



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



Departamento de
Química Analítica

**TÉCNICAS INTEGRADAS-SIMPLIFICADAS EN
LAS ETAPAS PREVIAS DEL ANÁLISIS
AMBIENTAL CON EL USO DE SISTEMAS
SUPRAMOLECULARES**

TESIS DOCTORAL
Noelia Luque Plata
Córdoba, Julio de 2012

TITULO: *TÉCNICAS INTEGRADAS-SIMPLIFICADAS EN LAS ETAPAS
PREVIAS DEL ANÁLISIS AMBIENTAL CON EL USO DE SISTEMAS
SUPRAMOLECULARES*

AUTOR: *NOELIA LUQUE PLATA*

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

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

**TÉCNICAS INTEGRADAS-SIMPLIFICADAS EN LAS ETAPAS PREVIAS
DEL ANÁLISIS AMBIENTAL CON EL USO DE SISTEMAS
SUPRAMOLECULARES**

Memoria presentada para aspirar al grado de Doctor por

LA DOCTORANDA,

que lo firma en Córdoba, a 2 de Julio de 2012

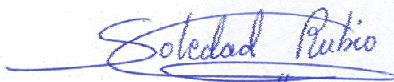


Fdo.: **Noelia Luque Plata**

Licenciada en Ciencias Ambientales

Con el Vº Bº de

LA DIRECTORA,



Fdo: **Dra. Soledad. Rubio Bravo**

Catedrática del Departamento de Química Analítica
de la Universidad de Córdoba



TÍTULO DE LA TESIS: TÉCNICAS INTEGRADAS-SIMPLIFICADAS EN LAS ETAPAS PREVIAS DEL ANÁLISIS AMBIENTAL CON EL USO DE SISTEMAS SUPRAMOLECULARES.

DOCTORANDO/A: NOELIA LUQUE PLATA

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

Las investigaciones que se incluyen en esta Tesis Doctoral han tenido como objetivo general simplificar e integrar las diferentes operaciones que constituyen la etapa de tratamiento de muestras ambientales haciendo uso de disolventes y adsorbentes supramoleculares. Se ha demostrado que estos sistemas extractantes proporcionan diferentes microambientes dentro de su estructura tridimensional donde se incrementa la estabilidad de la mayoría de los compuestos orgánicos. Esta propiedad, unida a la gran capacidad de extracción de los sistemas supramoleculares, derivada de los diferentes tipos de interacciones que establecen y el gran número de centros enlazantes que ofrecen, y su compatibilidad con cromatografía de líquidos y distintos sistemas de detección, han hecho posible el desarrollo de metodologías analíticas simples y rápidas para la determinación de contaminantes prioritarios y emergentes en muestras ambientales. Los objetivos científicos concretos que se plantearon al inicio de la Tesis fueron dos y en ellos se ha centrado la labor de la doctoranda Dña. Noelia Luque Plata durante el desarrollo de la misma.

El primer objetivo tuvo como finalidad explorar la capacidad de los disolventes y adsorbentes supramoleculares para integrar las etapas de extracción, estabilización, preconcentración y limpieza de contaminantes prioritarios. Se ha incidido en aquellos contaminantes para los que las metodologías convencionales no ofrecen respuesta adecuada para su monitorización en campañas ambientales en las que se requiere la recogida y análisis no inmediato de un gran número de muestras. Estos estudios han permitido el desarrollo de tres métodos analíticos para la determinación de

tensioactivos de benzalconio, hidrocarburos aromáticos policíclicos y plaguicidas en aguas naturales y residuales.

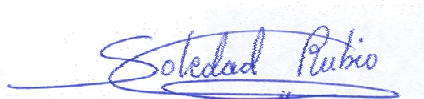
El segundo objetivo fue desarrollar nuevas metodologías basadas en agregados supramoleculares para la determinación de contaminantes emergentes, concretamente sustancias perfluoroalquiladas, en muestras biológicas. Como resultado se pusieron a punto dos métodos simples, rápidos y con elevado rendimiento de extracción para la determinación de estas sustancias en tejidos de aves y peces y suero sanguíneo. En este contexto, se desarrolló una nueva metodología para eliminar o reducir considerablemente el efecto espacio carga frecuentemente presente en la cuantificación de contaminantes en muestras ambientales cuando se usa espectrometría de masas con trampa iónica

Las investigaciones realizadas se han materializado en la publicación de 5 artículos en revistas del primer decil del Área de Química Analítica (4 artículos en J. Chromatogr. A y 1 artículo en Anal. Chim. Acta) y en la presentación de 9 contribuciones a Congresos, 5 internacionales y 4 nacionales. La Doctoranda ha obtenido el Diploma de Estudios Avanzados dentro del programa de doctorado de Química Fina, con mención de calidad, que se imparte en la Universidad de Córdoba, obteniendo la máxima calificación en las asignaturas cursadas y en el trabajo de investigación presentado.

Teniendo en cuenta la originalidad y extensión del trabajo de investigación realizado y la formación adquirida por Dña Noelia Luque Plata durante la realización de la Tesis Doctoral, la directora de este trabajo autoriza su presentación.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, a 2 de julio de 2012

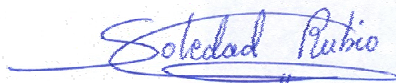
A handwritten signature in blue ink that reads "Soledad Rubio". The signature is written in a cursive style and is underlined with a blue horizontal line.

Fdo.: SOLEDAD RUBIO BRAVO

D^a Soledad Rubio Bravo, catedrática del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba, en calidad de Directora de la Tesis Doctoral presentada por la licenciada en Ciencias Ambientales, D^a. Noelia Luque Plata,

CERTIFICA: Que la citada Tesis Doctoral “Técnicas integradas-simplificadas en las etapas previas del análisis ambiental con el uso de agregados supramoleculares” se ha realizado en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Córdoba y que, a mi 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, 2 de julio de 2012.



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

A mis padres,
que me lo han dado todo

Mis Agradecimientos:

En primer lugar quiero agradecer a M^a Dolores Pérez Bendito y Soledad Rubio Bravo la oportunidad que me dieron de formar parte de su grupo de investigación.

Asimismo, agradezco al Ministerio de Educación y Ciencia la concesión de una beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU), con referencia AP-2004-3644, que me ha posibilitado la dedicación a esta Tesis Doctoral durante cuatro años, así como el apoyo económico del grupo de investigación FQM-186 que ha cubierto el resto del tiempo necesario hasta la finalización de la misma.

Gracias a todas aquellas personas que han dedicado parte de su tiempo a enseñarme conocimientos de Química Analítica y sobre todo a investigar. Mención especial merece Ana Ballesteros por guiarme tan acertadamente en nuestros últimos trabajos de "perfluoros" y bisfenol A.

Estoy profundamente agradecida a todos mis compañeros y amigos analíticos por los momentos de discusión de resultados y búsqueda de soluciones, por animarme y ayudarme cuando ya no podía más, por las risas, peroles, cafés y cervezas compartidas y por su paciencia conmigo. He aprendido de todos, habéis sido suelo en mi camino diario y peldaños en mis ascensos durante esta etapa de mi vida. Me llevo grandes amigos y solo por eso ya ha merecido la pena esta Tesis Doctoral. Sin ánimo de ofender a nadie no puedo pasar este párrafo sin nombrar a 4 analíticos especiales para mí. A Antonio por sus infinitos consejos, por ser un amigo de verdad, de esas personas tan honestas y tan auténticas que son difíciles encontrar, que suerte haberte conocido ☺. A Amalia por llenar de alegría nuestro cuartito, por bailar Jamiroquai como una loca o cantar *La Llorona* de Chavela Vargas esas tardes en las que las experiencias parecían no tener fin, porque hemos reído y llorado muchas veces juntas y porque siempre te llevo en mi corazón. Y a Francisco y

Aníta porque en los últimos años he pasado más tiempo con ellos que con mi familia y ya se sabe que el roce hace el cariño!... y por muchas cosas más que no hace falta explicar... me siento muy unida a vosotros dos.

Y no pueden faltar en estos agradecimientos "mis niñas y Rafita" y todos mis amigos fuera del labo (Eu y Marí vosotros también estáis incluidos), expertos muchos de ellos en coacervación y espectrometría de masas de tanto escuchar mis problemas analíticos!. Como olvidar esas meriendas tan riquisimas en Casa Molina-Barranco (centro neurálgico de operaciones), esas etapas de senderismo que reconfortan cuerpo y alma después de horas caminando a vuestro lado, esas veladas en el bar de mi cochera después de un duro día de trabajo, esos conciertos de Take That en primera fila que pasamos Lolita y yo todo un año planeando, esos cumpleaños todos juntos y últimamente también bodas... en definitiva mil gracias por estar siempre a mi lado año tras año compartiendo las alegrías y las penas, porque "everything changes but you" ¡Os quiero mucho, qué triste sería mi vida sin vosotros!

Gracias a mí "Sito" por soportarme, apoyarme y animarme en los momentos de desánimo que no han sido pocos. Y sobre todo gracias por tener tanta fe en mí, por quererme tal y como soy y por hacerme tan feliz.

Y a mis abuelos y mi hermano por estar siempre ahí.

Por último eternamente agradecida a mi amado y castigado planeta Tierra por proporcionarme folios donde poder imprimir esta Tesis, energía para encender mi ordenador, café para despejarme y aire para poder respirar. Con la esperanza de que algún día todos los recursos naturales estén protegidos y alcancemos el desarrollo sostenible, *because the earth matters*.

Gracias a todos,

Noelía.

ÍNDICE

OBJETO	- 1 -
CONTENIDO.....	- 7 -
INTRODUCCIÓN.....	- 11 -
1. ANÁLISIS AMBIENTAL: MARCO LEGISLATIVO.....	- 13 -
2. RETOS Y TENDENCIAS EN EL ANÁLISIS AMBIENTAL	- 23 -
2.1. Aspectos generales.....	- 23 -
2.2. Muestreo ambiental.....	- 25 -
2.3. Preparación de muestras ambientales.....	- 30 -
2.3.1. Muestras acuosas.....	- 30 -
2.3.1.1. Extracción en fase sólida	- 30 -
2.3.1.2. Disolventes supramoleculares	- 46 -
2.3.2. Muestras sólidas ambientales y biológicas	- 62 -
2.3.2.1. Técnicas asistidas por energías auxiliares.....	- 62 -
2.3.2.2. Dispersión de la matriz en fase sólida.....	- 64 -
2.3.2.3. Microextracción en fase sólida.....	- 66 -
2.3.2.4. Disolventes supramoleculares	- 67 -
2.3.3. Compuestos volátiles y semivolátiles.....	- 71 -
2.4. Técnicas de separación y detección	- 75 -
2.4.1. Cromatografía de gases/espectrometría de masas.	- 75 -
2.4.2. Cromatografía de líquidos/espectrometría de masas.	- 76 -
2.4.3. Electroforesis capilar.....	- 79 -
PARTE I: SISTEMAS SUPRAMOLECULARES PARA LA SIMPLIFICACIÓN DE OPERACIONES PREVIAS EN LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EN MUESTRAS ACUOSAS	- 81 -
OBJETO	- 83 -
CAPÍTULO 1: Stability of benzalkonium surfactants on hemimicelles- based solid-phase extraction cartridges.....	- 85 -
CAPÍTULO 2: Extraction and stability of pesticide multiresidue from natural water on a mixed-mode admicellar sorbent.....	- 102 -

CAPÍTULO 3: Use of coacervates for the on-site extraction/preservation of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzalkonium surfactants - 125 -

PARTE II: NUEVAS METODOLOGÍAS PARA EL ANÁLISIS DE SUSTANCIAS PERFLUOROALQUILADAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS - 145 -

OBJETO..... - 147 -

CAPÍTULO 4: Analysis of perfluorinated compounds in biota by microextraction with tetrahydrofuran and liquid chromatography/ion isolation-based ion trap mass spectrometry - 150 -

CAPÍTULO 5: A simple and rapid extraction method for sensitive determination of perfluoroalkyl substances in blood serum suitable for exposure evaluation - 177 -

RESUMEN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS - 203 -

1. INTRODUCCIÓN - 205 -

2. SISTEMAS SUPRAMOLECULARES PARA LA SIMPLIFICACIÓN DE OPERACIONES PREVIAS EN LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EN MUESTRAS ACUOSAS..... - 207 -

2.1. Muestras y analitos - 208 -

2.2. Extracción y concentración de los analitos - 215 -

2.2.1. Síntesis y características de los sistemas supramoleculares empleados - 216 -

2.2.2. Extracción y preconcentración - 219 -

2.3. Estabilización de los contaminantes en muestras acuosas - 223 -

2.3.1. Estabilización en adsorbentes hemimicelares/admicelares .. - 224 -

2.3.2. Estabilización en disolventes supramoleculares - 230 -

2.4. Cuantificación - 233 -

3. DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS PERFLUOROALQUILADAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS. ... - 238 -

3.1. Muestras y analitos - 240 -

3.2. Extracción de los analitos - 243 -

3.2.1. Síntesis y características de los sistemas extractantes empleados - 244 -

3.2.2.	Extracción y preconcentración	- 247 -
3.3.	Cuantificación.....	- 255 -
3.3.1.	Sensibilidad	- 257 -
3.3.2.	Selectividad	- 260 -
3.3.3.	Control de la contaminación	- 263 -
3.3.4.	Veracidad.....	- 264 -
3.3.5.	Precisión	- 265 -
3.3.6.	Análisis de muestras.....	- 266 -
CONCLUSIONES		- 269 -
APÉNDICES		- 275 -

OBJETO

El estudio de la calidad de ecosistemas naturales y contaminados requiere el análisis de un número elevado de muestras para la obtención de resultados representativos dada la gran variabilidad espacial y temporal con la que se distribuyen los contaminantes. Por otro lado, los contaminantes están presentes a muy baja concentración en los sistemas acuáticos lo que exige la recogida de volúmenes elevados de muestra para el análisis y plantea serios problemas de estabilidad. Por tanto, un aspecto clave en campañas de monitorización es disponer de estrategias que simplifiquen e integren los procesos de toma de muestra, transporte, conservación y tratamiento de la misma. Entre las estrategias que se han propuesto, el uso de extracción en fase sólida *on site* ha adquirido gran aceptación, dado los requerimientos mínimos exigidos para el transporte, y en muchos casos para la conservación de las muestras. Es interesante por tanto investigar el uso de nuevas fases adsorbentes para extracción en fase sólida, así como desarrollar nuevos medios de estabilización, con el fin de ampliar su aplicación al mayor número posible de contaminantes y tipos de muestras y mejorar las prestaciones de los sistemas propuestos hasta la fecha.

El objeto genérico de las investigaciones que se presentan en la Memoria de esta Tesis Doctoral se centra en el desarrollo de nuevos métodos basados en el empleo de agregados supramoleculares que integren y/o simplifiquen las operaciones de toma de muestra, extracción, limpieza, preconcentración, transporte y conservación de contaminantes ambientales, prioritarios y emergentes, en matrices acuosas y biológicas. Los agregados objeto de estudio han sido adsorbentes supramoleculares como nuevas fases adsorbentes para extracción en fase sólida y disolventes supramoleculares como nuevos sistemas de extracción líquido-líquido. Estos agregados, independientemente del estado en el que se encuentran, presentan un conjunto de características comunes de gran relevancia para los procesos de extracción:

- a) Los agregados que constituyen los materiales supramoleculares tienen estructura tridimensional y presentan regiones de diferente polaridad que muestran una excelente capacidad de extracción para una gran variedad de compuestos orgánicos, dado los múltiples enlaces que pueden establecerse entre los solutos y el extractante
- b) Las propiedades de los agregados pueden modificarse variando el grupo polar o la cadena hidrocarbonada lo que les confiere una gran versatilidad
- c) La síntesis de las estructuras tridimensionales que conforman los agregados se produce de forma espontánea y, por lo tanto, está al alcance de cualquier laboratorio
- d) Presentan baja volatilidad e inflamabilidad, lo que hace que los procesos de extracción sean menos contaminantes y más seguros. Se adaptan a los principios de la Química verde
- e) Proporcionan microambientes que evitan la degradación de los analitos.
- f) Se adaptan a los formatos convencionales y miniaturizados de extracción

Constituyen por tanto una alternativa interesante a los disolventes orgánicos y a los adsorbentes convencionales y la investigación que se desarrollará en esta Memoria pretende ampliar su aplicación en análisis ambiental. Con esta premisa, los objetivos específicos de los trabajos de investigación realizados han sido:

- 1) Evaluar la capacidad de los sistemas supramoleculares para la simplificación de las operaciones previas en la determinación de contaminantes orgánicos prioritarios en muestras acuosas
- 2) Desarrollar nuevas metodologías basadas en sistemas supramoleculares para la determinación de contaminantes emergentes en muestras biológicas

Paralelamente, la formación de la doctoranda mediante el desarrollo de actividades complementarias a la labor investigadora, como la publicación de artículos científicos y la asistencia y presentación de comunicaciones a congresos, constituye un objetivo fundamental en el desarrollo de esta Tesis.

CONTENIDO

El contenido de la Memoria de esta Tesis Doctoral se ha estructurado en dos partes, precedidas de una Introducción en la que se desarrolla el marco legislativo y los retos y tendencias del análisis ambiental. En esta introducción se profundiza en aspectos teóricos y prácticos relacionados con los adsorbentes y disolventes supramoleculares tales como tipos de agregados, formación, mecanismos de solubilización, modos de operación y aplicaciones en procesos de extracción.

