04-1.75 and were below the critical F-value (5.05, n<sub>1</sub> = n<sub>2</sub> = 6, significant level = 0.05).

---

[34] J.N. Miller, J.C. Miller Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry (fifth ed.) Pearson Education, Harlow (2005) pp. 49.



### 3.2.2. Linearity and sensitivity

Calibration curves for the target analytes were run using standard solutions in 100 mM acetate buffer at pH 5. Labelled herbicides [deuterated R/S-MCPP ( $D_6$ , ring  $D_3$ , methyl  $D_3$ ) and R/S-DCPP ( $D_6$ , ring  $D_3$ , 3,3,3- $D_3$ )] used as ISs were added to soil samples before extraction to control the performance of both analyte microextraction and MS detection. Calibration parameters and retention times obtained for R- and S-MCPP and R- and S-DCPP are shown in Table 2. The linear range for calibration curves was confirmed by visual inspection of the plot residuals versus analyte amount [35]. The number of positive residuals was approximately equal to that of negative ones and both positive and negative residuals were randomly scattered around the average residual value.

The quantitation (MQLs) and detection (MDLs) limits of the method were estimated from calibration curves using peak areas 10 and 3 times higher than noise, respectively. The noise at the retention time of each analyte was measured from twelve independent complete analyses (experimental procedure in Section 2.4) of 800 mg-soil samples (six aliquots of sample A and six of sample C) containing no MCPP or DCPD at detectable concentration levels. No significant differences in the noise measured for the two types of soils were observed. The MQL obtained for the four enantiomers tested was  $0.1 \text{ ng g}^{-1}$  and their MDL  $0.03 \text{ ng g}^{-1}$ .

### 3.2.3. Accuracy

The accuracy of the method was assessed by comparison of the slopes of the calibration curves obtained for the target enantiomers from standards in acetate buffer with those obtained from soil samples fortified with known amounts of racemic MCPP and DCPD ( $0.2\text{-}1500 \text{ ng g}^{-1}$ ), and run using the whole procedure. No statistically significant differences between the slopes obtained from standards and

---

[35] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. de Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A. Data Handling in Science and Technology Series, Vol. 20A. Elsevier, Amsterdam, 1997, p. 179.

those obtained from the samples were observed by applying a Student's t test [36]. For example, the slopes and correlation coefficients ( $n = 9$ ) obtained from the soil sample A for R-MCPP, S-MCPP, R-DCPP and S-DCPP were  $3.87 \pm 0.03 \text{ ng}^{-1}$ , 0.9997;  $3.87 \pm 0.05 \text{ ng}^{-1}$ , 0.994;  $8.18 \pm 0.07 \text{ ng}^{-1}$ , 0.9998 and  $8.21 \pm 0.07 \text{ ng}^{-1}$ , 0.9994, respectively and those obtained for standard in acetate buffer  $3.88 \pm 0.03 \text{ ng}^{-1}$ ;  $3.87 \pm 0.03 \text{ ng}^{-1}$ ;  $8.25 \pm 0.07 \text{ ng}^{-1}$  and  $8.25 \pm 0.07 \text{ ng}^{-1}$ . The experimental t-values were in the interval 0.07-0.64 and were below the critical t-value (2.98, significant level = 0.01).

#### 3.2.4. Precision

The precision was evaluated by analysing independent soil samples spiked with racemic MCPP and DCPP at two concentration levels: 10 and 200  $\text{ng g}^{-1}$  of each herbicide. The relative standard deviations ( $n=6$ ) obtained varied within the intervals 4.1–6.1% and 2.9–4.1%, respectively.

### 3.3 ANALYSIS OF SOILS SAMPLES

The proposed method was used for determining MCPP and DCPP enantiomers in both non-spiked and spiked soil samples. Racemic MCPP and DCPP, and both racemic and pure R-herbicides were added to soil samples to obtain concentrations of the S- and R-enantiomers of the herbicides within the interval 5–100  $\text{ng g}^{-1}$  and 5–180  $\text{ng g}^{-1}$ , respectively, and ERs of 1, 3 and 9. No analytes were detected in the non-spiked samples. Results obtained for spiked samples are listed in Table 4. Recoveries ranged in the intervals 93-102% for R-MCPP, 94-104% for S-MCPP, 94-102% for R-DCPP and 94-103% for S-DCPP with standard deviations of the percent recovery varying between 0.3 and 6. No significant differences between calculated and determined ERs were observed. Figure 3 shows the

---

[36] L. Cuadros, A.M. García, F. Alés, C. Jiménez, M. Román, J. AOAC Int. 78 (1995) 471.

chromatograms obtained from a standard solution (A) and a fortified soil sample (B).

Table 4

Recovery and enantiomeric ratio (ER) of MCPP and DCPD from spiked soil samples

Soil samples	Concentration added (ng g <sup>-1</sup> )				ER calculated		Recovery <sup>a</sup> ± s <sup>b</sup> (%)				ER determined <sup>a</sup> ± s <sup>b</sup>	
	R- MCPP	S- MCPP	R- DCPD	S- DCPD	MCPP	DCPD	R- MCPP	S- MCPP	R- DCPD	S- DCPD	MCPP	DCPD
A	5	5	5	5	1	1	99 ± 5	97 ± 4	100 ± 6	100 ± 5	1.01 ± 0.07	1.00 ± 0.08
	100	100	100	100	1	1	99 ± 2	99 ± 4	96 ± 2	96 ± 3	1.00 ± 0.05	1.01 ± 0.05
B	5	5	5	5	1	1	99.0 ± 0.5	96 ± 2	1.02 ± 1	97 ± 6	1.03 ± 0.07	1.05 ± 0.06
	100	100	100	100	1	1	96 ± 1	94 ± 1	97 ± 1	99.0 ± 0.4	1.02 ± 0.02	1.00 ± 0.03
C	180	20	180	20	9	9	93.0 ± 0.3	95 ± 2	94 ± 3	94 ± 1	8.9 ± 0.2	9.0 ± 0.3
	150	50	150	50	3	3	99 ± 4	97 ± 2	95 ± 2	100 ± 5	3.1 ± 0.2	2.9 ± 0.2
D	5	5	5	5	1	1	99 ± 2	96 ± 1	96 ± 4	96 ± 3	1.03 ± 0.03	1.00 ± 0.05
	100	100	100	100	1	1	98.9 ± 0.5	100 ± 3	97 ± 2	102 ± 1	0.98 ± 0.03	0.98 ± 0.04
E	5	5	5	5	1	1	97 ± 1	95 ± 1	100 ± 3	97.3 ± 0.8	1.02 ± 0.03	1.02 ± 0.03
	100	100	100	100	1	1	96 ± 4	104 ± 1	101 ± 3	99 ± 3	0.98 ± 0.02	1.03 ± 0.05
F	5	5	5	5	1	1	97 ± 3	95 ± 6	95 ± 5	94 ± 2	1.02 ± 0.07	1.01 ± 0.06
	100	100	100	100	1	1	98 ± 3	96 ± 2	94 ± 3	94.9 ± 0.5	1.01 ± 0.04	1.00 ± 0.03
F	5	5	5	5	1	1	102 ± 3	97 ± 3	98 ± 6	96 ± 3	1.05 ± 0.05	1.03 ± 0.06
	100	100	100	100	1	1	100 ± 6	101 ± 1	100 ± 6	103 ± 1	0.99 ± 0.06	0.98 ± 0.06

<sup>a</sup>Mean of three independent determination.

<sup>b</sup>Standard deviation.

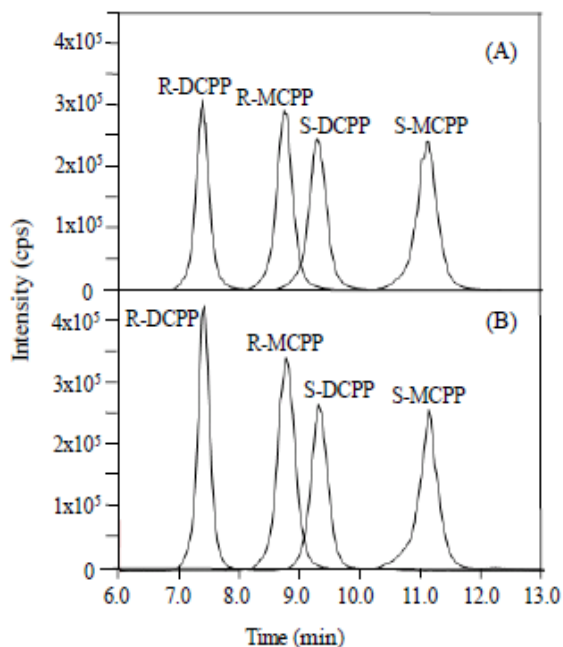


Fig. 3. LC-MS/MS selected ion chromatograms obtained from (A) a standard solution containing  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  of each enantiomer and (B) 800 mg of soil sample containing 3.8% organic matter (sample A in Table 1) and R/S-MCPP and R/S-DCPP at  $100 \text{ ng g}^{-1}$ .

#### 4. CONCLUSIONS

The combination of supramolecular solvent-based microextraction (SUSME) and LC-MS/MS is a valuable approach for determining enantiomers of MCPP and DCPP in soils. Because of its efficiency, simplicity, rapidity and low organic solvent consumption ( $0.65 \mu\text{L}$  of THF in the synthesis of the SUPRAS per soil sample analyzed) SUSME can be considered an outstanding alternative to the use of organic solvents in this type of applications. In contrast to previously reported methods [10,32,33], SUSME provides recoveries independent of the age of herbicide residues. Both the wide variety of interactions that SUPRASs can establish with analytes (i.e.

hydrogen bonds, dipole-dipole, dispersion, etc) and the high concentration of amphiphiles they contain, make these solvents efficient extractants of contaminants from solid samples using very low volumes. So, they have the potential to extract traces amount in soil without the need for solvent evaporation.

### **Acknowledgments**

The authors gratefully acknowledge financial support from Spanish MICINN (Project CTQ2011-23849) and from the Andalusian Government (Junta de Andalucía, Spain, Project P09-FQM-5151). FEDER also provided additional funding. C. Caballo acknowledges the Andalusian CICyE for a postgraduate fellowship.

# **CAPÍTULO 3:**

## **MUESTRAS BIOLÓGICAS**





Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, submitted for publication



## ENANTIOSELECTIVE ANALYSIS OF PROFENS IN FRESHWATER FISH BASED ON MICROEXTRACTION WITH A NANOSTRUCTURED LIQUID AND CHIRAL LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY

C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio

### ABSTRACT

Toxicity of pharmaceuticals to aquatic biota is still largely unknown and no research on the stereoselective toxicity of chiral drugs to these organisms has been undertaken to date. Because of the lack of analytical methods available for this purpose, this manuscript deals, for the first time, with the enantioselective analysis of profens (i.e. ibuprofen, naproxen and ketoprofen) in freshwater fish. The method was based on the microextraction of profens from fish muscle with a nanostructured liquid made up of inverted hexagonal aggregates of decanoic acid, their enantiomeric separation by liquid chromatography onto a (R)-1-naphthylglycine and 3,5-dinitrobenzoic acid stationary phase and quantification by tandem mass spectrometry. Method quantitation limits (MQLs) for profen enantiomers were in the range 1.7-3.3 ng g<sup>-1</sup> which permits to study their bioconcentration in fish exposed at both low and high concentration levels. Absolute recoveries were in the range 97-104% that indicating the high extraction efficiency of the nanostructured solvent. Extraction equilibrium conditions were reached after 10 min which permitted fast sample treatment. Relative standard deviations for enantiomers in fish muscle were always below 6%. Isotopically labelled internal standards were used to compensate for matrix interferences. The method was validated by application to five fish species living in freshwater (e.g. *Oncorhynchus mykiss*, *Alburnus alburnus*, *Lepomis gibbosus*, *Micropterus salmoides* and *Cyprinus carpio*). The results confirmed that the method meets



the analytical and operational features required in studies intended to evaluate the stereoselective toxicity of profens in aquatic organisms.

*Keywords:* Chiral analysis, supramolecular solvent-based microextraction, liquid chromatography/tandem mass spectrometry, ibuprofen, ketoprofen, naproxen, freshwater fishes.

## 1. INTRODUCCIÓN

Information on the toxicity of pharmaceuticals to biota is still scarce [1] and mostly inaccurate [2]. Lack of toxicological data are partly due to the still unresolved analytical challenges associated with the complexity of quantifying pharmaceuticals in biological matrices, which demand for exhaustive sample treatments and highly sensitive and selective detection techniques [1]. Inaccuracy of toxicological data mainly arises from the fact that enantioselective analysis of chiral drugs, which represent around 56% of the pharmaceuticals currently in use, has been overlooked, that leading to under or overestimation of environmental risk [2].

Exposure of biota to pharmaceuticals mainly occurs in rivers, lakes and coastal waters that receive discharge from wastewater treatment plants. Concentration of pharmaceuticals in such surface waters are usually in the range from  $\text{ng L}^{-1}$  to  $\mu\text{g L}^{-1}$  [3] and an increasing body of literature indicates their accumulation in wild-caught fish population at  $\text{ng g}^{-1}$  concentration [4-10]. There is growing concern about the effects of pharmaceuticals to aquatic organisms because of both their inherent biological activity and pseudo-persistence (i.e. environmental dissipation rates are exceeded by introduction rates from effluent loadings).

The interest in secondary effects of pharmaceuticals on biota imparts a sense of emergency to research focused on understanding uptake, metabolism, elimination

---

[1] B. Huerta, S. Rodríguez-Mozaz, D. Barceló, *Anal Bioanal Chem* 404 (2012) 2611.

[2] B. Kasprzyk-Hordern, *Chem Soc Rev* 39 (2010) 4466.

[3] J.N. Brown, N. Paxéus, L. Förlin, D.G.J. Larsson, *Environ Toxicol Pharmacol* 24 (2007) 267.

[4] J.M. Brozinski, M. Lahti, A. Meierjohann, A. Oikari, L. Kronberg, *Environ Sci Technol* 47 (2013) 342.

[5] R.J.B. Peters, Y.J.C. Bolck, A.A.M. Stolker, M.W.F. Nielen, *J Chromatogr A* 1216 (2009) 8206.

[6] R. Cueva-Mestanza, M.E. Torres-Padrón, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, *Biomed Chromatogr* 22 (2008) 1115.

[7] A.J. Ramirez, M.A. Mottaleb, B.W. Brooks, C.K. Chambliss, *Anal Chem* 79 (2007) 3155

[8] A.J. Ramirez, R.A. Brain, S. Usenko, M.A. Mottaleb, J.G. O'Donnell, L.L. Stahl, J.B. Wathen, B.D. Snyder, J.L. Pitt, P. Perez-Hurtado, L.L. Dobbins, B.W. Brook, C.K. Chambliss, *Environ Toxicol Chem* 28 (2009) 2587.

[9] B. Huerta, A. Jakimska, M. Gros, S. Rodríguez-Mozaz, D. Barceló, *J Chromatogr A* 1288 (2013) 63.

[10] A. Azzouz, B. Souhail, E. Ballesteros, *Talanta* 84 (2001) 820.

and correlations between bioaccumulation and effects in the aquatic organisms. In this respect, lab and/or field experiments involving fish exposure to controlled mixtures of pharmaceuticals and/or wastewater effluents are being increasingly undertaken [3-17]. Unfortunately, minimal research on stereoselective toxicity of chiral drugs has been conducted to date [18,19] despite the fact that enantiomers significantly differ in their activity. The need for extensive research on the enantioselective fate and toxicity of chiral drugs in the environment has been stressed in an excellent review article [2].

Among chiral drugs, profens are non-steroidal anti-inflammatory drugs prescribed in high quantities over the world. Human and veterinary consumption rates for profens follow the order ibuprofen, naproxen and ketoprofen, the former being one of the top-ten drugs sold worldwide [20]. Ibuprofen and ketoprofen are marketed as racemic mixtures, although their therapeutic effect resides almost exclusively in the S-enantiomers, whereas naproxen is only distributed as S-enantiomer since R-naproxen is hepatotoxic. Occurrence of profens in surface waters has been widely proved, reaching at times  $\mu\text{g L}^{-1}$  levels for ibuprofen [12]. The enantiomeric distribution of profens in the aquatic environment depends on the extent of both the chiral inversion of (R)-enantiomers during human metabolism and the preferential biodegradation of (S)-enantiomers during wastewater treatment. Their enantiomeric fractions, defined as  $[\text{S-enantiomer}]/([\text{S-enantiomer}]+[\text{R-}$

---

[11] S. Wang, K.D. Oakes, L.M. Bragg, J. Pawliszyn, G. Dixon, M.R. Servos *Chemosphere* 85 (2011) 1472.

[12] V. Contardo-Jara, C. Lorenz, S. Pflugmacher, G. Nützmann, W. Kloas, C. Wiegand *Aquatic Toxicol* 105 (2011) 428.

[13] O.P. Togunde, K.D. Oakes, M.R. Servos, J. Pawliszyn, *J Chromatogr A* 1261 (2012) 99.

[14] G.C. Nallani, P.M. Paulos, L.A. Constantine LA, B.J. Venables, D.B. Huggett *Chemosphere* 84 (2011) 1371.

[15] O.P. Togunde, K.D. Oakes, J. Pawliszyn *Environ Sci Technol* 46 (2012) 5302.

[16] J-M. Brozinski, M. Lahti, A. Oikari, L. Kronberg, *Environ Sci Pollut Res* 18 (2011) 811.

[17] M. Lahti, J-M Brozinski, H. Segner, L. Kronberg, A. Oikari, *Environ Toxicol Chem* 31 (2012) 1831.

[18] J.K. Stanley, A.J. Ramirez, C.K. Chambliss, B.W. Brooks, *Chemosphere* 69 (2007) 9.

[19] J.K. Stanley, A.J. Ramirez, M. Mottaleb, C.K. Chambliss, B.W. Brooks, *Environ Toxicol Chem* 25 (2006) 1780.

[20] <http://www.fiercepharma.com/special-reports/top-20-generic-molecules-worldwide>

enantiomer], are around 0.6-0.7 for ibuprofen and ketoprofen and close 1 for naproxen [2], that indicating the preferential occurrence of S-enantiomers in the aquatic environment. Previous research has shown that chronic exposure to ibuprofen may alter reproduction [21] and development [22] in fish, however, to the best of our knowledge, no research on the stereoselective toxicity of profens to aquatic organisms has been undertaken, nor methods for their enantioselective analysis in biota have been reported so far. In order to fill this gap, this paper deals with the development of a simple and reliable method for the enantioselective determination of profens in fish tissues with the aim of fostering research able to improve our understanding on the environmental toxicity of chiral drugs.

Analytical methods for the non-enantioselective determination of profens in fish tissue involve the use of rather aggressive sample treatments combined with GC-MS or LC-MS [5-8,12,14]. Common sample treatments require the extraction of 0.1-2 g of fish fillet in around 10 mL of solvent, often using repetitive microwave assisted extraction [6,12] or sonication [6], followed by solvent evaporation to dryness [7,8,14] and SPE clean-up in Oasis HLB [6,12] or florisil [14] cartridges. Both GC-MS [14] and LC-MS [5,7,8,12] have been used in studies related to fish exposure to profens, the latter being preferred because of the need of profen derivatisation in GC. Method quantification limits (MDLs) for profens are in the range 14-46 ng g<sup>-1</sup> using GC-MS or LC-(QQQ) MS [7,8,14], these values increasing for LC-(TOF)MS (e.g. 138-644 ng g<sup>-1</sup> [5]) or LC-UV (e.g. 100-410 ng g<sup>-1</sup> [6]). Concentrations of profens in fish depend on the exposure level (e.g. 21.14 and 18.74 ng g<sup>-1</sup> after exposure to 250 µg L<sup>-1</sup> of ibuprofen for 1 and 7 days, respectively [14]), which demands for techniques giving the lower MDLs (e.g. LC-(QQQ)MS) in order to cover a wide range of lab and/or field exposure studies.

---

[21] J.L. Flippin, D. Huggett, C.M. Foran, *Aquat Toxicol* 81 (2007) 73.

[22] A. David, K. Pancharatna, *Environ Toxicol Pharmacol* 27 (2009) 390.

Regarding the enantioselective determination of profens, the above described sample treatments should be also applicable to their chiral analysis; however the ability of these approaches to keep unaltered the enantiomeric fraction of profens throughout the whole process should be proved. So, sample treatments should be simple and using mild conditions in order to avoid enantiomer conversion or degradation [23]. On the other hand, stationary phases for enantiomeric resolution of individual profens have become commercially available [24], so their suitability for the simultaneous analysis of these chiral drugs in fish tissue can be assessed. A key point in chiral chromatography is to prove that detection is not stereoselective (i.e. there is not enantioselective signal suppression or enhancement) which could cause deviations in the measurement of the respective enantiomeric fractions.

This paper presents the development of a method for the determination of the enantiomeric composition of ibuprofen, ketoprofen and naproxen in fish tissue based on supramolecular solvent (SUPRAS) microextraction and chiral LC-MS/MS on a (R)-1-naphthylglycine 3,5-dinitrobenzoic acid stationary phase [24]. Selection of these profens was based on their occurrence in surface waters as well as their high human consumption. To the authors' knowledge, this is the first reported method for the determination of enantiomers of profens in fish, which constitutes one of the most studied organisms regarding the effect of pharmaceuticals on the environment [1].

The SUPRAS selected consisted of inverted hexagonal aggregates of decanoic acid [25], synthesized by a spontaneous self-assembly process from ternary mixtures of decanoic acid, tetrahydrofuran (THF) and water at the proportions shown in the phase diagram depicted in Figure 1. The hexagonal nanostructures making up the SUPRAS (viz. aqueous cavities surrounded by the carboxylic groups with the hydrocarbon chains dissolved in THF) are also displayed in that Figure. Selection of this SUPRAS was based on its high extraction potential derived from

---

[23] S.E. Evans, B. Kasprzyk-Hordern, Trends Environ Anal Chem 1 (2014) e34.

[24][http://www.sascorp.jp/english/public\\_html/sumichiral/d0107.pdf](http://www.sascorp.jp/english/public_html/sumichiral/d0107.pdf),

[http://www.sascorp.jp/english/public\\_html/sumichiral/d0814.pdf](http://www.sascorp.jp/english/public_html/sumichiral/d0814.pdf)

[25] F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito Anal Chem 79 (2007) 7473.

both the possibility to act as a mixed mode extractant (viz. it provides hydrogen bonding and dispersion interactions) and the huge concentration of binding sites it offers (viz. decanoic concentration in the SUPRAS is around  $0.8 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$ ). On the other hand, the size of the aqueous cavities can be tailored by controlling the THF:water ratio in the solution where decanoic acid self-assembles and, consequently, this solvent has the potential to exclude the extraction of macromolecules present in the fish. So this SUPRAS can simplify sample treatment by combining both isolation of profens and sample cleanup. Below the main results of this study are described and discussed.

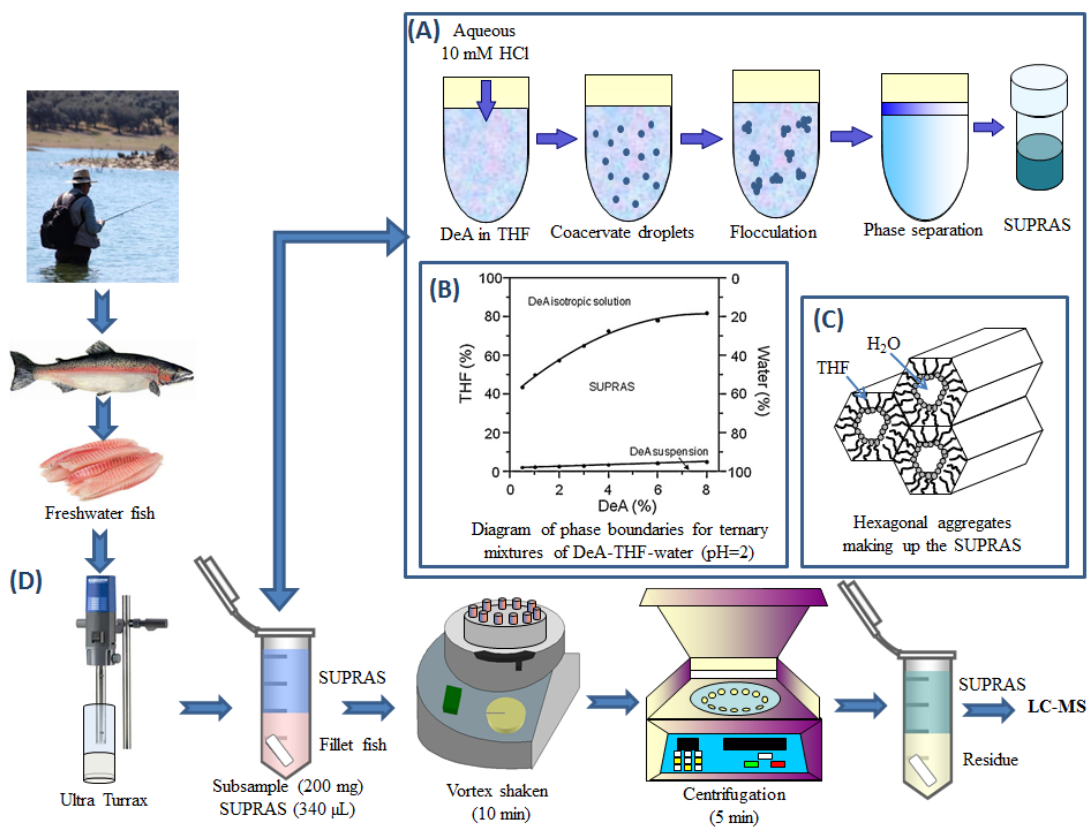


Figure 1. Schematic of the (A) synthesis, (B) phase diagram and (C) structure of the supramolecular solvent used for microextraction, and (D) the procedure used for sample treatment.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1 CHEMICALS

All chemical were of analytical reagent-grade and were used as supplied. Decanoic acid (DeA) and ammonium acetate were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland), (R)/(S)-ibuprofen ( $\geq 98\%$  purity) and (R)/(S)-ketoprofen ( $\geq 98\%$  purity) were supplied by Sigma (Saint Louis, MO, USA) whereas (R)/(S)-naproxen ( $\leq 100\%$  purity) was obtained from European Pharmacopoeia Reference Standard (Strasbourg, France). The isotopically labelled compounds (R)/(S)-ibuprofen (U-Ring- $^{13}\text{C}_6$ , 99% purity), (R)/(S)-ketoprofen ( $^{13}\text{C}_6$ , 99% purity) and (R)/(S)-naproxen ( $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}_3$ , 98% purity), acquired from <sup>ALSA</sup>CHIM (Strasbourg, France), were used as internal standards (IS). All profen standards contained R- and S- enantiomers in a 50:50 ratio, which was confirmed by LC-UV. Both individual stock standard (1 g L<sup>-1</sup>) and isotopically labelled internal standard (40 mg L<sup>-1</sup>) solutions of racemic profens were prepared on a weight basis in methanol and stored under dark conditions at 4°C. They were stable for at least 2 months. Working solutions containing mixtures of profens (5 mg L<sup>-1</sup> of each enantiomer) or ISs (4.2 mg L<sup>-1</sup> of each enantiomer of (R)/(S)-ibuprofen and 0.84 mg L<sup>-1</sup> of each enantiomer of (R)/(S)-ketoprofen and (R)/(S)-naproxen) were prepared in methanol and stored at 4°C. Tetrahydrofuran (THF) and hydrochloric acid were purchased from Panreac (Barcelona, Spain) and LC-grade methanol and acetonitrile from HiperSolv Chromanorm (Fontenay-Sous-Bois, France). Ultra-high-quality water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Madrid, Spain).

### 2.2 APPARATUS

The LC-MS system used was a hybrid triple quadrupole/linear ion trap Applied Biosystems MSD Sciex 4000QTRAP (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) coupled to a liquid chromatograph Agilent HP 1200 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) with a TurboIonSpray (TIS) interface. All data were acquired and processed using Analyst 1.5.1 Software. The analytical column

used for separation of profen enantiomers was a Sumichiral OA–2500 (stationary phase: (R)-1-naphthylglycine and 3,5-dinitrobenzoic acid, particle size 5  $\mu\text{m}$ , i.d. 4.6 mm, length 250 mm) from Sumika Chemical Analysis Service (Osaka, Japan). It was preceded by a guard column (Chirex 3005 from Phenomenex, Torrance, California, 30 mm length) with the same chiral selector, particle size and internal diameter to those of the analytical column. A magnetic stirrer Basicmagmix from Ovan (Barcelona, Spain) and a digitally regulated centrifuge Mixtasel equipped with an angle rotor 4 $\times$ 100 mL from JP-Selecta (Abrera, Spain) were used for SUPRAS production. A homogenizer-disperser Ultra-Turrax T25 Basic from Ika (Werke, Germany), a vortex-shaker REAX Top equipped with an attachment for 10 microtubes from Heidolph (Schwabach, Germany) and a high speed brushless centrifuge MPW-350 R equipped with an angle rotor 36 $\times$ 2.2/1.5 mL from MPW Med-Instruments (Warschaw, Poland), were used for sample treatment.

### 2.3 SUPRAMOLECULAR SOLVENT PRODUCTION

The following procedure, which permits to obtain a SUPRAS volume ( $\sim$  8.5 mL) able to treat 25 fish samples, was routinely followed. DeA (6.5 g) was dissolved in THF (4.2 mL) at room temperature in a 100 mL-glass centrifuge tube. Then, 80 mL of a 10 mM hydrochloric acid aqueous solution were added. After sealing the tube with parafilm to avoid THF evaporation, the mixture was magnetically stirred for 5 min at 900 rpm, time in which the SUPRAS spontaneously formed into the bulk solution. Then, the suspension was centrifuged at 3.500 rpm for 10 min to accelerate the separation of two liquid phases; namely the SUPRAS and a DeA-poor hydro-organic solution. Next, the SUPRAS, which is less dense than the hydro-organic solution, was withdrawn using a 20 mL-glass syringe, transferred to a hermetically closed storage glass vial to avoid THF losses and stored at 4  $^{\circ}\text{C}$ . Under these conditions the solvent produced was stable for at least one month. A scheme of the synthesis procedure is shown in Figure 1. The volume of solvent obtained can be adjusted at will by varying the amount of DeA, THF and water while keeping constant their above specified proportion.