Los contenidos de las dos partes en las que se ha dividido esta Memoria son los siguientes:

PARTE I: Sistemas supramoleculares para la simplificación de las operaciones previas en la determinación de contaminantes en muestras acuosas. En este bloque se presentan en tres capítulos los resultados obtenidos en las investigaciones realizadas para evaluar la capacidad de los sistemas supramoleculares para simplificar las operaciones previas en procesos analíticos. En los dos primeros capítulos se desarrollan dos metodologías para la extracción/preconcentración y estabilización de tensioactivos de benzalconio y plaguicidas. Con este fin, se emplean hemimicelas de dodecilsulfato y admicelas mixtas de dodecilsulfato y tetrabutilamonio sobre alúmina como adsorbentes para la extracción en fase sólida de estos contaminantes en muestras de agua naturales (fluviales y subterráneas) y residuales. En el tercer capítulo se proponen los disolventes supramoleculares de micelas acuosas de ácido dodecanosulfónico para extraer/preconcentrar y estabilizar los tensioactivos de benzalconio e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en aguas residuales y fluviales. Los estudios de estabilidad de los analitos en los diferentes adsorbentes y disolventes investigados se realizaron en distintas condiciones de temperatura, iluminación y acidez durante un periodo de tres meses. Las metodologías desarrolladas permiten la determinación de los contaminantes prioritarios seleccionados al nivel exigido por la legislación vigente.

PARTE II: Nuevas metodologías para el análisis de sustancias perfluoroalquiladas en muestras biológicas. Tras explicar brevemente el objeto

de esta parte de la Tesis, se presentan en dos capítulos los resultados de las investigaciones llevadas a cabo. Se desarrollan dos nuevas metodologías para el análisis de un grupo de contaminantes emergentes; las sustancias perfluoroalquiladas (PFASs). Estas sustancias son tensioactivos que se han usado sin interrupción desde los años 50 pero su detección en el medio ambiente no se inició hasta principios de la pasada década. Aunque ha habido muchos progresos en su análisis, aún se siguen demandando nuevos métodos que proporcionen mayor sensibilidad y selectividad. En el capítulo cuatro, se propone la extracción de las PFASs en un intervalo amplio de polaridad usando una mezcla de THF:agua en la que las PFASs forman agregados inversos. Esta metodología se aplica al análisis de muestras de distintos tejidos (hígado y músculo) de pescados y aves marinas. El último método desarrollado se basa en la extracción/preconcentración de estos analitos en muestras de suero sanguíneo mediante una microextracción con disolvente supramolecular de micelas inversas de ácido hexanoico en tetrahidrofurano-agua. Este disolvente se describe por vez primera en esta Memoria. Se incluye por tanto el estudio de su composición en función de la concentración de los componentes en el medio en el que se produce el autoensamblaje de los mismos y cómo afecta la composición a la eficiencia de la extracción de las PFASs. Las dos metodologías desarrolladas permiten la determinación de los contaminantes al nivel recomendado para evaluar la exposición humana a los mismos.

A continuación, se incluye en la Memoria una sección donde se discuten de forma global los resultados de esta Tesis, destacando las aportaciones más relevantes e innovadoras y por último se presentan las conclusiones obtenidas de los trabajos de investigación realizados.

Finalmente se incluyen los siguientes anexos: (A) artículos de investigación publicados en revistas internacionales derivados de las investigaciones realizadas dentro del contexto de la Tesis, (B) comunicaciones realizadas a Congresos nacionales e internacionales.

INTRODUCCIÓN

1. ANÁLISIS AMBIENTAL: MARCO LEGISLATIVO

La continua entrada, a través de vertidos de aguas residuales, de contaminantes orgánicos derivados de productos de cuidado personal, productos farmacéuticos y productos químicos industriales en los ríos y arroyos es un motivo de preocupación evidente para las autoridades comunitarias [1]. Además, no solo se contaminan las aguas superficiales, sino que suelos, biota y aguas potables subterráneas están igualmente expuestos y los efectos potencialmente tóxicos y sus consecuencias a largo plazo son desconocidos para muchos de estos productos. Por tanto, para la evaluación y control de la calidad ecológica de las zonas húmedas resulta imprescindible el estudio tanto de la matriz agua o los sedimentos cubiertos por ésta como de la biota que los habita.

Si nos centramos en la herramienta legislativa vigente para el control de la contaminación en materia de aguas, Europa se rige por la Directiva 2000/60/CE, también denominada Directiva Marco del Agua (DMA) [2]. Esta se caracteriza por presentar una visión global y un marco de acción local, y especificar las medidas a tomar para conseguir la protección integrada del agua y la calidad química y ecológica de la misma, mediante la reducción progresiva de la contaminación existente y, en el caso de las denominadas sustancias peligrosas prioritarias, mediante el cese o la progresiva eliminación de vertidos, emisiones y fugas. Esta Directiva también resaltó dos ámbitos en que era necesaria una normativa más específica: las aguas subterráneas y las sustancias prioritarias.

Las sustancias que esta directiva establece como de interés prioritario en el agua (33 en total) se encuentran actualmente recogidas en una lista

[1] The state of our river: EU-wide survey results. (Disponible en: <http://ec.europa.eu/environment/integration/research/newsalert/pdf/139na4.pdf>).

[2] DO L 327 de 22.12.2000, p. 1 Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.

dinámica (Directiva 2008/105/CE) que se revisa cada cuatro años [3]. Estas listas contienen una variedad de compuestos orgánicos, inorgánicos y metales considerados peligrosos para la salud humana y/o del medio ambiente. Muchos de estos compuestos, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, los plaguicidas y la mayor parte de los metales, han sido objeto de estudio y regulación durante décadas. Otros, por el contrario, han sido incluidos en las listas de sustancias prioritarias recientemente. Este es el caso, por ejemplo, de los alquilfenoles (productos de degradación de detergentes de tipo alquilfenol etoxilado), de los difeniléteres bromados (utilizados fundamentalmente como retardantes de llama) o los ftalatos, considerados hasta hace poco como contaminantes emergentes. Los contaminantes emergentes son contaminantes previamente desconocidos o no reconocidos como tales, cuya presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva pero si la preocupación por las posible consecuencias de la misma [4,5]. Por lo tanto suelen estar poco o nada investigados, hay escasez o ausencia de datos ambientales y faltan métodos analíticos adecuados para su determinación, lo cual dificulta su estudio en las campañas de monitorización ambiental. Entre estos contaminantes emergentes actualmente destacan los fármacos, las hormonas, compuestos alteradores endocrinos (EDCs) como el bisfenol A, el ácido de perfluorooctano sulfonato (PFOS) y otros compuestos perfluorados, nanomateriales, productos derivados de la desinfección de aguas potables y piscinas, productos de degradación de pesticidas, el perclorato, ciertas toxinas de algas, filtros ultravioleta, benzotriazoles, dioxano, arsénico, metil tert-butil éter y ácidos nafténicos.

Como complemento a la DMA se adoptó la Directiva 2006/118/CE, de 12 de diciembre de 2006, relativa a la protección de las aguas subterráneas

[3] DO L 348 de 24.12.2008, p. 84. Directiva 2008/105/CE del parlamento europeo y del consejo de 16 de diciembre de 2008 relativas a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican y derogan ulteriormente las Directivas 82/176/ CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE y 86/280/CEE del Consejo, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE.

[4] S.D. Richardson, Anal. Chem. 80 (2008) 4373.

[5] L.D. Barceló, M.J. López de Alda, Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. (Disponible en: www.unizar.es/fnca/variopanel/15.pdf)

contra la contaminación y el deterioro [6] y se ha propuesto otra relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE, en la que se definen concentraciones máximas admisibles y medias anuales para las sustancias consideradas como prioritarias y otros contaminantes en aguas superficiales y biota [3].

En aplicación del artículo 5 de la DMA, los Estados miembros tenían de plazo hasta diciembre de 2004 para elaborar un análisis de las características particulares de cada distrito hidrográfico, un estudio de la incidencia de la actividad humana sobre las aguas, un análisis económico de su uso y un registro de las zonas que necesitan una protección especial, utilizando ante todo la información existente. Por lo general, casi todos los Estados miembros dedicaron considerables esfuerzos a este primer análisis, creando una base de información que nunca había existido a escala comunitaria. Los resultados mostraron que porcentajes elevados de masas de agua corrían el riesgo de no alcanzar los objetivos previstos, los cuales estaban claramente vinculados a zonas y regiones densamente pobladas en las que se hacía un uso intensivo y a menudo no sostenible del agua.

Sobre la base de esta primera fase (2002-2004), distintas cuencas hidrográficas piloto participaron en la segunda fase (2005-2006) relativa a la estrategia común para la implementación de la DMA. Para ello cada distrito hidrográfico trabajó en distintas tareas y actividades clasificadas en grupos de trabajo (estado ecológico, gestión de las cuencas hidrológicas, aguas subterráneas, informes y sustancias prioritarias) y mantuvieron un intercambio de información constante. El objetivo era que los casos de estudio realizados sirvieran de ejemplo y facilitaran la implementación de la DMA en los Estados miembros, especialmente para el establecimiento de las redes de monitorización y la redacción de los planes de gestión de cuenca.

[6] DO L 372 de 27.12.2006, p.19 Directiva 2006/118/CE del parlamento europeo y del consejo de 12 de diciembre de 2006 relativa a la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación y el deterioro.

En 2007 la Comisión Europea llevó a cabo un estudio para determinar el estado de los ríos y arroyos de la Unión Europea [7]. Se recogieron numerosas muestras de agua, concretamente en 122 puntos de muestreo de más de 100 puntos hidrográficos de toda Europa, y se enviaron a analizar a un centro de investigación asociado a la Comisión Europea. Gracias a estos análisis se identificaron un número importante de contaminantes y pudo realizarse una estadística sobre las mayores emisiones y frecuencia de aparición en los diferentes ríos. Sólo el 10 % de los ríos estudiados pudieron clasificarse como muy limpios en términos de contaminación química y se puso de relieve la necesidad de incrementar las medidas para frenar el deterioro de los ríos europeos. El estudio también destacó la necesidad de anticipar los problemas ambientales derivados de la utilización de productos químicos en Europa.

Las tareas de implantación continuaron con la entrada en vigor de los planes hidrológicos en enero de 2010, los cuales son el eje principal de la aplicación de la DMA, en la medida en que constituye la principal herramienta de gestión. Estos planes deben haber sido específicamente diseñados para cada demarcación hidrográfica y llevan asociados programas de medidas que incluyen todas las medidas necesarias para lograr los objetivos medioambientales. Actualmente, algunos Estados miembros llevan un considerable retraso en la puesta en marcha de los planes hidrológicos ya que las consultas de participación públicas están todavía en curso o no han comenzado aún (caso de las cuencas hidrográficas en España) o los planes no han sido todavía establecidos. Antes de que acabe 2012 los Estados miembros deben enviar un informe intermedio a la Comisión europea sobre el grado de aplicación del programa de medidas y para finales de 2015 se prevé conseguir un buen estado de las aguas europeas. Los planes hidrológicos y programas de medidas serán revisados cada 6 años y si fuera necesario se actualizarán o elaborarán nuevos planes en 2015, 2021, etc. siendo 2027 la fecha tope para la consecución de los objetivos planteados.

[7] V. Naddeo, T. Zarra, V. Belgiorno, Environ. Sci. Policy, 10 (2007) 243.

En relación con el uso de las sustancias químicas en Europa, hasta hace poco, la legislación europea relativa a los productos químicos era un mosaico de distintas normativas y reglamentos, y no se disponía de suficiente información para evaluar y controlar las sustancias químicas de forma eficaz. La nueva política europea REACH [8], cuyas siglas en inglés corresponden a “registro, evaluación y autorización de sustancias químicas”, entró en vigor el 1 de junio de 2007 y creó un sistema normativo único para el tratamiento de las sustancias químicas. Este sistema pretende acabar con las carencias informativas que existían hasta la fecha, y hace recaer sobre la industria una mayor responsabilidad sobre la gestión del riesgo de los productos químicos y la información en materia de seguridad que se debe proporcionar a los usuarios profesionales. Todas las empresas que fabrican o importan al menos 1 tonelada de sustancias químicas al año deben registrarlos en la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos (ECHA), y presentar información sobre sus propiedades, usos y los medios para manipularlos de forma segura. Además, los productores e importadores tienen que transmitir la información sobre seguridad pertinente a todos los que utilicen las sustancias en el transcurso de su actividad industrial o profesional. De este modo se garantiza que se sepa cómo utilizarlas sin riesgo para los trabajadores, los consumidores y el medio ambiente. La ECHA, con sede en Helsinki, se encarga de gestionar el día a día de los procesos de registro, evaluación, autorización y restricción de sustancias químicas. Las empresas necesitarán autorización para poder utilizar sustancias químicas que provocan cáncer, mutaciones o problemas en el sistema reproductivo, o que se acumulan en nuestro organismo y en el entorno y estas no se concederán si la empresa en cuestión no demuestra un adecuado control de los riesgos. El objetivo final de esta política es fomentar la sustitución progresiva y definitiva de las sustancias más peligrosas por una alternativa más

[8] DO L 369 de 30.12.2006, p.1 Reglamento (EC) n° 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 18 de Diciembre de 2006 relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se deroga el Reglamento (CEE) n°793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) n° 1488/94 de la Comisión así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 9/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión.

segura y cabe la posibilidad de que se impongan restricciones o prohibiciones sobre la producción, introducción en el mercado o uso de determinadas sustancias que planteen riesgos inaceptables para la salud o el medio ambiente.

Por otro lado, la política sobre seguridad alimentaria en la Unión Europea fue reformada en 2002 volviéndose mucho más rigurosa con el objetivo de proteger la salud y los intereses de los consumidores, al tiempo que garantiza el buen funcionamiento del mercado interior. El reglamento CE nº178/2002 revisó los principios generales de legislación alimentaria y los procedimientos relativos a la seguridad de los alimentos, que se aplican igualmente a piensos. Los controles y el seguimiento se efectúan a lo largo de toda la cadena alimentaria adaptándose al enfoque <<de la granja a la mesa>>. Este mismo acto legislativo crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA); organismo europeo cuya misión consiste en emitir dictámenes y prestar apoyo científico y técnico en todos los ámbitos que tienen un impacto sobre la seguridad alimentaria. Para lograr estos objetivos, la Unión Europea establece y vela por el cumplimiento de unas normas de control en materia de higiene de los productos alimenticios [9], de salud y bienestar de los animales [10], de fitosanidad [11] y de prevención de los riesgos de contaminación por sustancias externas [12]. De este modo, la Unión regula el uso de algunas sustancias químicas específicas, como las que se utilizan en agricultura [13,14] o en

[9] Higiene de los productos alimenticios. (Disponible en: http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/veterinary_checks_and_food_hygiene/f84001_es.htm).

[10] Bienestar de los animales. (Disponible en: http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/animal_welfare/index_es.htm).

[11] Controles fitosanitarios. (Disponible en: http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/plant_health_checks/index_es.htm).

[12] Contaminación y factores medioambientales. (Disponible en: http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/contamination_environmental_factors/index_es.htm).

[13] DO L 375 de 31.12.1991, p.1 Directiva 91/676/CEE del Consejo, de 12 de diciembre de 1991, relativa a la protección de las aguas contra la contaminación producida por nitratos utilizados en la agricultura.

[14] Estrategia temática sobre la utilización sostenible de los plaguicidas. (Disponible en: http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/contamination_environmental_factor_s/l28178_es.htm

determinadas técnicas de producción o transformación de alimentos [15]. Además, se han adoptado medidas para limitar la contaminación a causa de la polución del agua o el aire [16] o por exposición a la radiactividad [17] y se controlan también los riesgos de contaminación por organismos modificados genéticamente [18] y por envases alimentarios [19].

Así, la Unión Europea regula los contenidos de contaminantes aceptados en los alimentos y los mantiene en los niveles más bajos posibles mediante el Reglamento (CEE) nº 315/93 [20]. Un Estado miembro puede adoptar medidas más rigurosas respecto del presente Reglamento cuando sospeche que la presencia de un contaminante puede representar un peligro para la salud humana. En ese caso, dicho Estado miembro informa de ello a los otros Estados miembros y a la Comisión, que adoptará las medidas adecuadas en colaboración con el Comité Permanente de la Cadena Alimentaria y de Sanidad Animal. Además, este Comité asiste a la Comisión en todas las cuestiones relativas a los contaminantes, incluida la fijación de las tolerancias máximas. El presente reglamento no se aplica a los contaminantes que sean objeto de una normativa más específica. Por ejemplo, el Reglamento (CE) nº

[15] DO L 141 de 6.6.2009, p. 3 Directiva 2009/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de abril de 2009, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre los disolventes de extracción utilizados en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes.

[16] DO L 209 de 31.7.2006, p. 1 Decisión 2006/507/CE del Consejo, de 14 de octubre de 2004, relativa a la celebración, en nombre la Comunidad Europea, del Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes.

[17] DO L 371 de 30.12.1987, p. 11 Reglamento (Euratom) nº 3954/87 del Consejo de 22 de diciembre de 1987 por el que se establecen tolerancias máximas de contaminación radiactiva de los productos alimenticios y los piensos tras un accidente nuclear o cualquier otro caso de emergencia radiológica.

[18] DO L 268 de 18.10.2003, p. 1 Reglamento (CE) nº1829/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre alimentos y piensos modificados genéticamente.

[19] DO L 338 de 13.11.2004, p. 4 Reglamento (CE) nº 1935/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de octubre de 2004, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos y por el que se derogan las Directivas 80/590/CEE y 89/109/CEE.

[20] DO L 37 de 13.2.1993, p. 1 Reglamento (CEE) nº 315/93 del Consejo, de 8 de febrero de 1993, por el que se establecen procedimientos comunitarios en relación con los contaminantes presentes en los productos alimenticios.

1881/2006 [21] fija para una serie de alimentos, los contenidos máximos admisibles de nitratos, micotoxinas, metales, dioxinas e hidrocarburos aromáticos policíclicos y reduce estos valores para lactantes y niños de corta edad con el fin de proteger la salud de ese grupo vulnerable. El muestreo y análisis para el control oficial de los contenidos máximos especificados debe efectuarse de conformidad con los reglamentos (CE) nº 1882/2006 [22], (CE) nº 401/2006 [23], (CE) nº 1883/2006 [24] y (CE) nº 333/2007 [25] de la comisión y los productos alimenticios enumerados en los anexos no se comercializarán cuando contengan uno de los contaminantes enumerados en el mismo en una cantidad que supere el contenido máximo establecido.

En relación con estas normas, también se encuentra la Directiva 96/23/CE [26] relativa a las medidas de control para buscar residuos clasificados en dos grupos: por un lado, las sustancias con efecto anabolizante y sustancias no autorizadas, y por otro lado, los medicamentos veterinarios y contaminantes en productos animales. Otra normativa relacionada con la contaminación por

[21] DO L 364 de 20.12.2006, p. 5 Reglamento (CE) nº 1881/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.

[22] DO L 364 de 20.12.2006, p. 25 Reglamento (CE) nº 1882/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006, por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de nitratos en ciertos productos alimenticios.

[23] DO L 70 de 9.3.2006, p. 12 Reglamento (CE) nº 401/2006 de la Comisión, de 23 de febrero de 2006, por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios.

[24] DO L 364 de 20.12.2006, p. 32 Reglamento (CE) nº 1883/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006, por el que se establecen métodos de muestreo y de análisis para el control oficial de los niveles de dioxinas y PCB similares a las dioxinas en determinados productos alimenticios.

[25] DO L 88 de 29.3.2007, p. 29 Reglamento (CE) nº 333/2007 de la Comisión, de 28 de marzo de 2007, por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los niveles de plomo, cadmio, mercurio, estaño inorgánico, 3-MCPD y benzo(a)pireno en los productos alimenticios.

[26] DO L 125 de 23.5.1996, p. 10 Directiva 96/23/CE del Consejo, de 29 de abril de 1996, relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE.

sustancias de efecto hormonal es la Directiva 96/22/CE [27] la cual tiene por objeto regular la utilización de determinadas sustancias de efecto hormonal y tireostático y sustancias beta-agonistas en la cría de ganado para proteger a los consumidores y preservar la calidad de los alimentos de origen animal. Esta Directiva se ha modificado mediante las Directivas 2003/74/CE y 2008/97/CE por las que se prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal y tireostático y sustancias β -agonistas en la cría de ganado. Los límites máximos de residuos para las sustancias farmacológicamente activas en productos de origen animal están establecidos en el Reglamento CE nº 37/2010.

La contaminación por plaguicidas en productos destinados a alimentación humana o animal también tiene un reglamento específico, el Reglamento (CE) nº 396/2005 [28], donde se recogen los límites máximos de residuos de plaguicidas (LMR) en su composición. Dichos LMR comprenden, por una parte, LMR específicos para ciertos alimentos destinados a las personas o los animales y, por otra, un límite general aplicable cuando no se haya fijado ningún LMR. El contenido máximo de residuos de plaguicidas en los alimentos se sitúa en $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$. Este límite general es aplicable «por defecto», es decir, en todos los casos en que no se haya fijado un LMR de forma específica para un producto o un tipo de producto. Por primera vez existe un límite común a escala europea para todos los tipos de plaguicidas, sin hacer distinciones entre las categorías de alimentos. Mediante programas plurianuales comunitarios y nacionales actualizados cada año, los Estados miembros realizan controles de los residuos de plaguicidas para verificar el cumplimiento de los LMR.

Como complemento a toda esta estricta legislación, en Europa existe una herramienta clave empleada para reaccionar con rapidez ante los incidentes

[27] DO L 125 de 23.5.1996, p. 3 Directiva 96/22/CE del Consejo, de 29 de abril de 1996, por la que se prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal y tireostático y sustancias β -agonistas en la cría de ganado y por la que se derogan las Directivas 81/602/CEE, 88/146/CEE y 88/299/CEE.

[28] DO L 70 de 16.3.2005, p. 1 Reglamento (CE) nº 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de febrero de 2005, relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo.

registrados en el ámbito de los alimentos y los piensos denominada “RASFF” el sistema de alerta rápida para alimentos y piensos. Los 27 Estados miembros de la UE forman parte del RASFF, junto con la Comisión Europea y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Así, cuando un miembro del RASFF dispone de información sobre un riesgo sanitario grave procedente de alimentos o piensos, debe informar inmediatamente a la Comisión Europea mediante el sistema RASFF que a su vez informa sin demora al resto de miembros con la finalidad de adoptar las acciones apropiadas. Existen cuatro tipos diferentes de notificación dependiendo de la gravedad: las notificaciones de alerta se mandan en el caso de que estén a la venta alimentos o piensos que presenten un grave riesgo y deban emprenderse acciones de forma rápida; las notificaciones de información se usan en la misma situación, pero cuando los otros miembros no deben adoptar medidas de forma rápida porque el producto no se encuentra en el mercado o el riesgo no se considera grave; el rechazo en frontera afecta a las remesas de alimentos y piensos que se han examinado y rechazado en las fronteras exteriores de la UE al detectarse un riesgo sanitario, y por último cualquier información relacionada con la seguridad de los alimentos y los piensos que no se haya comunicado como una notificación de alerta o de información, pero que las autoridades de control hayan considerado interesante se transmite a los miembros bajo el epígrafe de noticias. A continuación, según el tipo de notificación los miembros del RASFF emprenden acciones e informan de inmediato a la Comisión de las medidas adoptadas, entre las que puede incluirse la retirada de un producto del mercado para proteger la salud de los consumidores. Durante 2010, un total de 3.358 notificaciones fueron tramitadas a través de la RASFF, de las cuales 1.806 fueron dentro del territorio de la UE y 1.552 fueron notificaciones en frontera de alimentos procedentes de países fuera de la UE. La mayoría de las notificaciones fueron debidas a micotoxinas (principalmente aflatoxinas en frutos secos, semillas y verduras), seguidas de microorganismos entre los que destaca *salmonella sp*, residuos de pesticidas en frutas y verduras, presencia de anisaki y

mercurio en pescado, cereales modificados genéticamente, migración de cromo desde los recipientes a diferentes alimentos, biotoxinas marinas y dioxinas [29].

2. RETOS Y TENDENCIAS EN EL ANÁLISIS AMBIENTAL

2.1. Aspectos generales

Aunque los objetivos para los que se analizan los diferentes compartimentos ambientales (aire, agua, suelo, biota, etc.) son muy variados, en líneas generales puede considerarse que los resultados obtenidos estarán destinados a controlar o caracterizar la calidad de los mismos. Los programas de control de calidad tienen como objetivo conocer la concentración de uno o más contaminantes para dilucidar, a través de los resultados, si es necesaria o no una acción correctiva de la calidad del compartimento [30,31]. Es frecuente que se requiera determinar si existen áreas localizadas de contaminación dentro de un objeto (“hot spot”) con el fin de diseñar la recuperación del mismo. El objetivo final es determinar si se cumple con la legislación vigente y para ello los métodos analíticos correspondientes deben alcanzar los niveles de sensibilidad y exactitud adecuados para ofrecer una respuesta inequívoca.

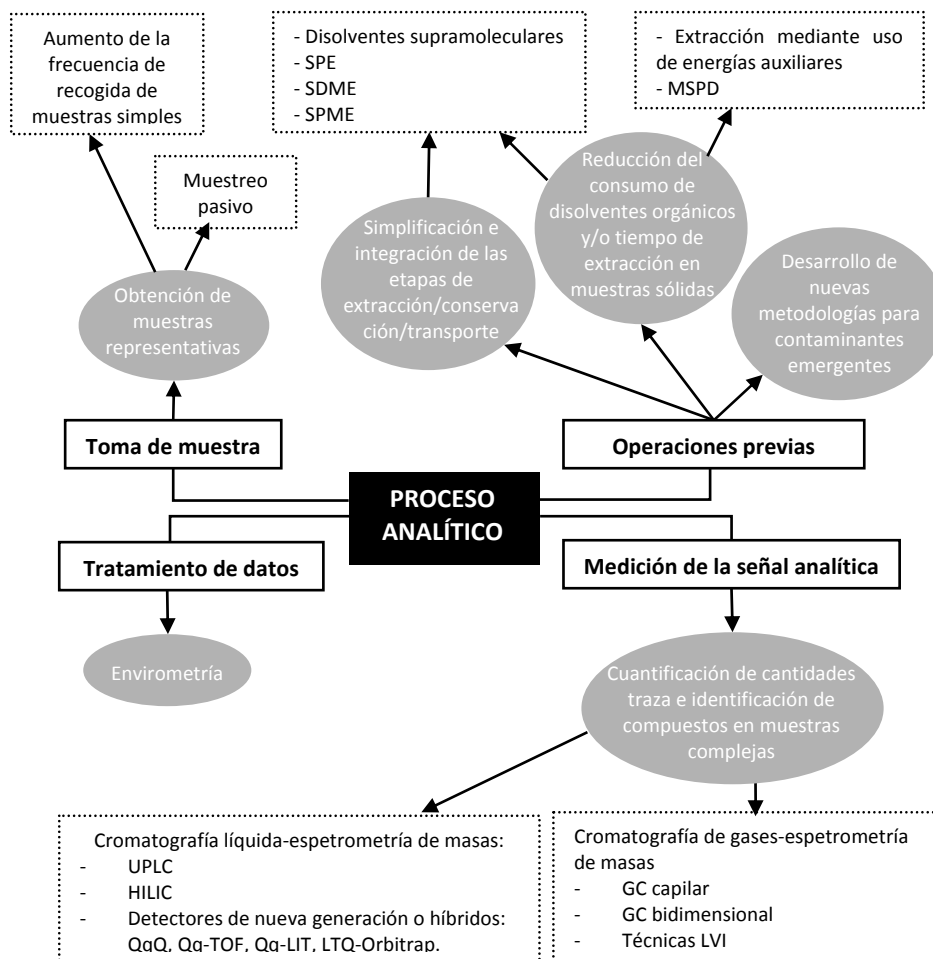
Otro de los objetivos esenciales es establecer la distribución, concentración, comportamiento y destino de los contaminantes emergentes en los diferentes compartimentos ambientales. Por lo general, no existen métodos analíticos adecuados para esta finalidad y se requiere un elevado nivel de

[29] The Rapid Alert System for Food and Feed. Annual Report 2010. (Disponible en: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/docs/rasff_annual_report_2010_en.pdf).

[30] D. Pérez-Bendito, S. Rubio en: Environmental analytical chemistry, Elsevier, Amsterdam, 1999.

[31] E. Andreu Moliner, A. Camacho González en: Recomendaciones para la toma de muestras de agua, biota y sedimentos en humedales Ramsar, Dirección General de Conservación de la Naturaleza (DGCN), Secretaria General de Medio Ambiente, Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, 2002.

sensibilidad y selectividad para determinar con exactitud las bajas concentraciones generalmente presentes.



SPE: Extracción en fase sólida; SDME: Microextracción en una gota; SPME: Microextracción en fase sólida, MSPD: Dispersión de la matriz en fase sólida; UPLC: Cromatografía líquida de ultrapresión; HILIC: Cromatografía líquida de interacción hidrofílica; QqQ: Triple cuadrupolo, Qq-TOF: Cuadrupolo-tiempo de vuelo; Qq-LIT: Cuadrupolo-trampas lineales; LTQ-Orbitrap: Trampa iónica lineal-Orbitrap; Técnicas LVI: Técnicas de gran volumen de inyección.

Figura 1. Esquema de los retos y estrategias desarrolladas en análisis ambiental.

El desarrollo de métodos en análisis ambiental se enfrenta a importantes retos en cada una de las etapas que constituyen el proceso analítico. En la Figura 1 se muestran estas etapas, algunos de los retos implicados y las estrategias que se han desarrollado hasta la fecha para su solución.

2.2. Muestreo ambiental

En relación a la toma de muestra, los dos problemas esenciales continúan siendo cómo obtener muestras representativas en sistemas afectados por elevada variabilidad espacial y temporal e identificar la fracción de contaminante que debe utilizarse para la evaluación de riesgos [32- 34].

La recogida de muestras simples o puntuales continúa siendo la estrategia de muestreo más popular, validada y legalmente aceptada de todos los métodos de muestreo ambiental desarrollados [32,35]. Sin embargo, estas muestras sólo representan a un punto concreto del sistema en un momento determinado y para obtener representatividad debe aumentarse la frecuencia de muestreo lo que encarece el proceso, en algunos casos de forma prohibitiva [36]. El uso de muestreadores automáticos que colectan muestras compuestas a lo largo de un periodo de tiempo variable (minutos-horas-días) es apropiado para evaluar la calidad media de sistemas ambientales cuya composición presenta elevada variabilidad temporal, ya que se reduce de forma considerable el número de muestras a analizar. En todo caso, la evaluación de sistemas muy dinámicos tales como los sistemas acuáticos requerirá de un número elevado de

[32] USEPA Handbook for sampling and sample preservation of water and wastewater. EPA-600/4-83-039. Cincinnati, 1982.

[33] D. Barceló, M. C. Hennion en: Techniques and instrumentation in analytical chemistry vol. 19: Trace determination of pesticides and their degradation products in water, Elsevier, Amsterdam, 2003, Chapter 2, p. 95.

[34] A. Hildebrandt, S. Lacorte, D. Barceló, Anal. Bioanal. Chem. 386 (2006) 1075.

[35] L.H. Keith en: Principles of environmental sampling, American Chemical Society, Washington DC, 1996.

[36] V. Naddeo, T. Zarra, V. Belgiorno, Environ. Sci. Policy 10 (2007) 243.

muestras, además de las muestras blanco, los duplicados, las submuestras y muestras con adiciones conocidas de contaminantes necesarias para el control y la garantía de la calidad, las cuales hay que conservar, transportar y almacenar adecuadamente para finalmente analizarlas. Al objeto de reducir el esfuerzo y coste implicado en el transporte y almacenamiento de relativamente altos volúmenes de muestras acuosas ambientales durante campañas de monitorización se han desarrollado estrategias que integran las etapas de extracción, conservación y transporte de los contaminantes de interés.

Simplificación e integración de operaciones previas

No cabe duda de que hoy en día la técnica de extracción en fase sólida (SPE) es la estrategia más aceptada para la preparación de muestras acuosas [37]. Esta técnica permite la extracción/preconcentración y conservación simultánea de los compuestos en una sola etapa. Por lo tanto, el empleo de SPE en campo evita tener que transportar y almacenar grandes volúmenes de muestras acuosas con la ventaja añadida de que los compuestos permanecen estabilizados en cartuchos de pequeño tamaño. Además, debido al poco volumen que ocupan, los cartuchos pueden mantenerse fácilmente a bajas temperaturas durante largos periodos de tiempos antes de su determinación. Su portabilidad, fácil uso y potencial para estabilizar los analitos hacen que SPE sea una técnica atractiva para simplificar e integrar las operaciones previas del proceso analítico.

Se han propuesto diferentes formatos (discos o cartuchos) de SPE para la extracción, preconcentración y estabilización de contaminantes orgánicos. En bibliografía pueden encontrarse numerosas publicaciones donde se demuestra la utilidad de esta técnica para la determinación de hidrocarburos [38], fenoles [39], tensioactivos [40], colorantes [41,42] y antibióticos [43], pero sin duda los

[37] C.J. Koester, Anal. Chem. 77 (2005) 3737.

[38] D.R. Green, D. Le Pape, Anal. Chem. 59 (1987) 699.

[39] M. Castillo, D. Puig, D. Barceló, J. Chromatogr. A 778 (1997) 301.

[40] M. Petrović, D. Barceló, Fresenius' J. Anal. Chem. 368 (2000) 676.

[41] M.C. Alonso, D. Barceló, J. Chromatogr. A 889 (2000) 2231.

analitos más investigados han sido los plaguicidas [44-56] ya que la estructura de éstos se diseñan para que su persistencia en el ambiente sea mínima, por lo que se degradan rápidamente y son necesarias metodologías que aseguren la preservación de las muestras hasta el momento de su análisis. Los materiales adsorbentes empleados como relleno para la simultánea extracción, preconcentración y conservación de los compuestos comprenden fases convencionales de sílice modificada con cadenas de octadecil (C_{18}), negro de carbón grafitizado (GCB), copolímeros de poliestireno y divinilbenceno y otras fases un poco más recientes como copolímeros de divinilbenceno y N-vinilpirrolidona. Respecto a las condiciones de conservación de los cartuchos de SPE, la luz y la temperatura son factores clave, y como regla general puede decirse que los analitos son estabilizados en los cartuchos durante mayores periodos de tiempo (que pueden ir desde semanas a meses dependiendo de las características de los diferentes compuestos) cuanto más baja es la temperatura de almacenamiento, independientemente de la naturaleza de la fase sorbente.

-
- [42] M.C. Alonso Barceló, *Analyst* 127 (2002) 472.
[43] E. Turiel, A. Martín-Esteban, G. Bordin, A.R. Rodriguez, *Anal. Bioanal. Chem.* 380 (2004) 123.
[44] A. Di Corcia, M. Marchetti, *J. Chromatogr. A* 541 (1991) 365.
[45] S.A. Senseman, T.L. Lavy, J.D. Mattice, B.M. Myers, B.W. Skulman, *Environ. Sci. Technol.* 27 (1993) 516.
[46] D. Barceló, S. Chiron, S. Lacorte, E. Martínez, J.S. Salau, M.C. Hennion, *Trends Anal. Chem.* 13 (1993) 352.
[47] W.G. Johnson, T.L. Lavy, J.A. Senseman, *J. Environ. Qual.* 23 (1994) 1027.
[48] C. Crezenci, A. Di Corcia, M.D. Madbouly, R. Samperi, *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 2185.
[49] S. Lacorte, N. Ehresmann, D. Barceló, *Sci. Technol.* 29 (1995) 2841.
[50] E. Martinez, D. Barceló, *Chromatographia* 42 (1996) 72.
[51] I. Ferrer, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 161.
[52] I. Liška, K. Bíliková, *J. Chromatogr. A* 795 (1998) 61.
[53] C. Aguilar, I. Ferrer, F. Borrul, R.M. Marce, D. Barceló, *Anal. Chim. Acta* 386 (1999) 237.
[54] J. Deplagne, J. Vial, V. Pichon, B. Lalere, G. Hervouet, M-C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 1123 (2006) 31.
[55] J.M. Cobb, J.D. Mattice, S.A. Senseman, J.A. Dumas, W. Mersie, M.B. Riley, T.C. Mueller, E. B. Watson, *J. AOAC Int.* 89 (2006) 903.
[56] T.L. Potter, M.A. Mohamed, H. Ali, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 204.