## 2.4 DETERMINATION OF PROFEN ENANTIOMERS IN FISH TISSUE

### 2.4.1 Sample collection and pretreatment

Different species of freshwater fish, namely rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), common bleak (*Alburnus alburnus*), pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*), largemouth bass (*Micropterus salmoides*) and common carp (*Cyprinus carpio*), were analysed. Rainbow trout were acquired from local markets in Córdoba (South of Spain) while the rest of fishes were captured in Breña dam, which is not impacted by effluent discharges and has a capability to house water of 100.131 Hm<sup>3</sup>. The Breña dam is located in the centre-west of the province of Córdoba (Spain). The head, fishbone and backbones of fishes were removed and the muscles were filleted. Cleaned fish muscles were stored at -20 °C until analysis. After thawing, about 200 g of sample were chopped and homogenized using a homogenizer-disperser.

### 2.4.2 SUPRAS-based microextraction

About 200 mg of chopped sample and 340 µL of SUPRAS were mixed in a 2 mL-microtube Safe-Lock from Eppendorf Ibérica (Madrid, Spain). A micro Teflon-coated bar (3×10 mm) was introduced in the microtube to favour sample dispersion during extraction, which was made by vortex-shaken at 2.500 rpm for 10 min. Then, the mixture, thermostated at 20 °C, was centrifuged at 15.000 rpm for 5 min and the extract separated from the sample residue. A volume of 100 µL of extract was spiked with 5 µL of the IS working solution containing 8.4 mg L<sup>-1</sup> of racemic (R)/(S)-ibuprofen and 1.7 mg L<sup>-1</sup> of racemic (R)/(S)-ketoprofen and (R)/(S)-naproxen [200 µg L<sup>-1</sup> of each enantiomer of (R)/(S)-ibuprofen and 40 µg L<sup>-1</sup> of each enantiomer of (R)/(S)-ketoprofen and (R)/(S)-naproxen] and directly analysed by chiral LC-MS. Figure 1 shows a schematic of the sample treatment and microextraction procedure.

### 2.4.3 LC-MS/MS analysis

Enantiomers of profens were separated and quantified by using chiral LC coupled with a Turbo Ion Spray (TIS) source operating in the negative ion mode and

a hybrid triple quadrupole/linear ion trap analyzer operating in the selected reaction monitoring (SRM) mode. The mobile phase consisted of 90% tetrahydrofuran and 10% ammonium acetate (50 mM) in methanol working at a variable flow: 0.5 mL min<sup>-1</sup> from 0 to 18 min and then 1.2 mL min<sup>-1</sup>. The injection volume used was 10 µL. The temperature of the analytical and guard column was kept at 25 °C. The eluates from the analytical column were diverted by the switching valve to waste from 0 to 14 min in order to prevent the mass spectrometer from the entrance of matrix components or decanoic acid. The TIS source and analyzer conditions were as follows: curtain gas 30 psi; nebulizer gas 65 psi; turbo gas 30 psi; temperature of the turbo gas 425 °C; ion spray voltage -4.500 V; entrance potential -5 V; collision gas 3.0x10<sup>-5</sup> Torr. Unit resolution was used for both first and third quadrupoles. Table 1 show the quantifier and qualifier ions used for each native profen and ISs. Only one SRM transition could be recorded for ibuprofen because of its poor fragmentation. Declustering potential, collision energy and collision cell exit potential parameters were optimized for each analyte (Table 1). Calibration curves were constructed from standard solutions in methanol containing the target enantiomers in the ranges 0.4-4.000, 1.0-4.000 and 1.2-4.000 µg L<sup>-1</sup> for (R)/(S)-ibuprofen, (R)/(S)-ketoprofen and (R)/(S)-naproxen respectively, and constant concentrations of ISs (200 µg L<sup>-1</sup> of each enantiomer of (R)/(S)-ibuprofen and 40 µg L<sup>-1</sup> of each enantiomer of (R)/(S)-ketoprofen and (R)/(S)-naproxen). The concentration of the target analytes in the extract were calculated from calibration curves obtained by plotting peak area ratios (A/A<sub>IS</sub>; A = peak area of individual enantiomers and A<sub>IS</sub> = peak area of the corresponding IS) versus the concentration of analytes injected.

**Table 1**

Quantifier and qualifier ion transitions and MS parameters used to determine profens in fish muscle					
Profen	Quantifier transition	Qualifier transition	MS parameters		
			Declustering potential (V)	Collision energy (V)	Collision cell exit potential (V)
(R)/(S)-Ibuprofen	205> 161	205> 161	-55	-10	-3
(R)/(S)-Ketoprofen	253> 209	253> 197	-35	-10	-11
(R)/(S)-Naproxen	229> 185	229> 170	-50	-10	-5
(R)/(S)- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> Ibuprofen	211> 167	211> 167	-40	-10	-13
(R)/(S)- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> Ketoprofen	259> 215	259> 199	-20	-12	-37
(R)/(S)- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>2</sup> H <sub>3</sub> Naproxen	233 > 189	233 > 170	-35	-10	-9

Profen precursor ion [M-H]<sup>-</sup>, quantifier product ion [M-H-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 ENANTIOSELECTIVE SEPARATION/DETECTION OF PROFENS IN FISH

LC-MS was the preferred choice for the enantioselective separation/detection of profens in fish because it far surpasses the sensitivity and selectivity of LC/UV, and the sample throughput and experimental convenience of GC-MS. The chiral stationary phase (R)-1-naphthylglycine and 3,5-dinitrobenzoic acid and the mobile phase 30-80 mM ammonium acetate in methanol, which provide good resolution for the enantiomeric separation of individual profens in chiral LC-UV [24], were used for this purpose. Ammonium acetate was required for the enantioselective separation of profens and highly influenced retention times. Unfortunately, this additive caused suppression of profen ionization in LC-(ESI)MS so, the concentration of ammonium acetate in the mobile phase should be kept as low as possible (e.g. 5 mM) in order to overcome signal suppression. At such low concentration, retention times became unacceptably long and consequently a stronger mobile phase had to be used (e.g. mixtures of THF and methanol). Figure 2A shows a representative chromatogram obtained from a standard solution of profens run under the experimental conditions proposed for their determination in fish muscle (i.e. 90% THF and 10% methanolic 50 mM ammonium acetate). Resolution values for the R/S enantiomers were in the range 1.4-2.8.

#### 3.2 SELECTION OF SUPRAS COMPOSITION

Figure 1 shows a scheme of the self-assembly process that leads to SUPRAS formation. Addition of aqueous 10 mM hydrochloric acid to a solution of decanoic acid (DeA) in THF causes the spontaneous self-assembly of the amphiphile in oily droplets, named coacervate droplets, which associate and finally flocculate as a new liquid phase (i.e. coacervate or supramolecular solvent). Acidification of the coacervating agent (i.e. water) is required to ensure protonation of DeA ( $pK_a = 4.8 \pm 0.1$ ).

One of the major properties of SUPRASs is that they are environment responsive. This means that tailoring of the environment or dynamically changing it provides an important means of controlling the self-assembling system. In the case of the SUPRAS here selected, the THF:water ratio in the bulk solution determines the relative proportion of DeA, THF and water in the solvent [25,26]. Thus, there is a gradual incorporation of both THF and water into the SUPRAS, and consequently it becomes increasingly diluted with respect to DeA, by increasing the THF/water percent ratio in the bulk solution. Interestingly, once formed, the composition of the SUPRAS can be reversed by modifying the THF:water ratio in the solution, so SUPRASs are highly adaptive.

In order to select a suitable solvent for extraction of enantiomers of profens from fish, SUPRASs of different compositions were prepared from a constant amount of DeA (6.5 g) and variable THF/water ratios (5/95 - 30/60, v/v, total volume= 85 mL) according to the procedure specified in Experimental. The concentration of DeA in the SUPRAS produced in this range of THF/water ratios varied from 0.76 to 0.21 mg  $\mu\text{L}^{-1}$ , respectively. The volume of SUPRAS produced in each of these syntheses can be accurately predicted from the following, previously derived, equation [26]:

$$y = (1.04 \pm 0.02) a e^{(0.0473 \pm 0.0009) b}$$

where y is the volume (mL) of SUPRAS, a the amount (g) of DeA and b the THF percentage (v/v).

The influence of SUPRAS composition on the extraction efficiency of profen enantiomers from fish was investigated by extracting around 300 mg of muscle fillet of rainbow trout spiked with 10  $\mu\text{L}$  of a standard solution containing 6 mg  $\text{L}^{-1}$  of native racemic profens (100 ng  $\text{g}^{-1}$  of each enantiomer). They were allowed to stand at room temperature between 0.5 and 24 h before analysis, which was made in triplicate. Extractions were carried out according to the procedure described in

---

[26] A. Ballesteros-Gomez, F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Perez-Bendito, *Anal. Chim. Acta.* 603 (2007) 51-.

Experimental. The volume of SUPRAS used was 500  $\mu\text{L}$ . Isotopically labelled internal standards [200  $\mu\text{g L}^{-1}$  of each enantiomer of (R)/(S)-ibuprofen and 40  $\mu\text{g L}^{-1}$  of each enantiomer of (R)/(S)-ketoprofen and (R)/(S)-naproxen] were added just prior injection in LC-MS in order to correct any potential matrix effects and ensure accurate quantitation during optimization.

The recoveries found for the target enantiomers were in the range 97-102 % for all the SUPRAS compositions investigated, that indicating their suitability for the intended purpose. A SUPRAS synthesized from a solution containing the minimum percentage of THF (5%) was selected for the extraction of the enantiomers of profens in order to consume the minimal volume of organic solvent in the treatment process (i.e. 170  $\mu\text{L}$  per sample). The time of contact between profens and the matrix in fortified samples had not effect on recoveries in the interval investigated (0.5-24 h), so further optimization studies involving fortified samples were carried out by extracting them after 30 min of adding the analytes.

### 3.3 OPTIMIZATION OF SUPRAS-BASED MICROEXTRACTION

The influence of variables such as the volume of SUPRAS required per unit of sample, pH used in the synthesis of the SUPRAS and vortex-shaking and centrifugation time, on the extraction of profens, was investigated. Optimization was carried out by extracting muscle fillet of rainbow trout, fortified with native profens (100  $\text{ng g}^{-1}$  of each enantiomer), under the same conditions above described for the choice of SUPRAS composition. Selection of optimal extraction conditions was based on recoveries.

Table 2 shows the results obtained for SUPRAS volume/sample amount ratios within the range 0.7-2  $\mu\text{L mg}^{-1}$ . Results were given for (R)/(S)-profens instead of individual enantiomers because of their equal behavior regarding both recoveries and standard deviations. Quantitative recoveries were obtained for SUPRAS volume/sample amount ratios equal or above 1.7  $\mu\text{L mg}^{-1}$ , independently of the amount of sample used. All the subsamples analyzed in the interval tested (200-600

mg) were representative, so the minimum amount (i.e. 200 mg) was selected for further studies. Standard deviations below 6% were obtained at the SUPRAS volume/sample amount ratio chosen (i.e.  $1.7 \mu\text{L mg}^{-1}$ ).

**Table 2**

Mean recoveries obtained for ibuprofen, ketoprofen and naproxen as a function of the volume of SUPRAS and the amount of sample used for analysis.

Sample amount (mg)	SUPRAS volume ( $\mu\text{L}$ )	SUPRAS volumen/sample amount ( $\mu\text{L}/\text{mg}$ )	Recovery $\pm$ s <sup>a</sup> (%)		
			(R)/(S)-Ibuprofen	(R)/(S)-Ketoprofen	(R)/(S)-Naproxen
600	400	0.7	$83 \pm 7$	$81 \pm 4$	$78 \pm 5$
	600	1.0	$90 \pm 4$	$89 \pm 5$	$89 \pm 5$
	800	1.3	$100 \pm 2$	$96.5 \pm 0.5$	$97 \pm 1$
	1000	1.7	$100 \pm 2$	$101 \pm 2$	$104 \pm 4$
300	300	1.0	$90 \pm 4$	$92 \pm 5$	$89 \pm 8$
	400	1.3	$96 \pm 1$	$96 \pm 3$	$97 \pm 2$
	500	1.7	$99 \pm 6$	$102 \pm 5$	$97 \pm 5$
	600	2.0	$107 \pm 5$	$107 \pm 6$	$102 \pm 4$
200	260	1.3	$98 \pm 5$	$95 \pm 3$	$94 \pm 5$
	340	1.7	$99 \pm 3$	$102 \pm 3$	$98 \pm 4$
	400	2.0	$99 \pm 2$	$98 \pm 3$	$100 \pm 1$

<sup>a</sup>Standard deviation, n=6.

The pH of the aqueous solution used for the synthesis of the SUPRAS did not influence recoveries of profens in the interval 1-4. Self-assembly was carried out at pH 2 in order to ensure maximal production of SUPRAS, since, as it has been previously mentioned, only the protonated form of DeA ( $\text{pK}_a = 4.8 \pm 0.1$ ) is able to coacervate.

The time for vortex shaking (vibration motion=2500rpm) was investigated in the interval 2-30 min. Extraction equilibrium conditions were reached from 10 min, which was selected as optimal. Recoveries at 2 and 5 min were in the interval 85-88% and 91-94% for the three profens. Effective separation of the SUPRAS extract from the sample residue was reached after centrifugation at 15.000 rpm for 5 min.

### 3.4 ANALYTICAL PERFORMANCE

**3.4.1 Recoveries and matrix effects** Method recoveries (R), absence or presence of matrix effects (ME) and overall process efficiency (PE) were evaluated from three sets of calibration [27]. The first set (A) consisted of eight standards in methanol at concentrations of each enantiomer in the ranges 0.4-4.000, 1.0-4.000 and 1.2-4.000  $\mu\text{g L}^{-1}$  for (R)/(S)-ibuprofen, (R)/(S)-ketoprofen and (R)/(S)-naproxen, respectively. The second set (B) was prepared by spiking the profen enantiomers (same concentration range as used for set 1) in SUPRAS aliquots obtained after rainbow trout extraction according to the procedure described in the section SUPRAS-based microextraction in Experimental. In set 3 (C), rainbow trout samples were fortified and subjected to the whole procedure. Matrix effects, absolute recoveries and process efficiency were evaluated by comparing the slopes of the calibration curves obtained by sets 1 and 2, sets 2 and 3 and sets 1 and 3, respectively, according to:

$$\begin{aligned}\text{ME (\%)} &= \text{B/A} \times 100 \\ \text{R (\%)} &= \text{C/B} \times 100 \\ \text{PE (\%)} &= (\text{ME} \times \text{R})/100 = \text{C/A} \times 100\end{aligned}$$

The ME calculated in this manner may be referred to as an absolute matrix effect; percentages higher than 100 indicate ion enhancement, while percentages lower than 100 are indicative of ion suppression.

Table 3 shows the results obtained for the different enantiomers investigated. Absolute recoveries varied in the range 97-103%, which confirmed both the similar behavior of enantiomers regarding extraction and the independence of recoveries of enantiomer concentration in the range evaluated.

Matrix effects were observed for all the profens (Table 3), although signal suppression progressively decreased with increasing retention time that indicating that most of matrix components were eluted in the first minutes due to the strength

---

[27] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, *Anal Chem* 75 (2003) 3019.

of the mobile phase required for enantiomeric separation. The overall process efficiency (PE) was in the range 43-93%.

**Table 3**

Matrix effect (ME), recovery (R) and process efficiency (PE) data for profen enantiomers in a rainbow trout sample.

Profen enantiomer	ME $\pm$ s <sup>a</sup> (%)	R $\pm$ s <sup>a</sup> (%)	PE $\pm$ s <sup>a</sup> (%)
(R)-Ibuprofen	44 $\pm$ 1	97 $\pm$ 3	43 $\pm$ 1
(S)-Ibuprofen	47 $\pm$ 2	99 $\pm$ 4	47 $\pm$ 1
(R)-Ketoprofen	71 $\pm$ 2	103 $\pm$ 5	74 $\pm$ 3
(S)-Ketoprofen	73 $\pm$ 2	102 $\pm$ 3	75 $\pm$ 2
(R)-Naproxen	83 $\pm$ 2	100 $\pm$ 3	82 $\pm$ 2
(S)-Naproxen	95 $\pm$ 3	98 $\pm$ 3	93 $\pm$ 3

<sup>a</sup>Standard deviation

The use of isotopically labelled standards to compensate for matrix effects was investigated by comparing the slopes of calibration curves obtained from standards (n=8) of native profen enantiomers (0.4-4000, 1.0-4000 and 1.2-4000  $\mu\text{g L}^{-1}$  for (R)/(S)-ibuprofen, (R)/(S)-ketoprofen and (R)/(S)-naproxen) in methanol and fortified SUPRAS extracts obtained from a rainbow trout sample. Both methanol and extracts were also spiked with a constant concentration of IS (200  $\mu\text{g L}^{-1}$  of each enantiomer of (R)/(S)-ibuprofen and 40  $\mu\text{g L}^{-1}$  of each enantiomer of (R)/(S)-ketoprofen and (R)/(S)-naproxen). Calibration curves were obtained by plotting peak area ratios ( $A/A_{\text{IS}}$ ;  $A$  = peak area of individual enantiomers and  $A_{\text{IS}}$  = peak area of the corresponding IS) versus the concentration of enantiomers injected.

No statistically significant difference between both slopes was found by applying a Student's test. The experimental t-values obtained for R-ibuprofen, S-ibuprofen, R-ketoprofen, S-ketoprofen, R-naproxen and S-naproxen were 0.61, 0.40, 0.78, 0.48, 0.85 and 0.88 respectively. These values were below the critical t value



(3.05, significant level=0.01). So, the isotopically labelled standards used were able to compensate for effects produced by matrix components in fish samples.

### 3.4.2 Sensitivity and linearity

Method detection limits (MDLs) were calculated from six independent complete analysis of blank rainbow trout samples, according to the procedure detailed in Experimental, by using a signal-to-noise ratio of 3. They were 0.6, 0.5, 0.7, 0.8, 1.0 and 0.9 ng g<sup>-1</sup> for R-ibuprofen, S-ibuprofen, R-ketoprofen, S-ketoprofen, R-naproxen and S-naproxen, respectively. Method quantification limits were calculated alike with a signal-to-noise ratio of 10. They were in the range 1.7-3.3 ng g<sup>-1</sup>. Both MDLs and MQLs were practically independent of the type of fish analysed. The high sensitivity of the method for the determination of enantiomers of profens makes it suitable to study fish exposure at very low concentrations of these drugs in surface waters.

Calibration curves were run from standards of profen enantiomers in methanol (n=8) using the internal standard approach. The range of linearity was confirmed by visual inspection of the plot residuals versus analyte concentration; the residuals were randomly scattered within a horizontal band and a random sequence of positive and negative residuals was obtained. Correlation between peak areas and enantiomer concentrations was determined by linear regression and 1/x weighted calibration. Correlation coefficients were in the range 0.9995-0.99998 for all enantiomers indicating good fits.

### 3.4.3 Precision

Precision was studied in terms of repeatability and expressed as relative standard deviation (RSD). For this purpose, 12 independent blank rainbow trout samples, spiked with (R)/(S)-ibuprofen, (R)/(S)-ketoprofen and (R)/(S)-naproxen at two concentrations (i.e. 15 and 400 ng g<sup>-1</sup> of each enantiomer), were subjected to the whole analytical process. The values obtained for RSD (n=6) were 4.8/4.2% for (R)/(S)-ibuprofen, 4.4/4.6% for (R)/(S)-ketoprofen and 4.6/5.3% for (R)/(S)-naproxen for samples spiked with 15 ng g<sup>-1</sup> of enantiomers and they decreased at

1.4/1.7% for (R)/(S)-ibuprofen, 1.4/1.6% for (R)/(S)-ketoprofen and 1.3/1.7% for (R)/(S)-naproxen as the concentration of enantiomers was 400 ng g<sup>-1</sup>. The precision was satisfactory at both low and high level of enantiomer concentrations.

### 3.5 ANALYSIS OF FRESHWATER FISH

The suitability of the method for application in studies involving exposure of freshwater fish to profens was investigated. Fish individuals belonging to five different species, namely *Oncorhynchus mykiss*, *Alburnus alburnus*, *Lepomis gibbosus*, *Micropterus salmoides* and *Cyprinus carpio*, were selected for this purpose. Unfortified and fortified samples were analysed according to the procedure specified in Experimental. Fortification of fish fillets for each profen enantiomer was performed at two concentrations (i.e. 15 and 400 ng g<sup>-1</sup>) in order to prove the suitability of the method for both low and high exposure studies. Samples were analysed in triplicate and both recoveries and enantiomeric fractions were measured.

Table 4 shows the results obtained. No profens were found in any of the fish analyzed. Absolute recoveries were in the range 97-104%, with relative standard deviations from 0.2 % to 6 %. Recoveries were independent of the fish species analyzed. Calculated enantiomeric fractions were near 0.5, which indicated the suitability of the isotopically labelled internal standard to correct for any sample matrix interferences and consequently to allow for accurate quantification of profen enantiomers. Fig. 2 depicts, as an example, the chromatograms obtained from the analysis of a rainbow trout sample fortified with 400 ng g<sup>-1</sup> (B) and 15 ng g<sup>-1</sup> (C) of each profen enantiomer.

**Table 4**  
Recovery and enantiomeric fraction of IBP, KPF and NPX from spiked fish samples.

Sample	Concentration added <sup>d</sup> (ng g <sup>-1</sup> )	Recovery <sup>b</sup> ±s <sup>c</sup> (%)						Enantiomeric fraction <sup>b</sup> (EF)			
		(R)-IBP	(S)-IBP	(R)-KTP	(S)-KTP	(R)-NPX	(S)-NPX	IBP	KTP	NPX	
Rainbow trout	15	102 ± 4	104 ± 6	101 ± 3	101 ± 4	100 ± 1	102 ± 2	0.495±0.004	0.501±0.002	0.496±0.002	
	400	102 ± 2	101 ± 1	102 ± 1	100.9 ± 0.2	102 ± 2	102 ± 2	0.500±0.002	0.504±0.002	0.5003±0.0007	
Common bleak	15	100 ± 3	101 ± 3	100 ± 2	98 ± 2	101 ± 3	100 ± 6	0.4979±0.0004	0.5064±0.0004	0.505±0.007	
	400	102 ± 5	101 ± 4	98 ± 4	101 ± 5	100 ± 2	103 ± 2	0.502±0.003	0.492±0.004	0.49±0.01	
Pumpkinseed sunfish	15	99 ± 2	99 ± 3	100 ± 2	98 ± 2	99 ± 4	99 ± 3	0.500±0.003	0.5072±0.0008	0.500±0.003	
	400	101 ± 2	103 ± 3	98 ± 4	101 ± 5	102 ± 2	100 ± 1	0.495±0.003	0.4964±0.0004	0.507±0.001	
Largemouth bass	15	99 ± 3	98 ± 4	98 ± 5	98 ± 3	101 ± 5	97 ± 3	0.502±0.002	0.500±0.005	0.506±0.006	
	400	102 ± 2	101.2 ± 0.5	98 ± 2	100.2 ± 0.4	101 ± 2	101 ± 2	0.501±0.007	0.495±0.006	0.5006±0.0001	
Common carp	15	100 ± 3	99 ± 4	100 ± 3	101 ± 3	101 ± 3	103 ± 1	0.501±0.003	0.500±0.001	0.50 ±0.01	
	400	101 ± 2	102 ± 1	100 ± 1	100 ± 1	102 ± 1	99 ± 1	0.497±0.003	0.501±0.004	0.507±0.002	

<sup>a</sup> Concentration for each enantiomer.

<sup>b</sup> Mean of three independent determinations.

<sup>c</sup> Standard deviation.

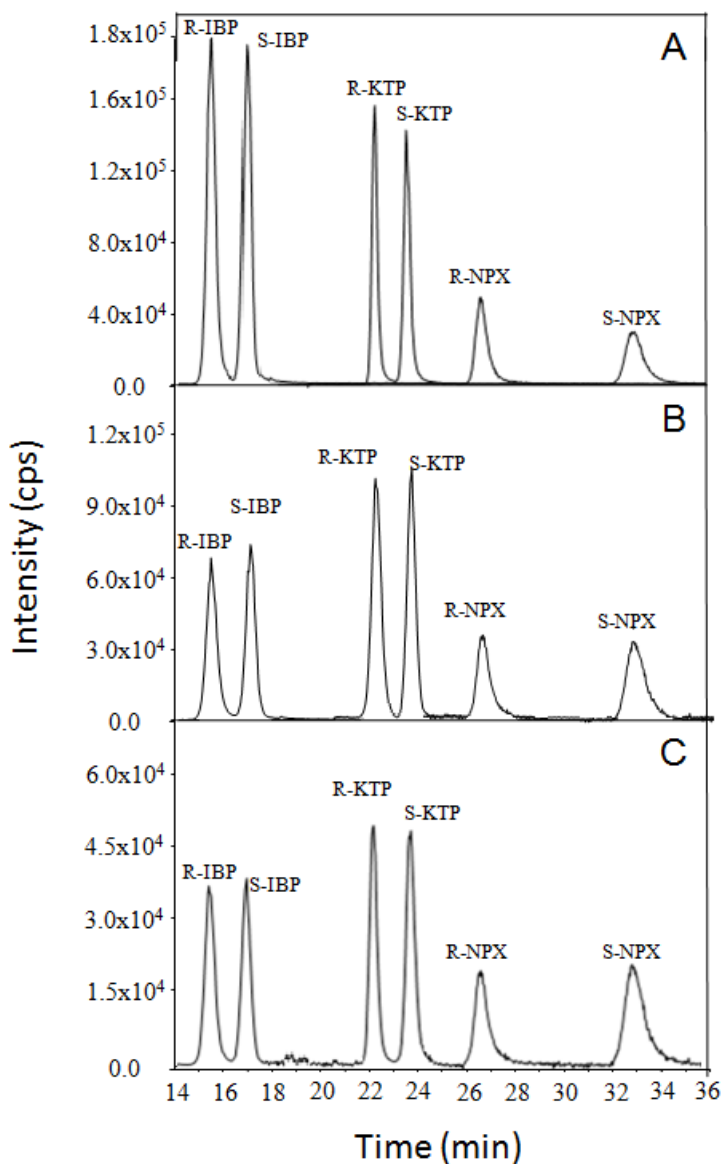


Figure 2. LC-MS/MS selected ion chromatograms obtained from (A) a standard solution containing  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  of each enantiomer of (R)/(S)-ibuprofen (IBP), (R)/(S)-ketoprofen (KTP) and (R)/(S)-naproxen (NPX) and (B,C) a rainbow trout sample spiked with (B)  $400 \text{ ng g}^{-1}$  and (C)  $15 \text{ ng g}^{-1}$  of each enantiomer.

## 4. CONCLUSIONS

The need for research on the enantioselective toxicity of chiral drugs to aquatic biota is essential for a correct risk assessment of the presence of such contaminants in the environment. The lack of studies in this area is partly due to the lack of reported analytical methods for this purpose. Because of the difficulty to undertake multiresidue analysis with chiral stationary phases, which are relatively exclusive regarding their binding potential [23], the need for developing methods for the determination of the major groups of chiral drugs (e.g. non-steroidal anti-inflammatory drugs, analgesics, central nervous system drugs, etc) has been highlighted [2].

The method here developed meets the analytical and operational features required to evaluate the enantioselective exposure of aquatic biota to profens. Major analytical features include: (a) quantitative absolute recoveries (97-104%) for all the enantiomers investigated, (b) method quantification limits that are 5- to 9-fold lower than those previously reported for the non-stereoselective determination of profens in biota by using GC-MS or LC-(QQQ)MS [7,8,14] and (c) accurate quantification of enantiomers and consequently accurate calculation of their enantiomeric fractions.

From an operational point of view, the proposed sample treatment is fast (e.g. sample extraction takes about 15 min and several samples can be treated simultaneously), simple (it uses conventional lab equipment such as vortex-shakers or centrifuges), cheap (340  $\mu$ L of SUPRAS per sample are only required) and high sample throughput (no evaporation or further cleanup steps are necessary).

LC-(QQQ)MS is necessary to achieve detection limits low enough to evaluate fish exposure to low concentrations of profens. The use of isotopically labelled internal standards is encouraged in order to correct for matrix ionization suppression.