Los sistemas supramoleculares también son útiles para la mejora e integración de las operaciones previas del proceso analítico. Así, se ha demostrado que los medios micelares constituidos por tensioactivos iónicos (cetilpiridinio cloruro, dodecilsulfato sódico y ácido dodecilsulfónico) y no iónicos (Tritón X-114 y Brij-35) son útiles para evitar la degradación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en disoluciones acuosas y su adsorción sobre la superficie del contenedor [57-59]. También se ha demostrado que algunos colorantes naturales [60] y fungicidas [61] mejoran su estabilidad en disoluciones acuosas mediante el uso de micelas normales de SDS y Triton X-114, respectivamente. La ventaja añadida de estos procedimientos es que además de estabilizar los compuestos durante el transporte y almacenamiento, los medios micelares permiten la extracción y preconcentración de los analitos mediante el fenómeno de la coacervación o mejoran los factores de preconcentración de SPE al evitar la dilución de las muestras con disolventes orgánicos.

La capacidad que presentan los sistemas supramoleculares para estabilizar los compuestos que solubilizan o encapsulan ha hecho que sean ampliamente utilizados en muy diferentes áreas. Por ejemplo, la incorporación de las ciclodextrinas en los procesos de fabricación de una amplia variedad de productos se ha hecho muy común en los últimos años [62]. Estas macromoléculas tienen la capacidad de formar complejos de inclusión que modifican las propiedades de la molécula encapsulada, siendo una de estas propiedades la estabilización de la misma. Las ciclodextrinas se han empleado en numerosas aplicaciones en alimentación, farmacia, medicina, cosmética y

[57] A. López García, E. Blanco González, J.I. García Alonso, A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta* 264 (1992) 241.

[58] C. García Pinto, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, *Anal. Chem.* 66 (1994) 874.

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

[60] N. Mulinacci, A. Romani, P. Pinelli, S. Gallori, C. Giaccherini, F.F. Vinceri, *Int. J. Pharm.* 216 (2001) 23.

[61] R. Carabias Martínez, E. Rodríguez Gonzalo, M.G. García Jiménez, C. García Pinto, J.L. Pérez Pavón, J. Hernández Méndez, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 85.

[62] E.M. Martín Del Valle, *Process Biochem.* 39 (2004) 1033.

algunos procesos químicos. Por ejemplo, los saborizantes son, por lo general, sustancias volátiles que se deterioran rápidamente y que en presencia de ciclodextrinas forman complejos estables que pueden permanecer en estado seco sin degradarse durante largos periodos de tiempo a temperatura ambiente [62,63]. Otros compuestos, como por ejemplo las vitaminas, se destruyen por el calor y gracias a su complejación con ciclodextrinas se estabilizan sin sufrir pérdidas en los procesos de procesamiento térmico [64]. También se han utilizado para mejorar la conservación de diversos alimentos [64,65] y las industrias de cosméticos y aseo personal también las han usado ampliamente para la estabilización de fragancias [66,67], tintes y bronceadores. El principal uso farmacéutico de las ciclodextrinas es aumentar la solubilidad, estabilidad y biodisponibilidad de los principios activos en medicamentos [62]. Con este mismo fin, también se han usado otros sistemas supramoleculares tales como micelas acuosas [68], e inversas [69] y liposomas [68]. Diferentes sistemas coloidales lipídicos [70,71] (como nanocápsulas, nanoemulsiones, nanopartículas sólidas lipídicas, etc.) se han empleado para proteger y estabilizar principios activos de diferente naturaleza química. Por último, se han usado micelas inversas y microemulsiones [72] para solubilizar enzimas (principalmente lipasas) y aumentar su estabilidad.

Otra estrategia que está ganando considerable interés en los programas de monitorización ambiental es el uso del muestreo pasivo debido a su potencial para afrontar el enorme reto de obtener muestras representativas en los sistemas ambientales, sujetos a elevada variabilidad espacial y/o temporal,

[63] S. Muñoz-Botella, B. del Castillo, M.A. Martín, *Ars Pharm.* 36 (1995) 187.

[64] L. Szente, J. Szejtli, *Trends Food Sci. Technol.* 15 (2004) 137.

[65] K. Takeshita, T. Urata, Antimicrobial food preservatives containing cyclodextrin inclusion complexes. Japanese Patent JP 29, 054 (2001).

[66] R.A. Hedges, *Chem. Rev.* 98 (1998) 2035.

[67] S. Tatsuya, Stabilization of fragrance in bathing preparations, Japanese Patent 11, 209, 787 (1999).

[68] G. Bonacucina, M. Cespi, M. Misici-Falzi, G.F. Palmieri, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 1.

[69] H. Sah, *Biomed. Chromatogr.* 20 (2006) 1142.

[70] M. García-Fuentes, D. Torres, M.J. Alonso, *Int. J. Pharm.* 296 (2005) 122.

[71] M. Rawat, D. Singh, S. Saraf, S. Saraf, *Yakugaku Zasshi* 182 (2008) 269.

[72] C.M.L. Carvalho, J.M.S. Cabral, *Biochimie* 82 (2000) 1063.

de una manera efectiva, robusta y de bajo coste [73]. Los muestreadores pasivos fueron diseñados inicialmente para compuestos gaseosos en aire, área donde han ganado una importante aceptación por parte de la industria y las autoridades legislativas [74,75]. Sin embargo, el uso de muestreadores pasivos para muestreo acuoso está todavía limitado al ámbito de la investigación. Si se considera el potencial de esta tecnología, el limitado uso que actualmente presenta puede atribuirse probablemente a su relativamente temprano estadio de desarrollo y a la falta de información sobre esta técnica por parte de fabricantes y científicos [76]. En los últimos años, el muestreo pasivo en matrices sólidas tales como suelos y sedimentos se está convirtiendo en un área de investigación muy activa.

2.3. Preparación de muestras ambientales

La preparación de muestras continúa siendo una etapa clave en el análisis ambiental. La tendencia en esta área es el desarrollo de métodos más rápidos, económicos y respetuosos con el medio ambiente y por tanto se ha dedicado mucho esfuerzo a la sustitución y/o eliminación de los disolventes orgánicos y al desarrollo de estrategias automáticas aplicables universalmente.

2.3.1. Muestras acuosas

2.3.1.1. Extracción en fase sólida

[73] A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, Anal. Chem. 83 (2011) 4579.

[74] S. Seethapathy, T. Gorecki, X. Li, J. Chromatogr. A 1184 (2008) 234.

[75] H.J. McDermott (Ed.) en: Air monitoring for toxic exposures, Wiley-Interscience, New Jersey, 2004, parte II, capítulo 6.

[76] A. Kot-Wasik, B. Zabiegała, M. Urbanowicz, E. Dominiak, A. Wasik, J. Namiesnik, Anal. Chim. Acta 602 (2007) 141.

Como se comentó anteriormente, la extracción en fase sólida es la técnica más popular y establecida para el tratamiento de muestras acuosas ambientales. Recientes desarrollos en esta área son los relacionados con el uso de nuevos materiales adsorbentes por ejemplo, polímeros de impresión molecular (MIPs), nanotubos de carbono (CNTs), hemimicelas/admicelas, etc. con potencial para mejorar la eficacia de extracción y extender la aplicabilidad de SPE. Por otro lado, los materiales sorbentes que permiten la retención de compuestos en un amplio intervalo de polaridad continúan utilizándose ampliamente, por ejemplo los copolímeros de divinilbenceno/N-vinilpirrodilona y aquellos que permiten establecer mecanismos mixtos de interacción.

A continuación se describen las principales características de estos adsorbentes con especial énfasis en hemimicelas/admicelas que serán los sistemas utilizados en las investigaciones llevadas a cabo en esta Memoria.

- Copolímeros de divinilbenceno/N-vinilpirrolidona (patentados por Waters, nombre comercial, OASIS HLB). Su elevada área superficial ($800 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$) y la presencia en el polímero del grupo pirrolidona, que es un aceptor de hidrógeno, mejora notablemente la retención de compuestos polares, mientras que el polímero divinilbenceno permite la retención eficaz de los compuestos hidrófobos. El adsorbente es estable en un amplio intervalo de pH (1-14) y aunque inicialmente se aplicó principalmente en el campo de la bioanalítica hoy en día es muy utilizado en el análisis de contaminantes en muestras acuosas ambientales [77-80].

- Adsorbentes que proporcionan mecanismos de retención mixto. Existen diferentes tipos de estos sorbentes pero pueden clasificarse en tres grandes grupos. El primero está constituido por sorbentes de sílice funcionalizada al que se enlazan cadenas alquilo (C4, C8 y C18) y grupos cambiadores de iones (ej.

[77] X. Chen, R.X. Hao, N. Yao, Prog. Environ. Sci. Technol. 1 (2007) 377.

[78] G. Gervais, S. Brosillon, A. Laplanche, C. Helen, J. Chromatogr. A 1202 (2008) 163.

[79] A. Arditoglou, D. Voutsas, Environ. Sci. Pollut. Res. 15 (2008) 228.

[80] E. Gracia-Lor, J.V. Sancho, F. Hernandez, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 622.

Isolute HCX, HCX-3, HCX-5, HCX-Q y HAX), el segundo grupo lo forman sorbentes poliméricos modificados químicamente a los que se le introducen grupos funcionales de intercambio iónico (ej. Oasis MCX, MAX, WCX y WAX) y el tercer grupo está constituido por una mezcla de sorbentes sílice-C8 o C18 y polímeros altamente entrecruzados de poliestireno divinilbenceno (ej. Isolute C8/Env+, C18/Env+). El doble mecanismo de retención de estos adsorbentes permite la elución secuencial de las interferencias de la matriz y proporciona extractos fácilmente analizables por LC/MS [81].

- Los polímeros de impresión molecular (MIPs) se obtienen mediante el ensamblaje de una matriz polimérica alrededor de un analito o molécula diana, de manera que se crea una huella del analito. Una vez obtenido el polímero es posible extraer el compuesto quedando así huecos libres con “memoria” selectiva que reconocerán de forma específica nuevas moléculas del contaminante molde. Así los MIPs tienen una selectividad predeterminada para un analito dado o grupo de compuestos relacionados estructuralmente. Aunque muchos estudios tratan el desarrollo de MIPs para analitos diana individuales, el desarrollo de MIPs para la extracción de grupos de compuestos análogos estructuralmente es una tendencia en esta área. Para este propósito, el molde tiene que ser cuidadosamente seleccionado para producir las cavidades capaces de presentar afinidad por el grupo completo. La afinidad y selectividad del sitio de unión por el analito es muchas veces comparable a la desarrollada por los anticuerpos. La extracción en fase sólida de contaminantes mediante MIPs ha sido revisada con respecto a las moléculas usadas como moldes, las aplicaciones desarrolladas y las ventajas e inconvenientes de su preparación y uso [82-84]. Entre las ventajas de estos materiales destacan la sencillez y rapidez de preparación, la elevada estabilidad química, física y térmica y el bajo coste. Presentan el inconveniente de la incompleta eliminación de las moléculas molde lo que origina problemas de contaminación. Los MIPs se han aplicado

[81] L. Grey, B. Nguyen, P. Yang, *J. Chromatogr. A* 958 (2002) 25.

[82] V. Pichon, F. Chapuis-Hugon, *Anal. Chim. Acta* 27 (2008) 48.

[83] C.Y. He, Y.Y. Long, J.L. Pan, K. Li, F. Liu, *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 133.

[84] F.G. Tamayo, E. Turiel, A. Martín-Esteban, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 32.

ampliamente en el área medioambiental y biológica [84-86]. Varios ejemplos de extracción de estructuras análogas pueden encontrarse en bibliografía por ejemplo, β -bloqueantes en aguas residuales [87], fluoroquinolonas en suelos [88], verde malaquita en peces y alimento para pescado [89], nonilfenol y sus derivados etoxilados en sedimentos y lodos [90], etc.

- Adsorbentes de carbono. Los adsorbentes de carbono inicialmente utilizados eran no porosos con un área superficial muy baja (por ejemplo ENVI-Carb, comercializado por Supelco). Aún así, la retención de analitos polares era superior comparada con la correspondiente en sílice-C18. En la actualidad se investiga extensamente el uso de fullerenos y nanotubos de carbono (CNTs) como adsorbentes para SPE. Ambas formas alotrópicas del carbono presentan una elevada área superficial y se han aplicado hasta la fecha a la extracción de diferentes tipos de compuestos tales como alteradores endocrinos, proteínas, compuestos orgánicos volátiles, iones metálicos, etc. [91,92]. Los CNTs son hojas de grafito enrolladas formando un tubo coaxial. Las hojas de grafito enrolladas una sola vez forman nanotubos monocapa (SWCNTs), mientras que los nanotubos multicapas (MWCNTs) están constituidos por varias hojas de grafito enrolladas. La investigación en esta área se ha centrado en el desarrollo de nuevas aplicaciones y la mejora de las propiedades de los CNTs. Una aplicación interesante en este contexto es el uso de MWCNTs como adsorbentes de SPE para multiextracción de pesticidas en aguas superficiales antes de cromatografía de gases (GC)/MS [93]. Los límites de detección para los pesticidas estudiados (carbofuran, iprobenfos, metil paratión, prometrin, fenitrotion, etil paratión, isocarbofos, fentoato, metidation, endrín, etión,

[85] V. Pichon, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 41.

[86] D. Stevenson, *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 154.

[87] M. Gros, T.M. Pizzolato, M. Petrovic, M.J. López de Alda, D. Barceló, *J. Chromatogr. A*, 1189 (2008) 374.

[88] E. Turiel, A. Martin-Esteban, J.L. Tadeo, *J. Chromatogr. A* 1172 (2007) 97.

[89] Y.H. Li, T. Lang, X.L. Qi, Y. Qiao, A. Deng, *Anal. Chim. Acta* 624 (2008) 317.

[90] L. Nuñez, E. Turiel, A. Martin-Esteban, J.L. Tadeo, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 2492.

[91] K. Pyrzynska, *Anal. Sci.* 23 (2007) 631.

[92] M. Valcárcel, B.M. Simonet, S. Cárdenas, B. Suárez, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1783.

[93] S. Wang, P. Zhao, G. Min, G. Fang, *J. Chromatogr. A* 1165 (2007) 166.

metoxicloro) estuvieron en el intervalo 0,01-0,03 $\mu\text{g L}^{-1}$. Los MWCNTs son también válidos para extraer metales pesados, por ejemplo, Cu (II), Cd (II), Pb (II), Zn (II), Ni (II) y Co (II) antes de su determinación por espectrometría atómica [94]. Los límites de detección para estos iones, extraídos como quelatos con pirrolidina ditiocarbamato amónico, estuvieron en el intervalo 0,30-0,60 $\mu\text{g L}^{-1}$. Estos MWCNTs (300 mg) se usaron en 250 experimentos sin que se observara ninguna pérdida en su capacidad de adsorción.

Muchos autores han intentado mejorar las propiedades de los CNTs a través de un proceso de oxidación. Se sabe que el tratamiento con ácido nítrico incrementa el área superficial y el diámetro de los CNTs modificando las propiedades de adsorción de los SWCNTs. El-Sheikh et al. [95] estudiaron la influencia de la oxidación de los MWCNTs en la extracción de algunos pesticidas modelo (atrazina, propoxur y metidati6n) concluyendo que la oxidaci6n afectaba a la eficacia de extracci6n de los mismos dependiendo de la naturaleza del MWCNTs y del agente oxidante empleado. En los MWCNTs oxidados con per6xido de hidr6geno y persulfato am6nico no se observaron mejoras en las recuperaciones de los pesticidas, mientras que aquellos oxidados con 6cido n6trico mostraron mejor eficiencia de enriquecimiento a pH 5 comparado con los MWCNTs sin oxidar. Los l6mites de detecci6n para propoxur, atrazina y metidati6n fueron 220, 57,5 y 37,5 ng L^{-1} , respectivamente.

- Las hemimicelas y admicelas son adsorbentes constituidos por agregados de tensioactivos i6nicos adsorbidos sobre la superficie de 6xidos minerales. Las hemimicelas consisten en monocapas de tensioactivo en las que el grupo i6nico interacciona electrost6ticamente con la superficie de un 6xido mineral de carga opuesta y las cadenas hidrocarbonadas experimentan fuertes interacciones laterales entre ellas. Se producen estructuras tipo "teepee" en la terminolog6a anglosajona. Las admicelas son agregados tridimensionales de tensioactivo, similares a las micelas en disoluci6n acuosa, adsorbidos sobre la superficie del 6xido mineral. Se forman despu6s de que las hemimicelas hayan neutralizado

[94] M. Tuzen, K.O. Saygi, M. Soylak, J. Hazard. Mater. 152 (2008) 632.

[95] A.H. El-Sheikh, A.A. Insisi, J.A. Sweileh, J. Chromatogr. A 1164 (2007) 25.

completamente la superficie del óxido. Las estructuras de estos agregados moleculares pueden verse en la Figura 2.