**Acknowledgments**

The authors gratefully acknowledge financial support from Spanish MICINN (Project CTQ2011-23849). Carmen Caballo acknowledges the Andalusian CICYE for a postgraduate fellowship (P09-FQM-5151)





## DETERMINATION OF SUPPLEMENTAL FEEDING NEEDS FOR ASTAXANTHIN AND CANTHAXANTHIN IN SALMONIDS BY SUPRAMOLECULAR SOLVENT-BASED MICROEXTRACTION AND LIQUID CHROMATOGRAPHY–UV/VIS SPECTROSCOPY

C. Caballo, E.M. Costi, M.D. Sicilia, S. Rubio

### ABSTRACT

Development of simple and rapid analytical methods for predicting supplemental feeding requirements in aquaculture is a need to reduce production costs. In this article, a supramolecular solvent (SUPRAS) made up of decanoic acid (DeA) assemblies was proposed to simplify sample treatment in the total and individual determination of carotenoids (red–pink pigments) in farmed salmonids. The analytes were quantitatively extracted in a single step that spends a few minutes using a small volume of SUPRAS (i.e. 800  $\mu$ L) and directly determined in extracts without the interference from fats or other matrix components. The methods based on the combination of microextraction with SUPRAS and photometry or LC–UV/VIS spectroscopy were developed for the determination of total and individual carotenoids, respectively. The applicability of the methods was demonstrated by analysing non-fortified and fortified samples of farmed Atlantic salmon and rainbow trouts. Recoveries obtained by photometry and LC–UV/VIS spectroscopy were within the intervals 98–104% and 94–106%, respectively

*Keywords:* Supramolecular solvent; microextraction; liquid chromatography/photometry; carotenoids; salmonids



## 1. INTRODUCTION

Colour is a key factor for the consumer acceptability of many foods. In salmonid fishes, a uniform pink-red colour is considered to indicate a high quality product and the market price is in a high degree determined by this attribute. The red-pink colour of salmonids is due to the presence of carotenoids, mainly astaxanthin, AST, and canthaxanthin, CAN, in the fish muscle. Fishes, like other animals, cannot produce carotenoids, which are solely synthesized by a small number of plants and micro-organisms. They obtain these natural pigments (mainly AST) from dietary sources; wild and farmed salmonids from crustaceans [1] and synthetic carotenoid-supplemented feed [2], respectively. Carotenoids significantly contribute to the total feed cost (e.g. the AST supplied for maturing farmed Atlantic salmon represents between 10% and 15% of the total feed cost [3]) and, hence, to the global production cost (6-8% [4]).

The fish farming industry routinely monitors carotenoids in salmonids in order to ensure a satisfactory product quality and adjust the production cost. The visual inspection of fish fillets using colour cards, generally the Roche SalmoFan™ one [4-6], is a cheap and simple method frequently used to evaluate salmonid flesh colour, but correlations between pigment content and visual colour scores show significant variations among observers, even by performing evaluations under standardized light conditions. Methods based on colorimetry [6] provide a more objective evaluation of the salmonid flesh colour, their main disadvantage being the unrepresentativity of the results owing to the quite small surface measured (typically 2 cm<sup>2</sup> of fish fillet). Instrumental techniques that provide more representative results

---

[1] S. Anderson, (2000). Salmon colour and the consumer, IIFET 2000 Proceedings.

[2] E.M. Sheehan, T.P. O'Connor, P.J.A. Sheehy, D.J. Buckley, R. FitzGerald, Food Chemistry, 63 (1998) 313-317.

[3] O.J. Torrissen, R.W. Hardy, K.D. Shearer, T.D. Scott, F.E. Stone, Aquaculture 88 (1990) 351-362

[4] I.A. Johnston, X. Li, V.L.A. Vieira, D. Nickell, A. Dingwall, R. Alderson, P. Campbell, R. Bickerdike, Aquaculture 256 (2006) 323-336.

[5] E. Misimi, J.R. Mathiassen, U. Erikson, Journal of Food Science 72 (2007) 30-35.

[6] B. Bjerkgeng, S. Refstie, K.T. Fjalestad, T. Storebakken, M. Rødbotten, A.J. Roem, Aquaculture 157 (1997) 297-309.

include visible/near-infrared (VIS/NIR) [7] and VIS reflectance [8] spectroscopy, computerized X-ray tomography [6,7] and computer vision ([5,9], the latter based on the combination of a digital camera or scanner and computational image processing. These techniques permit to predict the total carotenoid content after quite complex statistical treatments, the prediction errors varying with factors such as the physical structure of fish muscles (e.g. fibre size, connective tissue, etc.). The accurate determination of carotenoids in salmonids necessarily involves the extraction of the target analytes from the fish muscle prior to their photometric or liquid chromatography (LC)-UV/VIS spectroscopic determination. Reported extraction methods use large volumes (typically 150-170 mL [4,8,10] of toxic, flammable and environmentally damaging organic solvents, they are laborious and time-consuming and invariably involve multi-step extractions (e.g. 2x80 mL acetone [4], 2x(50 mL methanol+25 mL chloroform) [8], 3x40 mL acetone + 50 mL n-hexane [10]. Furthermore, sometimes solvent evaporation is required [2,4] and the fish fats interfere in the photometric determination of total carotenoids and their contribution to the absorbance measurements must be subtracted to obtain accurate results [8].

This article deals with the evaluation of supramolecular solvents (SUPRASs) for the effective, rapid and inexpensive extraction of AST and CAN from farmed salmonid fishes. SUPRASs are water-immiscible liquids made up of surfactant aggregates dispersed in a continuous phase (usually water), which are produced by two well-defined self-assembly processes occurring on two scales, molecular and nano [11]. First, surfactants aggregate above a critical concentration and then, the generated nanostructures self-assemble under the action of an external stimuli (e.g. temperature, pH, electrolyte, a non-solvent for the surfactant aggregate) and separate

---

[7] A. Folkestad, J.P. Wold, K.A. Rørvik, J. Tschudi, K.H. Haugholt, *Aquaculture* 280 (2008) 129-135.

[8] B. Rønsholdt, E. McLean, *Journal of Food Composition and Analysis* 14 (2001) 345-357.

[9] A. Kause, L.H. Stien, K. Rungruangsak-Torrissen, O. Ritola, K. Ruohonen, A. Kiessling, *Livestock Science* 114 (2008) 315-324.

[10] S. Tolosa, S. Cakli, U. Ostermeyer, *European Food Research and Technology* 221 (2005) 787-791.

[11] A.M. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, M.D. Pérez-Bendito, *Journal of Chromatography A* 1216 (2009) 530-539.

as an immiscible liquid in equilibrium with a surfactant-lean phase. Investigations on SUPRAS-based extractions were initiated by Ishii, Miura and Watanabe [12] (usually referred as the cloud point extraction technique) and numerous applications have been described since then [13-15]. Although temperature-induced SUPRASs made up of non-ionic surfactant aggregates have been the most widely used in analytical extractions [13-15], SUPRASs consisting of zwitterionic [16] and ionic [17,18] surfactant aggregates have been also proposed. In the last few years, new SUPRASs produced from vesicles [19] or reverse micelles [20] of alkylcarboxylic acids have been described. These solvents constitute an advantageous alternative for the extraction of organic compounds in a wide polarity range from both liquid [19-21] and solid samples [22,23]. Among their characteristics, it should be noticed their capability to solubilise a variety of solutes through different interaction mechanisms, the high number of solubilisation sites they have and their low cost.

The SUPRAS proposed in this article for the extraction of AST and CAN was produced from an isotropic solution of reverse micelles of decanoic acid (DeA) in tetrahydrofuran (THF) by addition of water. The variables affecting the efficiency and kinetics of the supramolecular solvent-based microextraction (SUSME) were studied, the analytical features of the proposed SUSME-photometric and SUSME-LC-UV/VIS spectroscopic methods were evaluated and both approaches were

- 
- [12] H. Ishii, J. Miura, H. Watanabe, *Bunseki Kagaku* 26 (1977) 252-256.  
[13] W.L. Hinze, E. Pramauro, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 24 (1993) 133-177.  
[14] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, C. García Pinto, E. Fernández Laespada, *Journal of Chromatography A* 902 (2000) 251-265.  
[15] A. Ballesteros-Gómez, M.D. Sicilia, S. Rubio, *Analytica Chimica Acta* 677 (2010) 108-130.  
[16] T. Saitoh, W.L. Hinze, *Analytical Chemistry* 63 (1991) 2520-2525.  
[17] X. Jin, M. Zhu, E.D. Conte, *Analytical Chemistry* 71 (1999) 514-517.  
[18] I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Analytical Chemistry* 71 (1999) 4519-4526.  
[19] F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Analytical Chemistry* 78 (2006) 7229-7239.  
[20] F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Analytical Chemistry* 79 (2007) 7473-7484.  
[21] S. García-Fonseca, A.M. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, M.D. Pérez-Bendito, M.D. *Analytica Chimica Acta* 617 (2008) 3-10.  
[22] A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Food Additives & Contaminants*, 26 (2009) 265-274.  
[23] A. Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, *Analytica Chimica Acta* 650 (2009) 207-213.

applied to the determination of carotenoids in non-spiked and spiked salmonid samples.

## **2. EXPERIMENTAL**

### **2.1. CHEMICALS**

All chemicals were of analytical reagent-grade and were used as supplied. Astaxanthin (AST) and canthaxanthin (CAN) were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland), decanoic acid (DeA) and butylated hydroxyl anisole (BHA) from Sigma (Saint Louis, MO, USA) and, acetone, methanol and tetrahydrofuran (THF) from Panreac (Barcelona, Spain). Ultra-high-quality water was obtained from a Mili-Q water purification system (Millipore, Madrid, Spain). Stock solutions of 100 mg L<sup>-1</sup> of each carotenoid were prepared by dissolving pure compounds in acetone containing 1% BHA, as the antioxidant, and were stored under dark conditions at -20° C not more than one month. A standard solution containing 2 mg L<sup>-1</sup> of AST was made daily by appropriate dilution with acetone. Calibration solutions containing AST at concentrations in the interval 0.007-15 mg L<sup>-1</sup> were prepared by placing in 2 mL-volumetric flasks appropriate volumes of the 2 mg L<sup>-1</sup> or the 100 mg L<sup>-1</sup> AST standard solution, 500 µL of SUPRAS and acetone to the mark.

### **2.2. APPARATUS**

The liquid chromatographic system used consisted of a Waters System furnished with a 1525 binary pump, a 600S Controller, a 717 auto-sampler and a 996 Photodiode Array Detector. The stationary-phase column was an Ascentis<sup>TM</sup> C<sub>18</sub> column (3 µm, 150 mm x 2.1 mm) from Supelco (Bellefonte, PA, USA). The photometric determination of the total carotenoids in salmonids was performed in a Hitachi U-2800A spectrophotometer furnished with a 1-cm glass cell. A homogenizer-disperser Ultra-Turrax T25 Basic from Ika (Werke, Germany), a vortex-shaker REAX Top equipped with an attachment (ref. 549-01000-00) for 10

microtubes from Heidolph (Schwabach, Germany) and a high speed brushless centrifuge MPW-350R equipped with an angle rotor 36x2.2/1.5 mL (ref. 11462) from MPW Med-Instruments (Warszaw, Poland) were used for sample preparation. A magnetic stirrer Basicmagnmix from Ovan (Barcelona, Spain) and a digitally regulated centrifuge Mixtasel equipped with an angle rotor 4x100 mL (ref. 7001326) from JP-Selecta (Abrera, Spain) were used for SUPRAS production.

### **2.3. SUPRAMOLECULAR SOLVENT PRODUCTION**

The following procedure, which permits to obtain a SUPRAS volume (~ 8.5 mL) able to treat 10 fish samples, was routinely followed. DeA (6.5 g) was dissolved in THF (4.2 mL) in a 100 mL-glass centrifuge tube. Then, 80 mL of a 10 mM hydrochloric acid aqueous solution were added. The mixture was magnetically stirred for 5 min, time in which the SUPRAS spontaneously formed into the bulk solution. Then, the suspension was centrifuged at 3.500 rpm for 10 min to speed solvent separation up, which is less dense than water. Next, it was withdrawn using a 10 mL-syringe, transferred to a hermetically close storage glass vial to avoid THF losses and stored at 4 °C. Under these conditions, the solvent produced was stable for at least one month. The volume of solvent obtained can be adjusted at will by choosing an appropriate, constant DeA/THF/water proportion.

### **2.4. ANALYSIS OF SALMONID FISH**

#### **2.4.1. Sample pretreatment**

Salmonids (Atlantic salmon and rainbow trout) were produced in Norway fish farms and bought in supermarkets in Córdoba (Spain). The head, fishbone and backbones of fishes were removed and the muscles were filleted. Cleaned fishes were stored at -20 °C until analysis. After thawing, about 200 g of sample were chopped and homogenized using a homogenizer-disperser. Then, portions of about 500 mg were taken for analysis and recovery experiments, which were performed in triplicate.

Spiking of samples was made by adding a minute volume (1-400  $\mu\text{L}$ ) of a solution containing AST and CAN (50  $\text{mg L}^{-1}$  each) in acetone. Spiked samples were allowed to stand at room temperature under dark conditions for 15 min before analysis.

#### **2.4.2. Microextraction of carotenoids**

About 500 mg of chopped sample and 800  $\mu\text{L}$  of SUPRAS were mixed in a 2 mL-microtube Safe-Lock from Eppendorf Ibérica (Madrid, Spain). A micro teflon-coated bar (3x10 mm) was introduced in the microtube to favour sample dispersion during extraction, which was made by vortex-shaken at 2.500 rpm for 10 min. Then, the mixture, thermostated at 10  $^{\circ}\text{C}$ , was centrifuged at 15000 rpm (16.720xg) for 15 min. Finally, 500  $\mu\text{L}$  of the supernatant were transferred to a 2 mL-volumetric flask and acetone was added up to the mark.

#### **2.4.3. Determination of total carotenoids by photometry**

The acetone-diluted extract obtained in Section 2.4.2 was transferred to a cell and its absorbance measured at 480 nm against a blank solution containing no carotenoids. A calibration curve was run from standards containing AST at concentrations in the interval 0.2-7.5  $\text{mg L}^{-1}$  prepared in acetone/SUPRAS (75:25, v/v) as specified in Section 2.1.

#### **2.4.4. Determination of AST and CAN by LC-UV/VIS spectroscopy**

Carotenoids were separated using isocratic elution with a mobile phase consisting of 95% methanol and 5% water at a flow rate of 0.4 mL/min. The volume of diluted extract or standard solution injected in the chromatographer was 10  $\mu\text{L}$ . Both AST and CAN were detected at 480 nm and quantified from peak areas using a unique calibration graph, which was run from AST standards (0.07-150 ng) prepared in acetone/SUPRAS (75:25, v/v).

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. MICROEXTRACTION OF CAROTENOIDS IN A DECANOIC ACID AGGREGATE-BASED SUPRAS

##### 3.1.1. Synthesis and composition

The SUPRAS used for the extraction of carotenoids was produced from ternary mixtures of DeA, THF and water. DeA molecules self-assemble as reverse micelles in THF. The addition of water to this mixture causes the partial desolvation of DeA alkyl chains which results in an increase of the size of the aggregates. The larger assemblies formed are insoluble in the water:THF solution and separate from the bulk solution as an immiscible liquid phase (the SUPRAS). The production of the SUPRAS is carried out under acidic conditions ( $\text{pH} < 4$ ) to ensure that biosurfactant molecules are protonated ( $\text{pK}_a$  of DeA =  $4.8 \pm 0.2$ ) since decanoate does not form reverse micelles.

The SUPRAS is made up of biosurfactant, THF and water, their relative concentrations in the solvent being determined by the relative concentrations of THF and water used to produce it. The amount of organic solvent incorporated into the SUPRAS increases exponentially with the percentage of THF, which results in decreased DeA concentrations [24]. Thus, the concentration of biosurfactant decreased from  $0.76 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$  to  $0.21 \text{ mg } \mu\text{L}^{-1}$  by increasing the THF concentration from 5 to 30%. In contrast, the composition of the SUPRAS is independent of the concentration of DeA. At a constant water:THF ratio, the volume of SUPRAS obtained increases linearly with the amount of DeA and therefore, the concentration of biosurfactant in the SUPRAS keeps constant [24].

##### 3.1.2. Solvent bonding capabilities

Solubilisation of organic compounds in the aggregates making up the SUPRAS can occur through hydrophobic interactions with the hydrocarbon chains

---

[24] A.M. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, M.D. Pérez-Bendito, *Analytica Chimica Acta* 603 (2007) 51-59.

of the biosurfactant and hydrogen bond formation with their hydrophilic groups. AST and CAN are very hydrophobic compounds [ $\log K_{ow} = 8.2$  and  $9.5$ , respectively, calculated using the Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 for Solaris] containing hydrogen donor (OH in AST) and/or acceptor (O in both AST and CAN) groups in their molecular structures. Therefore, the driving forces for the extraction of these carotenoids are expected to be both dispersive forces between the hydrophobic regions of analytes and DeA and hydrogen bonds between the carboxylic groups of DeA molecules and the hydroxyl/carbonyl groups of analytes.

### 3.1.3. Optimization

Optimal conditions for microextraction of carotenoids in salmonids were determined using both spiked ( $n=3$ ;  $2 \mu\text{g}$  AST and  $2 \mu\text{g}$  CAN) and non-spiked salmon fillets ( $100\text{-}500 \text{ mg}$ ). Samples were extracted using variable volumes ( $0.3\text{-}1.2 \text{ mL}$ ) of SUPRAS, produced from different THF concentrations ( $5\text{-}30\%$ ) and pH ( $1\text{-}4$ ), different times for vortex-shake ( $2\text{-}30 \text{ min}$ ) and variable rotation rates ( $1.000\text{-}15.000 \text{ rpm}$ ) and times ( $10\text{-}30 \text{ min}$ ) of centrifugation. The concentration of AST and CAN in the supramolecular extract was determined by LC-UV/VIS spectroscopy (see Section 2.4.4). Experimental conditions selected as optimal were those providing quantitative recoveries and the minimum extractant volume/sample amount ratio. Samples were kept under dark conditions to avoid the photo-degradation of analytes and under refrigeration to prevent water losses. To check whether the time of contact between the analytes and the salmon fillet in spiked-samples influenced the extraction efficiency for AST and CAN, a salmon sample containing  $11.7 \pm 0.3 \text{ mg Kg}^{-1}$  of AST was spiked with  $5 \text{ mg Kg}^{-1}$  of each carotenoid and aliquots of this sample were analysed  $15 \text{ min}$  and  $24 \text{ h}$  after the spiking following the procedure specified in Section 2.4. No effect of the time of contact on the recoveries obtained for AST ( $99 \pm 2\%$  and  $96 \pm 3\%$ , for  $15 \text{ min}$  and  $24 \text{ h}$ , respectively) and CAN ( $98 \pm 2\%$  and  $101 \pm 5\%$ , for  $15 \text{ min}$  and  $24 \text{ h}$  respectively) was observed. Finally, the stability of both AST and CAN in sample extracts was assessed by extracting two aliquots of a salmon sample containing both carotenoids ( $6.4 \text{ mg Kg}^{-1}$  of AST and  $5.6 \text{ mg Kg}^{-1}$  CAN) and determining the target analytes in one extract immediately after extraction



and in the other one after 12 h of storage under dark conditions and refrigeration. No differences were obtained between the results obtained from both extracts.

SUPRASs of different compositions were prepared from a constant amount of DeA (6.5 g) and variable THF/water ratios (5/95 to 30/70, v/v, total volume of water+THF = 85 mL). No changes in recoveries obtained for both AST and CAN were observed as solvents of different composition (DeA concentration in the solvents tested ranged between 0.76 and 0.21 mg  $\mu\text{L}^{-1}$ ) were used for extractions (e.g quantitative recoveries were achieved by extracting 500 mg-salmon samples with 800  $\mu\text{L}$  of SUPRAS independently of the THF concentration used to synthesize it). With the aim of minimizing the organic solvent consumption, the SUPRAS selected for further studies was synthesized in 5% THF aqueous solutions. The pH at which the SUPRAS was prepared did not affect extraction efficiencies for carotenoids in the range 1 to 4.

Table 1 shows the recoveries obtained for both AST and CAN as a function of the volume of SUPRAS used for extraction. A SUPRAS volume ( $\mu\text{L}$ )/ sample amount (mg) of 1.6 was found sufficient to get quantitative recoveries for both AST and CAN.

**Table 1**

Mean recoveries<sup>a</sup> and standard deviations (s) obtained for astaxanthin and canthaxanthin as a function of the volume of supramolecular solvent used for extraction

SUPRAS volume ( $\mu\text{L}$ )	<sup>a</sup> Recovery $\pm$ s (%)	
	AST	CAN
300	75 $\pm$ 2	76 $\pm$ 3
400	79 $\pm$ 1	80 $\pm$ 2
600	93 $\pm$ 2	91 $\pm$ 1
800	100 $\pm$ 2	99 $\pm$ 1
1000	98 $\pm$ 2	101 $\pm$ 2
1200	100 $\pm$ 3	100 $\pm$ 2

<sup>a</sup>500 mg of salmon spiked with 2  $\mu\text{g}$  of AST and 2  $\mu\text{g}$  of CAN; n=3

The microextraction was performed by vortex-shaking utilising a micro Teflon-coated bar to favour the dispersion of the sample in the SUPRAS. Using a vortex-shaking rate of 2.500 rpm (the maximum provided by the vortex-shaker REAX Top), both AST and CAN were completely extracted in the solvent in about 10 min. Small differences in the extraction kinetics of both analytes were observed; after 2 min, the percentage of CAN extracted was  $89\pm 1\%$  and that of AST  $82\pm 1\%$ , and after 5 min, recoveries were  $97\pm 1\%$  and  $93\pm 1\%$ , for CAN and AST, respectively. After the shaking-assisted extraction of samples, the liquid extract was separated from the non-soluble matrix components by ultracentrifugation using different rotation rates and times. Centrifugation of the sample at 15.000 rpm (16.720xg) for 15 min is recommended. Lower rotation rates/times of centrifugation did not provide an effective separation of sample particles from the supramolecular extract.

The major matrix components in fishes are proteins, fats and water, their average concentrations expressed as g per 100 g of fish muscle being 20.2, 13.3 and 64.2 for salmon and 19.9, 6.2 and 73.8 for rainbow trout, respectively [25]. The possible effect of matrix components in the capability of the SUPRAS to extract AST and CAN from salmonids was evaluated by analysing different amounts (100, 300 and 500 mg) of a salmon and a rainbow trout sample before and after spiking with 2  $\mu\text{g}$  of AST and 2  $\mu\text{g}$  of CAN. Results obtained are shown in Table 2. The concentrations of AST found in non-spiked samples were similar in the range investigated. No CAN was found in non-fortified salmon or rainbow trout. In addition, recoveries achieved for both AST and CAN were quantitative and independent of the amount of fortified sample analysed. From these results it can be inferred that matrix components did not influence the extraction process.

---

[25] Nutrition Facts Database (version 0.9.5.0, 2011), available at <http://silvertriad.com/nutrition-facts/download/>

**Table 2**  
Mean concentrations, standard deviations and recoveries obtained for astaxanthin and canthaxanthin in non-fortified and fortified salmonid samples as a function of the amount of sample analyzed

Sample	Sample amount (mg)	AST			CAN		
		Concentration added (mg Kg <sup>-1</sup> )	Concentration found <sup>a</sup> ±s <sup>b</sup> (mg Kg <sup>-1</sup> )	Recovery (%)	Concentration added (mg Kg <sup>-1</sup> )	Concentration found <sup>a</sup> ±s <sup>b</sup> (mg Kg <sup>-1</sup> )	Recovery (%)
Salmon	100	0	8.35±0.05	—	0	—	—
	300	20.0	29.2±0.4	104±1	20.0	20.8±0.3	104±1
	500	0	8.3±0.2	—	0	—	—
Rainbow trout	100	6.7	15.05±0.07	101±1	6.7	6.7±0.3	100±1
	300	0	8.3±0.1	—	0	—	—
	500	4.0	12.45±0.07	103±2	4.0	4.25±0.07	106±2
Rainbow trout	100	0	3.22±0.03	—	0	—	—
	300	20.0	23.8±0.8	103±3	20.0	20.2±0.6	100±3
	500	0	3.15±0.05	—	0	—	—
Rainbow trout	100	6.7	10.1±0.1	102±2	6.7	6.8±0.2	101±3
	300	0	3.3±0.1	—	0	—	—
	500	4.0	7.4±0.2	102±4	4.0	4.11±0.08	103±2

<sup>a</sup>Mean of three independent determinations

<sup>b</sup>Standard deviation

### 3.2. DETERMINATION OF TOTAL CAROTENOIDS BY PHOTOMETRY

Figure 1 shows the UV/VIS spectra recorded for AST and CAN dissolved in acetone and acetone/SUPRAS (75:25, v/v). Spectra obtained for both carotenoids were identical. In acetone, they showed an absorption peak at 480 nm, which underwent a slight hyperchromic shift in the presence of SUPRAS. Neither bathochromic nor hypsochromic shifts corresponding to J- and H-type aggregate formation [26] were observed, and therefore it can be concluded that no aggregation of the target carotenoids occurred when they were dissolved in acetone/SUPRAS.

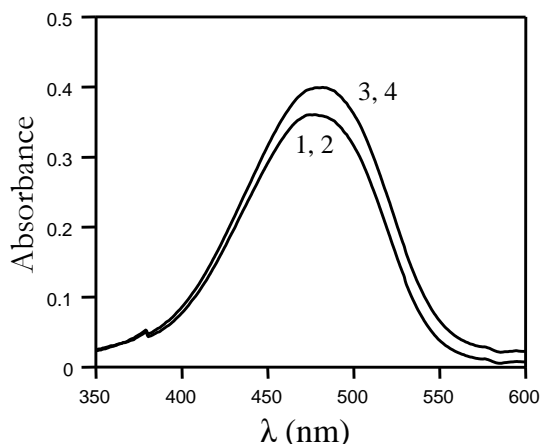


Fig. 1. UV/VIS spectra obtained for (1,3) AST and CAN (2,4) dissolved in (1,2) acetone and (3,4) acetone/SUPRAS (75:25, v/v). [AST] = [CAN] = 1.7 mg L<sup>-1</sup>.

Calibrations were run from standards prepared in acetone/SUPRAS (75:25, v/v) to ensure accurate measurements of carotenoids. Linearity was obtained in the interval 0.2–7.5 mg L<sup>-1</sup> for both AST and CAN. The intercept of the calibration graph was not significantly different from zero ( $0.01 \pm 0.02$ ) and the sensitivity, defined as the slope of the calibration graph was  $0.236 \pm 0.005$  L mg<sup>-1</sup>. The standard error of the estimate was 0.01 and the correlation coefficient 0.9990. Similar calibration parameters were obtained for CAN so, a single calibration using AST standards was

---

[26] C. Köpsel, H. Möltgen, Schuch, H. Auweter, K. Kleinermanns, H-D Martin, H. Bettermann, *Journal of Molecular Structure* 750 (2005) 109-115.

used for quantitation of total carotenoids. The instrumental detection and quantitation limits (calculated as three or ten-fold the standard deviation of six blank determinations) were 0.06 and 0.2 mg L<sup>-1</sup>, respectively. Taking into account the amount of sample extracted (500 mg), the volume of SUPRAS used for extractions (800 µL), the recovery obtained (around 100%) and the dilution factor (500 µL of supramolecular extract diluted to 2 mL with acetone), the detection and quantitation limits of the SUSME/photometric method for the determination of total carotenoids in salmonid fishes were estimated to be 0.4 and 1.3 mg Kg<sup>-1</sup>, respectively, and its upper concentration limit, 48 mg Kg<sup>-1</sup>. The concentration of total carotenoids in market salmon and rainbow trout typically varies between about 3 and 37 mg Kg<sup>-1</sup> [2], therefore, the proposed method is suitable in terms of sensitivity for the determination of colour in farming salmonid fishes.

The accuracy of the determination of the carotenoid content in fishes using external calibration was evaluated by comparison of the slopes of the calibration curves obtained from standards in acetone/SUPRAS (75:25, v/v) with those obtained from 500 mg of salmon fortified with known amounts of AST (0.7-24 µg) and analyzed using the whole procedure. Eight different concentrations were used for construction of each calibration curve. No statistically significant differences between the slopes obtained from standards and those obtained from the samples were observed by applying a Student t test [27]. The slope obtained from standards was  $0.236 \pm 0.005$  L mg<sup>-1</sup> (correlation coefficient = 0.9990), and that obtained from salmon samples  $0.233 \pm 0.007$  L mg<sup>-1</sup> (correlation coefficient = 0.997). The experimental t-value, 1.33, was below the critical t-value (3.05, significant level = 0.01).

The precision of the method was assessed by applying the whole procedure (see Section 2.4) to ten aliquots of a salmon sample containing a total concentration of carotenoids of 12.0 mg Kg<sup>-1</sup>. The relative standard deviation obtained was 3.3%.

---

[27] L. Cuadros, A.M. García, F. Alés, C. Jiménez, M. Román, *Journal of AOAC International* 78 (1995) 471-476.

### 3.3. DETERMINATION OF AST AND CAN BY LC-UV/VIS SPECTROSCOPY

Quantitation of individual carotenoids, AST and CAN, was performed by LC using UV-VIS spectroscopic detection (wavelength = 480 nm). The retention times were 3.0 and 8.3 min for AST and CAN in diluted extractant phases (500  $\mu$ L of extract diluted to 2 mL by the addition of acetone). Lower retention times (1.8 and 7.2 min, for AST and CAN, respectively) and wider and asymmetric chromatographic peaks were observed as non-diluted extractant phases were analysed. The SUPRAS acted as a pseudo-stationary phase where analytes solubilised and consequently their residence times in the chromatographic system changed.

Because of the similar photometric responses for AST and CAN, their quantification was performed from calibration with AST standards prepared in acetone/SUPRAS (75:25, v/v). A linear calibration graph in the interval 0.07-150 ng (correlation coefficient = 0.9998) with a slope of  $31.3 \pm 0.4 \text{ pg}^{-1}$  was obtained. The instrumental detection and quantitation limits for the target analytes were calculated from blank determinations by using a signal-to-noise ratio of 3 and 10, respectively. They were estimated to be 0.02 and 0.07 ng for AST, and 0.04 and 0.1 ng for CAN, respectively. Differences in detection and quantitation limits for carotenoids were a consequence of the differences in noise measured for each analyte at their corresponding retention times. The detection and quantitation limits of the method, calculated taking into account the weight of sample, the volume of extractant, the dilution factor and the injection volume, were 0.01 and 0.04  $\text{mg Kg}^{-1}$  for AST and, 0.02 and 0.07  $\text{mg Kg}^{-1}$  for CAN, respectively.

The accuracy of the determination of AST and CAN was evaluated by comparison of the slope of the calibration curve obtained from AST standards in acetone/SUPRAS (75:25) with those obtained for both AST and CAN from 500 mg salmon samples fortified with known amounts of carotenoids (0.05 – 20  $\mu$ g). No statistically significant differences between the slope obtained from standards and

those obtained from the samples were observed by applying a Student t test [28]. The slopes and correlation coefficients ( $n = 6$ ) obtained from salmon samples for AST and CAN were  $30.5 \pm 0.2 \text{ pg}^{-1}$ , 0.99996 and  $31.5 \pm 0.7 \text{ pg}^{-1}$ , 0.9991, respectively and that obtained from AST standards was  $31.3 \pm 0.4 \text{ pg}^{-1}$ , 0.9998. The experimental t-values obtained (0.65 and 0.47) were below the critical t-value (3.36 significant level = 0.01).

The precision of the method for the quantitation of AST and CAN was assessed by analysing ten 500 mg-aliquots of a salmon sample containing  $9.8 \text{ mg Kg}^{-1}$  AST which was spiked with  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  CAN. The relative standard deviations obtained for AST and CAN were 2.5% and 1.6%, respectively.

### 3.4. ANALYSIS OF SALMONID FISHES

Three salmons and three rainbow trouts were analysed to determine their total carotenoid content and the individual concentrations of both AST and CAN. The results obtained are shown in Table 3. AST was found in all the samples analysed, its concentration ranging in the intervals  $5.4\text{-}11.7 \text{ mg kg}^{-1}$  and  $3.5\text{-}7.6 \text{ mg kg}^{-1}$  for salmons and rainbow trouts, respectively. CAN was present in only one of these samples which contained a CAN/AST concentration ratio of c.a. 40:60, which has been reported to be that providing the most efficient pigmentation in farming rainbow trout [3]. No significant difference was observed for total concentration of carotenoids calculated from photometry and LC-UV/VIS spectroscopy. Consequently, as it was expected, no significant amount of other carotenoids compounds were present in the samples analysed.

Recovery studies were performed by analysing salmon and rainbow trout samples spiked with  $5 \text{ mg g}^{-1}$  of both AST and CAN. Recoveries for individual

---

[28] L. Cuadros, A.M. García, F. Alés, C. Jiménez, M. Román, Journal of AOAC International, 78 (1995) 471

carotenoids were within the interval 94-106% and those for total carotenoids ranged between 98 and 104% (Table 4).

**Table 3**

Mean concentration of astaxanthin and canthaxanthin, and total carotenoid content found in different salmonid fishes analysed by SUSME-LC-UV/VIS spectroscopy and SUSME-photometry

Sample	AST <sup>a</sup>	CAN <sup>a</sup>	Total carotenoid content <sup>a</sup>	
			SUSME-LC-UV/VIS spectroscopy	SUSME-photometry
Salmon 1	11.7±0.3	—	11.7±0.3	12.00±0.01
Salmon 2	5.4±0.1	—	5.4±0.1	5.3±0.1
Salmon 3	6.7±0.2	—	6.7±0.2	6.7±0.3
Rainbow trout 1	3.5±0.2	3.2±0.2	6.7±0.2	6.9±0.3
Rainbow trout 2	4.65±0.05	—	4.65±0.05	4.5±0.2
Rainbow trout 3	7.6±0.2	—	7.6±0.2	7.8±0.1

<sup>a</sup>Mean of three independent determinations (mg Kg<sup>-1</sup>) ± standard deviation

**Table 4**

Mean percent recoveries<sup>a</sup> obtained for astaxanthin, canthaxanthin and total carotenoids by analyzing fortified salmonid samples<sup>b</sup> by SUSME-LC-UV/VIS spectroscopy and SUSME-photometry

Sample	AST	CAN	Total carotenoids <sup>c</sup>
Salmon 1	99±2	98±2	99±2
Salmon 2	100±5	102±4	98±1
Salmon 3	98±3	94±4	98±2
Rainbow trout 1	99±4	102±1	100±3
Rainbow trout 2	102±4	98±2	101±1
Rainbow trout 3	99±2	106±5	104±3

<sup>a</sup>Mean of three independent determinations

<sup>b</sup>Spiking level: 5 mg Kg<sup>-1</sup> AST and 5 mg Kg<sup>-1</sup> CAN

<sup>c</sup>Determined by SUSME-photometry



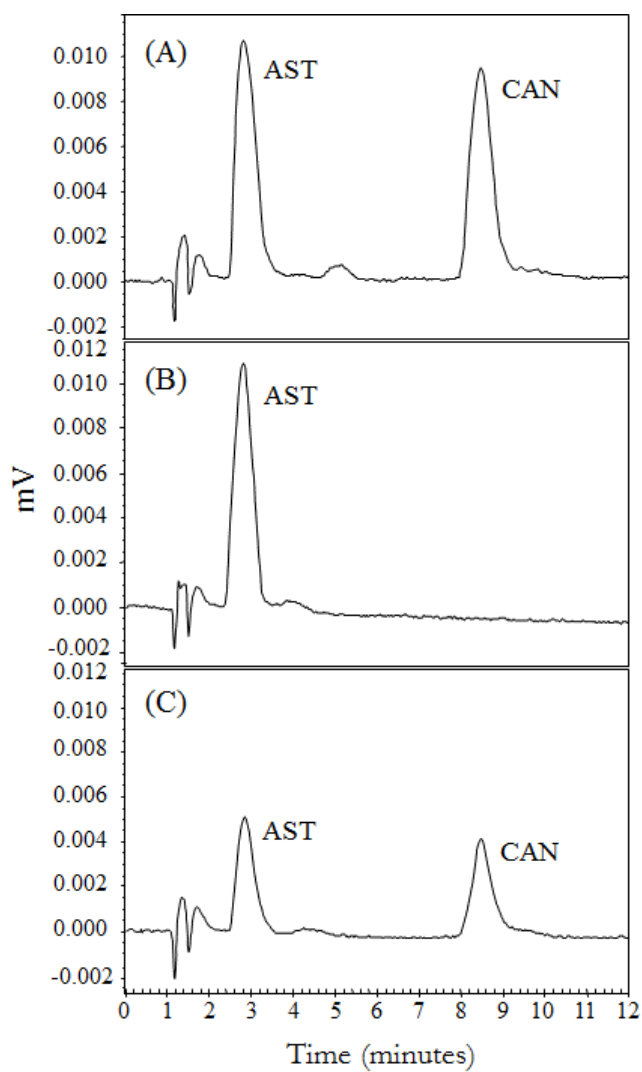


Fig. 2. Chromatograms obtained from (A) a standard solution of 1 mg L<sup>-1</sup> AST and 1 mg L<sup>-1</sup> CAN, (B) 500 mg of salmon containing 6.7±0.2 mg Kg<sup>-1</sup> of AST and (C) 500 mg of rainbow trout containing 3.5±0.2 mg Kg<sup>-1</sup> of AST and 3.2±0.2 mg Kg<sup>-1</sup> of CAN.

#### **4. CONCLUSIONS**

A SUPRAS made up of DeA aggregates dispersed in a THF-water phase has proved to be a suitable tool for the extraction of carotenoids in farmed salmonids. The direct analysis of the supramolecular extracts by photometry or LC-UV/VIS spectroscopy provided simple, rapid and low-cost methods to determine supplemental feeding needs for AST and/or CAT in aquafarming. Additional valuable assets of the methods here proposed were their selectivity (no interference from fats or other matrix components was observed which resulted in increased sample throughput) and robustness (extractions were not dependent on the concentration of THF or DeA, or the pH used to produce the SUPRAS).

#### **Acknowledgments**

The authors gratefully acknowledge financial support from Spanish MICINN (Project CTQ2011-23849) and from the Andalusian Government (Junta de Andalucía, Spain, Project P09-FQM-5151). FEDER also provided additional funding. C. Caballo acknowledges the Andalusian CICyE for a postgraduate fellowship.



# **RESUMEN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**





## 1. MUESTRAS Y ANALITOS

Las investigaciones realizadas en esta Tesis Doctoral han tenido como principal objetivo el desarrollo de métodos analíticos para la determinación enantioselectiva de contaminantes quirales en el medio ambiente, un ámbito de investigación prácticamente inexplorado. También se han realizado estudios en el área del control de la calidad alimentaria, con el desarrollo de métodos para la determinación de carotenoides en salmónidos.

Las muestras medioambientales analizadas incluyeron una gran variedad de muestras líquidas y sólidas. Se analizaron aguas naturales (aguas de río y subterráneas) y aguas residuales (influentes y efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales), suelos con diferente pH, contenido en materia orgánica y composición granulométrica (franco arenosos, franco arcillo arenosos, arcillosos y arcillo limosos) y distintas especies de peces de agua dulce (trucha arcoíris, carpa común, carpa americana, alburno y pez sol). La determinación enantioselectiva de contaminantes quirales en estas muestras presenta como principal dificultad, además de las inherentes al análisis ambiental, baja concentración de los analitos (del orden de los  $\text{ng L}^{-1}$  a los  $\mu\text{g L}^{-1}$  en muestras acuosas y de los  $\text{ng g}^{-1}$  a los  $\mu\text{g g}^{-1}$  en muestras sólidas) en muestras muy complejas, las propias del análisis quiral, analitos con estructuras moleculares muy similares que sólo se diferencian en la disposición espacial de sus grupos funcionales.

Los contaminantes quirales determinados fueron los enantiómeros R y S de diferentes plaguicidas y fármacos quirales ampliamente utilizados. En la Tabla 1 se muestran las características físico-químicas de los compuestos determinados y la estructura química de sus enantiómeros. Los enantiómeros R y S de los plaguicidas mecoprop (MCP) y diclorprop (DCPP), utilizados como herbicidas en numerosos cultivos, se determinaron en suelos y aguas naturales. Estos herbicidas llegan a las aguas subterráneas y a los ríos mediante lixiviación y escorrentía de suelos contaminados, respectivamente, debido a su elevada movilidad en el suelo y solubilidad en agua. El enantiómero R es el único que ejerce efecto herbicida, aunque tanto MCP como DCPP se utilizan frecuentemente como racematos. En el medio

ambiente, ambos herbicidas pueden sufrir degradación exclusiva o preferencial de uno de los enantiómeros o transformación de un enantiómero en otro. Además, la ecotoxicidad de cada uno de los enantiómeros es diferente.

**Tabla 1**

Constante de partición octanol/agua ( $K_{o/w}$ ), constante de acidez ( $pK_a$ ) y estructura química de los enantiómeros de los compuestos quirales determinados

Compuesto	Log $K_{o/w}$	$pK_a$	Estructura Química	
			Enantiómero R	Enantiómero S
<b>Plaguicidas</b>				
Mecoprop (MCP)	3,1	3,1		
Diclorprop (DCPP)	3,4	3,1		
<b>Fármacos</b>				
Ibuprofeno (IBP)	4,0	4,9		
Ketoprofeno (KTP)	3,1	4,5		
Naproxeno (NPX)	3,2	4,2		

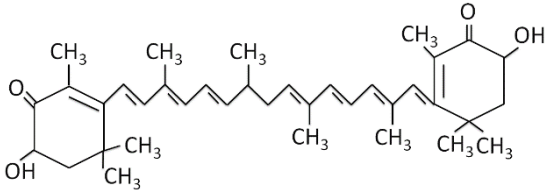
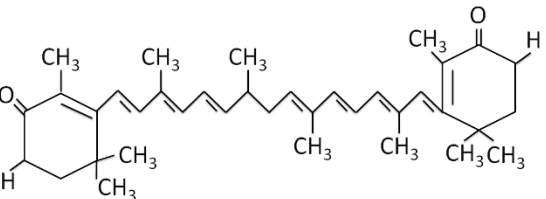
Los fármacos quirales determinados fueron ibuprofeno (IBP), ketoprofeno (KTP) y naproxeno (NPX). La determinación de sus enantiómeros R y S se llevó a cabo en aguas residuales y peces de agua dulce. Estos fármacos se consumen en grandes cantidades en los países desarrollados, con frecuencia sin prescripción facultativa, por su efecto analgésico y antiinflamatorio. El ibuprofeno y el naproxeno se comercializan como racematos, aunque su efecto terapéutico se debe casi exclusivamente al enantiómero S, mientras que el naproxeno sólo se comercializa como (S)-naproxeno, ya que el (R)-naproxeno es hepatotóxico. Estos tres fármacos están presentes en la práctica totalidad de las aguas residuales urbanas fundamentalmente procedentes de la excreción de fármacos parcialmente metabolizados. Los residuos de ibuprofeno, ketoprofeno y naproxeno no se eliminan completamente en las plantas de tratamiento de aguas residuales y llegan a los ríos donde contaminan a la biota acuática.

Finalmente, en el ámbito del control de la calidad alimentaria, se han desarrollado métodos para la determinación de carotenoides totales en salmónidos de piscifactoría (salmones y truchas arcoíris) y para la determinación individualizada de los dos carotenoides presentes en estos peces, astaxantina (AST) y cantaxantina (CAN). En la Tabla 2 se muestran las características químico-físicas y la estructura química de estos dos compuestos. AST y CAN son pigmentos naturales responsables del color rosado del músculo de los salmónidos. Este color rosado se considera un índice de calidad y determina el precio y la aceptación del producto en el mercado. Los carotenoides no son sintetizados por los salmónidos sino ingeridos en su dieta, por lo que los piensos con los que se alimentan a los salmónidos en las piscifactorías deben contener estos pigmentos. El aporte de carotenoides en los piensos supone entre el 6 y el 8% del coste de producción total de los salmónidos y por lo tanto, con el fin de reducir costes, los productores de este tipo de pescado ajustan al máximo la cantidad de pigmento que les suministran a los peces en la dieta y realizan análisis del contenido de carotenoides antes de su comercialización. Se considera que la concentración mínima de carotenoides que debe contener el músculo de los salmónidos para alcanzar una pigmentación visual aceptable es de  $4 \text{ mg Kg}^{-1}$ .



**Tabla 2**

Constante de partición octanol/agua ( $K_{o/w}$ ), constante de acidez ( $pK_a$ ) y estructura química de los carotenoides estudiados

Compuesto	Log $K_{o/w}$	$pK_a$	Estructura Química
Astaxantina (AST)	8,2	12,3	
Cantaxantina (CAN)	9,5	—	

## 2. MICROEXTRACCIÓN CON DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES

### 2.1. DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES INVESTIGADOS

La extracción de los analitos tanto de muestras líquidas como sólidas se ha realizado usando disolventes supramoleculares (SUPRAS) constituidos por agregados inversos de ácidos alquil carboxílicos. En la Figura 1, se muestra un esquema de la estructura de los agregados en este tipo de SUPRAS. Se trata de estructuras hexagonales en las que las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas de ácido alquil carboxílico (AAC) se orientan hacia el exterior en contacto con tetrahidrofurano (THF) y el grupo carboxílico hacia el interior en contacto con agua.

Estos SUPRAS se forman a temperatura ambiente en mezclas ternarias de AAC, THF y agua. El agua debe tener un pH igual o inferior a 4 para que la totalidad del AAC presente en la mezcla hidroorgánica se encuentre protonado ( $pK_a$  de los AAC = 4,8) y pase a formar parte del disolvente supramolecular. A valores de pH

superiores a 4, disminuye el volumen de SUPRAS generado debido a la desprotonación del tensioactivo.

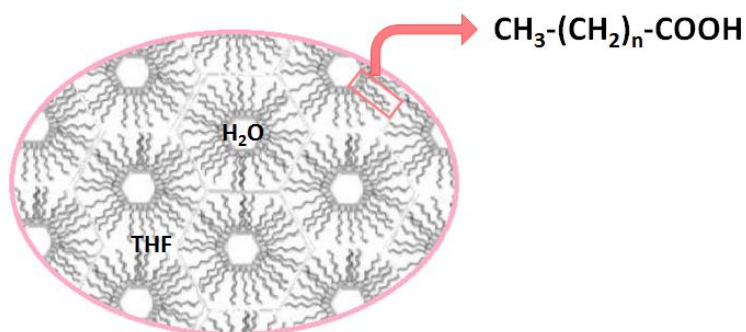


Figura 1. Esquema de la estructura de los agregados que constituyen los disolventes supramoleculares de ácidos alquilcarboxílicos.

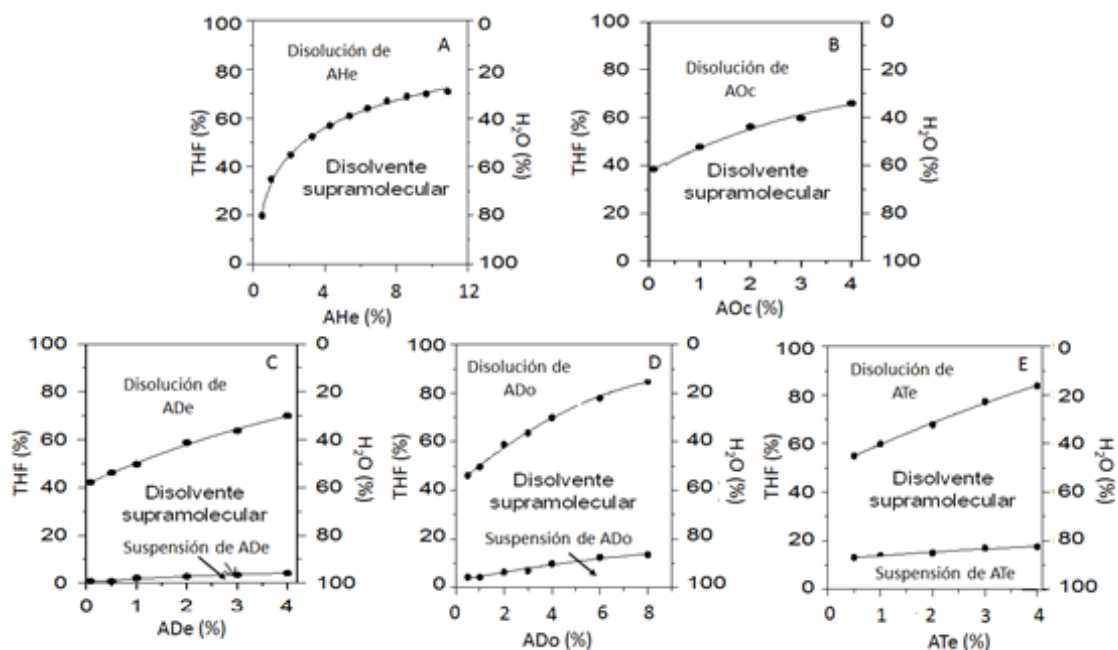


Figura 2. Diagrama de fases para mezclas ternarias de tetrahidrofurano, agua (pH < 4) y (A) ácido hexanoico (AHe), (B) ácido octanoico (AOc), (C) ácido decanoico (ADe), (D) ácido dodecanoico (ADo) o (E) ácido tetradecanoico (ATE) obtenidos a temperatura ambiente.

En la Figura 2 se muestran los diagramas de fases tensioactivo-THF-H<sub>2</sub>O para los ácidos alquil carboxílicos evaluados en esta Tesis Doctoral: ácido hexanoico (AHe), octanoico (AOc), decanoico (ADe), dodecanoico (ADo) y tetradecanoico (ATe). El disolvente supramolecular se genera en un amplio intervalo de concentraciones de AAC, THF y H<sub>2</sub>O, que varían en función de la longitud de la cadena hidrocarbonada del AAC. A porcentajes de THF superiores a los requeridos para la formación del SUPRAS, el AAC se solubiliza en la mezcla THF- H<sub>2</sub>O, mientras que a porcentajes inferiores se produce la insolubilización del tensioactivo, excepto para el caso del ácido hexanoico y octanoico que son líquidos a temperatura ambiente.

Los disolventes de agregados inversos de ácidos alquilcarboxílicos presentan dos importantes ventajas: una elevada eficacia de extracción y la obtención de extractos libres de macromoléculas como proteínas, polisacáridos y ácidos húmicos o fúlvicos. Su elevada eficacia de extracción se debe por una parte, a su capacidad de solubilizar analitos mediante diferentes tipos de interacciones, de dispersión con la cadena hidrocarbonadas de las moléculas de tensioactivo que forman los agregados y polares y formación de puentes de hidrógeno con sus grupos carboxílicos, y por otra, al elevado número de centros de solubilización que poseen como consecuencia de las elevadas concentraciones de tensioactivo que contienen (por ejemplo, la concentración de ADe en SUPRAS obtenidos usando un 5% de THF es de 0,76 mg  $\mu\text{L}^{-1}$ ). Por otra parte, su capacidad para extraer una gran variedad de compuestos sin extraer macromoléculas, permite obtener extractos que no requieren etapas de limpieza adicionales y pueden ser inyectados directamente en el sistema cromatográfico. El tamaño de las moléculas extraídas se puede controlar seleccionando los porcentajes de tetrahidrofurano y agua usados en la síntesis, ya que estos dos parámetros son los que determinan el tamaño de las cavidades acuosas de las estructuras hexagonales invertidas que forman los ácidos alquilcarboxílicos.

## 2.2. SELECCIÓN DEL DISOLVENTE SUPRAMOLECULAR

El disolvente supramolecular utilizado en cada uno de los métodos de microextracción desarrollados se seleccionó de entre aquellos que permitían obtener extractos compatibles con la separación de los analitos mediante cromatografía líquida (CL) y su cuantificación fotométrica o mediante espectrometría de masas (EM), para carotenoides y contaminantes quirales, respectivamente. El SUPRAS no debe interferir en la separación ni en la detección de los analitos y además, en los casos en los que se usa detección mediante EM, se debe evitar la entrada del tensioactivo en la fuente de ionización para evitar su contaminación. Para evaluar la compatibilidad del SUPRAS con el proceso de separación/cuantificación de los analitos, se prepararon patrones de los analitos en los diferentes disolventes supramoleculares ensayados (disolventes de AHe, AOc, ADe, ADo y ATe) y se obtuvieron los correspondientes cromatogramas usando cromatografía líquida en las condiciones cromatográficas requeridas para la separación. El uso de un detector de diodos en fila permitió obtener cromatogramas a las longitudes de onda de máxima absorción de cada uno de los analitos investigados (230 nm para MCPP y DCPP, 220 nm para IBP, 255 nm para KTP, 230 nm para NPX y 480 nm para AST y CAN) y de los ácidos alquil carboxílicos que constituyen los SUPRAS ensayados (210 nm) y detectar posibles problemas de coelución.

La separación simultánea de los enantiómeros R y S de MCPP y DCPP se realizó utilizando una columna Nucleodex  $\alpha$ -PM (selector quiral:  $\alpha$ -ciclodextrina permitilada) y una fase móvil con un 65% de metanol y un 35 % de tampón ácido fórmico/formiato amónico 100 mM a pH 5, a un caudal de 0,5 mL min<sup>-1</sup>. En estas condiciones, el ácido alquil carboxílico presente en el SUPRAS se eluye de la columna en un amplio intervalo de tiempo, que solapa con los tiempos de retención de los analitos, con independencia de cuál sea la longitud de su cadena hidrocarbonada (6-14 átomos de C). Por lo tanto, es imprescindible eliminar el tensioactivo del extracto antes de su inyección en el sistema cromatográfico.

La eliminación de ADo y ATe se puede realizar fácilmente eliminando el THF y el agua presentes en el SUPRAS mediante evaporación y redisolviendo los

analitos en un tampón de acetato amónico a pH 5, condiciones en las que ADO y ATe no son solubilizados (solubilidad de ADO y ATe a pH 5 y 25 °C = 0,26 y 0,06 g L<sup>-1</sup>, respectivamente). A valores de pH inferiores a 5, no se solubilizan totalmente los analitos en la disolución acuosa y a pH superiores a 5 aumenta la solubilidad de ADO y ATe en la disolución acuosa y su eliminación no es efectiva.

El procedimiento utilizado para eliminar ADO o ATe de los extractos supramoleculares se muestra en la Figura 3. La evaporación del THF y el agua del extracto supramolecular se realiza usando una corriente de N<sub>2</sub> y agitación magnética y la redisolución de los analitos en tampón acetato, usando agitación vortex. Finalmente, el extracto acuoso donde se encuentran solubilizados los analitos, se separa del tensioactivo insolubilizado mediante centrifugación.

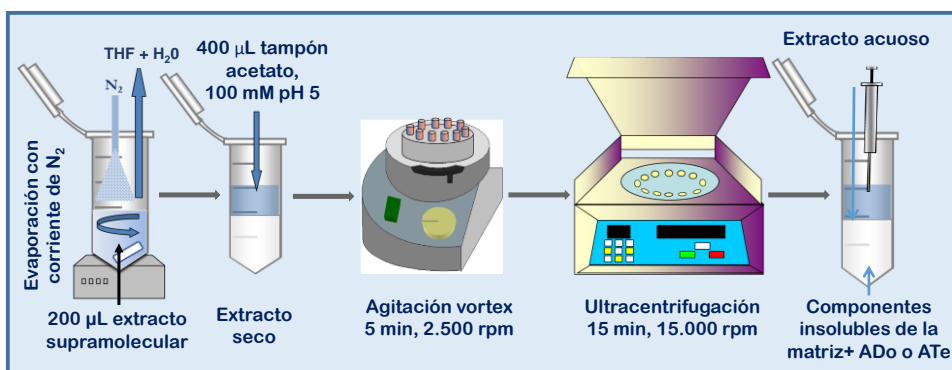


Figura 3. Procedimiento usado para eliminar ácido dodecanoico o tetradecanoico del extracto supramolecular.

Este método de eliminación del tensioactivo no se pudo aplicar a los extractos obtenidos usando SUPRAS de AHe, AOc, ADe, debido a que estos tensioactivos se solubilizan en cantidades apreciables en tampón acetato a pH 5 (solubilidad de AHe, AOc y ADe a pH 5 y 25 °C = 26, 5,5 y 1,2 g L<sup>-1</sup>, respectivamente) y por lo tanto, no son eliminados totalmente del extracto.

El disolvente seleccionado para extraer MCP y DCPP de aguas naturales y suelos fue el constituido por agregados de ADO, ya que su síntesis requiere menor porcentaje de THF que la del SUPRAS constituido por agregados de ATe (comparar los diagramas de fases para mezclas ternarias de ADO-THF-agua y de ATe-THF-

agua, Figuras 2D y 2E, respectivamente) y por lo tanto, permite obtener factores de concentración mayores en la extracción de muestras acuosas (el volumen de SUPRAS formado aumenta exponencialmente con el porcentaje de THF usado en la síntesis) y reduce el consumo de disolvente orgánico en la extracción tanto de muestras líquidas como sólidas.

Los enantiómeros R y S de IBP, KTP y NPX se separaron usando una columna Sumichiral OA-2500 [selector quirál: (R)-1-naftilglicina y ácido 3,5-dinitrobenzoico] y una fase móvil con un 90% de THF y un 10 % de tampón acetato amónico 50 mM en metanol, con un caudal variable de 0,5 mL min<sup>-1</sup> de 0 a 18 min y 1,2 mL min<sup>-1</sup> de 18 a 36 min. En estas condiciones, el ácido alquil carboxílico presente en el SUPRAS presenta un tiempo de retención inferior al de los analitos, con independencia de la longitud de su cadena hidrocarbonada. Por lo tanto, cualquiera de los SUPRAS ensayados (AHe, AOc, ADe, ADo y ATe) sería adecuado para la extracción de IBP, KTP y NPX de muestras de aguas residuales y peces previa a su determinación enantioselectiva mediante LC-EM, con la única precaución de enviar el eluido de la columna a desecho durante el tiempo de elución del tensioactivo para evitar su entrada en la fuente de ionización del espectrómetro de masas. El SUPRAS seleccionado en este caso fue el constituido por agregados de ADe, es decir el SUPRAS que requiere un menor porcentaje de THF para su formación de entre los que se preparan a partir de un ácido alquil carboxílico sólido (ADe, ADo y ATe, comparar los diagramas de fases en la Figura 2). El AHe y AOc son líquidos viscosos a temperatura ambiente, lo que dificulta medir volúmenes de forma exacta y pesar cantidades predeterminadas del orden de los mg.

Finalmente, los carotenoides AST y CAN se separaron en una columna Ascentis™ C18 usando una fase móvil con un 95% de metanol y un 5 % de agua a un caudal de 0,4 mL min<sup>-1</sup>. En este caso sólo se ensayó el SUPRAS de ADe como posible extractante. La inyección en el sistema cromatográfico de disoluciones de los analitos en SUPRAS dio lugar a cromatogramas con picos anchos y asimétricos que no permitieron una medida reproducible del área de pico. La dilución de las disoluciones con acetona (acetona/SUPRAS 75/25) mejoró apreciablemente la forma de los picos y la reproducibilidad de las medidas cromatográficas. Por lo tanto,

se usó ADe para extraer AST y CAN de salmónidos y los analitos se separaron mediante CL previa dilución de los extractos con acetona. La determinación de carotenoides totales mediante fotometría también se llevó a cabo realizando las medidas en extractos diluidos con acetona (acetona/SUPRAS 75/25).

### 2.3 PROCEDIMIENTOS DE MICROEXTRACCIÓN USADOS

El procedimiento de extracción usado varió en función del tipo de muestra analizada. Cuando se analizaron muestras acuosas medioambientales (aguas naturales o residuales), el SUPRAS se formó en la propia muestra, mientras que cuando se analizaron muestras sólidas (suelos o peces), la extracción se realizó usando un SUPRAS previamente sintetizado. En la Figura 4 se esquematiza el procedimiento seguido para extraer muestras acuosas. El SUPRAS se genera mediante la adición de la muestra acidificada a una disolución de AAC en THF. La mezcla de AAC-THF-agua en la que se ha formado el SUPRAS, se agita usando un agitador magnético para favorecer la dispersión del SUPRAS en la muestra y acelerar el proceso de extracción, y se centrifuga para separar las dos fases líquidas, el extracto de disolvente supramolecular y una disolución hidroorgánica. Las extracciones se realizan en tubos de centrífuga especialmente diseñados por nuestro grupo de investigación para facilitar la recolección de los extractos obtenidos. La baja viscosidad del extracto permite retirarlo fácilmente utilizando una microjeringa.