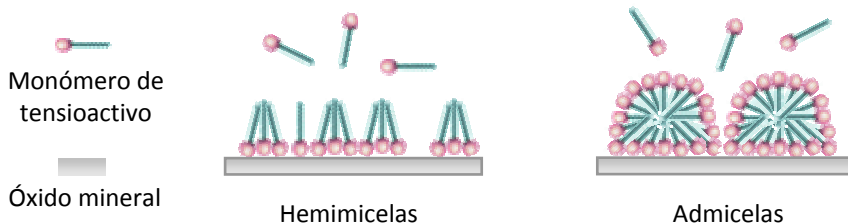


Figura 2. Representación simplificada de hemimicelas y admicelas de tensioactivos.

Estos sistemas poseen características únicas que los hacen muy versátiles como materiales para SPE. Debido al carácter anfílico de los tensioactivos, sus agregados tienen regiones de diferente polaridad donde los analitos de un amplio intervalo de polaridad y carga pueden solubilizarse. Siempre proporcionan mecanismos mixtos de interacción que pueden variarse mediante la selección del grupo polar del tensioactivo (ej. interacciones iónicas, π -catión, puentes de hidrógeno) y la cadena hidrocarbonada (ej. interacciones de dispersión, π - π , etc).

Para poder utilizar este tipo de adsorbentes en SPE es necesario conocer las isothermas de adsorción del correspondiente tensioactivo sobre el óxido adecuado en las condiciones experimentales en las que se va a llevar a cabo la extracción. En general, las isothermas se dividen en cuatro regiones bien diferenciadas cuando se representa, en una escala logarítmica, la cantidad de tensioactivo adsorbido en función de la cantidad de tensioactivo en disolución (Figura 3).

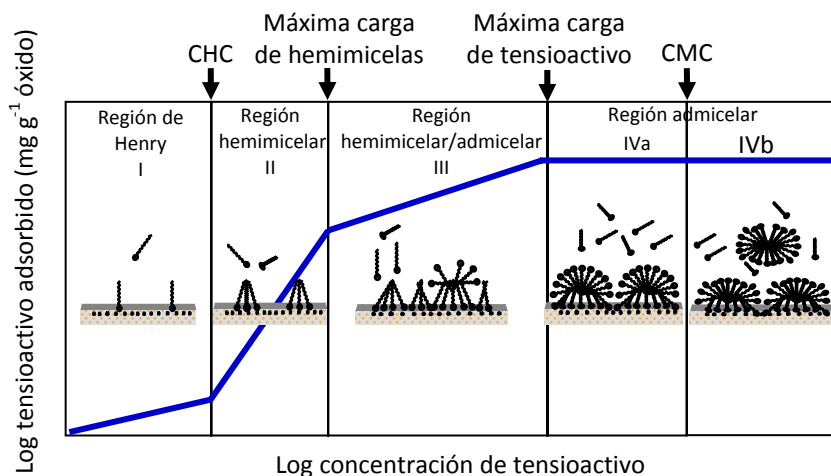


Figura 3. Representación esquemática de una isoterma de adsorción típica de cuatro regiones y estructuras propuestas para los diferentes agregados de tensoactivo formados.

En la región I, denominada región de Henry, el grupo polar de los monómeros de tensoactivo interactúan electrostáticamente con la superficie del óxido mineral. La adsorción de las moléculas de tensoactivo ocurre de forma aislada, sin ningún tipo de interacción entre los monómeros adsorbidos (Figura 3). La formación de hemimicelas se inicia cuando se alcanza la concentración hemimicelar crítica (CHC). La adsorción de tensoactivo en la región hemimicelar se produce por interacciones electrostáticas con la superficie del óxido e interacciones laterales entre las cadenas hidrocarbonadas produciendo una monocapa con estructuras de agregación típicas (Figura 3), denominadas “teepee”. La región III comienza cuando se produce la saturación de los centros activos del óxido por el tensoactivo adsorbido. En esta región, la adsorción del tensoactivo se debe exclusivamente a las interacciones hidrófobas entre las cadenas hidrocarbonadas produciéndose agregados denominados admicelas. Una vez alcanzada la carga máxima de tensoactivo sobre el óxido mineral, la adición de más tensoactivo al sistema producirá el aumento de la concentración del mismo en disolución hasta alcanzar la concentración micelar crítica (CMC), a partir de la cual se forman micelas en

disolución. Algunos de los sistemas óxido mineral-tensioactivo cuyas isothermas son similares a la descrita [96] están constituidos por agregados de dodecil sulfonato sódico, alquilbenceno sulfonato, dodecil sulfato sódico o 4-C₁₁ paraxileno sulfonato sobre alúmina; agregados de cloruro de tetradecilpiridinio, bromuro de tetradecil piridinio o bromuro de dodecil piridinio sobre gel de sílice; agregados de Igepal Co-660 sobre sílice pirogénica; y agregados de cloruro de dodecil piridinio o p-3 nonilbenceno sulfonato sódico sobre rutilo.

La formación de hemimicelas y admicelas sobre la superficie de un óxido mineral está influenciada fundamentalmente por el pH y la longitud de la cadena hidrocarbonada de la molécula de tensioactivo. El pH determina la densidad de carga superficial del óxido mineral y por tanto la cantidad de tensioactivo que puede adsorberse. Los óxidos minerales más usados, alúmina y sílice, tienen punto de carga cero (pcz) a valores de pH alrededor de 9 y 3, respectivamente. Por tanto, la alúmina se usa a valores de pH ácidos para la adsorción de tensioactivos aniónicos y la sílice a valores de pH neutros o ligeramente básicos para la adsorción de tensioactivos catiónicos. Con relación a la cadena hidrocarbonada, cuanto mayor es su longitud, más hidrófoba es la molécula y mayor es su facilidad para formar agregados, con la consiguiente disminución de la CHC o CMC. Un incremento de un grupo -CH₂- en la cadena hidrocarbonada del tensioactivo produce una disminución de la CMC y CHC de tres veces (regla de Traube) [97].

Mecanismos de adsolubilización de los analitos

El fenómeno de adsolubilización de compuestos orgánicos sobre hemimicelas y admicelas presenta un gran potencial para extracción en fase sólida. Los agregados de tensioactivos poseen estructura tridimensional con diferentes microambientes donde analitos de muy diversa polaridad y carga pueden solubilizarse. Las interacciones que pueden ofrecer son muy variadas dependiendo de las características del grupo polar del tensioactivo y del tipo de

[96] S. Paria, K.C. Khilar, Adv. Colloid Interfac. 110 (2004) 75.

[97] A. Fan, P. Somasundaran, N.J. Turro, Langmuir 13 (1997) 506.

agregado seleccionado. En la figura 4 se muestra el tipo de interacciones que pueden darse dependiendo de la región de la isoterma donde nos encontremos.

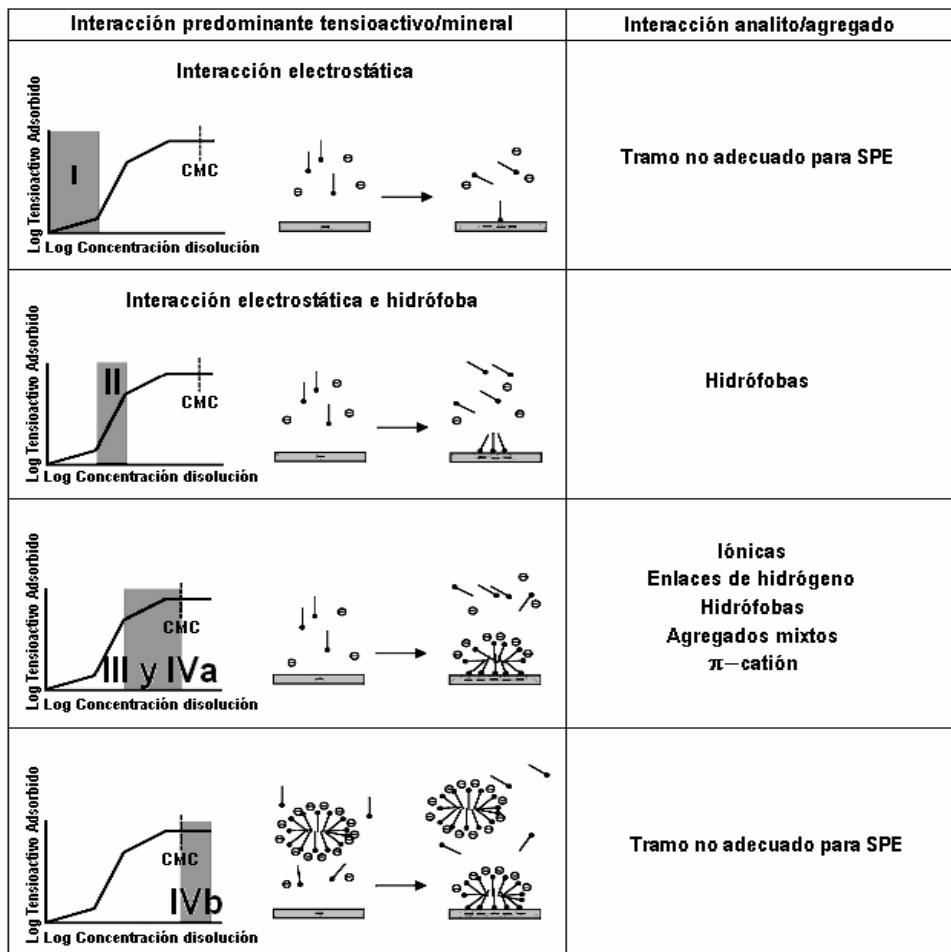


Figura 4. Mecanismo de adsorción del tensioactivo sobre el óxido mineral y de adsolubilización de solutos sobre los agregados formados en las distintas regiones de la isoterma de adsorción.

De las cuatro regiones en las que se divide una isoterma, no todas son adecuadas para su utilización en SPE. Las regiones que pueden utilizarse son

aquellas en las que hemimicelas y admicelas están en equilibrio con monómeros en disolución. Así, la región I (Figura 4), donde el mecanismo de adsorción de tensioactivo sobre el óxido mineral se debe a interacciones meramente electrostáticas, no es apta para SPE puesto que no se forma ningún tipo de agregado donde los analitos puedan solubilizarse. En la región hemimicelar (región II, Figura 4) los analitos pueden solubilizarse en el adsorbente mediante interacciones hidrófobas con la cadena hidrocarbonada del tensioactivo. Las regiones III (constituida por hemimicelas y admicelas) y IVa (admicelas) son las que ofrecen mayores posibilidades en SPE puesto que la superficie exterior es polar o iónica y el tipo de interacción puede modificarse mediante selección del tensioactivo. En estas regiones pueden adsolubilizarse analitos de muy diferente polaridad, ya que pueden producirse enlaces por puente de hidrógeno, interacciones iónicas, de Van der Waals o π -catión y formación de agregados mixtos (cuando los analitos presentan carácter anfifílico). Así, se podría lograr la retención simultánea de analitos con muy diferente polaridad, siendo esta característica muy importante en monitorización medioambiental. Cuando la concentración de tensioactivo en disolución alcanza la CMC, región IVb, (Figura 4), comienzan a formarse micelas y en este caso la retención de los analitos sobre el adsorbente no es cuantitativa ya que éstos se distribuyen entre el adsorbente y las micelas en disolución. Por consiguiente, esta región de la isoterma tampoco es apta para SPE.

Modo de operación

Un aspecto importante a considerar cuando se trabaja con hemimicelas y/o admicelas como adsorbente en SPE es que la adsorción del tensioactivo sobre el óxido mineral es un proceso dinámico, por lo que estos agregados se encuentran en equilibrio con moléculas de tensioactivo en disolución. Por tanto, durante la percolación de la muestra a través del adsorbente se producirá una pérdida progresiva de tensioactivo, lo cual modificará la cantidad y/o características de la fase adsorbente usada. Si se trabaja en la región hemimicelar, la concentración en disolución es del orden de $\mu\text{g L}^{-1}$ y la pérdida de tensioactivo durante la percolación de la muestra es despreciable, no

necesitándose hacer un aporte adicional de tensioactivo a la muestra. Sin embargo, la concentración de tensioactivo en disolución en las regiones donde se producen admicelas es del orden de mg L^{-1} , y por tanto si estos agregados se usan en SPE es fundamental añadir a la muestra la concentración adecuada de tensioactivo, para mantener constante la cantidad de tensioactivo adsorbido.

El modo de operación cuando se trabaja en extracción en fase sólida con hemimicelas/admicelas es similar a la extracción en fase sólida convencional (Figura 5):

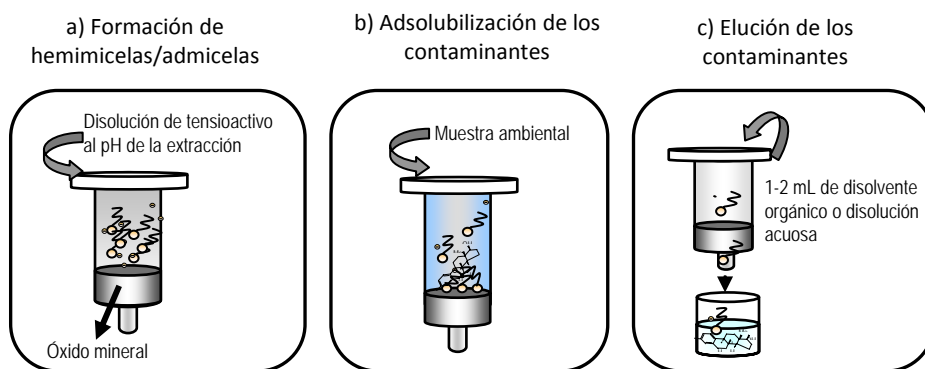


Figura 5. Modo de operación cuando se usan hemimicelas y/o admicelas como adsorbente en SPE.

a) En primer lugar se procede a la formación de hemimicela y/o admicelas pasando una disolución del tensioactivo seleccionado, al pH al que se llevará a cabo la extracción, a través del óxido mineral.

b) A continuación se procede a la percolación de la muestra de manera que se produce la adsolubilización de los analitos (retención). Hay que tener presente el tipo de agregado con el que se trabaja, pues según se acaba de mencionar, si se trabaja en la zona admicelar hay que añadir a la muestra la concentración

adecuada de tensioactivo, para mantener constante la cantidad adsorbida del mismo.

c) Finalmente, los analitos se eluyen con 1-2 mL de disolvente orgánico o disoluciones acuosas a un valor de pH adecuado para romper las interacciones tensioactivo-óxido mineral.

Aplicaciones

Inicialmente los adsorbentes hemimicelares/admicelares se aplicaron a la extracción de metales pesados presentes en muestras acuosas mediante la formación de complejos con agentes quelatantes, previamente solubilizados sobre el agregado [98-101] o bien mediante formación de un quelato en disolución acuosa y posterior adsolubilización [98,99,101,102].

Hasta hace pocos años, las hemimicelas/admicelas no comenzaron a utilizarse para la extracción/preconcentración de compuestos orgánicos previa a su determinación analítica. La presencia de regiones de diferente polaridad en estos agregados supramoleculares hace que tengan una excelente capacidad para solubilizar una gran variedad de compuestos orgánicos. Muchos de los métodos desarrollados han empleado hemimicelas del tensioactivo aniónico dodecil sulfato sódico adsorbido sobre alúmina para la extracción y preconcentración de diferentes compuestos tales como clorofenoles [103,104], alquilfenoles y alquilfenoles carboxilados [105], ftalatos [104,106],

[98] J.L. Manzoori, M.H. Sorouraddin, A.M.H. Shabani, J. Anal. At. Spectrom. 13 (1998) 305.

[99] J.L. Manzoori, M.H. Sorouraddin, A.M.H. Shabani, Microchem. J. 63 (1999) 295.

[100] J.L. Manzoori, M.H. Sorouranddin, F. Semirani, Talanta 42 (1995) 1151.

[101] M. Hirade, J. Iwasawa, H. Tawaguchi, Talanta 44 (1997) 231.

[102] M. Hirade, J. Hori, Anal. Sci. 15 (1999) 1055.

[103] T. Saitoh, Y. Nakayama, M.T. Hiraide, J. Chromatogr. A 972 (2002) 205.

[104] T. Saitoh, Y. Nakayama, M.T. Hiraide, J. Chromatogr. A 1040 (2004) 185.

[105] M. Cantero, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, J. Chromatogr. A 1120 (2006) 271.

[106] F.J. López-Jiménez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Anal. Chim. Acta 551 (2005) 142.

hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) [107] y estrógenos [108] presentes en muestras acuosas ambientales. También se ha propuesto la determinación de clorofenoles en agua de río [109] y PAHs en distintas muestras acuosas [110] usando admicelas de aerosol OT sobre alúmina y de bromuro de dihexadecildimetil amonio sobre sílice, respectivamente. En la mayoría de estas aplicaciones el mecanismo principal de solubilización de los analitos sobre el agregado se debe al establecimiento de interacciones hidrófobas, aunque también pueden darse otro tipo de interacciones (electrostáticas, π -catión, puentes de hidrógeno, etc.) dependiendo de la naturaleza del grupo polar del tensioactivo, pudiéndose seleccionar a priori el adsorbente más adecuado para una aplicación concreta. Así, se ha llevado a cabo la extracción de benzimidazoles [111] y herbicidas de amonio cuaternario “quats” [112] utilizando admicelas de SDS sobre alúmina donde los analitos se retienen mediante interacciones de tipo electrostático o por formación de pares iónicos, respectivamente. En la aplicación relativa a los quats, se propuso por vez primera el acoplamiento on-line de un adsorbente de SPE basado en agregados supramoleculares de tensioactivo a cromatografía de líquidos.