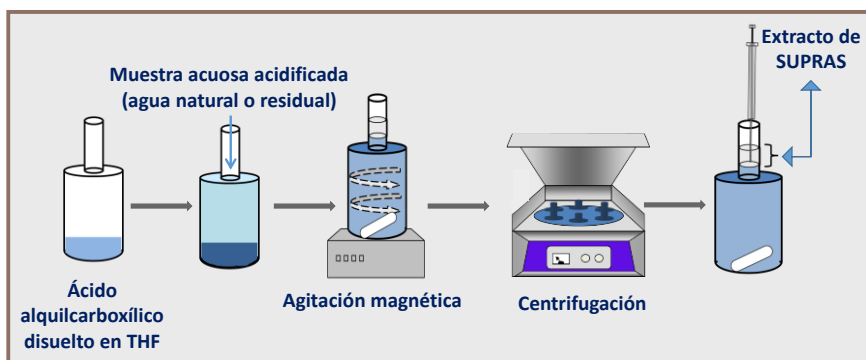


Figura 4. Procedimiento utilizado para la microextracción de muestras acuosas con disolventes de agregados inversos de ácidos carboxílicos.

El procedimiento utilizado para extraer muestras sólidas se muestra en la Figura 5. El SUPRAS utilizado en la microextracción se sintetiza añadiendo una disolución de HCl  $10^{-2}$  M a una disolución de tensioactivo en THF. La mezcla se agita y posteriormente, se centrifuga para favorecer la separación del disolvente supramolecular. El SUPRAS se retira usando una jeringa y se almacena herméticamente cerrado a 4 °C para evitar pérdidas de THF. El volumen de disolvente supramolecular obtenido varía en función de la naturaleza y cantidad de tensioactivo y el porcentaje de THF usados en la síntesis (ej. usando 6,5 g de ADe y un 5% de THF se obtienen aproximadamente 8,5 mL de SUPRAS).

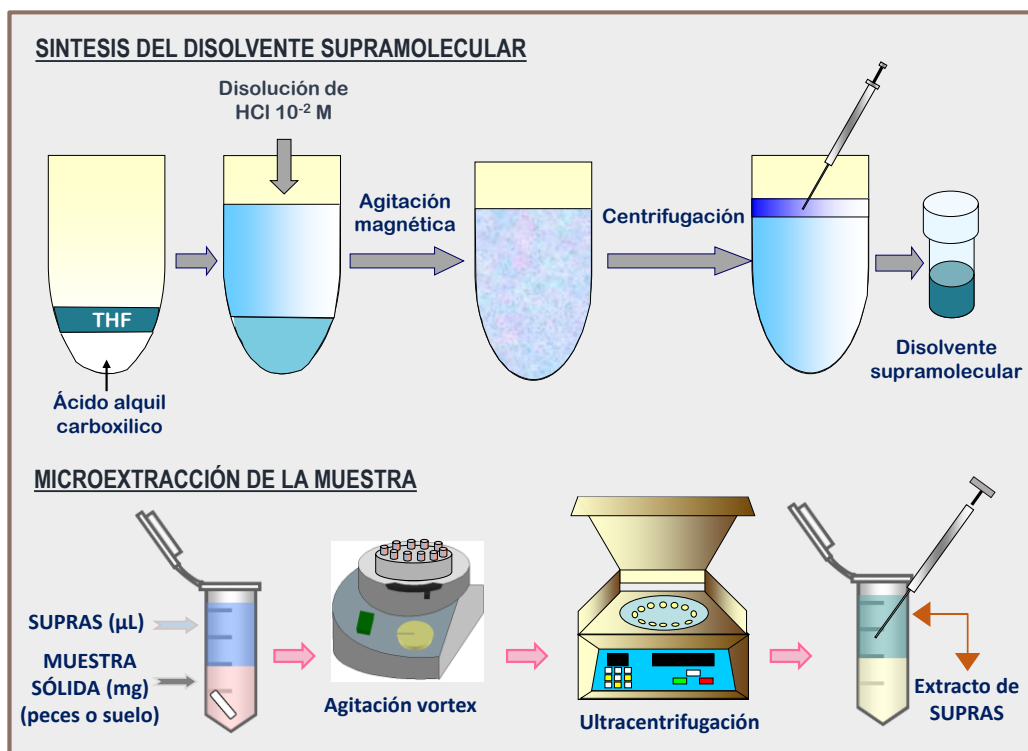


Figura 5. Procedimiento utilizado para la microextracción de muestras de suelo y peces usando disolventes de agregados inversos de ácidos alquil carboxílicos.

Una vez sintetizado el disolvente supramolecular, las muestras de suelo secas y cribadas y las muestras de peces trituradas en un homogenizador-dispersador se pesan (pesadas del orden de los mg) en un microtubo y se extraen en un pequeño



volumen de SUPRAS (del orden de los  $\mu\text{L}$ ). Para favorecer la dispersión de la muestra en el disolvente, se añade una varilla magnética al microtubo y éste se agita usando un agitador de vórtice. Posteriormente, el microtubo se centrifuga para separar el extracto supramolecular líquido de las partículas sólidas de muestra y el extracto se retira usando una microjeringa.

## 2.4. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA EFICACIA DE EXTRACCIÓN

### 2.4.1. Extracción de muestras líquidas

El porcentaje de THF y la cantidad de tensioactivo usados para formar los SUPRAS de agregados inversos de AAC son dos factores clave en la extracción de compuestos orgánicos en muestras acuosas, ya que estas dos variables determinan el volumen de SUPRAS formado y su composición. En la Tabla 3 se muestran los volúmenes obtenidos para SUPRAS de ADe y ADo y las concentraciones de AAC presentes en dichos SUPRAS en función del porcentaje de THF y cantidad de AAC usada en su generación. En todos los casos el volumen total de la mezcla hidroorgánica usada en el proceso de extracción (volumen de muestra acuosa + volumen de THF) fue de 76 mL. El volumen de SUPRAS obtenido aumenta tanto al aumentar el porcentaje de THF como la cantidad de AAC, con la diferencia de que la dependencia del volumen de SUPRAS con el porcentaje de disolvente orgánico es exponencial y con la cantidad de tensioactivo es lineal. Las expresiones matemáticas que relacionan los volúmenes de SUPRAS generados con el porcentaje de THF y la cantidad de ADe o ADo usados son:

$$V_{\text{SUPRAS}} = (1,04 \pm 0,02) Q_{\text{ADe}} e^{(0,0473 \pm 0,0009) [\text{THF}]}$$

$$V_{\text{SUPRAS}} = (1,07 \pm 0,02) Q_{\text{ADo}} e^{(0,044 \pm 0,01) [\text{THF}]}$$

donde  $V_{\text{SUPRAS}}$  es el volumen de SUPRAS en  $\mu\text{L}$ ,  $Q_{\text{ADe}}$  y  $Q_{\text{ADo}}$  la cantidad de ácido decanoico y dodecanoico en mg, respectivamente, y  $[\text{THF}]$  la concentración THF expresada en tanto por ciento.

En cuanto a la composición del SUPRAS, la concentración de AAC en el disolvente disminuye a medida que aumenta el porcentaje de THF usado para

**Tabla 3**  
Volumen de SUPRAS ( $V_{\text{SUPRAS}}$ ), concentración de ácido alquil carboxílico en el SUPRAS ( $[\text{AAC}]_{\text{SUPRAS}}$ ) y recuperación y factor de concentración obtenidos para profenos y fenoxiácidos en muestras acuosas en función del porcentaje de THF y la cantidad de ácido alquil carboxílico ( $Q_{\text{AAC}}$ ) usadas en el proceso de extracción

SUPRAS	Variable	$V_{\text{SUPRAS}}$ ( $\mu\text{L}$ )	$[\text{AAC}]_{\text{SUPRAS}}$ (M)	Recuperación $\pm$ s <sup>a</sup> (%)			Factor de concentración $\pm$ s <sup>a</sup>		
				KTP	NPX	IBP	KTP	NPX	IBP
ADe <sup>b</sup>	[THF] (%)								
	5	100	4,4	65 $\pm$ 2	67 $\pm$ 1	102 $\pm$ 3	470 $\pm$ 20	487 $\pm$ 8	740 $\pm$ 20
	10	127	3,2	70,1 $\pm$ 0,4	69 $\pm$ 2	99 $\pm$ 2	378 $\pm$ 2	372 $\pm$ 9	530 $\pm$ 10
	15	161	2,5	65,3 $\pm$ 0,2	68,1 $\pm$ 0,5	98 $\pm$ 2	262 $\pm$ 1	273 $\pm$ 2	392 $\pm$ 7
	20	204	2,2	58 $\pm$ 2	61 $\pm$ 1	96 $\pm$ 1	174 $\pm$ 5	182 $\pm$ 4	287 $\pm$ 3
ADo <sup>c</sup>				MCPP	DCPP		MCPP	DCPP	
	10	249	3,1	59 $\pm$ 2	56 $\pm$ 2		162 $\pm$ 6	154 $\pm$ 7	
	12	272	2,9	76,0 $\pm$ 0,8	77 $\pm$ 2		187 $\pm$ 2	189 $\pm$ 4	
	15	310	2,6	75 $\pm$ 1	74 $\pm$ 1		155 $\pm$ 3	154 $\pm$ 3	
	20	387	2,1	72 $\pm$ 1	73 $\pm$ 1		112 $\pm$ 2	114 $\pm$ 2	
ADe <sup>d</sup>	25	482	1,7	66 $\pm$ 3	65 $\pm$ 2		78 $\pm$ 3	77 $\pm$ 2	
	$Q_{\text{AAC}}$ (mg)			KTP	NPX	IBP	KTP	NPX	IBP
	76	100	4,4	65 $\pm$ 2	67 $\pm$ 1	102 $\pm$ 3	470 $\pm$ 20	487 $\pm$ 8	740 $\pm$ 20
	114	150	4,4	74 $\pm$ 1	74 $\pm$ 2	102 $\pm$ 2	354 $\pm$ 7	357 $\pm$ 9	490 $\pm$ 10
	152	200	4,4	79,2 $\pm$ 0,7	79,1 $\pm$ 0,3	101,7 $\pm$ 0,1	286 $\pm$ 2	286 $\pm$ 1	367,1 $\pm$ 0,3
ADo <sup>e</sup>	228	300	4,4	87,7 $\pm$ 0,1	84,8 $\pm$ 0,2	99,6 $\pm$ 0,7	213,3 $\pm$ 0,2	206,2 $\pm$ 0,5	242 $\pm$ 2
	380	501	4,4	98 $\pm$ 2	93 $\pm$ 3	101 $\pm$ 2	143 $\pm$ 3	135 $\pm$ 4	147 $\pm$ 4
				MCPP	DCPP		MCPP	DCPP	
	50	91	2,9	55 $\pm$ 2	56 $\pm$ 2		400 $\pm$ 13	410 $\pm$ 13	
	100	181	2,9	68 $\pm$ 1	68,0 $\pm$ 0,8		250 $\pm$ 4	251 $\pm$ 3	
	150	272	2,9	76,0 $\pm$ 0,8	77 $\pm$ 2		187 $\pm$ 2	189 $\pm$ 4	
	200	363	2,9	79 $\pm$ 1	82 $\pm$ 1		147 $\pm$ 2	152 $\pm$ 3	
	300	544	2,9	89 $\pm$ 1	89 $\pm$ 1		100 $\pm$ 2	110 $\pm$ 3	

<sup>a</sup>Desviación estándar (n=6);

<sup>b</sup>76 mg de ADe; <sup>c</sup>150 mg de ADo; <sup>d</sup>5% de THF; <sup>e</sup>12% de THF; <sup>b,d</sup>pH=2,0; <sup>c,e</sup>pH=1,5

<sup>b,c,d,e</sup>Volumen de muestra+Volumen de THF = 76 mL

generarlo, debido a que se produce un aumento en la cantidad de disolvente orgánico y agua incorporados al SUPRAS. Sin embargo, la composición del SUPRAS no se ve afectada por la cantidad de tensioactivo usada para su generación en las condiciones ensayadas (porcentaje de THF = 5% y 12% para SUPRAS de ADe y ADo, respectivamente). Además, la longitud de la cadena hidrocarbonada del AAC tampoco afecta a la concentración molar de tensioactivo presente en el SUPRAS (comparar las concentraciones de AAC en los SUPRAS de ADe y ADo obtenidos con 10%, 15% y 20% de THF).

En la Tabla 3 también se muestran las recuperaciones y factores de concentración obtenidos para KTP, NPX e IBP usando SUPRAS de ADe y para MCPP y DCPD usando SUPRAS de ADo generados utilizando diferentes porcentajes de THF y cantidades de AAC. El factor de concentración (FC) se obtuvo a partir de la expresión:  $FC = 0,01 R(\%) V_M / V_{SUPRAS}$ , donde  $R(\%)$  es el porcentaje de recuperación y  $V_M$  el volumen de muestra. Las recuperaciones obtenidas apenas varían con el porcentaje de THF, ya que se producen dos efectos contrapuestos que influyen en la cantidad de analito extraído, aumento del volumen de SUPRAS y disminución de la concentración de AAC en el mismo. Al mantenerse prácticamente constante la cantidad de analito extraído y aumentar exponencialmente el volumen de SUPRAS generado, se produce una importante disminución del factor de concentración obtenido al aumentar el porcentaje de THF.

Sin embargo, un aumento en la cantidad de AAC origina un incremento en la cantidad de analito extraído, con la única excepción de IBP, el analito más apolar (ver constantes octanol/agua en la Tabla 1), que se extrae cuantitativamente con independencia de la cantidad de ADe usado en la extracción. El aumento del rendimiento observado para los analitos más polares se debe a que se produce un aumento del volumen de SUPRAS generado manteniéndose constante su composición. En cualquier caso, un aumento en la cantidad de AAC origina una disminución del FC para todos los analitos ensayados, ya que el aumento del rendimiento, es menos pronunciado que el aumento del volumen de SUPRAS.

Las recuperaciones y factores de concentración son muy semejantes para analitos con similar polaridad dentro de cada grupo estructural, aumentando de forma apreciable al disminuir la polaridad del analito (comparar los resultados obtenidos para KTP y NPX con los obtenidos para IBP). Cuanto más apolar es un analito menor es su solubilidad en agua y más fuertes son las interacciones de dispersión que puede establecer con las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas de AAC en los agregados que constituyen el SUPRAS.

La cantidad de tensioactivo y porcentaje de THF seleccionados en cada caso deben ser aquellos que proporcionen el FC necesario para alcanzar el límite de cuantificación requerido. Dado que los contaminantes se encuentran en las muestras acuosas ambientales a muy baja concentración (del orden de los  $\text{ng L}^{-1}$  a los  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), los límites de cuantificación de los métodos usados para su determinación deben ser del orden de pocos  $\text{ng L}^{-1}$ . En el caso de la determinación de los enantiómeros R y S de DCP y MCP se debe tener en cuenta que en la etapa de eliminación del tensioactivo del extracto supramolecular se produce una dilución de los analitos 1:2 (ver apartado 2.2) y por lo tanto, los FC obtenidos en el proceso analítico global se obtienen dividiendo por un factor de 2 los FC obtenidos en el proceso de extracción. No obstante, la elevada sensibilidad obtenida en LC-EM para la determinación de los enantiómeros R y S de DCP y MCP permite obtener límites de cuantificación en aguas naturales en el intervalo 1-4  $\text{ng L}^{-1}$  en condiciones (12% de THF y 150 mg de ADo) en las que se obtiene un FC de 94 para ambos analitos. En estas condiciones, se obtienen recuperaciones superiores al 70% para ambos fenoxiácidos.

Las condiciones seleccionadas como óptimas para la extracción de profenos en aguas residuales fueron 5% de THF y 76 mg de ADe. En estas condiciones se obtuvieron valores de FC de aproximadamente 470, 490 y 740 para KTP, NPX e IBP, respectivamente, recuperaciones ligeramente inferiores al 70% para los dos primeros y próximas al 100% para el tercero y límites de cuantificación para la determinación de los enantiómeros R y S de estos profenos entre 0,7 y 1,2  $\text{ng L}^{-1}$ .

El pH de la muestra acuosa determina la forma (neutra o cargada) en la que los analitos se encuentran en dicha muestra y por lo tanto, también puede influir en

la eficacia de la extracción. Como ya hemos comentado, la formación de los SUPRAS de AAC se produce a valores de pH iguales o inferiores a 4 y por lo tanto, la influencia del pH se investigó en el intervalo 1-4. Esta variable no influyó en la extracción de KTP y IBP ya que ambos analitos se encuentran en su forma neutra en todo el intervalo de pH investigado (ver constantes de acidez en la Tabla 1). Sin embargo, se observa una disminución de la recuperación para NPX a pH 4 y para MCPP y DCCP a valores de pH inferiores a 2, condiciones en las que los analitos se encuentran parcialmente desprotonados y por lo tanto, son más solubles en agua. Puesto que el pH no influye en el volumen de SUPRAS obtenido, la disminución de la recuperación estuvo acompañada de una disminución en el valor de FC.

Otras variables como la fuerza iónica y la temperatura también pueden afectar al equilibrio de distribución de los analitos entre las dos fases, SUPRAS y disolución en equilibrio, así como al propio proceso de agregación que da lugar a la formación del SUPRAS. Su influencia se estudió adicionando NaCl a concentraciones en el intervalo  $10^{-3}$ -1 M a las muestras acuosas y realizando su extracción a temperaturas comprendidas entre 20 y 55 °C. Ninguna de estas variables influyó en las recuperaciones ni en los FC obtenidos para IBP, KTP y NPX. La temperatura tampoco afectó a la extracción de MCPP y DCCP, pero la adición de NaCl 1 M originó un ligero aumento del volumen de SUPRAS formado y de la recuperación obtenida para ambos fenoxiácidos (de aproximadamente el 76% al 86%), probablemente debido a una disminución de la solubilidad del ADo y de MCPP y DCCP en la disolución en equilibrio con el SUPRAS. No obstante, el aumento de volumen de SUPRAS fue más pronunciado que el aumento de recuperación y el FC obtenido para MCPP y DCCP disminuyó (de 94 a 85). No cabe esperar que la fuerza iónica afecte a la extracción de MCPP y DCCP de aguas naturales, puesto que la concentración total de sales inorgánicas en estas muestras generalmente es inferior a  $4 \times 10^{-4}$  M (conductividad  $< 3.000 \mu\text{S cm}^{-1}$ ).

Finalmente, se estudió la influencia del tiempo de extracción en las recuperaciones obtenidas para IBP, KTP y NPX usando el SUPRAS de ADe y para MCPP y DCCP usando el SUPRAS de ADo en las condiciones óptimas de extracción (5% de THF, 76 mg de ADe y pH 2, en el primer caso, y 12% de THF, 150 mg de

ADo y pH 1,5, en el segundo). Las extracciones se realizaron a tiempos comprendidos entre 2 y 30 min utilizando agitación magnética a 900 rpm. Las condiciones de equilibrio se alcanzaron en 5 min para todos los analitos estudiados, si bien un aumento del tiempo de extracción hasta los 10 min mejoró la reproducibilidad de las medidas obtenidas para los profenos (la desviación estándar de las medidas disminuyó 4 veces al aumentar el tiempo de extracción de 5 a 10 min). A tiempos inferiores a 5 min se observa una disminución en los valores de recuperación; éstos disminuyeron de aproximadamente el 100% al 90% para IBP, del 65% al 56% para KTP y NPX y del 76% al 55% para MCPP y DCPD cuando el tiempo de extracción disminuyó de 5 a 2 min.

#### **2.4.2. Extracción de muestras sólidas**

Como ya hemos comentado, la extracción de muestras sólidas (suelo, peces de agua dulce y salmónidos de piscifactoría) se realizó utilizando disolventes supramoleculares previamente sintetizados. Las variables experimentales investigadas en este caso fueron: composición y volumen de SUPRAS, cantidad de muestra, temperatura y tiempo de extracción usando agitación de vórtice. Para las muestras de suelo también se estudió la influencia del tiempo de contacto entre los analitos (MCPP y DCPD) y las partículas de suelo en la eficacia de la extracción.

El efecto de la composición del SUPRAS de ADe en los rendimientos de extracción obtenidos para profenos (KTP, NPX y IBP) en peces de agua dulce y carotenoides (AST y CAN) en salmónidos de piscifactoría se estudió utilizando SUPRAS con diferente concentración de ADe (1,2-4,4 M) y distintos valores de pH (1-4) en la disolución acuosa que ocupa el interior de los agregados inversos que constituyen el disolvente. Estos SUPRAS se sintetizaron usando una cantidad constante de ADe (6,5 g), concentraciones variables de THF en la mezcla hidroorgánica (5-30 %, volumen total disolución acuosa + THF = 85 mL) y distintas concentraciones de HCl en la disolución acuosa ( $10^{-4}$ - $10^{-1}$ M). La composición del SUPRAS de ADe no influyó en la eficacia de la extracción para ninguno de los analitos y muestras ensayadas. El SUPRAS de ADe utilizado para la extracción de

profenos y carotenoides en peces se sintetizó usando un 5% de THF con el fin de reducir al mínimo el consumo de disolvente orgánico.

Para la extracción de los fenoxiácidos MCPP y DCPD en suelos se utilizaron SUPRAS de agregados inversos de ADO. Los SUPRAS de ADO con diferente composición (concentración de ADO= 0,5-2,6 M y pH=1-4) se prepararon usando distintas concentraciones de tensioactivo (1-8%), THF (15-60% volumen total disolución acuosa + THF = 80 mL) y HCl ( $10^{-4}$ - $10^{-1}$ M). La concentración de ADO en el SUPRAS disminuye con la concentración de THF (ej. usando en la síntesis un 1% de ADO, disminuye de 2,6 M a 0,5 M cuando el porcentaje de THF aumenta del 15 al 60%), es independiente de la concentración de tensioactivo siempre que el porcentaje de THF usado en la síntesis sea igual o inferior al 20% y aumenta ligeramente con la concentración de tensioactivo cuando la concentración de THF usada en la síntesis es superior al 20% (ej. para 40% de THF, aumenta de 0,8 M a 1,2 M cuando el porcentaje de ADO aumenta del 1% al 8%). Al igual que en las extracciones realizadas con SUPRAS de ADE, la composición del SUPRAS de ADO no influyó en la eficacia de la extracción de fenoxiácidos en suelos, pero sí afectó a la cantidad de sustancias húmicas extraídas en el disolvente. La cantidad de materia orgánica extraída en el SUPRAS aumentó a medida que disminuyó la concentración de ADO y aumentó la cantidad de THF y H<sub>2</sub>O en el disolvente, debido al aumento del tamaño del núcleo acuoso de los agregados inversos de ADO que favoreció la solubilización de macromoléculas en el SUPRAS. Los disolventes que permitieron obtener extractos con menor contenido en sustancias húmicas fueron los sintetizados usando un 15% de THF, independientemente de la concentración de ADO y HCl usadas en la síntesis, por lo tanto, ésta fue la concentración de THF usada para sintetizar el SUPRAS de ADO utilizado para extraer fenoxiácidos en suelos.

En la Tabla 4 se muestran las recuperaciones obtenidas usando diferentes volúmenes de SUPRAS y cantidades de muestra. Cuando se utilizaron SUPRAS de ADE, se obtuvieron recuperaciones cuantitativas usando una relación volumen de SUPRAS/cantidad de muestra igual o superior a  $1,6 \mu\text{L mg}^{-1}$  para la extracción de carotenoides en salmónidos e igual o superior a  $1,7 \mu\text{L mg}^{-1}$  para la extracción de

profenos en peces de agua dulce. Sin embargo, cuando se extrajeron fenoxiácidos de suelos con SUPRAS de ADo, la máxima recuperación se obtuvo usando una relación volumen de SUPRAS/cantidad de muestra igual o superior a  $0,75 \mu\text{L mg}^{-1}$ , siendo dicha recuperación de aproximadamente el 80%.

**Tabla 4**

Recuperaciones obtenidas para profenos en peces de río, carotenoides en salmónidos de piscifactoría y fenoxiácidos en suelos en función del volumen de SUPRAS ( $V_{\text{SUPRAS}}$ ) y la cantidad de muestra ( $Q_M$ ) usadas en el proceso de extracción

Muestra	SUPRAS	Variable	$V_{\text{SUPRAS}}/Q_M$ ( $\mu\text{L mg}^{-1}$ )	Recuperación $\pm s^a$ (%)		
				KTP	NPX	IBP
Peces de agua dulce <sup>b</sup>	ADe	$V_{\text{SUPRAS}}$ ( $\mu\text{L}$ )				
		260	1,3	98 $\pm$ 5	95 $\pm$ 3	94 $\pm$ 5
		340	1,7	99 $\pm$ 3	102 $\pm$ 3	98 $\pm$ 4
Salmónidos <sup>c</sup>	ADe	400	2,0	99 $\pm$ 2	98 $\pm$ 3	100 $\pm$ 1
				AST	CAN	
		300	0,6	75 $\pm$ 2	76 $\pm$ 3	
		600	1,2	93 $\pm$ 2	91 $\pm$ 1	
		800	1,6	100 $\pm$ 2	99 $\pm$ 1	
		1200	2,4	100 $\pm$ 3	100 $\pm$ 2	
Suelos <sup>d</sup>	ADo			MCCP	DCCP	
		400	0,5	71 $\pm$ 2	71 $\pm$ 2	
		600	0,75	79 $\pm$ 2	80 $\pm$ 2	
		800	1,0	80 $\pm$ 2	80 $\pm$ 1	
		1200	1,5	80 $\pm$ 3	83 $\pm$ 2	
Peces de agua dulce	ADe <sup>e</sup>	$Q_M$ (mg)		KTP	NPX	IBP
		600	0,7	83 $\pm$ 7	81 $\pm$ 4	78 $\pm$ 5
		300	1,3	96 $\pm$ 1	96 $\pm$ 3	97 $\pm$ 2
Salmónidos	ADe <sup>f</sup>	200	2,0	99 $\pm$ 2	98 $\pm$ 3	100 $\pm$ 1
				AST	CAN	
		500	1,6	104 $\pm$ 1	104 $\pm$ 1	
		300	2,7	101 $\pm$ 1	100 $\pm$ 1	
Suelos	ADo <sup>g</sup>	100	8,0	103 $\pm$ 2	106 $\pm$ 2	
				MCCP	DCCP	
		1200	0,5	68 $\pm$ 3	68 $\pm$ 2	
		800	0,75	79 $\pm$ 3	81 $\pm$ 2	
		400	1,5	81 $\pm$ 2	78 $\pm$ 1	
		200	3,0	79 $\pm$ 2	80 $\pm$ 1	
		200	3,0	79 $\pm$ 2	80 $\pm$ 1	

<sup>a</sup>Desviación estándar (n=3-6);  $Q_M$ =<sup>b</sup>200 mg; <sup>c</sup>500 mg; <sup>d</sup>800 mg;  $V_{\text{SUPRAS}}$ =<sup>e</sup>400  $\mu\text{L}$ ; <sup>f</sup>800  $\mu\text{L}$ ; <sup>g</sup>600  $\mu\text{L}$



Con el fin de reducir al mínimo el límite de cuantificación para la determinación de los analitos ensayados se recomienda utilizar un volumen de SUPRAS y una cantidad de muestra cuya relación sea igual a la mínima requerida para obtener la máxima recuperación posible, es decir, 200 mg de muestra y 340  $\mu\text{L}$  de SUPRAS para extraer profenos de peces de agua dulce, 500 mg de muestra y 800  $\mu\text{L}$  de SUPRAS para extraer carotenoides de salmónidos y 800 mg de muestra y 600  $\mu\text{L}$  de SUPRAS para extraer fenoxiácidos de suelos.

Los rendimientos de extracción de fenoxiácidos en suelos no aumentaron cuando la extracción se realizó en un agitador termostatado a temperaturas comprendidas entre 25 y 60°C (velocidad de agitación=900 rpm). A temperaturas superiores al punto de ebullición del THF (66 °C), la evaporación del disolvente orgánico presente en el SUPRAS origina la precipitación del ADO. Técnicas como la extracción Soxhlet con disolventes orgánicos tampoco permiten extraer la fracción de fenoxiácidos más fuertemente adsorbida en las partículas de suelo, de hecho sólo se ha descrito un método que hace uso de extracción asistida por microondas a elevada temperatura (80 °C) que permita extraer dicha fracción en disolventes orgánicos.

Usando agitación vortex a temperatura ambiente y a una velocidad de 2.500 rpm, los carotenoides y profenos se extrajeron cuantitativamente de las muestras de peces en 10 min y se alcanzó el equilibrio en la extracción de fenoxiácidos de suelos en 5 min. Finalmente, el extracto se separó de las partículas sólidas de muestra mediante centrifugación a 15.000 rpm durante entre 5 y 15 min para muestras de peces, reduciéndose la velocidad de centrifugación requerida para separar el extracto de las partículas de muestra a 7.000 rpm usando un tiempo de centrifugación de 5 min cuando se analizaron muestras de suelo.

Por último, se investigó la influencia del tiempo de contacto entre fenoxiácidos y suelo en la eficacia de la extracción. Un aumento en el tiempo de contacto puede causar una disminución en las recuperaciones obtenidas debido al aumento de las fuerzas del enlace plaguicida-suelo, siendo este efecto más acusado en suelos ricos en materia orgánica. Al contrario que ocurre cuando se utilizan otras

técnicas de extracción como la extracción asistida por microondas, no se observa ningún efecto del tiempo de contacto en las recuperaciones obtenidas para MCPP y DCPD a los tiempos ensayados (1-180 días), con independencia del contenido de materia orgánica del suelo (1,2-3,8 %).

### 3. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA Y CUANTIFICACIÓN

#### 3.1. CONTAMINANTES QUIRALES

La determinación de los enantiómeros R y S de MCPP, DCPD, IBP, NPX y KTP en los extractos de muestras se realizó usando cromatografía líquida quiral acoplada a espectrometría de masas. La selección de las fases estacionarias quirales usadas para la separación de los enantiómeros,  $\alpha$ -ciclodextrina permitilada para fenoxiácidos y selector tipo Pirkle de (R)-1-naftilglicina y ácido 3,5-dinitrobenzoico para profenos, se basó en estudios previos e informes de los propios distribuidores de las columnas quirales que indican que dichas fases estacionarias proporcionan una buena resolución en LC-UV para la separación individualizada de los enantiómeros de cada uno de los analitos.

Las fases móviles descritas para la separación de los enantiómeros R y S de MCPP y DCPD mediante LC-UV (mezclas de metanol y tampón fosfato 25-50 mM a pH=3 en proporciones 70/30 o 60/40) no son compatibles con EM. Para compatibilizar la separación cromatográfica de los analitos y su determinación mediante espectrometría de masas se sustituyó el tampón fosfato por tampón formiato amónico y se determinó el pH y la concentración de tampón requeridos para obtener una buena resolución enantiomérica. Usando una fase móvil constituida por metanol y tampón formiato amónico en proporción 65/35, el pH y concentración de tampón formiato amónico requeridos para separar (R)- y (S)-DCPD fueron 4 y 100 mM, respectivamente. A concentraciones de tampón inferiores a 100 mM, se obtuvo una buena resolución cromatográfica para (R)- y (S)-MCPP (ej. resolución = 2.0 para formiato amónico 50 mM), pero a valores de pH superiores a 4 disminuye la resolución cromatográfica para ambos fenoxiácidos. La separación

simultánea de los enantiómeros R y S de MCPP y R y S de DCPD se llevó a cabo usando una fase móvil de metanol/formiato amónico 100 mM a pH 5 65/35, condiciones en las que se obtuvieron resoluciones para los enantiómeros de MCPP y DCPD de 2,5 y 1,9, respectivamente.

Las fases móviles utilizadas en LC-UV para la separación individualizada de los enantiómeros R y S de IBP, KTP y NPX son disoluciones en metanol de acetato amónico a concentraciones que varían entre 30 y 80 mM dependiendo del profeno determinado. Se comprobó que en ausencia de acetato amónico no se produce separación enantioselectiva de los profenos investigados en la fase estacionaria de (R)-1-naftilglicina y ácido 3,5-dinitrobenzoico y que por otra parte, el acetato amónico causa una disminución de la señal analítica de dichos profenos debida a la supresión de su ionización en la fuente de electrospray; la señal disminuye 20 veces cuando la concentración de acetato amónico aumenta 10 veces. Además, los tiempos de retención obtenidos para los analitos también dependen de la concentración de acetato amónico, obteniéndose tiempos de retención excesivamente elevados para los enantiómeros R y S de KTP y NPX cuando se usan concentraciones bajas de acetato amónico (ej. 5 mM). Con el fin de usar la mínima concentración de acetato amónico requerida para separar los enantiómeros de IBP, KTP y NPX (acetato amónico 5 mM) y al mismo tiempo obtener tiempos de retención razonables para (R)/(S)-KTP y (R)/(S)-NPX, se ensayaron fases móviles con mayor capacidad de desplazamiento, constituidas por metanol y THF en diferentes proporciones (metanol/THF= 0/100-90/10) y a distintos caudales (0,5-1,2 mL min<sup>-1</sup>). Usando una fase móvil que contiene un 90% de THF y un 10% de una disolución de acetato amónico 50 mM en metanol (concentración de acetato amónico en la fase móvil = 5,0 mM) y un caudal de 0,5 mL min<sup>-1</sup> entre 0-18 min y de 1,2 mL min<sup>-1</sup> a partir de los 18 min, se obtienen resoluciones para (R)/(S)-IBP, (R)/(S)-KTP y (R)/(S)-NPX de 1,4, 1,7 y 2,8, respectivamente, y tiempos de retención para los analitos comprendidos entre 15,7 y 32,9 min. Por lo tanto, éstas fueron las condiciones seleccionadas como óptimas.

La cuantificación de los analitos en el extracto se realizó utilizando un espectrómetro de masas equipado con una fuente de ionización de electrospray

operando en modo negativo y un analizador de triple cuadrupolo que monitorizó dos transiciones para cada analito, la primera usada para su cuantificación y la segunda para confirmar su identificación, con la única excepción de los enantiómeros del ibuprofeno para los que sólo fue posible monitorizar una transición dado su pobre patrón de fragmentación. En la Tabla 5 se muestran las transiciones monitorizadas.

**Tabla 5**

Transiciones monitorizadas para la cuantificación e identificación de los enantiómeros R y S de fenoxiácidos y profenos mediante espectrometría de masas en tandem

Compuesto	Transición de cuantificación	Transición de identificación
Analito		
(R)/(S)-MCCP	213> 141	213> 71
(R)/(S)-DCPP	233> 161	233> 125
(R)/(S)-IBP	205> 161	205> 161
(R)/(S)-KTP	253> 209	253> 197
(R)/(S)-NPX	229> 185	229> 170
Patrón interno		
(R)/(S)-D <sub>6</sub> MCCP	219> 147	219> 71
(R)/(S)-D <sub>6</sub> DCPP	239> 164	239> 127
(R)/(S)- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> IBP	211> 167	211> 167
(R)/(S)- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> KTP	259> 215	259> 199
(R)/(S)- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> , <sup>2</sup> H <sub>3</sub> NPX	233 > 189	233 > 170

La calibración se realizó usando patrones de los analitos preparados en metanol para la determinación de enantiómeros de profenos y en disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico 100 mM a pH 5 para la cuantificación de enantiómeros de fenoxiácidos. Para los dos tipos de muestras en las que se determinaron profenos, aguas residuales y peces de agua dulce, se observó una disminución de la señal analítica para (R)- y (S)-IBP debida a la supresión de la ionización de los analitos causada por componentes de la matriz de la muestra que

coeluyen con dichos analitos. Sin embargo, no se observó efecto matriz para (R)- y (S)-KTP y (R)- y (S)-NPX en aguas residuales y el efecto matriz observado para estos analitos en peces de agua dulce fue muy inferior al observado para (R)- y (S)-IBP. Esto es probablemente debido a que al usar una fase móvil con elevada capacidad desplazante (90% de THF y un 10% de una disolución de acetato amónico 50 mM en metanol), prácticamente todos los componentes polares y moderadamente polares de la matriz de aguas residuales y la mayoría de los de la matriz de peces se eluyeron rápidamente, afectando fundamentalmente a la ionización de los analitos con menores tiempos de retención.

La señal analítica medida para fenoxiácidos en los extractos obtenidos en el análisis de aguas naturales y suelos aumentó con respecto a la medida para patrones en disolución reguladora, probablemente debido a que la presencia en el extracto acuoso de pequeñas cantidades del tensioactivo que constituye el SUPRAS favorece la ionización de los analitos. Como ya hemos comentado, la mayor parte del tensioactivo que constituye el SUPRAS (ADo) se eliminó del extracto supramolecular llevando dicho extracto a sequedad y redisolviendo los analitos en tampón acetato a pH 5, quedando una pequeña cantidad de tensioactivo solubilizada en dicho tampón (solubilidad de ADo a pH 5 y 25 °C = 0,26 g L<sup>-1</sup>).

Para corregir el efecto matriz y el efecto del tensioactivo en la determinación de enantiómeros de profenos y fenoxiácidos, respectivamente, se utilizaron patrones internos marcados isotópicamente. En aquellos casos en los que los rendimientos de extracción obtenidos son inferiores al 100% [fenoxiácidos en suelos y (R)/(S)-KTP y (R)/(S)-NPX en aguas residuales], el uso de patrones internos marcados isotópicamente permite controlar tanto la determinación de los analitos en el espectrómetro de masas como el proceso de extracción, siempre que los patrones internos se adicionen a las muestras antes de su análisis. En la Tabla 5 se muestran los patrones marcados isotópicamente utilizados para la determinación de los analitos investigados y las transiciones monitorizadas para dichos patrones.

### **3.2. CAROTENOIDES**

Como ya se ha comentado, se han desarrollado métodos para la determinación de la concentración total de carotenoides y de AST y CAN en salmónidos de piscifactoría. La determinación de carotenoides totales se basó en medidas fotométricas a una longitud de onda de 480 nm y para la determinación de carotenoides individuales, se utilizó LC con detección fotométrica a la misma longitud de onda.

Los espectros de absorción obtenidos para AST y CAN son idénticos y por otra parte, la presencia de SUPRAS en los extractos de las muestras diluidos con (acetona/SUPRAS 75/25) causa un ligero desplazamiento hipercrómico en el espectro de absorción de ambos analitos con respecto a los espectros obtenidos en acetona. Por lo tanto, con el fin de asegurar la exactitud de las medidas, las rectas de calibrado para la determinación de la concentración total de carotenoides se obtuvieron a partir de patrones de AST en acetona/SUPRAS 75/25.

La presencia de SUPRAS en los extractos también origina cambios en los tiempos de retención y las áreas de pico medidas para AST y CAN en CL-fotometría. Puesto que, al igual que en fotometría, AST y CAN presentan la misma respuesta analítica en CL-fotometría, las rectas de calibrado para la determinación de carotenoides individuales se obtuvieron a partir de patrones de AST en acetona/SUPRAS 75/25.

## **4. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE LOS MÉTODOS DESARROLLADOS**

### **4.1. LINEALIDAD Y SENSIBILIDAD**

En la Tabla 6 se muestra el intervalo de linealidad y la pendiente de las rectas de calibrado obtenidas mediante LC-EM para la determinación de los enantiómeros R y S de los diferentes contaminantes quirales investigados y los límites de detección (LDM) y cuantificación (LCM) de los métodos desarrollados basados en microextracción con disolventes supramoleculares de ADe (fenoxiácidos) o ADo (profenos) y cuantificación mediante LC-EM.

**Tabla 6**

Parámetros de calibración y límites de detección y cuantificación de los métodos desarrollados para la determinación enantioselectiva de contaminantes quirales en muestras medioambientales

Método	Analito	Parámetros de calibración		Muestra	LDM <sup>c</sup> (ng L <sup>-1</sup> /ng g <sup>-1</sup> )	LCM <sup>d</sup> (ng L <sup>-1</sup> /ng g)
		Intervalo de linealidad <sup>a</sup> (ng)	Pendiente ± s <sup>b</sup> (ng <sup>-1</sup> )			
MESADo-CL-EM	R-MCPP	0,002-20	3,88 ± 0,03 <sup>c</sup>	Aguas naturales	0,3	1,0
				Suelos	0,02	0,08
	S-MCPP	0,002-20	3,87 ± 0,03 <sup>c</sup>	Aguas naturales	0,3	1,0
				Suelos	0,03	0,09
	R-DCPP	0,002-20	8,25 ± 0,07 <sup>c</sup>	Aguas naturales	1,2	4,0
				Suelos	0,03	0,1
	S-DCPP	0,002-20	8,28 ± 0,07 <sup>c</sup>	Aguas naturales	1,2	4,0
				Suelos	0,02	0,08
MESADe-CL-EM	R-IBP	0,004-40	0,4005 ± 0,003 <sup>d</sup>	Aguas residuales	0,5-0,7	1,8-2,5
				Peces de agua dulce	0,6	2,1
	S-IBP	0,004-40	0,4000 ± 0,003 <sup>d</sup>	Aguas residuales	0,5-0,7	1,7-2,4
				Peces de agua dulce	0,5	1,7
	R-KTP	0,01-40	4,36 ± 0,05 <sup>c</sup>	Aguas residuales	0,9	3,0
				Peces de agua dulce	0,7	2,4
	S-KTP	0,01-40	4,28 ± 0,03 <sup>c</sup>	Aguas residuales	0,8	2,7
				Peces de agua dulce	0,8	2,6
	R-NPX	0,01-40	3,500 ± 0,007 <sup>c</sup>	Aguas residuales	1,2	3,9
				Peces de agua dulce	1,0	3,3
	S-NPX	0,01-40	3,498 ± 0,008 <sup>c</sup>	Aguas residuales	1,1	3,6
				Peces de agua dulce	0,9	3,1

<sup>a</sup>El límite inferior del intervalo de linealidad se corresponde con el límite de cuantificación del método; <sup>b</sup>Desviación estándar (n=7-9) Concentración de estándar interno marcado isotópicamente = <sup>c</sup>10 µg L<sup>-1</sup>, <sup>d</sup>200 µg L<sup>-1</sup>, <sup>e</sup>40 µg L<sup>-1</sup>  
MESADo y MESADe: Microextracción en SUPRAS de ADo y ADe, respectivamente  
CL-EM: cromatografía líquida-espectrometría de masas

Los LDM y LCM se estimaron a partir del análisis de muestras blanco (n= 6) midiendo el ruido obtenido al tiempo de retención de cada analito y calculando, a través de la correspondiente recta de calibrado, la concentración que proporciona una señal igual a 3 y 10 veces el ruido medido. Cuando no se dispuso de muestras blanco, como es el caso de la determinación de profenos en aguas residuales, se analizaron muestras que contenían a los analitos (n=6) y se realizó una estimación del ruido realizando su medida en las inmediaciones de los picos cromatográficos de los analitos en los cromatogramas obtenidos.

Todos los métodos desarrollados proporcionan una elevada sensibilidad para la determinación de enantiómeros de contaminantes en muestras mediambientales; los LCM obtenidos para muestras acuosas son en todos los casos del orden de los

pocos ng L<sup>-1</sup>, en muestras de peces del orden de los pocos ng g<sup>-1</sup> y en muestras de suelo disminuyen hasta el orden de los pg g<sup>-1</sup>. Esta elevada sensibilidad, junto con la selectividad proporcionada por la espectrometría de masas y los amplios intervalos de concentraciones en los que se pueden aplicar los métodos (3-4 órdenes de magnitud) hacen que dichos métodos sean especialmente adecuados para su aplicación en análisis ambiental.

**Tabla 7**

Parámetros de calibración y límites de detección y cuantificación de los métodos desarrollados para la determinación de la concentración total de carotenoides y la concentración de AST y CAN en muestras de salmónidos

Parámetros	MESADe-FT <sup>a</sup>	MESADe-CL-FT <sup>b</sup>	
	Carotenoides totales	AST	CAN
<b>Calibración</b>			
Intervalo de linealidad (mg L <sup>-1</sup> )	0,2-7,5	0,007-15	
Pendiente±s <sup>c</sup> (L mg <sup>-1</sup> )	0,236±0,005	(31,3±0,4)x10 <sup>5</sup>	
LDI <sup>d</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	0,06	0,002	0,004
LCI <sup>e</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	0,2	0,007	0,01
<b>Método</b>			
LDM <sup>f</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	0,4	0,01	0,02
LCM <sup>g</sup> (mg kg <sup>-1</sup> )	1,3	0,04	0,07

<sup>a</sup>Microextracción en SUPRAS de ADe-Fotometría; <sup>b</sup>Microextracción en SUPRAS de ADe-Cromatografía líquida-Fotometría; <sup>c</sup>Desviación estándar (n=6-8); <sup>d</sup>Límite de detección instrumental; <sup>e</sup>Límite de cuantificación instrumental; <sup>f</sup>Límite de detección del método; <sup>g</sup>Límite de cuantificación del método.

En cuanto a la determinación de carotenoides en salmónidos, en la Tabla 7 se muestran los parámetros de calibración y los LDM y LCM de los métodos basados en microextracción con disolvente supramolecular de ADe y cuantificación fotométrica o mediante cromatografía líquida con detección fotométrica. Los LDM y LCM se calcularon a partir de los límites de detección (LDI) y cuantificación (LCI) instrumentales teniendo en cuenta el peso de muestra y el volumen de SUPRAS usado en la extracción y el factor de dilución de los extractos en acetona. Los LDI y



LCI del método fotométrico se estimaron calculando las concentraciones de carotenoides que proporcionan una señal 3 y 10 veces la desviación estándar de la señal medida para disoluciones blanco (acetona/SUPRAS 75/25), mientras que los correspondientes al método cromatográfico se estimaron calculando a través de la correspondiente recta de calibrado, la concentración que proporciona una señal igual a 3 y 10 veces el ruido medido a los tiempos de retención de los analitos para disoluciones blanco (acetona/SUPRAS 75/25).

El método fotométrico desarrollado permite determinar concentraciones totales de carotenoides en salmónidos entre 1,3 y 48 mg kg<sup>-1</sup>. Teniendo en cuenta que la concentración total de carotenoides en salmónidos de piscifactoría generalmente varía entre 3 y 37 mg kg<sup>-1</sup>, podemos afirmar que el método propuesto es adecuado en términos de sensibilidad para el control de calidad de la pigmentación en este tipo de peces. El método cromatográfico, por otra parte, proporciona una elevada sensibilidad para la determinación de AST y CAN en salmónidos con límites de cuantificación del orden de los µg kg<sup>-1</sup>. Las diferencias entre los LDM y LCM obtenidos para la determinación de AST y CAN se deben a diferencias en el ruido medido a los tiempos de retención de cada analito.

## 4.2. EXACTITUD

La exactitud de los métodos desarrollados se evaluó comparando las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas usando disoluciones estándar con las obtenidas aplicando el procedimiento analítico completo a muestras a las que se le habían adicionado concentraciones conocidas de los analitos. El analito adicionado para evaluar la exactitud del método desarrollado para la determinación de la concentración total de carotenoides en salmónidos fue AST. La comparación de las pendientes de las rectas de calibrado se realizó aplicando un test de la t.

En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos en la aplicación del test de la t. En todos los casos los valores del parámetro t obtenido experimentalmente fueron inferiores al valor de t crítica tabulado para un nivel de significación de 0,01 y n-2 grados de libertad, siendo n el número de valores utilizados para construir las

rectas de calibrado. Por lo tanto, podemos concluir que no existen diferencias significativas entre las pendientes obtenidas a partir de disoluciones estándar y las obtenidas a partir de muestras adicionadas y en consecuencia, todos los métodos desarrollados son exactos.

**Tabla 8**

Valores de los parámetro t experimental y t crítica obtenidos en la evaluación de la exactitud de los métodos desarrollados

Método	Analito	Muestra	n <sup>a</sup>	t experimental	t crítica <sup>b</sup>
MESADo-CL-EM	Enantiómeros R y S de MCPP y DCPD	Aguas naturales	9	0,17-2,99	3,25
		Suelos	14	0,07-0,64	2,98
MESADe-CL-EM	Enantiómeros R y S de IBP, KTP y NPX	Aguas residuales	12	0,54-2,84	3,05
		Peces de agua dulce	12	0,40-0,88	3,05
MESADe-FT	AST	Salmónidos	12	1,33	3,05
MESADe-CL-FT	AST y CAN	Salmónidos	8	0,47-0,65	3,36

<sup>a</sup>Números de valores en las rectas de calibrado; <sup>b</sup>nivel de significación=0,01 y grados de libertad=n-2.

MESADo y MESADe: Microextracción en SUPRAS de ADO y ADe, respectivamente; CL: cromatografía líquida; EM: espectrometría de masas; FT: Fotometría

### 4.3. PRECISIÓN

La precisión de los métodos desarrollados para la determinación enantioselectiva de contaminantes quirales en muestras medioambientales se evaluó realizando seis repeticiones del análisis de muestras blanco a las que se adicionaron concentraciones conocidas de los analitos, con la única excepción del método desarrollado para la determinación de enantiómeros de profenos en aguas residuales, cuya precisión se evaluó analizando seis alícuotas de una muestra de influente y de una muestra de efluente que contenían concentraciones de los analitos en los intervalos 21-1049 y 14-177 ng L<sup>-1</sup>, respectivamente.

En la Tabla 9 se muestra la precisión, expresada como desviación estándar relativa, obtenida para la determinación de los diferentes enantiómeros ensayados y las concentraciones de los analitos en las muestras que se analizaron para evaluar dicha precisión. En todos los casos se obtuvieron desviaciones estándar relativas inferiores al 8% para la determinación de concentraciones de pocos ng L<sup>-1</sup> en el caso de muestras líquidas y de pocos ng g<sup>-1</sup> para muestras sólidas. Finalmente, cabe

destacar la precisión obtenida para la determinación de los enantiómeros R y S de MCPP y DCPP en aguas naturales, con desviaciones estándar relativas inferiores al 3% para concentraciones entre 5 y 100 ng L<sup>-1</sup>.

**Tabla 9**

Precisión expresada como desviación estándar relativa obtenida para la determinación de enantiómeros de contaminantes quirales en muestras medioambientales usando los métodos desarrollados

Método	Muestra	Analito	Concentración (ng L <sup>-1</sup> /ng g <sup>-1</sup> )	DER <sup>a</sup> (%)
MESADo-CL-EM	Aguas naturales	R- MCPP	5, 100	1,6-2,7
		S- MCPP	5, 100	1,7-2,6
		R- DCPP	15, 100	1,8-2,4
		S- DCPP	15, 100	1,8-2,5
	Suelos	R- MCPP	5, 100	2,9-5,2
		S- MCPP	5, 100	3,8-4,1
		R- DCPP	5, 100	2,9-6,1
		S- DCPP	5, 100	4,1-5,1
MESADe-CL-EM	Aguas residuales	R- IBP	42-257	2,1-4,5
		S- IBP	72-957	1,3-3,2
		R- KTP	86-240	3,1-3,3
		S- KTP	177-510	1,0-2,4
		R- NPX	14-21	5,3-7,8
		S- NPX	175-1049	1,2-1,7
	Peces de agua dulce	R- IBP	15, 400	1,4-4,8
		S- IBP	15, 400	1,7-4,2
		R- KTP	15, 400	1,4-4,4
		S- KTP	15, 400	1,6-4,6
		R- NPX	15, 400	1,3-4,6
		S- NPX	15, 400	1,7-5,3

<sup>a</sup>Desviación estándar relativa (n=6)

MESADo y MESADe: Microextracción en SUPRAS de ADo y ADe, respectivamente; CL-EM: cromatografía líquida-espectrometría de masas

La precisión del método fotométrico desarrollado para la determinación de la concentración total de carotenoides se evaluó analizando una muestra que contenía una concentración de carotenoides de 12,0 mg kg<sup>-1</sup>, mientras que la correspondiente al método cromatográfico propuesto para la determinación de carotenoides

individuales se evaluó analizando una muestra que contenía 9,8 mg kg<sup>-1</sup> de AST y a la que se le añadieron 10 mg kg<sup>-1</sup> de CAN. En ambos casos se realizaron diez repeticiones del análisis. La desviación estándar relativa obtenida para la determinación de carotenoides totales fue 3,3% y las obtenidas para la determinación de AST y CAN 2,5 y 1,6, respectivamente.

#### **4.4. REPRESENTATIVIDAD**

La representatividad de las muestras de suelo se evaluó comparando la varianza de los resultados obtenidos analizando muestras de 800 mg a las que una vez pesadas se le adicionaron 100 ng g<sup>-1</sup> de R-MCPP, S-MCPP, R-DCPP y S-DCPP con la varianza de las medidas obtenidas analizando alícuotas de 800 mg tomadas de una muestra de suelo de 50 g a la que se le adicionaron las mismas concentraciones de los analitos. La comparación de las varianzas se realizó aplicando el test de Fisher. Los valores obtenidos experimentalmente para el parámetro F para los cuatro enantiómeros determinados (1,04-1,75) fueron inferiores al valor crítico tabulado para el parámetro F (5,05, para  $n_1=n_2=6$ ; nivel de significación= 0,05), y por lo tanto, podemos concluir que no existen diferencias significativas entre las varianzas comparadas y que las muestras analizadas son representativas.

En cuanto a las muestras de peces, con el fin de asegurar la representatividad de las muestras analizadas, los análisis se realizaron usando muestras de 200 g de músculo de pez que se trituró y homogeneizó usando un homogeneizador-dispersador. A partir de esta muestra homogénea de 200 g se tomaron alícuotas de 800 y 200 mg para la determinación de carotenoides y profenos, en salmónidos y peces de agua de río, respectivamente.

## 5. ANÁLISIS DE MUESTRAS

### 5.1. DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES QUIRALES EN MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES

Los métodos desarrollados para la determinación enantioselectiva de contaminantes quirales en muestras medioambientales se aplicaron al análisis de una gran variedad de muestras que incluyen aguas de los ríos Rabanales, Guadalquivir y Mata, aguas de acuíferos de Córdoba, Trassierra y Andújar, suelos localizados en seis zonas diferentes de la provincia de Córdoba, influentes y efluentes de tres plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) situadas en localidades de la provincia de Córdoba, y seis especies distintas de peces de agua dulce (trucha arcoíris, carpa común, carpa americana, alburno y pez sol). En aguas naturales y suelos se determinaron los fenoxiácidos MCPP y DCPD y en aguas residuales y peces de agua dulce, los profenos IBP, KTP, NPX. Los análisis se realizaron en muestras sin adicionar y adicionadas con diferentes concentraciones de los enantiómeros R y S de los contaminantes quirales investigados. En todos los casos se determinaron, además de las concentraciones de los enantiómeros, sus fracciones enantioméricas (EF), definidas como:  $EF = \frac{[\text{enantiómero S}]}{[\text{enantiómero S}] + [\text{enantiómero R}]}$ . Los valores de EF iguales a 0 y 1 corresponden a profenos enantioméricamente puros y un valor de EF de 0,5 corresponde a la mezcla racémica de los dos enantiómeros. Finalmente, para las muestras adicionadas también se determinaron las recuperaciones obtenidas.

En todas las muestras sin adicionar de aguas residuales analizadas se encontraron los dos enantiómeros de IBP, KTP y NPX. En la Tabla 10 se muestran las concentraciones de enantiómeros encontradas y las EF calculadas. Los valores de concentración y EF se encuentran dentro de los intervalos previamente descritos en la bibliografía. Las concentraciones en efluentes ( $8,7\text{-}481 \text{ ng L}^{-1}$ ) fueron en todos los casos inferiores a las de influentes ( $18\text{-}3,172 \text{ ng L}^{-1}$ ) y por lo tanto, todas las PTAR estudiadas eliminan parcialmente IBP, KTP y NPX, variando los porcentajes de eliminación entre el 65 y el 95% para todos los enantiómeros excepto para S-naproxeno cuyo porcentaje de eliminación varió entre el 25 y el 51%.

**Tabla 10**

Concentraciones de los enantiómeros R y S de IBP, KTP y NPX y fracciones enantioméricas (FE) de IBP, KTP y NPX encontradas en influentes y efluentes de aguas residuales.

Muestra	Concentración <sup>a</sup> ± s <sup>b</sup> (ng L <sup>-1</sup> )								FE <sup>a</sup> ± s <sup>b</sup>		
	(R)-IBP	(S)-IBP	(R)-KTP	(S)-KTP	(R)-NPX	(S)-NPX	IBP	KTP	NPX		
<b>PTAR 1</b>											
Influyente	415 ± 3	1643 ± 50	191 ± 9	220 ± 3	29.4 ± 0.2	3172 ± 37	0,798 ± 0,006	0,54 ± 0,02	0,9908 ± 0,0002		
Efluente	83 ± 2	172 ± 8	28 ± 1	60 ± 3	22 ± 1	481 ± 17	0,67 ± 0,02	0,683 ± 0,002	0,9555 ± 0,0002		
<b>PTAR 2</b>											
Influyente	257 ± 5	957 ± 12	240 ± 8	510 ± 5	21 ± 1	1049 ± 13	0,788 ± 0,003	0,680 ± 0,007	0,9808 ± 0,0008		
Efluente	42 ± 2	72 ± 2	86 ± 3	177 ± 4	14 ± 1	175 ± 3	0,629 ± 0,008	0,673 ± 0,008	0,927 ± 0,005		
<b>PTAR 3</b>											
Influyente	256 ± 3	1536 ± 47	87,9 ± 0,9	121 ± 2	18 ± 1	1747 ± 3	0,857 ± 0,002	0,5797 ± 0,0003	0,9899 ± 0,0006		
Efluente	98 ± 4	210 ± 5	24 ± 2	38 ± 1	8,7 ± 0,4	241 ± 7	0,68 ± 0,02	0,61 ± 0,03	0,965 ± 0,002		

PTAR: Planta de tratamiento de agua residual

<sup>a</sup>Valor medio obtenido a partir de tres determinaciones independientes

<sup>b</sup>Desviación estándar

Aunque el ibuprofeno se comercializa como racemato, en los influentes de las PTAR se encontró un exceso del enantiómero S ( $EF=0,79-0,86$ ) debido a la transformación del enantiómero R en enantiómero S durante la metabolización del fármaco en humanos. En efluentes, el valor de EF disminuye ( $EF= 0,63-0,68$ ), lo que indica que el (S)-IBP se degrada en mayor proporción que el (R)-IBP en las PTAR.

Puesto que los valores de EF son muy similares en efluentes de PTAR y en aguas naturales superficiales y el IBP es un contaminante que se encuentra con mucha frecuencia en estas aguas, el EF de IBP puede considerarse un indicador adecuado para detectar el vertido de aguas residuales sin tratar o con un tratamiento mínimo a las aguas naturales.

El KTP, también comercializado como racemato, sufre al igual que el IBP, inversión quiral durante su metabolización, aunque en menor grado que éste último, por lo que los valores de EF del KTP en influente son más próximos a 0,5 ( $EF=0,54-0,68$ ) que los de IBP. Los valores de EF en efluentes ( $EF=0,58-0,68$ ) se aproximan a los encontrados en influentes, ya que las velocidades de degradación de (R)-KTP y (S)-KTP en las PTAR son similares. Finalmente, el NPX se comercializa como (S)-NPX debido a que el enantiómero R del NPX es hepatotóxico, y además, apenas se produce inversión quiral durante su metabolización, por lo tanto, los valores de EF en influentes de PTAR son próximos a 1. Los valores de EF del NPX encontrados en influentes ( $0,98-0,99$ ) fueron ligeramente superiores a los encontrados en efluentes ( $0,93-0,96$ ), lo que indica una pequeña degradación preferencial del enantiómero S.