La formación de hemimicelas/admicelas mixtas de tetrabutilamonio (TBA)-SDS adsorbidas sobre alúmina ofrece otro mecanismo de retención de analitos por el establecimiento de interacciones π -catión entre el grupo aromático de éstos y el grupo amonio del tetrabutilamonio. Con esta estrategia se han extraído bisfenoles y multiresiduos de plaguicidas [113,114].

[107] T. Saitoh, S. Matsushima, M. Hiraide, J. Chromatogr. A 1069 (2005) 271.

[108] A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Analyst 131 (2006) 407.

[109] T. Saitoh, S. Matsushima, M. Hiraide, J. Chromatogr. A 1040 (2004) 185.

[110] Q. Zhao, J. Simmons, E.D. Conte, J. Chromatogr. A 1132 (2006) 1.

[111] A. Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Anal. Chim. Acta 569 (2006) 132.

[112] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Anal. Chem. 76 (2004) 3878.

[113] A. Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito J. Chromatogr. A 1100 (2005) 8.

[114] A. Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Anal. Chim. Acta 608 (2008) 61.

Recientemente se han desarrollado métodos en los que el mecanismo de extracción se basa en la formación de agregados mixtos analito-extractante, siendo requisito indispensable el carácter anfifílico del analito por lo que esta metodología ha sido muy aplicada para el análisis de tensioactivos. Hemimicelas del tensioactivo aniónico SDS adsorbidas sobre alúmina o resinas de intercambio aniónico se han empleado para extraer tensioactivos catiónicos [115,116] y no iónicos [117], mientras que hemimicelas de tensioactivos catiónicos (cloruro de cetilpiridinio y bromuro de cetiltrimetilamonio) adsorbidas sobre sílice se han empleado para extraer tensioactivos aniónicos de muestras de agua potable, de río y residuales [118,119].

En los últimos años la investigación sobre hemimicelas/admicelas como sorbentes para SPE ha estado relacionada principalmente con el desarrollo de nuevas aplicaciones [114,119-121] y formatos [122-127] así como estudios teóricos para elucidar y comprender los mecanismos de interacción que gobiernan el proceso de SPE [128].

Li et al [120] propusieron el adsorbente bromuro de octadeciltrimetilamonio adsorbido sobre alúmina para la extracción de

-
- [115] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6799.
[116] J.K. Autry, E.G. Vaught, E.D. Conte, *Microchem. J.* 80 (2005) 25.
[117] M. Cantero, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 161.
[118] L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Analyst* 131 (2006) 835.
[119] X. Zhao, J. Li, Y. Shi, Y. Cai, S. Mou, G. Jiang, *J. Chromatogr. A* 1154 (2007) 52.
[120] J-D. Li, Y-Q. Cai, Y.L. Shi, S.F. Mou, G.B. Jiang, *J. Chromatogr. A* 1139 (2007) 178.
[121] E.M. Costi, I. Goryacheva, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1210 (2008) 1210.
[122] H. Niu, Y. Cai, Y. Shi, F. Wei, S. Mou, G. Jiang, *J. Chromatogr. A* 1172 (2007) 113.
[123] J. Li, X. Zhao, Y. Shi, Y. Cai, S. Mou, G. Jiang, *J. Chromatogr. A* 1180 (2008) 24.
[124] X. Zhao, Y. Shi, T. Wang, Y. Cai, G. Jiang, *J. Chromatogr. A* 1188 (2008) 140.
[125] X. Zhao, Y. Shi, Y. Cai, S. Mou, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 1201.
[126] L. Sun, C. Zhang, L. Chen, J. Liu, H. Jin, H. Xu, L. Diang, *Anal. Chim. Acta* 638 (2009) 162.
[127] A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, *Anal. Chem.* 81 (2009) 9012.
[128] A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 1823.

sulfonamidas (suldiazina, sulfatiazol, sulfapiridina, sulfametazina y sulfametoxazol) en aguas de río y residuales previamente a su detección por cromatografía líquida-detección ultravioleta (LC-UV). Las sulfonamidas se retuvieron cuantitativamente, los factores de preconcentración estuvieron entre 300 y 600 y los límites de detección estuvieron comprendidos entre 0,15 y 0,35 $\mu\text{g L}^{-1}$. Costi et al [121] usaron el sorbente SDS adsorbido sobre alúmina para la extracción cuantitativa de ibuprofeno y naproxeno en aguas residuales. Las drogas formaron agregados mixtos con el tensioactivo y consecuentemente fueron fuertemente retenidas sobre el adsorbente. Los volúmenes de ruptura y límites de detección para el naproxeno e ibuprofeno en las muestras estuvieron alrededor de 0,75 L y 1L y 0,5-0,8 y 7-9 ng L^{-1} , respectivamente. El método se aplicó a la determinación de estas drogas en 3 plantas de tratamiento de aguas residuales del sur de España. Las concentraciones de naproxeno e ibuprofeno estuvieron entre 2,0 y 7,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 0,9 y 3,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ en los influentes y 0,4 y 1,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 0,2 y 0,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ en efluentes, respectivamente.

La capacidad de las hemimicelas/admicelas para proporcionar diferentes mecanismos de retención las hace adsorbentes ideales para los análisis multiresiduo. Esta propiedad fue aprovechada por Moral et al. [114] para la extracción de 17 pesticidas representativos de los diferentes grupos (triazinas, fenilureas, carbamatos, azoles, anilidas, cloroacetanilidas, organofosforados, fenoxiácidos, ácidos ariloxiácidos y fenoles) en aguas de río y subterráneas. El adsorbente seleccionado (hemimicelas/admicelas mixtas de dodecil sulfato sódico y tetrabutilamonio sobre alúmina) proporcionó interacciones hidrofóbicas, iónicas y π -catión que retuvieron fuertemente los pesticidas con diferentes polaridades y acidez (bases, neutros y ácidos). Se obtuvieron límites de detección menores de 100 ng L^{-1} para la determinación de los 17 pesticidas mediante LC-UV.

Con el fin de acelerar la extracción en fase sólida convencional y evitar la percolación de la muestra, varios grupos de investigación han utilizado nanopartículas como soporte sólido para las hemimicelas/admicelas. Niu et al [122] prepararon nanotubos de titanato cubiertos de hemimicelas y admicelas

de bromuro de cetiltrimetilamonio para preconcentrar ésteres de ftalato (di-n-propil-ftalato, di-n-butil-ftalato, di-ciclohexil-ftalato y di-n-octil-ftalato) en muestras acuosas. El método alcanzó límites de detección entre 19 y 39 ng L⁻¹. Li et al [123] propusieron el uso de nanopartículas de Fe₃O₄ como óxido mineral. De este modo, la SPE se lleva a cabo en modo batch y a continuación se separan las nanopartículas utilizando un imán de Nd-Fe-B. El método propuesto se ha usado para la extracción de clorofenoles (2-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-diclorofenol y pentaclorofenol) en muestras acuosas ambientales usando bromuro de cetiltrimetilamonio adsorbido sobre Fe₃O₄. Los elevados factores de preconcentración (700) que se alcanzaron para los analitos resultaron en límites de detección entre 0,11-0,15 µg L⁻¹ usando LC-UV. Ballesteros et al. [127] utilizaron una estrategia parecida empleando nanopartículas magnéticas recubiertas con hemimicelas de tetradecanoato para extraer hidrocarburos aromáticos policíclicos (benzo(*a*)antraceno, criseno, benzo(*b*)fluoranteno, benzo(*k*)fluoranteno, benzo(*a*)pireno, dibenzo(*a,h*)antraceno, benzo(*ghi*)perileno e indeno(*1,2,3-cd*)pireno). La principal ventaja de este adsorbente es el fuerte enlace químico entre las nanopartículas y las hemimicelas que evita la elución de las mismas y por tanto, se producen extractos libres de tensioactivo. La eficiencia de extracción no se influencia por la concentración de sales hasta 1 M y valores de pH comprendidos entre 2,5-9 y el factor de preconcentración alcanzado fue 116. Los límites de cuantificación obtenidos estuvieron comprendidos entre 0,2-0,5 ng L⁻¹ utilizando cromatografía líquida-detección por fluorescencia (LC-FL). El método propuesto se aplicó a la determinación de estos contaminantes en aguas superficiales y subterráneas de varios lugares del sur de España.

Un buen conocimiento de las interacciones entre la matriz y el adsorbente es esencial para prevenir las interferencias y desarrollar métodos SPE eficientes y robustos. García-Prieto et al. [128] estudiaron el efecto de los componentes de la matriz de aguas de río y residuales en la adsorción del dodecilsulfato sódico sobre la alúmina, el cual es el adsorbente hemimicelar/admicelar más usado en SPE, y discutió las consecuencias analíticas de las modificaciones observadas. Se demostró que los electrolitos

competían con las moléculas de tensioactivo por los sitios de carga superficial en la primera parte de la región hemimicelar. Por otro lado se comprobó que los agentes precipitantes producían sales insolubles con el tensioactivo en el adsorbente admicelar y que la materia orgánica no tenía ningún tipo de influencia. A partir de estos resultados, se establecieron reglas simples para prevenir y detectar modificaciones en la adsorción del tensioactivo, inducidas por la matriz de la muestra. Asimismo, con el conocimiento adquirido a partir de estos resultados, es posible conocer, a priori, la idoneidad de un adsorbente para una aplicación específica lo cual debería permitir el desarrollo de métodos más robustos y simples.

2.3.1.2. Disolventes supramoleculares

La búsqueda de alternativas a los disolventes orgánicos tradicionales en las extracciones líquido-líquido ha fomentado el uso de líquidos más respetuosos con el medio ambiente como es el caso de los disolventes supramoleculares (SUPRASs). El interés por aplicar estos disolventes en procesos de extracción y otras técnicas de separación se debe a su versatilidad, principalmente derivada de los diferentes tipos de interacciones que pueden establecer con los analitos, lo que hace que tengan capacidad para solubilizar compuestos en un amplio intervalo de polaridad.

Los disolventes supramoleculares se sintetizan a partir de disoluciones de moléculas anfifílicas mediante procesos de autoensamblaje y coacervación. La IUPAC define la coacervación como un fenómeno que consiste en la separación de sistemas coloidales en dos fases líquidas [129]. A la fase más concentrada en el componente coloidal se le denomina coacervado o disolvente supramolecular, la otra fase tiene muy baja concentración en este componente y se denomina fase en equilibrio.

[129] IUPAC Compendium of chemicals terminology 31 (1972) 611.

A continuación se comentan los aspectos más importantes de los diferentes tipos de disolventes supramoleculares con especial énfasis en los constituidos por micelas normales e inversas y vesículas de tensioactivos aniónicos que serán los sistemas utilizados en las investigaciones llevadas a cabo en esta memoria.

- *Los disolventes supramoleculares constituidos por micelas de tensioactivos no iónicos* han sido los más utilizados en las extracciones analíticas y los que más atención han recibido desde que fueron descritos por Watanabe et al. [130]. Se forman al elevarse la temperatura de las disoluciones acuosas que contienen concentraciones de tensioactivos no iónicos superiores a su concentración micelar crítica (cmc). La temperatura a partir de la cual se produce el fenómeno de coacervación se denomina punto de nube "cloud point" y varía en función de la estructura molecular del tensioactivo y de su concentración en disolución. Esta metodología denominada "cloud point extraction" (CPE) se ha aplicado usando fundamentalmente Triton X-114 para la extracción de sustancias apolares en muestras acuosas ambientales [131-135] y quelatos metálicos [136,137]. CPE continúa siendo una de las técnicas líder para la extracción de metales en agua previa a su determinación por espectrometría de absorción atómica. La aplicación de CPE a la extracción de contaminantes orgánicos ha encontrado más problemas debido a la coelución originada por los tensioactivos no iónicos en cromatografía líquida, ya que éstos sólo están disponibles comercialmente como mezclas de homólogos e isómeros.

[130] H. Ishii, J. Miura, H. Watanabe, *Bunseki Kagaku* 26 (1997) 252

[131] S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Trend Anal. Chem* 22 (2002) 470.

[132] E. Pramauro, A.B. Prevot, *Recent Res. Develop. in Pure & Appl. Anal. Chem.* 1 (1998) 225.

[133] Z. Sosa Ferrera, C. Padrón Sanz, C. Mahugo Santana, J.J. Santana Rodríguez, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 469.

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

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

[136] M. Bezerra, M.A. Arruda, S.L. Ferreira, *Applied Spectrosc. Reviews* 40 (2005) 269.

[137] C.D. Stalikas, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 343.

- *Disolventes supramoleculares constituidos por micelas de tensioactivos anfóteros*. El uso de este tipo de disolventes en procesos de extracción fue propuesta por Saitoh et al. en la década de los 90 [138]. Al contrario que ocurre con los tensioactivos no iónicos, la formación del disolvente supramolecular en disoluciones de tensioactivos anfóteros se produce cuando la temperatura disminuye por debajo de un valor crítico.

- *Disolventes supramoleculares constituidos por micelas de tensioactivos catiónicos*. Las disoluciones de tensioactivos catiónicos experimentan por lo general coacervación en presencia de sales inorgánicas [139], aunque existen casos en los que además de la adición de la sal es necesaria la presencia de un co-tensioactivo para que se produzca el fenómeno de la coacervación. Existen pocas aplicaciones de estos disolventes en procesos de extracción analítica y se limitan a la determinación de compuestos orgánicos en aguas naturales [139,140].

- *Disolventes supramoleculares constituidos por micelas de tensioactivos aniónicos*. Estos disolventes están constituidos por micelas de los tensioactivos alquil sulfatos, alquil sulfonatos, alquilbenceno sulfonatos y alquil sulfosucinatos y se forman en presencia de ácidos a concentraciones 2-3 M [141], siendo su coacervación independiente de la temperatura [142]. Dodecil sulfato y dodecil sulfonato sódico han sido los tensioactivos aniónicos más utilizados en los procesos de extracción analíticas [59, 143-145].

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

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

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

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

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

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

[144] G. Jia, L. Li, J. Qiu, X. Wang, W. Zhu, Y. Sun, Z. Zhou, Spectrochim. Acta 67 (2007) 460.

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

- *Disolventes supramoleculares constituidos por micelas mixtas.* Estos disolventes se obtienen a partir de disoluciones acuosas que contienen mezclas de tensioactivos no iónicos, mezclas de un tensioactivo no iónico y un tensioactivo iónico o mezclas de un tensioactivo catiónico y otro aniónico. El agente inductor de la coacervación es la temperatura y el valor al que se alcanza el cloud point de las disoluciones depende de la mezcla de tensioactivos de cada sistema. Estos disolventes se han usado para extraer y preconcentrar compuestos orgánicos [146-151] y metales [152-157].

- *Disolventes supramoleculares constituidos por micelas inversas de ácidos alquilcarboxílicos.* Los disolventes supramoleculares de micelas inversas se producen al adicionar agua a disoluciones de ácidos carboxílicos entre 6 y 18 átomos de carbono en tetrahidrofurano [158]. Ya que la micela inversa se produce a partir de la forma protonada de los ácidos, el disolvente sólo se forma a valores de pH inferiores a 4 (pK_a R-COOH = 4.8 ± 0.2). Estos disolventes son compatibles con cromatografía líquida seguida de detección UV, FL y espectrometría de masas (MS). Su potencial para la extracción de

[146] R.P. Frankewich, W.L. Hinze, *Anal. Chem.* 66 (1994) 944.

[147] E. Evdokimov, R. von Wandruszka, *Anal. Lett.* 31 (1998) 2289.

[148] E.J. Kim, D.O. Shah, *Langmuir*, 18 (2002) 10105.

[149] J.C.A. de Wuilloud, R.G. Wuilloud, B.B.M. Sadi, J.A. Caruso, *Analyst*, 128 (2003) 453.

[150] B. Delgado, V. Pino, J.H. Ayala, V. González, A.M. Alonso, *Anal. Chim. Acta* 518 (2004) 165.

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

[152] E.K. Paleologos, A.G. Vlessidis, M.I. Karayannis, N.P. Evmiridis, *Anal. Chim. Acta* 477 (2003) 223.

[153] D.L. Giokas, E.K. Paleologos, M.I. Karayannis, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 237.

[154] D.L. Giokas, J. Antelo, E.K. Paleologos, F. Aree, M.I. Karayannis, *J. Environ. Monit.* 4 (2002) 505.

[155] E.K. Paleologos, D.L. Giokas, S.M. Tzouwara-Karayanni, *Anal. Chim. Acta* 458 (2002) 241.

[156] N.N. Meeravali, S.J. Jiang, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 1365.

[157] H. Filik, F. Dondurmacioglu, R. Apak, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 80 (2008) 637.

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

contaminantes orgánicos en un amplio intervalo de polaridad se ha demostrado mediante su aplicación a aguas naturales y residuales [158,159].

- *Disolventes de vesículas de ácidos alquilcarboxílicos.* Estos disolventes se producen en disoluciones acuosas de ácidos alquilcarboxílicos, con longitudes de cadena hidrocarbonada comprendida entre 6 y 18 átomos de carbono, a valores de pH en los cuales los ácidos se encuentran protonados y desprotonados en proporciones equimoleculares [160]. El catión tetrabutilamonio actúa como agente inductor de la coacervación mediante la neutralización de las cargas negativas de las moléculas de alquilcarboxilato en la superficie de la vesícula, lo que facilita las interacciones entre las macromoléculas que originan el disolvente supramolecular. El pH es un factor clave en la formación de estos disolventes y son necesarios valores comprendidos en el intervalo de $pK_{a \text{ (aparente)}} \pm 1$, donde $pK_{a \text{ (aparente)}}$ corresponde al pK_a del ácido cuando está formando parte de la vesícula. El valor de $pK_{a \text{ (aparente)}}$ varía entre 6 y 8,5 para los ácidos alquilcarboxílicos con longitudes de cadena hidrocarbonada entre 8 y 18 átomos de carbono. Los disolventes supramoleculares de vesículas se han empleado para la extracción de distintos contaminantes orgánicos en aguas naturales y residuales [160,161].