No se detectó ninguno de los profenos investigados en peces de agua dulce, probablemente debido a que los peces analizados se capturaron en zonas alejadas de los puntos de vertido de las aguas residuales tratadas donde las concentraciones de residuos de estos fármacos son muy bajas. Tampoco se detectó MCPP ni DCPP en ninguna de las muestras de aguas naturales y suelos analizadas.

En lo que se refiere al análisis de muestras adicionadas, en la Tabla 11 se muestran los intervalos de concentraciones añadidas de cada analito a los diferentes tipos de muestras analizadas, el método usado para el análisis y las recuperaciones

obtenidas. El cálculo de las recuperaciones de los enantiómeros R y S de MCPP y DCPD en aguas se ha realizado teniendo en cuenta que la recuperación obtenida en la extracción de los analitos en agua ultrapura es del 76% y aplicando el correspondiente factor corrector. En el resto de los casos en los que no se obtuvieron recuperaciones cuantitativas de los analitos (MCPP y DCPD en suelos y KTP y NPX en aguas residuales), se adicionaron patrones internos marcados isotópicamente a las muestras antes del análisis, lo que permitió controlar tanto las medidas en el espectrómetro de masas, como el proceso de extracción. Las recuperaciones obtenidas fueron en todos los casos próximas al 100%, lo que demostró la aplicabilidad de los métodos desarrollados.

**Tabla 11**

Recuperaciones obtenidas para enantiómeros de contaminantes quirales en muestras medioambientales usando los métodos desarrollados

Método	Muestra	Analito	Concentración adicionada (ng L <sup>-1</sup> /ng g <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)
MESADo-CL-EM	Aguas naturales	R- MCPP	15-180	97-105
		S- MCPP	15-100	99-104
		R- DCPD	15-180	96-103
		S- DCPD	15-100	96-103
	Suelos	R- MCPP	5-180	93-102
		S- MCPP	5-100	94-104
		R- DCPD	5-180	94-102
		S- DCPD	5-100	94-103
MESADe-CL-EM	Aguas residuales	R- IBP	100, 300	100-102
		S- IBP	100, 300	99-103
		R- KTP	100, 300	98-104
		S- KTP	100, 300	99-103
		R- NPX	100, 300	97-101
		S- NPX	100, 300	99-103
	Peces de agua dulce	R- IBP	15, 400	99-102
		S- IBP	15, 400	98-104
		R- KTP	15, 400	98-102
		S- KTP	15, 400	98-101
		R- NPX	15, 400	99-102
		S- NPX	15, 400	97-103

MESADo y MESADe: Microextracción en SUPRAS de ADo y ADe, respectivamente  
CL-EM: cromatografía líquida-espectrometría de masas



En la Figura 6 se muestran a modo de ejemplo cromatogramas obtenidos al aplicar los métodos desarrollados al análisis de muestras adicionadas (A-D) de agua subterránea (A) y de río (B), suelo (C) y trucha arcoíris (D) y muestras sin adicionar (E-F) de influente (E) y efluente (F) de una PTAR.

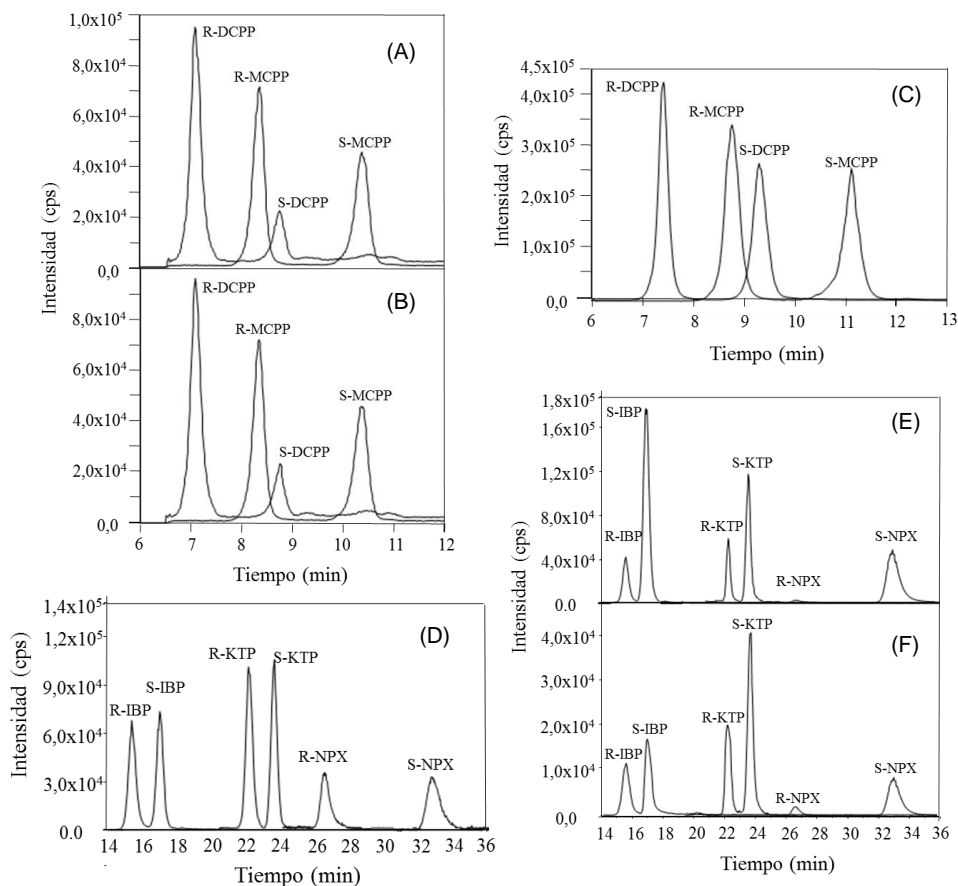


Figura 6. Cromatogramas obtenidos en el análisis de (A-D) muestras adicionadas de (A) agua subterránea y (B) de río, (C) suelo y (D) trucha arcoíris y (E-F) muestras sin adicionar de (E) influente y (F) efluente de una planta de tratamiento de agua residual usando los métodos desarrollados para la determinación enantioselectiva de contaminantes quirales basados en extracción en un disolvente supramolecular de (A-C) ADo o (D-F) ADe y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

## 5.2. DETERMINACIÓN DE CAROTENOIDES EN SALMÓNIDOS

Los métodos desarrollados para la determinación de la concentración total de carotenoides y carotenoides individuales en salmónidos se aplicaron al análisis de tres salmones y tres truchas arcoiris procedentes de piscifactorías noruegas y adquiridas en supermercados de Córdoba. Los resultados obtenidos en estos análisis se muestran en la Tabla 12.

**Tabla 12**

Concentración de astaxantina y cantaxantina y concentración total de carotenoides encontrados en salmónidos analizados mediante MESADe-CL-FT y MESADe-FT.

Muestra	AST <sup>a</sup>	CAN <sup>a</sup>	Concentración total de carotenoides <sup>a</sup>	
			MESADe-CL-FT	MESADe-FT
Salmón 1	11,7±0,3	—	11,7±0,3	12,00±0,01
Salmón 2	5,4±0,1	—	5,4±0,1	5,3±0,1
Salmón 3	6,7±0,2	—	6,7±0,2	6,7±0,3
Trucha arcoiris 1	3,5±0,2	3,2±0,2	6,7±0,2	6,9±0,3
Trucha arcoiris 2	4,65±0,05	—	4,65±0,05	4,5±0,2
Trucha arcoiris 3	7,6±0,2	—	7,6±0,2	7,8±0,1

<sup>a</sup>Valor medio obtenido a partir de tres determinaciones independientes ± desviación estándar (mg Kg<sup>-1</sup>).

MESADe: Microextracción en SUPRAS de ADe, CL: cromatografía líquida; FT: Fotometría.

La AST se encontró en todas las muestras analizadas, en concentraciones comprendidas entre 5,4 y 11,7 mg kg<sup>-1</sup> para salmón y entre 3,5 y 7,6 mg kg<sup>-1</sup> para trucha arcoiris. La AST es el carotenoide más usado en acuicultura debido a su elevada eficacia de deposición en el músculo de los peces. La CAN solo se encontró en una de las muestras de trucha arcoiris analizada, en la que la proporción CAN/AST fue aproximadamente igual a 40:60, proporción en la que, según la bibliografía, se obtiene una pigmentación eficiente de la trucha arcoiris. Los resultados obtenidos para el contenido total de carotenoides usando cromatografía líquida con detección fotométrica y fotometría son concordantes, lo que indica que

en los salmónidos analizados no existen cantidades significativas de otros carotenoides, además de AST y CAN.

En la Figura 7 se muestran los cromatogramas obtenidos para una muestra de salmón (A) y una muestra de trucha arcoíris (B).

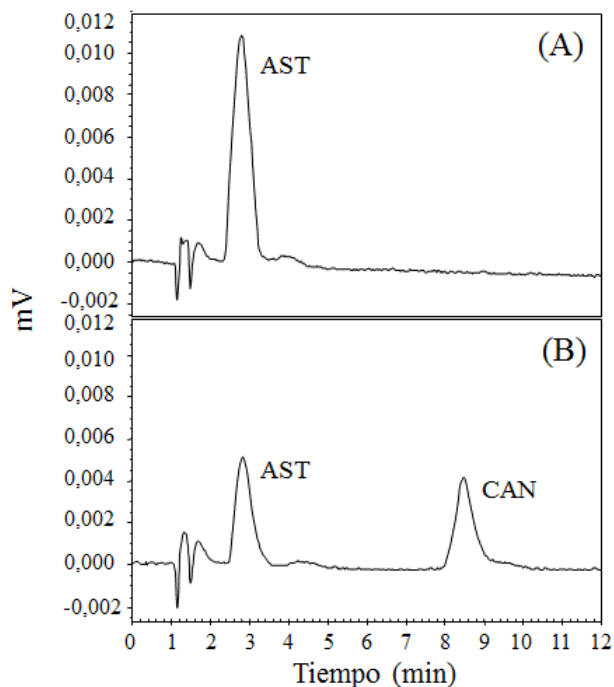
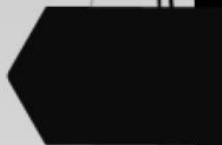


Figura 7. Cromatogramas obtenidos en la determinación de carotenoides individuales en muestras de (A) salmón y (B) trucha arcoíris.

Los estudios de recuperación se realizaron analizando muestras de salmón y trucha arcoíris a las que se les adicionaron  $5 \text{ mg g}^{-1}$  de AST y  $5 \text{ mg g}^{-1}$  de CAN. Las recuperaciones obtenidas usando el método cromatográfico oscilaron entre 99 y 102% para AST y entre 95 y 106% para CAN y las obtenidas para carotenoides totales usando el método fotométrico variaron dentro del intervalo 98-104%.

# CONCLUSIONES





Los resultados obtenidos en los estudios realizados en esta Tesis Doctoral nos permiten concluir que:

- La combinación de microextracción con disolventes supramoleculares (MEDS) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (CL-EM) es una estrategia adecuada para la determinación enantioselectiva de contaminantes quirales a bajas concentraciones en muestras medioambientales.
- Los disolventes supramoleculares usados en la técnica de MEDS, constituidos por agregados inversos de ácidos alquil carboxílicos, presentan una elevada eficacia para la extracción de compuestos de diferente naturaleza, desde muy apolares (carotenoides) hasta polares (fenoxiácidos y profenos), en una gran variedad de muestras (aguas naturales y residuales, suelos y peces) fundamentalmente debido a:
  - Su capacidad para solubilizar analitos mediante diferentes tipos de interacciones (de dispersión, polares y formación de puentes de hidrógeno).
  - El elevado número de centros de solubilización que poseen al estar constituidos por nanoestructuras en las que las moléculas de tensioactivo se agregan con un elevado grado de empaquetamiento; las concentraciones de ácido alquil carboxílico en los disolventes usados en los diferentes métodos desarrollados variaron entre 2,6 y 4,4 M.
- La elevada eficacia de extracción proporcionada por los disolventes supramoleculares de ácidos alquil carboxílicos permite obtener elevados factores de concentración cuando se analizan muestras acuosas, siendo dichos factores de concentración tanto más elevados cuanto menor es la polaridad del analito, ya que la eficacia de extracción aumenta a medida que disminuye la solubilidad del analito en agua y aumentan las interacciones de dispersión entre las moléculas de analito y las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas de tensioactivo que constituyen los disolventes supramoleculares.

- El disolvente constituido por agregados inversos de ácido decanoico proporciona factores de concentración más elevados en el análisis de muestras acuosas que el constituido por agregados de ácido dodecanoico debido a que dicho disolvente se forma en mezclas ternarias de tensioactivo-tetrahidrofurano-agua a concentraciones de disolvente orgánico más bajas que el disolvente de ácido dodecanoico, lo que conlleva la formación de menores volúmenes de disolvente con concentración más elevada de tensioactivo.
- Los disolventes de ácidos alquil carboxílicos también presentan una elevada eficacia para la extracción de compuestos orgánicos en muestras sólidas, proporcionando recuperaciones muy elevadas (entre aproximadamente el 80 y el 100%) usando relaciones de volumen de disolvente supramolecular/cantidad de muestra muy pequeñas;  $0,75 \mu\text{L mg}^{-1}$  para muestras de suelos y  $1,6-1,7 \mu\text{L mg}^{-1}$  para muestras de peces.
- Las extracciones de muestras sólidas no requiere el uso de temperatura o energías auxiliares, usadas con frecuencia cuando la extracción de los contaminantes quirales se realiza utilizando disolventes orgánicos.
- Los pequeños volúmenes de disolvente supramolecular en los que se lleva a cabo la extracción tanto de muestras líquidas como sólidas evita realizar etapas de concentración adicionales, generalmente requeridas en los métodos enantioselectivos descritos en la bibliografía. Los procedimientos de extracción usados en estos métodos, extracción con disolventes orgánicos para muestras sólidas y extracción en fase sólida para muestras líquidas, utilizan elevados volúmenes de disolvente orgánico, lo que hace imprescindible incluir etapas de evaporación del disolvente en el proceso analítico para alcanzar los factores de concentración requeridos en análisis medioambiental.
- Los disolventes de agregados inversos de ácidos alquil carboxílicos presentan la ventaja adicional de proporcionar extractos libres de macromoléculas

como proteínas, polisacáridos, ácidos húmicos o fúlvicos, lo que evita llevar a cabo etapas de limpieza adicionales, generalmente requeridas en los métodos enantioselectivos descritos en la bibliografía.

- La MEDS es una técnica:
  - Rápida, las extracciones se realizan en pocos minutos.
  - Simple, lo que permite el tratamiento de varias muestras simultáneamente, con el consiguiente aumento de la frecuencia de muestreo.
  - Segura y respetuosa con el medio ambiente, reduciendo drásticamente el consumo de disolventes orgánicos con respecto a las técnicas de extracción convencionales.
- El uso de la cromatografía líquida para la determinación de compuestos quirales polares, que constituyen la mayoría de los contaminantes quirales medioambientales, permite simplificar los procesos analíticos frente al uso de la cromatografía de gases evitando la etapa de derivatización de los analitos.
- Las principales dificultades encontradas para el uso de la cromatografía líquida en análisis quiral medioambiental derivan de la incompatibilidad de las fases móviles usadas en separaciones quirales con la detección de los enantiómeros mediante espectrometría de masas, técnica que proporciona la sensibilidad y selectividad requeridas en análisis medioambiental. Esta Tesis ha contribuido al desarrollo de este ámbito de trabajo con la propuesta de dos métodos cromatográficos para la separación de enantiómeros de contaminantes quirales basadas en el uso de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.
- La compatibilización de las técnica MEDS y CL-EM necesariamente implica la separación cromatográfica de los analitos del tensioactivo que constituye el disolvente supramolecular o en el caso de que esto no sea posible, la eliminación del tensioactivo previa a la inyección del extracto en el



cromatógrafo de líquidos, con el fin de evitar la entrada del tensioactivo en la fuente de ionización del espectrómetro de masas.

- Los métodos basados en MEDS y LC-EM son más simples que los descritos en la bibliografía basados en técnicas de extracción convencionales y GC-EM, proporcionan la sensibilidad (límites de cuantificación del orden de pocos  $\text{ng L}^{-1}$  para muestras acuosas, de  $\text{pg g}^{-1}$  para muestras de suelo y de pocos  $\text{ng g}^{-1}$  para muestras de peces) y selectividad requeridas en análisis quiral medioambiental y son exactos y precisos.
- Los métodos desarrollados para la determinación de carotenoides totales y astaxantina y cantaxantina en productos piscícolas basados en MEDS y fotometría o cromatografía líquida con detección fotométrica aventajan a los que hacen uso de disolventes orgánicos para la extracción de los analitos en rapidez, simplicidad, selectividad y robustez.



# **APÉNDICE A:**

## **PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL**



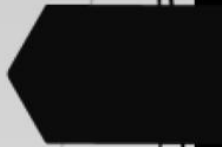
1. “Determination of supplemental feeding needs for astaxanthin and canthaxanthin in salmonids by supramolecular solvent-based microextraction and liquid chromatography–UV/VIS spectroscopy”  
C. Caballo, E.M. Costi, M.D. Sicilia, S. Rubio.  
*Food Chemistry* 134 (2012) 1244–1249.
2. “Stereoselective quantitation of mecoprop and dichlorprop in natural waters by supramolecular solvent-based microextraction, chiral liquid chromatography and tandem mass spectrometry”  
C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio.  
*Analytica Chimica Acta* 761 (2013) 102-108.
3. “Fast, simple and efficient supramolecular solvent-based microextraction of mecoprop and dichlorprop in soils prior to their enantioselective determination by liquid chromatography–tandem mass spectrometry”  
C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio.  
*Talanta* 119(2014) 46–52.
4. “Enantioselective determination of representative profens in wastewater by a single-step sample treatment and chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometry”  
C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio.  
*Talanta* (2014), aceptado.
5. “Enantioselective analysis of profens in freshwater fish based on microextraction with a nanostructured liquid and chiral liquid chromatography–tandem mass spectrometry”  
C. Caballo, M.D. Sicilia, S. Rubio  
*Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2014) enviado para su publicación

Todos los objetivos de esta Tesis Doctoral especificados al inicio de esta Memoria se abordan en los artículos 2 y 4. En los artículos 3 y 5 se abordan los objetivos 1, 3 y 4 y en el artículo 1 se resumen las investigaciones realizadas sobre el control de calidad de los productos piscícolas.

# **APÉNDICE B:**

# **COMUNICACIONES EN**

# **CONGRESOS**





**ORAL INTERNACIONAL**

*Supramolecular solvent-based microextraction for the determination of drug enantiomers in  
sewage and fish samples*

Congreso: 14<sup>as</sup> Jornadas de Análisis Instrumental

Barcelona, del 1 al 3 de octubre de 2014



# 14<sup>as</sup> JORNADAS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL

RECINTO FIRA GRAN VÍA. BARCELONA, 1-3 OCTUBRE 2014

# 14<sup>th</sup> INSTRUMENTAL ANALYSIS CONFERENCE

GRAN VIA VENUE. BARCELONA, OCTOBER 1st - 3rd 2014

## LIBRO DE ABSTRACTS





AME-OC06

### SUPRAMOLECULAR SOLVENT-BASED MICROEXTRACTION FOR THE DETERMINATION OF DRUG ENANTIOMERS IN SEWAGE AND FISH SAMPLES

**C. Caballo Linares, M.D. Sicilia Criado, S. Rubio Bravo**

Faculty of Science, University of Córdoba, Spain  
e-mail: calic\_amb@hotmail.es

The growing consumption of pharmaceuticals in the developed world has resulted in a noticeable increase in environment pollution by pharmacologically active compounds (PhACs), effluents from wastewater treatment plants (WWTPs) being the major sources of PhAC contamination. Chiral drugs, that represent a half of market pharmaceuticals, are enantioselectively degraded in WWTPs and in the environment, and drug enantiomers can have quite different ecotoxicity. Therefore, enantiomeric ratio (ER) of PhACs can be a useful marker of drug biotransformation during wastewater treatment and an important factor for environmental risk assessment. However, information on enantiomeric distribution of PhACs in wastewater and environmental samples is scarce, primarily because measuring drug enantiomers at low concentration levels in such complex samples is difficult. In fact, only a few methods for the enantioselective determination of PhACs in natural and wastewater samples have been described and no methods to analyze other environmental samples such as biota are available.

This work deals with the development of simple, rapid and reliable methods for the determination of ibuprofen, naproxen and ketoprofen enantiomers in wastewater and fish samples using chiral liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry after supramolecular solvent-based microextraction. Supramolecular solvents (SUPRAS) are water-immiscible liquids consisting of surfactant aggregates with the capacity to extract analytes of different nature through a variety of interaction mechanisms. The SUPRAS used in this research that consisted of decaanoicacid (DeA) aggregates, solubilised profens through hydrogen bonds between the carboxyl/carbonyl/ether groups of the analytes and the carboxyl groups of DeA, and dispersion interactions between the apolar moieties of the drugs and the DeA hydrocarbon chain. Extractions of both wastewater and fish samples were performed in a single step in a short time (c.a. 20 min.), and the extracts were directly injected in the chromatograph where the drug enantiomers were separated on a (R)-1-naphthylglycine/3,5-dinitrobenzoic acid stationary phase and quantified in a mass spectrometer equipped with an electrospray ionization source and a triple quadrupole mass analyser. The high extraction efficiency provided by the SUPRAS permitted to obtain elevated concentration factors for wastewater samples (i.e. 456-715) and quantitative recoveries for fish ones using a low SUPRAS volume/sample amount ratio (i.e. 1.7  $\mu\text{L}/\text{mg}$ ). The quantitation limits for the determination of profen enantiomers in wastewater and fish samples were in the intervals 1-4  $\text{ng L}^{-1}$  and 2-7  $\text{ng g}^{-1}$ , respectively.



**CARTEL INTERNACIONAL**

*Stereoselective determination of mecoprop and dichlorprop in natural waters by  
supramolecular solvent-based microextraction and liquid chromatography-tandem mass  
spectrometry*

Congreso: 13<sup>as</sup> Jornadas de Análisis Instrumental

Barcelona, del 14 al 16 de noviembre de 2011

# 13<sup>as</sup> JORNADAS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL

RECINTO GRAN VIA. 14-16 NOVIEMBRE 2011

**EXPOQUIMIA**  
Salón Internacional de la Química

**Fira Barcelona**

**Año Internacional de la QUÍMICA 2011**



**SPONSORS**

**SEQA**  
Sociedad Española de Química Analítica

**SECYTA**  
Sociedad Española de Química Analítica

**SEEM**

**GOBIERNO DE ESPAÑA** **MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN**

In collaboration with EuChMS-DAC

**EUROPEAN UNION**  
**COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES**  
**EUROPEAN RESEARCH INFRASTRUCTURE CONFERENCE**

CTQ2011-14060-E

**PROGRAMA CIENTÍFICO**

**STEREOSELECTIVE DETERMINATION OF MECOPROP AND  
DICHLORPROP IN NATURAL WATERS BY SUPRAMOLECULAR  
SOLVENT-BASED MICROEXTRACTION AND LIQUID  
CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY**

C. Caballo, M. D. Sicilia, S. Rubio

Department of Analytical Chemistry, Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry.  
Edificio Anexo Marie Curie, Campus de Rabanales, 14071- Córdoba, España.  
Teléfono/Fax: 957218644; qalrubs@uco.es; www.uco.es/sac

About a quarter of currently used pesticides are chiral and, although their pesticide activity is generally enantioselective, they are frequently commercialized as racemates for economical reasons. In the environment, chiral pesticides are enantioselectively degraded by microorganisms and consequently, their enantiomeric ratio (ER, defined as the molar ratio of R to S enantiomers) progressively deviates from the original value. Since enantiomers of the same pesticide can cause variable toxicological effects on life organisms, the enantiomeric distribution of chiral pesticides in the different environmental compartments should be known to correctly assess the environmental risk from these pollutants. Consequently, analytical methods for the accurate and precise stereoselective determination of pesticides in environmental samples are required.

This research deals with the development of a method for the simultaneous determination of the R- and S-enantiomers of mecoprop (MCPP) and dichlorprop (DCPP) in river and underground waters, where they are frequently found owing to their high water solubility and widespread use. They are employed as both pure R-enantiomers and racemates and, once into the environment, they can suffer exclusive or preferential degradation of one of the enantiomers, or interconversion between them, the degradation mechanism depending of factors such as microbial population, pH, etc. Only a few analytical methods able to stereoselectively determine MCPP and DCPP at the low concentration levels present in natural waters (from few  $\text{ng L}^{-1}$  to  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) have been reported. These approaches invariably involve gas chromatography (GC) with mass spectrometry (MS) detection after laborious and time-consuming sample treatments including liquid-liquid or solid phase extraction, clean-up of extracts, analyte derivatization and multiple solvent evaporation steps.

In this work, the combination of supramolecular solvent-based microextraction (SUSME) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry permitted to simplify sample treatment in the stereoselective determination of MCPP and DCPP in natural waters. The proposed procedure was as follows: extraction of the analytes in a dodecanoic acid (DoA) aggregate-based solvent, analyte re-extraction in acetate buffer (pH = 5.0), separation of the target enantiomers on a  $\alpha$ -cyclodextrin-based chiral column under isocratic conditions (30% 100 mM formic acid/ammonium formate at pH 4.0 and 70% methanol, flow rate = 0.3 mL/min), and detection of the daughter ions ( $m/z = 141$  and  $161$  for MCPP and DCPP, respectively) obtained by fragmentation of the corresponding molecular ions using a triple quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray ionization source operating in the negative ion mode. The high extraction efficiency afforded by the supramolecular solvent for the target analytes and the sensitivity and selectivity obtained by LC-MS/MS permitted to reach low quantitation limits (about  $5 \text{ ng L}^{-1}$  of each enantiomer) using external calibration. Recoveries and actual concentration factors obtained for MCPP and DCPP enantiomers using the proposed SUSME approach varied within the intervals 74-78% and 79-83, respectively. The developed method was successfully applied to the determination of the ERs of MCPP and DCPP in river and underground water samples taken in the South of Spain.

*Tipo de comunicación: Poster-Medio ambiente*



## **ORAL NACIONAL**

*Microextracción con disolvente supramoleculares de plaguicidas quirales en muestras medioambientales*

Congreso: XVIII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica

Úbeda, del 16 al 19 de junio de 2013

*Disolventes supramoleculares en análisis quiral*

Congreso: Nanouco IV

Córdoba, del 7 al 8 de febrero de 2013

*Simplificación del tratamiento de muestra en análisis quiral con el uso de disolventes nanoestructurados*

Congreso: XVIII Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica

Málaga, del 7 al 8 de junio de 2012

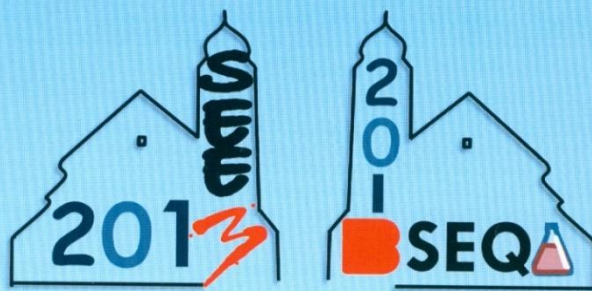
*Extracción de compuestos quirales en procesos analíticos e industriales con el uso de disolventes supramoleculares*

Congreso: I Congreso Científico de Investigadores en Formación en Agroalimentación y II Congreso Científico de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba

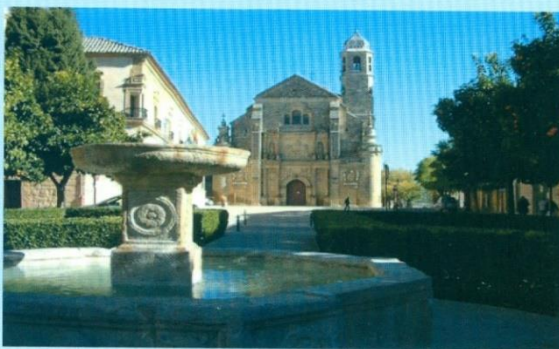
Córdoba, del 8 al 9 de mayo de 2012



# XVIII REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA



## VI REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS



Úbeda, 16-19 junio 2013



O-24

**MICROEXTRACCIÓN CON DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES DE  
PLAGUICIDAS QUIRALES EN MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES****C. Caballo, M. D. Sicilia, S. Rubio**

Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba  
Edificio Anexo Marie Curie. Campus de Rabanales, 14071-Córdoba  
calic\_amb@hotmail.es

El extendido uso de los plaguicidas en actividades agrícolas y ganaderas, jardinería e incluso en usos domésticos origina importantes problemas de contaminación en aguas naturales y suelos. De los más de mil plaguicidas registrados, aproximadamente trescientos son quirales. Los plaguicidas quirales se comercializan tanto como enantiómeros puros como en mezclas racémicas y su degradación biológica es generalmente enantioselectiva, por lo que la concentración de cada uno de los enantiómeros de un determinado plaguicida quiral en los distintos compartimentos medioambientales puede ser muy diferente. Teniendo en cuenta, además, que cada uno de los enantiómeros de la mayoría de los plaguicidas quirales presentan diferente toxicidad, es fundamental disponer de métodos de análisis enantioselectivos que permitan establecer la distribución enantiomérica de estos contaminantes en el medio ambiente y evaluar los riesgos asociados a cada uno de los enantiómeros de forma diferencial. Los métodos disponibles para la determinación de enantiómeros de plaguicidas a los bajos niveles de concentración encontrados en muestras medioambientales ( $\text{ng L}^{-1}$  -  $\mu\text{g L}^{-1}$  en muestras acuosas y  $\text{ng g}^{-1}$  -  $\mu\text{g g}^{-1}$  en suelos) son escasos e invariablemente implican tratamientos de muestra complejos previos a la determinación de los enantiómeros mediante electroforesis capilar quiral con detección fotométrica o cromatografía (líquida o de gases) quiral acoplada a espectrometría de masa. La extracción de los plaguicidas en muestras acuosas se realiza mediante extracción líquido-líquido repetitiva o extracción en fase sólida, y en muestras sólidas se ha propuesto el uso de extracción Soxhlet, extracción con líquidos presurizados y con fluidos supercríticos y extracción asistida por microondas o ultrasonidos. La mayoría de estos tratamientos requieren el uso de elevados volúmenes de disolventes orgánicos, y de etapas de limpieza y concentración de los extractos mediante evaporación de disolvente para alcanzar los límites de cuantificación requeridos.

En este trabajo se propone el uso de disolventes supramoleculares para la microextracción de plaguicidas quirales de aguas naturales y suelos previa a su determinación enantioselectiva mediante cromatografía líquida quiral acoplada a espectrometría de masas en tándem. Los disolventes supramoleculares (SUPRAS) son líquidos inmiscibles en agua constituidos por agregados de tensioactivos y generados mediante un proceso de coacervación. Los SUPRAS usados en esta investigación se producen espontáneamente a temperatura ambiente en mezclas del ácido dodecanoico, tetrahidrofurano y agua. El tratamiento de las muestras líquidas se realiza adicionando la propia muestra a disoluciones del ácido alquilarboxílico en THF, lo que origina la formación del SUPRAS que solubiliza a los analitos y se separa de la disolución como una segunda fase líquida. En el caso de muestras de suelos, la síntesis del SUPRAS es previa a la extracción. En ambos casos, la extracción se realiza en una única etapa, en un tiempo reducido (pocos minutos), sin el uso de energías auxiliares y utilizando un pequeño volumen de disolvente supramolecular (del orden de los microlitros), lo que permite obtener elevados factores de concentración, sin necesidad de realizar etapas de concentración de los extractos. Esta técnicas se han utilizado con éxito para la extracción de dos herbicidas quirales, diclorprop y mecorprop, en aguas de río y subterráneas y en suelos, obteniéndose elevadas eficacias de extracción y bajos límites de cuantificación para la determinación de los enantiómeros R y S de ambos herbicidas ( $1-4 \text{ ng L}^{-1}$  en aguas de río y subterráneas y  $1 \text{ ng g}^{-1}$  en suelos). Los métodos desarrollados se han aplicado al análisis de muestras medioambientales de diferente procedencia y composición.



**LIBRO DE RESÚMENES**

## **NANOUCO IV**

Encuentro sobre Nanociencia y Nanotecnología  
de Investigadores y Tecnólogos Andaluces



**Córdoba, 7 y 8 de Febrero 2013**





**06-CFQ****DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES EN ANÁLISIS QUIRAL****C. Caballo, A.B. Lara, M.D. Sicilia, S. Rubio**

*Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba  
Edificio Anexo Marie Curie. Campus de Rabanales, 14071- Córdoba. España  
Teléfono/Fax: 957218644; qa1rubrs@uco.es; [www.uco.es/investiga/grupos/FQM-186](http://www.uco.es/investiga/grupos/FQM-186)*

Los disolventes supramoleculares, líquidos nanoestructurados constituidos por agregados tridimensionales de moléculas anfífilas, presentan una serie de características que los hacen especialmente adecuados para su uso como extractantes en procesos analíticos: capacidad para solubilizar analitos en un amplio intervalo de polaridades, elevada eficacia de extracción debido a la presencia de un elevado número de centros de solubilización, baja toxicidad e inflamabilidad y bajo coste. Además, determinados disolventes supramoleculares, como es el caso de los constituidos por agregados de ácidos alquilcarboxílicos, actúan como materiales con propiedades de acceso restringido, es decir, presentan baja eficacia de extracción para macromoléculas como proteínas, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos, lo que permite obtener extractos más limpios que los que se obtienen usando disolventes orgánicos en la extracción de material biológico, suelos y otras muestras complejas. Investigaciones recientes desarrolladas por nuestro grupo de investigación han demostrado que las excelentes prestaciones de los disolventes supramoleculares de ácidos alquilcarboxílicos permiten simplificar los procesos de tratamiento de muestra en análisis quiral.

El análisis quiral implica la determinación de enantiómeros (imágenes especulares) de compuestos quirales o incluso enantiómeros de los diferentes isómeros de estos compuestos, a concentraciones bajas en muestras complejas. Dada la complejidad de este tipo de análisis, a día de hoy, los métodos enantioselectivos descritos son escasos y muy laboriosos. Generalmente incluyen varias etapas de extracción, limpieza y concentración de los extractos obtenidos, separación de los analitos mediante cromatografía quiral líquida o de gases y determinación de los mismos mediante espectrometría de masas. En los métodos propuestos por nuestro grupo de investigación, los analitos quirales se extraen de muestras líquidas y sólidas en una única etapa utilizando un pequeño volumen de disolvente supramolecular y se determinan directamente en los extractos usando cromatografía líquida quiral acoplada a espectrometría de masas en tándem. De esta forma se consigue reducir drásticamente el tiempo de análisis y el consumo de disolventes orgánicos.

Los disolventes supramoleculares usados se forman espontáneamente a temperatura ambiente en disoluciones de ácido alquilcarboxílico (ácido decanoico o dodecanoico) en tetrahidrofurano (THF) mediante la adición de agua. La extracción de muestras líquidas implica la adición de la muestra a la disolución de tensioactivo, lo que origina la formación de un pequeño volumen de disolvente supramolecular en el que se extraen los analitos con la ayuda de agitación magnética. En el caso de muestras sólidas, el disolvente supramolecular previamente sintetizado se utiliza para extraer los analitos con la ayuda de agitación en vortex. Hasta el momento, se han desarrollado métodos para la determinación de los enantiómeros R y S de dos herbicidas quirales el mecoprop (MCP) y el diclorprop (DCPP) en aguas de río, aguas subterráneas y suelos y los tres pares de enantiómeros de los tres isómeros ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) del hexabromociclododecano (HBCD), un retardante de llama usado como aditivo industrial, en sedimentos de río, suelos y diferentes especies de peces. Los métodos desarrollados presentan la sensibilidad, selectividad, exactitud y precisión requerida en análisis quiral y son mucho más simples y rápidos que los métodos descritos en la bibliografía para estos analitos.



**XIII**

**Reunión del Grupo Regional  
Andaluz de la Sociedad  
Española de Química Analítica**

**GRASEQA 2012**

**MÁLAGA,  
7 y 8 de junio de 2012**

SECRETARÍA TÉCNICA: **Wajés Villaverde**, Av. García Lorca s/n. Edif. Club Municipal de Hielo, 29030 Benalmádena, Málaga, España.  
teléfono: +34 952 44 55 96 fax: +34 952 56 45 33 Email: [congreso@wvillaverde.com](mailto:congreso@wvillaverde.com) [www.graseqa2012.com](http://www.graseqa2012.com)

Logos:    

## Simplificación del tratamiento de muestra en análisis quiral con el uso de disolventes nanoestructurados

C. Caballo, A. B. Lara, M. D. Sicilia, S. Rubio

*Departamento de Química Analítica, Instituto de Química Fina y Nanoquímica,  
Edificio Anexo Marie Curie, Campus de Rabanales, 14071- Córdoba, España  
Teléfono/Fax: 957218644; qal.rubrs@uco.es; www.uco.es/investig/grupos/FQM-186*

Numerosos compuestos químicos de uso agrícola, industrial y farmacéutico (plagucidas, principios activos, aditivos, etc.) son quirales. Estos compuestos se utilizan como mezclas racémicas o enantiómeros puros, pero en el medio ambiente se producen importantes cambios de su relación enantiómerica (RE, cociente entre las concentraciones molares de los dos enantiómeros) debido a procesos de biodegradación, interconversión y metabolización enantioselectiva. Además, cada uno de los enantiómeros de un contaminante quiral presenta diferente toxicidad, carcinogenicidad, mutagenicidad, etc. por lo tanto, para realizar una adecuada evaluación de riesgos medioambientales y para la salud humana es fundamental conocer su distribución enantiómerica.

La gran similitud de las estructuras químicas de los enantiómeros, su baja concentración en muestras medioambientales y la complejidad de las matrices hace que la determinación estereoselectiva de contaminantes no sea una tarea fácil. Los métodos descritos hasta la fecha combinan tratamientos de muestra muy laboriosos con técnicas cromatográficas quirales [cromatografía de gases (CG) o cromatografía líquida (CL)] acopladas a espectrometría de masas (EM) para alcanzar la selectividad y sensibilidad necesarias. Los tratamientos de muestra incluyen etapas de extracción, limpieza y concentración de los extractos y en el caso de determinaciones mediante CG-EM de contaminantes polares, derivatización de los analitos.

En este trabajo se propone la microextracción con disolventes supramoleculares previa a CL-EM para la simplificación del tratamiento de muestras medioambientales en análisis quiral. Los disolventes supramoleculares son líquidos nanoestructurados inmiscibles con agua constituidos por agregados de tensioactivo con capacidad para extraer eficazmente una gran variedad de analitos (desde apolares hasta muy polares) debido a que proporcionan diferentes tipos de interacciones (dispersión, dipolo-dipolo, formación de puentes de hidrógeno, etc.) y presentan un elevado número de centros de solubilización. Los disolventes supramoleculares usados en los métodos desarrollados se obtuvieron a partir de mezclas ternarias de ácido decanoico (ADe) o dodecanoico (ADo), tetrahidrofurano (THF) y agua. El disolvente de ADo se utilizó para la extracción de los herbicidas mecoprop (MCP) y diclorprop (DCPP) en muestras de aguas naturales y el disolvente de ADe, para la extracción de hexabromociclododecano (HBCD, un retardante de llama usado como aditivo en aislantes poliméricos, tapicerías y carcasas de aparatos eléctricos) en muestras de peces. Los enantiómeros R y S del MCP y el DCPP y los tres pares de enantiómeros correspondientes a los tres isómeros ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) del HBCD se separaron en fases estacionarias de  $\alpha$ -ciclodextrina permetilada y de  $\beta$ -ciclodextrina, respectivamente. La cuantificación de los enantiómeros se realizó mediante espectrometría de masas en tándem usando un triple cuadrupolo con fuente de ionización por electronebulización. Los métodos desarrollados son más rápidos y simples que los descritos hasta el momento y proporcionan muy bajos límites de cuantificación (inferiores a  $5 \text{ ng L}^{-1}$  y  $10 \text{ ng g}^{-1}$  para la determinación de enantiómeros de herbicidas en aguas y enantiómeros de HBCD en peces, respectivamente).



**TÍTULO:****Extracción de compuestos quirales en procesos analíticos e industriales con el uso de disolventes supramoleculares****INTRODUCCIÓN**

En la actualidad existe una clara tendencia a utilizar enantiómeros puros en fármacos y productos fitosanitarios ya que los organismos vivos presentan respuestas biológicas diferenciadas para cada uno de los enantiómeros de un determinado compuesto quiral. Es frecuente que sólo uno de los enantiómeros de un principio activo farmacéutico o fitosanitario ejerza acción terapéutica o plaguicida, respectivamente, mientras que el otro no ejerce efecto o incluso produce efectos nocivos con graves consecuencias para la salud o el medio ambiente. Sin embargo, el coste de la producción de enantiómeros puros es muy elevado, por lo que es fundamental desarrollar nuevos métodos de producción enantioselectiva que permitan reducir costes.

Por otra parte, aunque los principios activos de fármacos y plaguicidas se utilizan como mezclas racémicas o enantiómeros puros, en el medio ambiente, cada enantiómero se degrada a diferente velocidad o incluso se produce la interconversión de un enantiómero en otro. Por lo tanto, la relación enantiomérica (RE, cociente entre las concentraciones molares de los dos enantiómeros) de los residuos de fármacos y plaguicidas en los diferentes compartimentos ambientales difiere significativamente de su valor original. Además, cada uno de los enantiómeros de estos contaminantes presenta diferente toxicidad, por lo que es fundamental conocer su distribución enantiomérica para realizar una adecuada evaluación de los riesgos medioambientales.

Los disolventes supramoleculares son líquidos nanoestructurados constituidos por agregados de tensioactivo que tienen la capacidad de extraer eficazmente una gran variedad de compuestos orgánicos, por lo que constituyen una buena alternativa a los



disolventes orgánicos para la extracción de contaminantes quirales en muestras ambientales previa a su determinación estereoselectiva y para la extracción enantioselectiva de principios activos para la producción de enantiómeros puros en la industria farmacéutica y agroquímica.

## OBJETIVOS

Los objetivos de los trabajos de investigación que se están realizando son dos:

- 1) Desarrollar nuevos métodos analíticos para la determinación de contaminantes quirales en muestras medioambientales basados en el uso de disolventes supramoleculares que aventajen a los basados en técnicas convencionales de extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida en simplicidad y rapidez, y que proporcionen una exactitud, precisión, sensibilidad y selectividad similar o mayor a la obtenida usando estas técnicas convencionales.
- 2) Diseñar y sintetizar disolventes supramoleculares con capacidad de extracción enantioselectiva para la producción de enantiómeros puros de principios activos de fármacos y productos fitosanitarios a escala industrial. La finalidad es establecer metodologías de producción simples, eficaces y rentables económicamente.

## MATERIAL Y METODOS

La metodología general utilizada consiste en:

- 1) Seleccionar o sintetizar el compuesto anfifílico más adecuado para generar el disolvente supramolecular con las funciones o propiedades requeridas.
- 2) Establecer las condiciones experimentales necesarias para sintetizar el disolvente supramolecular.
- 3) Estudiar la influencia de las variables experimentales en la eficacia de las extracciones analíticas y en la enantioselectividad de las extracciones industriales. Las variables optimizadas en extracciones analíticas son: volumen

y composición del disolvente supramolecular, cantidad de muestra, pH, tiempo de extracción, fuerza iónica y temperatura, y para las extracciones industriales: concentración de tensioactivo quiral usado para obtener el disolvente supramolecular, relación de volúmenes de agua a disolvente supramolecular y concentración de cada uno de los reactivos usados en la extracción enantioselectiva.

- 4) Caracterizar los métodos analíticos desarrollados. Para ello se determinan sus límites de detección y cuantificación y se evalúan su exactitud y precisión.
- 5) Aplicar los métodos analíticos desarrollados a la determinación enantioselectiva de contaminantes quirales en muestras ambientales.
- 6) Evaluar los disolventes supramoleculares quirales para la producción de enantiómeros puros a escala industrial.

La separación de los enantiómeros de principios activos de fármacos y productos fitosanitarios previa a su determinación se realiza mediante cromatografía líquida utilizando columnas quirales y los detectores usados son espectrómetro UV/Visible con diodos en fila y espectrometrómetro de masas con fuente de ionización por electronebulización y analizador de triple cuadrupolo.

#### PRINCIPALES APORTACIONES

Los trabajos de investigación realizados hasta la fecha se han centrado en la determinación de enantiómeros de plaguicidas quirales en muestras acuosas medioambientales y en la extracción enantioselectiva de principios activos farmacéuticos. Se ha desarrollado un método para la determinación de los enantiómeros R y S de dos herbicidas, mecoprop (MCCP) y diclorprop (DCPP), en aguas de río y subterráneas. Los plaguicidas se extraen en un disolvente supramolecular obtenido a partir de ácido dodecanoico (ADo) disuelto en tetrahidrofurano (THF) mediante la adición de la muestra acuosa, y sus enantiómeros se cuantifican mediante cromatografía líquida quiral acoplada a espectrometría de masas en tándem. La recuperación obtenida

para ambos plaguicidas es de aproximadamente el 78% y el factor de concentración 94, los límites de cuantificación son inferiores a 5 ng L<sup>-1</sup> para todos los enantiómeros y la precisión, expresada como desviación estándar relativa (n=6, concentraciones=5-100 ng L<sup>-1</sup>) es inferior al 3%.

En cuanto a la extracción enantioselectiva de principios activos en fármacos, se ha sintetizado un disolvente supramolecular constituido por agregados del tensioactivo quiral didodecil R-tartrato (DDL-T) y se ha evaluado su capacidad para extraer enantioselectivamente propranolol, un principio activo del grupo de los β-bloqueantes usado para tratar la hipertensión. El tensioactivo quiral se sintetizó a partir de ácido R-tartárico y dodecanol en tolueno y posteriormente, se obtuvo el disolvente supramolecular a partir de mezclas ternarias de DDL-T, tetrahidrofurano y agua. La extracción enantioselectiva se basa en la formación de un complejo entre el tensioactivo quiral, borato y propranolol. El factor de separación y el exceso enantiomérico obtenido depende de las concentraciones de DDL-T y ácido bórico y del pH. El máximo factor de separación y exceso enantiomérico obtenidos fueron aproximadamente 1,4 y 4%, respectivamente.

#### PRINCIPALES REFERENCIAS

- R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, C. García-Pinto, E. Fernández Laespada. *Surfactant cloud point extraction and preconcentration of organic compounds prior to chromatography and capillary electrophoresis*. J. Chromatogr. A 903 (2000) 251
- S. Rubio, D. Pérez-Bendito. *Supramolecular assemblies for extracting organic compounds*. Trends Anal. Chem. 22 (2003) 470
- A. Ballesteros-Gómez, M.D. Sicilia, S. Rubio. *Supramolecular solvents in the extraction of organic compounds. A review*. Anal. Chim. Acta 677 (2010) 108.
- F. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito. *Tetrabutylammonium-induced coacervation in vesicular solutions of alkyl carboxylic acids for the extraction of organic*

*compounds*. Anal. Chem. 78 (2006) 7229.

- F. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito. *Water-induced coacervation of alkyl carboxylic acid reverse micelles: phenomenon description and potential for the extraction of organic compounds*. Anal. Chem. 79(2007) 79.
- K.Otsuka, S.J. Terabe. *Enantiomer separation of drugs by micellar electrokinetic chromatography using chiral surfactants*. Chromatogr. A, 875 (2000) 163.
- Y. Abe, T. Shoji, M. Kobayashi, W. Qing, N. Asai, H. Nishizawa. *Enantioselective distribution of amino-alcohols in a liquid-liquid two-phase system containing dialkyl L-tartrate and boric acid*. Che. Pharm. Bull 43 (1995) 262.




**COMUNICACIÓN FASH NACIONAL**


*Microextracción de carotenoides en salmónidos con el uso de disolventes supramoleculares*

Congreso: XVII Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica

Córdoba, del 10 al 11 de junio de 2010




REUNIÓN DEL GRUPO REGIONAL ANDALUZ DE LA  
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA




XII 2010  
GRASEQA

Córdoba, 10 y 11 de junio



LIBRO DE RESÚMENES



UNIVERSIDAD DE CORDOBA

## PF-8

**Microextracción de carotenoides en salmónidos con el uso de disolventes supramoleculares**

C. Caballo, E. M. Costi, M. D. Sicilia, S. Rubio

*Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba  
Edificio Anexo Marie Curie. Campus de Rabanales, 14071- Córdoba. España  
Teléfono/Fax: 957218644; qa1rubrs@uco.es; http://www.uco.es/sac*

El color rosado de los salmónidos (ej. salmones y truchas asalmonadas) determina la aceptación del producto en el mercado y su precio, ya que el consumidor lo considera un índice de calidad. Este color rosáceo se debe a la presencia de carotenoides, fundamentalmente astaxantina y cantaxantina, en el tejido de los peces. Estos compuestos no son sintetizados por los salmónidos sino ingeridos en su dieta, por lo que la alimentación de los peces criados en piscifactoría debe contener carotenoides, suponiendo el aporte de estos compuestos entre un 6 y un 8% del coste de producción total. Por lo tanto, el contenido en carotenoides en los salmónidos de piscifactoría debe ser controlado con el fin de asegurar la calidad del producto y ajustar costes.

Aunque se han propuesto diferentes métodos para la evaluación del color en el propio tejido del pez (uso de cartas de color, medidas colorimétricas o espectrométricas de reflectancia visible, etc.), la única alternativa que proporciona resultados exactos del contenido total de carotenoides y permite determinar la concentración individual de cada carenoide, pasa por la extracción de los analitos de interés en un disolvente adecuado y su posterior determinación en el extracto. Los métodos de extracción propuestos hasta la fecha se basan en el uso de elevados volúmenes de disolventes orgánicos tóxicos, inflamables y altamente contaminantes, son lentos y laboriosos, y las grasas extraídas en estos disolventes interfieren en la determinación de los analitos.

En este trabajo se propone el uso de un disolvente supramolecular constituido por micelas inversas de ácido decanoico (ADe) para la microextracción de astaxantina y cantaxantina en salmónidos de piscifactoría. El disolvente supramolecular se sintetiza mediante la adición de agua a una disolución de micelas inversas del biotensioactivo en tetrahidrofurano (THF). En presencia de agua se produce un aumento del tamaño de los agregados debido a la desolvatación parcial de las moléculas de ADe. Los nuevos agregados formados son insolubles en THF-agua y se separan como una segunda fase que constituye el disolvente supramolecular. Para realizar la microextracción de los carotenoides se sigue el siguiente procedimiento: Se adicionan 800  $\mu$ L del disolvente supramolecular sintetizado a 500 mg de muestra triturada, la mezcla se agita en un vortex durante 10 min y se centrifuga a 15000 rpm durante 15 minutos. En el extracto líquido se determinan el contenido total de carotenoides mediante medidas fotométricas y la concentración de astaxantina y cantaxantina mediante cromatografía líquida con detección fotométrica.

El método de microextracción desarrollado aventaja a los basados en el uso de disolventes orgánicos en: 1) Eficacia de extracción, debido a la capacidad del disolvente supramolecular para solubilizar a los analitos mediante diferentes tipos de interacciones (hidrófobas y formación de puentes de hidrógeno) y al elevado número de centros de solubilización existentes en el mismo. 2) Selectividad para la determinación fotométrica del contenido total de carotenoides, ya que se evita la interferencia debida a las grasas del pescado. 3) Frecuencia de muestreo, gracias a la simplicidad y rapidez del proceso de extracción. 4) Consumo de disolventes orgánicos, que se reduce de 150 mL a 0.4 mL por muestra analizada.





**CARTEL NACIONAL**

*Enantiomer-specific determination of chiral pesticides in natural waters by microextraction in a Supramolecular Solvent and Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry*

Congreso: Nanouco IV

Córdoba, del 7 al 8 de febrero de 2013

*Disolventes nanoestructurados para la microextracción de astaxantina y cantaxantina en productos de piscifactoría*

Congreso: Nanouco III

Córdoba, del 10 al 11 de febrero de 2011



**LIBRO DE RESÚMENES**

## **NANOUCO IV**

Encuentro sobre Nanociencia y Nanotecnología  
de Investigadores y Tecnólogos Andaluces



**Córdoba, 7 y 8 de Febrero 2013**



**P4-CFQ****ENANTIOMER-SPECIFIC DETERMINATION OF CHIRAL PESTICIDES IN NATURAL WATERS BY MICROEXTRACTION IN A SUPRAMOLECULAR SOLVENT AND LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY****C. Caballo, M. D. Sicilia, S. Rubio**

*Department of Analytical Chemistry, Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry, Edificio Anexo Marie Curie. Campus de Rabanales, 14071- Córdoba. España  
Teléfono/Fax: 957218644; qa1rubrs@uco.es; [www.uco.es/investiga/grupos/FQM-186](http://www.uco.es/investiga/grupos/FQM-186)*

Quantitation of individual enantiomers of chiral pesticides in aqueous environmental samples is a difficult task and only a few methods providing the selectivity and sensitivity (quantitation limits at the low ng L<sup>-1</sup> level) required have been reported. These methods are based on the liquid-liquid or solid phase extraction (SPE) of the target pesticides, the clean-up and concentration of the extracts, and the chiral liquid (LC) or gas (GC) chromatographic separation and mass spectrometry (MS) detection of the enantiomers.

In this work, supramolecular solvent-based microextraction (SUSME) was used to simplify sample treatment in the enantiomer-specific determination of pesticides. A method for the simultaneous quantitation of the R- and S-enantiomers of mecoprop (MCCP) and dichlorprop (DCPP) in natural waters was developed. MCCP and DCPP are herbicides widely used that can easily reach natural waters owing to their high water-solubility and soil mobility. They are frequently employed as racemates, but in the environment, their enantiomeric ratio (ER, defined as the molar ratio of R to S enantiomers) is usually different from one as a result of differences in the degradation rates between the R- and S-enantiomers and the occurrence of interconversion reactions. Differential toxicological effects of the R- and S-enantiomers of MCCP and DCPP on aquatic organisms and plants have been also reported. Therefore, determination of individual enantiomers will provide a more adequate basis for assessing the risk of these chiral pollutants in the environment.

Reported method for the stereoselective determination of MCCP and DCPP in natural waters at concentrations at the low ng L<sup>-1</sup> level are based on GC with MS detection. No methods based on LC-MS have been described so far. Analytes are extracted from samples by repetitive (n=3) liquid-liquid extraction with dichloromethane or solid phase extraction (SPE) on polymeric sorbents, the extracts are subjected to derivatization to obtain methyl or pentafluorobenzyl esters, cleaned-up by liquid-liquid back-extraction or SPE on silica, and concentrated by solvent evaporation.

SUSME and LC-MS were combined in this research to develop a simple rapid method for the sensitive and selective determination of the R- and S-enantiomers of DCPP and MCCP in underground and river waters. The method involved the extraction of the herbicides in a supramolecular solvent made up of reverse aggregates of dodecanoic acid, analyte re-extraction in acetate buffer (pH = 5.0), separation of the target enantiomers on a chiral column of permethylated  $\alpha$ -cyclodextrin under isocratic conditions, and detection of the daughter ions (m/z = 140.9 and 160.6 for MCCP and DCPP, respectively) using a triple quadrupole mass spectrometer equipped with a TurbolonSpray source operating in the negative ion mode. The quantitation limits were 1 ng L<sup>-1</sup> for R- and S-MCCP, and 4 ng L<sup>-1</sup> for R- and S-MCCP, and the precision, expressed as relative standard deviation (n=6) were lower than 3 % at concentrations at the low ng L<sup>-1</sup> level.



**LIBRO DE RESÚMENES**

**NANOUCO III**

Encuentro sobre Nanociencia y Nanotecnología de  
Investigadores y Tecnólogos Andaluces



**Córdoba, 10 y 11 de febrero de 2011**



## P-6

### DISOLVENTES NANOESTRUCTURADOS PARA LA MICROEXTRACCIÓN DE ASTAXANTINA Y CANTAXANTINA EN PRODUCTOS DE PISCIFACTORÍA

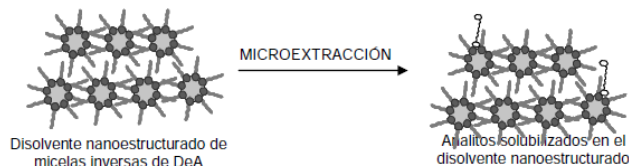
C. Caballo, E. M. Costi, M. D. Sicilia, S. Rubio

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba  
Edificio Anexo Marie Curie, Campus de Rabanales, 14071- Córdoba, España  
Teléfono/Fax: 957218644; qalrubrs@uco.es; [www.uco.es/investiga/grupos/FQM-186](http://www.uco.es/investiga/grupos/FQM-186)

Los disolventes nanoestructurados formados mediante la coacervación de disoluciones de tensioactivos constituyen una poderosa herramienta para la microextracción de compuestos en un amplio intervalo de polaridades. En este trabajo se propone el uso de un disolvente constituido por micelas inversas de ácido decaicoico (ADe) para la microextracción de astaxantina y cantaxantina en productos de piscifactoría. Este disolvente se sintetiza mediante la adición de agua a una disolución de micelas inversas de DeA en tetrahidrofurano (THF). En presencia de agua se produce un aumento del tamaño de los agregados, que debido a su baja solubilidad en la mezcla de disolventes se separan como una segunda fase que constituye el disolvente supramolecular nanoestructurado.

La astaxantina y cantaxantina son dos carotenoides responsables del color rosado de determinados peces (ej. salmones, truchas asalmonadas, etc.). Este color rosado es considerado un índice de calidad y determina la aceptación del producto en el mercado y su precio. La dieta de los peces criados en piscifactoría debe contener carotenoides para que adquieran su color rosado, lo que supone un incremento del coste de producción. Por lo tanto, para asegurar la calidad del producto y ajustar costes es necesario controlar el contenido en carotenoides en los peces. Los métodos desarrollados hasta el momento para la determinación de carotenoides en materiales biológicos utilizan elevados volúmenes de disolventes orgánicos tóxicos, inflamables y altamente contaminantes para la extracción de los analitos, además, son lentos y laboriosos y las grasas del pescado extraídas junto con los carotenoides interfieren en la determinación.

Una alternativa a los disolventes orgánicos es la microextracción con el uso de disolventes nanoestructurados. El proceso de microextracción de los carotenoides de las muestras de pescado se realiza en menos de 30 minutos utilizando material convencional de laboratorio y bajas cantidades de muestra (500 mg) y de disolvente (800  $\mu$ L), siendo posible realizar el tratamiento de hasta 10 muestras simultáneamente. En el extracto líquido obtenido se determina la concentración de astaxantina y cantaxantina mediante cromatografía líquida con detección fotométrica y el contenido total de carotenoides mediante medidas fotométricas sin interferencia de las grasas del pescado. La elevada eficacia del proceso de microextracción se debe a la capacidad del disolvente supramolecular para solubilizar a los analitos mediante diferentes tipos de interacciones (hidrófobas y formación de puentes de hidrógeno) y al elevado número de centros de solubilización existentes en el mismo.











UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



Departamento de  
Química Analítica



*Supramolecular  
Analytical Chemistry*  
research group FQM-186