La Figura 6 muestra una representación simplificada de las estructuras supramoleculares que componen los disolventes supramoleculares descritos y aplicados a extracciones analíticas por nuestro grupo de investigación, así como fotografías de microscopía óptica de los disolventes supramoleculares de micelas normales y de micelas inversas y una fotografía de microscopía electrónica de transmisión de un disolvente supramolecular de vesículas.

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

[160] F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Anal. Chem. 72 (2006) 7229.

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

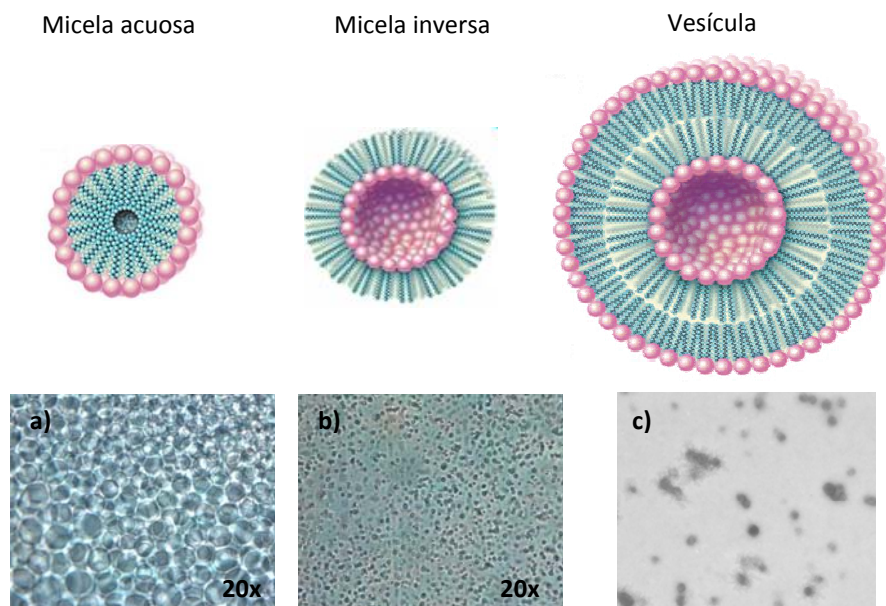


Figura 6. Representación simplificada de diferentes tipos de agregados y fotografías obtenidas para disolventes supramoleculares constituidos por micelas aniónicas de SDS (a), micelas inversas de ácido decanoico (b) y vesículas de ácido decanoico (c) mediante microscopía óptica (a y b) y de microscopía electrónica de transmisión (c).

Existen diferencias morfológicas y estructurales entre los distintos tipos de agregados producidos en disolución las cuales afectan al proceso de extracción. Así, aunque las micelas acuosas e inversas son entidades esféricas con diámetros muy similares (3-60 y 40-80 Å, respectivamente) las primeras se forman en agua y la segundas en disolventes apolares y de baja constante dieléctrica y por tanto, los medios de extracción utilizados son diferentes. El tamaño de las vesículas es considerablemente mayor (300-5000 Å) y como consecuencia el número de moléculas de soluto que pueden solubilizarse en las mismas es superior al que se solubilizan en las micelas. En 2010 se publicó una

revisión sobre aspectos teórico-prácticos relacionados con el uso de diferentes SUPRASs en extracciones analíticas [162].

Diagrama de fases

Para describir el comportamiento de sistemas en equilibrio donde se generan diferentes fases se recurre a los denominados diagramas de fases, que son representaciones gráficas donde se muestra el comportamiento del sistema en función de diferentes variables. Concretamente, en el proceso de coacervación es muy importante determinar los valores relativos (concentraciones, temperatura, etc.) de los componentes del sistema a los que ocurre la separación de fases con objeto de determinar los límites en los que se obtiene el disolvente supramolecular. En la figura 7 se muestran los diagramas de fases de distintos tensioactivos dando lugar a diferentes disolventes supramoleculares. En (a) y (c) se muestran los diagramas de fases a partir de disoluciones acuosas del tensioactivo no iónico (triton X-114) y de un tensioactivo anfótero 3-(nonildimetilamonio) propil sulfato (C_9 -APSO₄) en función de la temperatura. La denominada curva de coexistencia separa dos regiones; en la región L el tensioactivo forma micelas acuosas, mientras en la región L-L coexisten dos fases: el disolvente supramolecular constituido por micelas acuosas de grandes dimensiones y la fase en equilibrio donde el tensioactivo se encuentra en forma monomérica a la concentración micelar crítica. Las disoluciones de micelas aniónicas acuosa constituidas por alquil sulfatos, alquil sulfonatos y alquil sulfosucinatos, que experimentan coacervación inducida por ácidos a temperatura ambiente, presentan diagramas de fases complejos [141,59]. En la Figura 7b se muestra el diagrama de fases de micelas acuosas de dodecano sulfonato sódico (SDSA). En este caso se definen cuatro regiones en las que se observa: una fase líquida homogénea (L), la región de coacervación (L-L), una emulsión (E) y una región constituida por dos fases, una de ellas líquida y la otra sólida (S). La figura 7d muestra el diagrama de fases correspondiente al sistema tetrahidrofurano/ácido decanoico (DA)/agua que da lugar a disolventes supramoleculares de micelas inversas. La región S representa

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

una región heterogénea donde el ácido decanoico permanece insoluble mientras que en la región L-L coexisten el disolvente supramolecular y la fase en equilibrio. A altos porcentajes de tetrahidrofurano se forma una única fase homogénea donde el biotensioactivo forma micelas inversas (región L). Finalmente en la figura 7e puede observarse el comportamiento de fases de mezclas de ácido decanoico/decanoato en relación 1:1 en presencia de tetrabutilamonio bromuro a temperatura ambiente. En la región L mezclas de ácidos carboxílicos protonados y desprotonados en relación 1:1 producen vesículas. La presencia de iones tetrabutilamonio hace que estas vesículas coacerven formándose el disolvente supramolecular en la región L-L. Un exceso de estos iones provocaría mezclas del disolvente supramolecular con precipitados sólidos correspondientes a la región S de la gráfica.

En general, todos los diagramas de fases se modifican en presencia de aditivos tales como sales, disolventes orgánicos, etc. por lo que este hecho debe tenerse en cuenta en los procesos de extracción basados en fenómenos de coacervación. Así la adición de aditivos a una disolución acuosa de Tritón X-100 puede producir un aumento o una disminución de la temperatura del punto de nube y en los tensioactivos anfóteros, por lo general, la adición de una sal provoca un aumento en la temperatura del punto de nube. Los diagramas de fases de tensioactivos iónicos también pueden modificarse por la presencia de aditivos. Por ejemplo, la adición de concentraciones de cloruro sódico superiores a 0,4 M a disoluciones acuosas ácidas (0-3,5 M HCl) de dodecanosulfonato sódico a una concentración del 1% (w/v) provoca la precipitación del tensioactivo.

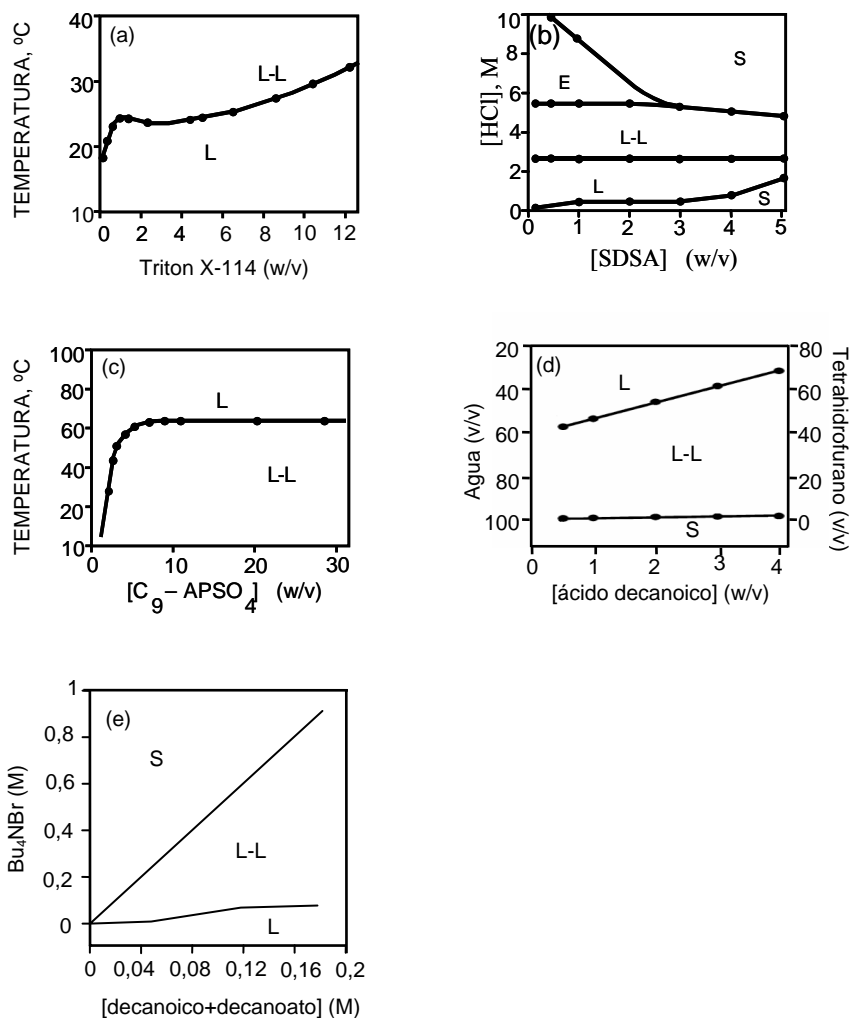


Figura 7. Diagrama de fases de (a) micelas acuosas de Triton X-114, (b) micelas acuosas de dodecanosulfonato sódico, (c) micelas acuosas de 3-(nonildimetilamonio)propil sulfato, (d) micelas inversas de ácido decanoico y (e) vesículas de ácido decanoico/decanoato.

Mecanismos de solubilización y concentración de los analitos

La solubilización de analitos en las macromoléculas que forman el disolvente supramolecular constituye la base de su aplicación en procesos de separación. Teniendo en cuenta que el disolvente supramolecular está formado por agregados tridimensionales de sustancias anfifílicas, éstos presentan diferentes regiones donde se pueden solubilizar analitos de distinta polaridad y carga. Así, los analitos hidrófobos se solubilizarán en la región hidrocarbonada de las macromoléculas que conforman el disolvente supramolecular debido exclusivamente a interacciones hidrófobas mientras que los analitos iónicos y polares se solubilizarán en la región polar a través de diferentes interacciones iónicas, π -catión, enlaces por puentes de hidrógeno, etc. Por otro lado, los solutos con carácter anfifílico formarán agregados mixtos con el disolvente supramolecular mediante interacciones con los grupos polares e hidrófobos de los tensioactivos que los constituyen.

El volumen de disolvente supramolecular obtenido será el que determine el factor de preconcentración teórico en cada caso, mientras que el factor de preconcentración real variará en función de la recuperación obtenida para cada analito concreto.

No existe uniformidad en la bibliografía acerca de la definición del coeficiente de partición o de la constante de equilibrio que puede usarse para representar la solubilización de los componentes de una disolución en sistemas supramoleculares [163]. Para aplicaciones analíticas, uno de los procedimientos más comunes ha sido calcular un coeficiente de distribución (D), que viene dado por la siguiente expresión matemática:

$$D = [A]_d / [A]_{aq}$$

[163] S.D. Christian, J.F. Scamehorn (Eds.) en: Surfactant-Based Separation Processes, Surfactant Science Series 33, Dekker, New York, 1989.

donde $[A]_d$ y $[A]_{aq}$ son las concentraciones, en el disolvente supramolecular y en la fase acuosa, respectivamente.

Modo de operación

El modo de operación cuando se trabaja en extracción líquido-líquido usando disolventes supramoleculares consta de dos etapas:

a) Formación del disolvente supramolecular. En esta etapa el tensioactivo se añade a la muestra a concentraciones por encima de la concentración micelar crítica y se establecen las condiciones de coacervación. En estos casos, la formación del disolvente se lleva a cabo en unos botes de vidrio especialmente diseñados que poseen un cuello estrecho en la parte superior que facilita la posterior medida y recogida del volumen del disolvente supramolecular con los analitos extraídos (Figura 8a).

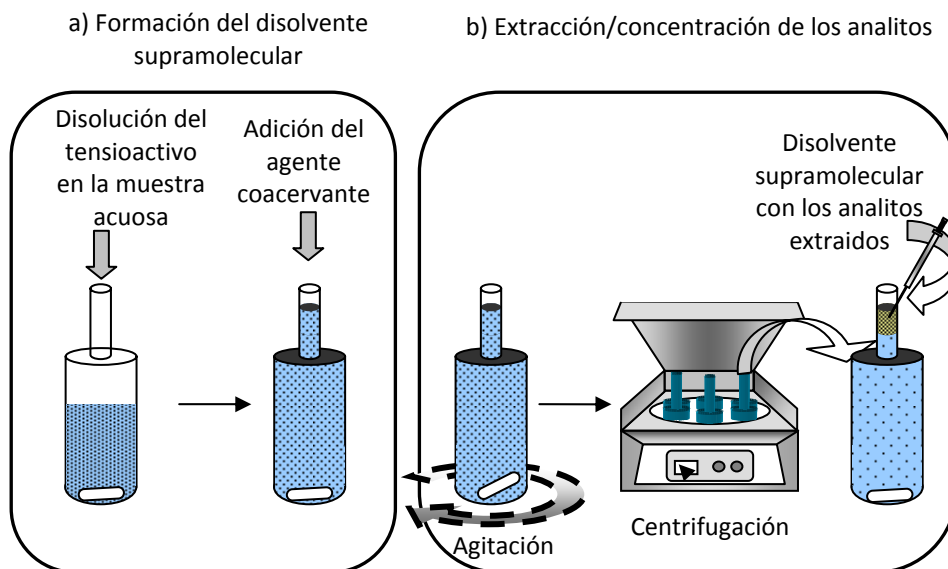


Figura 8. Modo de operación cuando se forma el disolvente supramolecular en presencia de la muestra acuosa.

b) Extracción de los analitos. La mezcla se agita durante un determinado tiempo con objeto de favorecer la transferencia del analito o analitos al disolvente supramolecular y a continuación se centrifuga para acelerar la separación de las fases. Los analitos extraídos generalmente se determinan mediante la inyección de una alícuota de disolvente supramolecular en un cromatógrafo de líquidos (Figura 8b).

Asimismo, los disolventes supramoleculares pueden usarse en el formato de microextracción en una gota [161]. Concretamente, se ha descrito el uso de gotas de 10-30 μL de SUPRAS constituido por vesículas de decanoico/decanoato a la extracción de clorofenoles en muestras acuosas ambientales. Las muestras se agitaron mediante una varilla magnética para favorecer la transferencia de los analitos al disolvente supramolecular y una vez alcanzado el tiempo de extracción, las gotas se recogieron en la microjeringa y se inyectaron directamente en un cromatógrafo de líquidos (Figura 9). La dinámica de este tipo de microextracción se ajusta a la ecuación general de extracción líquido-líquido.

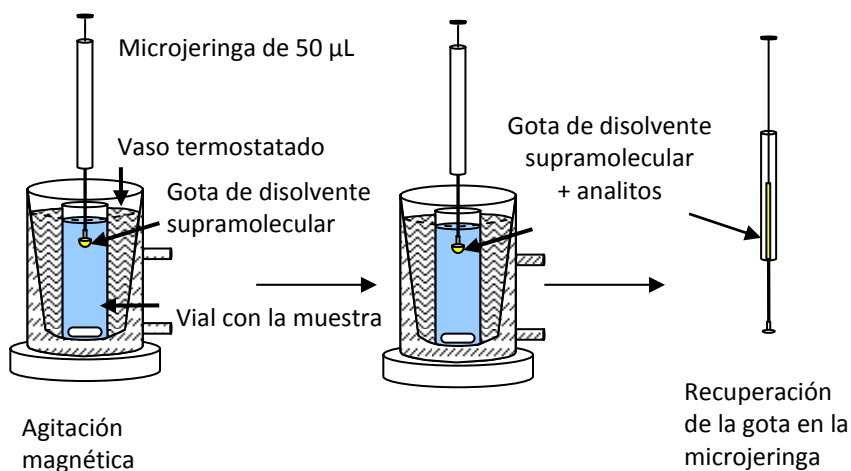


Figura 9. Extracción de los analitos operando en modo microextracción en una gota con disolvente supramolecular formado en ausencia de la muestra acuosa.

Aplicaciones

La mayoría de las aplicaciones analíticas que se han desarrollado hasta la fecha han hecho uso de disolventes supramoleculares constituidos por micelas de tensioactivos no iónicos (ej. tritón X-100; la serie PONPE, éteres polietilenglicolmono-4-nonilfenol, etc.). Entre las aplicaciones destacan la extracción de aminoácidos [164], proteínas [138,165]; vitaminas [166]; iones metálicos previa formación de complejos neutros [136,137,167-170]; y compuestos orgánicos tales como PAHs [58,171], PCBs [172]; ácidos húmicos y fúlvicos [173], plaguicidas [174,175], drogas terapéuticas [176], etc.

La descripción de disolventes supramoleculares constituidos por micelas acuosas de tensioactivos catiónicos [139] y aniónicos [141] eliminó algunos de los inconvenientes asociados al uso de tensioactivos no iónicos como eran los problemas de coelución. Además,, fue posible la extracción de compuestos en un mayor intervalo de polaridad mediante su solubilización en los grupos polares de las micelas a través de diferentes interacciones (electrostáticas, π -catión, formación de agregados mixtos, etc.). Basada en la coacervación de tensioactivos catiónicos se propuso la extracción/concentración de clorofenoles en agua de río [140]. En este caso la eficacia de extracción es muy elevada ya

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

[165] J. Bouvier, R.J. Etges, C. Bordier, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 15504.

[166] S.R. Sirimanne, D.G. Patterson, L. Ma, J.B. Justice, *J. Chromatogr. B* 716 (1998) 129.

[167] J. Chen, K.C. Teo, *Anal. Chim. Acta* 434 (2001) 325.

[168] E.K. Paleologos, D.L. Giokas, M.I. Karayannis, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 426.

[169] C. Bosh, F. Sánchez, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 759.

[170] A.R. Rod, S. Borhani, F. Shemirani, *Eur. Food Res. Technol.* 223 (2006) 649.

[171] R. Ferrer, J.L. Beltrán, J. Guiteras, *Anal. Chim. Acta* 330 (1996) 199.

[172] A. Eiguren-Fernández, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, *Quim. Anal.* 16 (1997) 283.

[173] R.L. Revia, G.A. Makharadze, *Talanta* 48 (1999) 409.

[174] C. García-Pinto, J.L. Pérez-Pavón, B. Moreno-Cordero, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2606.

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

[176] M.D. Rukhadze, S.K. Tsagareli, N.S. Sidamonidze, V.R. Meyer, *Anal. Biochem.* 287 (2009) 279.

que además de interacciones hidrófobas entre los analitos y las micelas se producen interacciones π -catión entre el anillo aromático de los clorofenoles y el grupo amonio del tensioactivo. El inconveniente de estos disolventes supramoleculares es la elevada concentración de electrolito necesaria para que se produzca la coacervación (400 g L^{-1} de NaCl), lo que ha restringido su uso.

La coacervación de micelas acuosas de tensioactivos aniónicos, inducida por ácido, fue propuesta por nuestro grupo de investigación con objeto de evitar la coelución de los analitos polares y los tensioactivos en el sistema cromatográfico [141]. La ausencia de anillos aromáticos en la estructura de los tensioactivos y su carácter polar ha permitido la aplicación de estos disolventes supramoleculares a la extracción de plaguicidas [144,145] y PAHs [59,143] y su posterior determinación mediante cromatografía líquida combinada con detección UV, fluorescente y espectrometría de masas.

Respecto a los disolventes supramoleculares de micelas mixtas, su uso ha estado muy centrado en la determinación de iones metálicos [152-157] en muestras acuosas aunque también se han utilizado, en menor medida, en el análisis de compuestos orgánicos [146-151]. El uso de mezclas de tensioactivos catiónicos y no iónicos permite incrementar la eficacia de extracción para algunos compuestos orgánicos polares [146,149] en muestras de aguas naturales.

En los últimos años, una de las líneas prioritarias de investigación en nuestro grupo ha sido el desarrollo de nuevos disolventes supramoleculares que se sinteticen en condiciones experimentales suaves, permitan el establecimiento de diferentes interacciones con los analitos y puedan alcanzarse elevados factores de preconcentración. En este contexto destacan los disolventes supramoleculares constituidos por micelas inversas [158] y vesículas [160] de ácidos alquilcarboxílicos, inducidos por agua y tetrabutilamonio, respectivamente. Además de las interacciones que permiten establecer (hidrófobas, puentes de hidrógeno, iónicas y π -catión), un aspecto clave de estos disolventes supramoleculares es la elevada concentración de

ácidos alquilcarboxílicos que contienen (entre 0,7 y 1 mg μL^{-1}) lo que permite alcanzar elevados rendimientos utilizando pequeños volúmenes de los mismos. Como consecuencia, se alcanzan factores de preconcentración entre 100 y 400. Por otro lado, los disolventes supramoleculares de micelas inversas se producen a pH inferiores a 4 y los de vesículas en el intervalo de pH entre 5 y 10, abarcando un amplio intervalo en el que se puede seleccionar el valor más apropiado para la extracción, dependiendo de las características de los analitos. En la Tabla 1 se comparan las recuperaciones obtenidas empleando disolventes supramoleculares de vesículas y micelas inversas para diferentes analitos, clasificados respecto al tipo de interacción predominante que se produce con el tensioactivo que forma el disolvente supramolecular.

Tabla 1. Recuperaciones, expresadas en porcentajes, obtenidas en la extracción coacervativa de diferentes compuestos orgánicos usando disolventes supramoleculares de vesículas de ácido decanoico y micelas inversas de ácido octanoico..

Tipo de Interacción	Analito	[Analito] (M)	Recuperaciones (%)	
			Vesículas	M. inversas
Hidrófoba	Naftaleno	3.9×10^{-5}	99±3	95±2
	Antraceno	2.8×10^{-5}	101±2	98±1
	Benzo(a)pireno	2.0×10^{-5}	100±3	97±1
Agregados mixtos	Tritón X-100	8.3×10^{-6}	99±1	98±3
	Alquilbenceno sulfonatos	2.9×10^{-5}	100±2	5±1
Enlaces de hidrógeno	4-clorofenol	3.9×10^{-5}	95±1	97±2
	2,4-diclorofenol	3.2×10^{-5}	100±1	99±1
	2,4,6-triclorofenol	2.6×10^{-5}	98±2	101±1
	Pentaclorofenol	1.9×10^{-5}	100±2	101±1
	Bisfenol A	3.8×10^{-5}	99±3	95±3
	Bisfenol F	3.6×10^{-5}	100±2	97±1
	Bencilbutilftalato	5.1×10^{-5}	80±3	99±1
	Dibutilftalato	4.8×10^{-5}	85±4	100±1
	Paratión	4.1×10^{-5}	90±2	96±2
	Atrazina		98±4	95±4
	Hidroquinona sulfonada	5.2×10^{-5}	-	95±3
Iónica	Hidroquinona sulfonada	5.2×10^{-5}	95±3	-
	Azul brillante de cumasín	7.3×10^{-7}	100±4	-
	Difenzoquat	6.9×10^{-6}	50±2	-

Como puede observarse, prácticamente en todos los casos se obtienen recuperaciones cuantitativas a excepción de la extracción de alquilbenceno sulfonatos y difenzoquat cuando se utilizan disolventes supramoleculares de micelas inversas y vesículas, respectivamente.

Hasta la fecha, los disolventes supramoleculares de micelas inversas se han aplicado a la extracción de bisfenoles A y F y los correspondientes éteres y diglicidílicos en aguas residuales [177], de bisfenol A en muestras de orina [178] y alimentos líquidos [179], de Ocratoxina A en vino, vinagre y cerveza [179,180], de PAHs en té, café, aguas naturales y residuales [179,181] y de colorantes de tipo Sudan en salsas para alimentos [182]. Por otro lado, los disolventes supramoleculares de vesículas de ácido decanoico inducidas por tetrabutilamonio también se han propuesto para la extracción de bisfenol A y F y sus correspondientes éteres diglicidílicos en aguas residuales y de río [183]. Los factores de preconcentración estuvieron comprendidos entre 477 y 569, las extracciones fueron independientes de la presencia de sales hasta 1M o temperatura hasta 60°C y las condiciones de equilibrio se alcanzaron en 5 minutos. La combinación de coacervación vesicular con CL-fluorescencia permitió la cuantificación de los analitos con límites de detección de 9-10 ng L⁻¹. Los disolventes supramoleculares vesiculares combinados con fluorescencia también se han empleado para la determinación de fungicidas benzimidazoles [184]. Hasta la fecha, son los únicos tipos de disolventes supramoleculares que se han utilizado en el formato de microextracción en una gota [161].

[177] A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 603 (2007) 51.

[178] A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 630 (2008) 19.

[179] A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 530.

[180] S. García-Fonseca, A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 617 (2008) 3.

[181] A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1203 (2008) 168.

[182] F.J. López-Jiménez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Food Chem.* 121 (2010) 763.

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

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

2.3.2. Muestras sólidas ambientales y biológicas

La extracción/concentración de los contaminantes químicos presentes en muestras sólidas se lleva a cabo rutinariamente utilizando disolventes orgánicos y es necesario que la muestra esté suficientemente homogenizada para que se obtengan resultados reproducibles. Con objeto de alcanzar suficiente sensibilidad y selectividad, el proceso requiere generalmente el tratamiento de una cantidad considerable de muestra, el desarrollo de extracciones repetidas para asegurar el aislamiento completo del analito de interés, una etapa de limpieza del extracto y la evaporación del disolvente. En este contexto, las investigaciones en los últimos años se han centrado en el desarrollo de estrategias que permitan reducir el consumo de disolventes y el tiempo necesario para la extracción. Las estrategias con mayor éxito se han basado en el aumento de la eficacia de la extracción mediante el uso de energías auxiliares [ej. extracción asistida por microondas (MAE), extracción acelerada por ultrasonidos y extracción con líquidos presurizados (PLE)], el uso de disolventes alternativos [ej. fluidos supercríticos (SFE) o disolventes supramoleculares], o el uso combinado de disolventes y adsorbentes para la simultánea extracción y limpieza de la muestra (dispersión de la matriz en fase sólida).

2.3.2.1. Técnicas asistidas por energías auxiliares

La extracción asistida por microondas se realiza en equipos que difieren en el tipo de energía aplicada a la muestra (multimodo o focalizada) y en el uso o no de sobrepresión. Generalmente, los sistemas cerrados (los que operan a alta presión) son multimodo, es decir la radiación generada se dispersa de forma aleatoria en una cavidad. Los sistemas abiertos (en los que el proceso se lleva a cabo a presión atmosférica) son sistemas focalizados o monomodo, es decir la radiación microondas se confina en un espacio mucho más reducido, donde se sitúa la muestra, y por tanto la radiación que llega a la misma es más intensa que en los sistemas multimodo. Existen numerosas revisiones en las que

se describen los equipos utilizados, los principios en los que se basa la técnica y las aplicaciones desarrolladas hasta la fecha [185-187].

En la extracción asistida por ultrasonidos (sonidos con una frecuencia superior a la que el oído humano puede percibir, >20 kHz) se utilizan dos tipos de dispositivos; los baños y las sondas [188]. En los primeros, la reproducibilidad es muy baja debido a la falta de uniformidad en la transmisión de los ultrasonidos y la disminución de la potencia con el tiempo, por lo que su uso debería restringirse a operaciones como las de eliminación de gases disueltos, disolución etc., para las que han sido diseñadas. Las sondas ultrasónicas o sonotrodos focalizan su energía en una zona específica y producen resultados más reproducibles, aunque en general son poco robustos y dependen de la composición de la matriz de la muestra y del tamaño de partícula de la misma.

La extracción con líquidos presurizados, también denominada extracción acelerada con disolventes (ASE), implica el uso de disolventes a elevada temperatura (40-200°C) y presión (1.000-2.500 psi). En estas condiciones los disolventes aumentan el poder de solvatación y se incrementa la velocidad de extracción. La técnica tiene capacidad para realizar múltiples extracciones, puede automatizarse y ha encontrado amplia aplicación en la extracción de contaminantes en muestras ambientales, biológicas y de alimentos [189-192]. La USEPA (United States Environmental Protection Agency) ha adoptado esta técnica para el análisis de plaguicidas en suelos [193].

[185] L. Cheng, D Song, Y. Tian, L. Ding, A. Yu, H. Zhang, Trends Anal. Chem. 47 (2008) 151.

[186] J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro, Trends Anal. Chem. 22 (2003) 90.

[187] Q. Jin, F. Liang, H. Zhang, L. Zhao, Y. Huan, D. Song, Trends Anal. Chem. 18 (1999) 479.

[188] J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro, Trends Anal. Chem. 22 (2003) 41.

[189] R. Carabías-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, P. Revilla-Ruiz, J. Hernández-Méndel, J. Chromatogr. A 1089 (2005) 1.

[190] L. Ramos, E.M. Kristenson, U.A.T. Brinkman, J. Chromatogr. A 975 (2002) 3.

[191] H. Runnqvist, S.A. Back, M. Hansen, B. Styrihave, B. Halling-Sorensen, E. Björklund, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 2447.

[192] A. Nieto, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marcé, Trends Anal. Chem. 29 (2010) 752.

[193] EPA Method 3545, US Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1996.

Frecuentemente, PLE se combina con SPE o extracción por adsorción con barritas agitadoras (SBSE una variedad de SPME, comercialmente conocidas como "Twister") para preconcentrar los analitos.

Los fluidos supercríticos son extractantes con propiedades intermedias entre los líquidos y los gases. Tienen viscosidad parecida a los gases, densidad parecida a los líquidos y elevada difusividad [194]. La densidad del fluido, y por tanto su capacidad de solvatación para el soluto depende de la presión y la temperatura. El fluido más utilizado es el dióxido de carbono (punto crítico 31°C y 74 bar). Tiene baja polaridad y es ideal para extracción de compuestos apolares. La adición de metanol (1-10%) aumenta la polaridad y permite su aplicación a la extracción de un amplio número de compuestos [195,196].

2.3.2.2. Dispersión de la matriz en fase sólida

La dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) es una técnica ampliamente aceptada para la extracción de muestras de alimentos y biológicas sólidas, semisólidas y/o de elevada viscosidad [197,198]. El procedimiento consiste en dispersar la muestra con un adsorbente tal como C₁₈, C₈, sulfato sódico, tierra de diatomeas, etc. hasta conseguir una mezcla homogénea. A continuación se procede al lavado de la mezcla con un pequeño volumen de disolvente o bien ésta se sitúa en una minicolumna de SPE antes de la elución. El procedimiento es simple, versátil y ofrece la posibilidad de llevar a cabo la extracción y la purificación de la muestra en una única etapa con lo que se reduce el tiempo de análisis y el consumo de disolvente orgánico. La MSPD se utiliza ampliamente en la extracción de drogas en tejidos animales y

[194] M. Valcarcel, M.D. Luque de Castro, M.T. Tena en: Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico, Editorial Reverté S.A., Barcelona, 1993.

[195] S.M. Pourmortazavi, S.S. Hajimirsadeghi, J. Chromatogr. A 1163 (2007) 2.

[196] M. Herrero, J.A. Mendiola, A. Cifuentes, E. Ibáñez, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 2495.

[197] S. Bogialli, A. Di Corcia, J. Biochem. Bioph. Methods 70 (2007) 163.

[198] S.A. Baker, J. Biochem. Bioph. Methods 70 (2007) 151.

multiresiduos de plaguicidas en frutas y verduras [199] y su utilidad es evidente a la luz del gran número de aplicaciones desarrolladas y revisadas en los últimos años [198,200,201]. Nuevas tendencias en esta área son las relacionadas con el uso de nuevos adsorbentes y la combinación de MSPD y PLE para conseguir extracciones MSPD más rápidas, exhaustivas y automáticas.

Entre los nuevos adsorbentes evaluados como dispersantes MSPD, los MIPs han despertado especial interés. Estos fueron propuestos por Yan et al. [202] para la extracción de cinco fluoroquinolonas en huevos de pollo y tejidos de cerdo alcanzando mejores recuperaciones que con los adsorbentes convencionales C₁₈, sílica, Florisil o arena y con la ventaja añadida de una extraordinaria mejora de la selectividad. Canosa et al. [203] desarrollaron un procedimiento PLE para la determinación de parabenos y triclosán en polvo con Florisil, sulfato sódico y acetato de etilo a 103°C y 1.500 psi, con una etapa de lavado con n-hexano. Las recuperaciones del más polar de los analitos bajo estudio fueron ligeramente superiores con la metodología PLE propuesta. Además, la automatización de la preparación de la muestra permitió realizar las extracciones más rápidamente.

Un ejemplo interesante es la extracción de especies de arsénico (arsenito, As (III); arsenato, As (V); ácido monometil arsónico; ácido dimetilarsónico; arsenobetaina y arsenocolina) de diferentes moluscos y peces [204]. Se obtuvieron recuperaciones cuantitativas de las especies de arsénico orgánicas e inorgánicas usando tierra de diatomeas o gel de sílice octadecil-funcionalizado (C₁₈) como material sólido soporte. Se usó LC-espectrometría de

[199] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, J. AOAC 86 (2003) 412.

[200] M. García-López, P. Canosa, I. Rodríguez, Anal. Bioanal. Chem. 391 (2008) 963.

[201] N. Fidalgo-Used, E. Blanco-González, A. Sanz-Medel, Anal. Chim. Acta 590 (2007) 1.

[202] H. Yan, F. Qiao, K.-H. Row, Anal. Chem. 79 (2007) 8242.

[203] P. Canosa, D. Pérez-Palacios, A. Garrido-López, M.T. Tena, I. Rodríguez, E. Rubi, R. Cela, J. Chromatogr. A 1161 (2007) 105.

[204] A. Moreda-Pineiro, E. Pena-Vazquez, P. Hermelo-Herbello, P. Bermejo-Barrera, J. Moreda-Pineiro, E. Alonso-Rodríguez, S. Muniategui-Lorenzo, P. Lopez-Mahia, D. Prada-Rodríguez, Anal. Chem. 80 (2008) 9272.

masas con fuente de plasma acoplada (ICPMS) para separar y detectar todas las especies de arsénico. Otro ejemplo interesante consiste en la extracción de 27 PAHs en lodos de depuradoras de Madrid [205]. Los PAHs se extrajeron con MSPD asistida con ultrasonidos. La purificación de los extractos se llevó a cabo mediante SPE con C₁₈ y los PAHs se determinaron por dilución isotópica GC/MS. Los límites de detección estuvieron comprendidos entre 0,03 ng g⁻¹ para el acenaftileno y 0,45 ng g⁻¹ para el benzo[*b*]nafto[2,1-*d*]tiofeno. Se detectaron PAHs en todas las muestras con concentraciones entre 390 y 6.390 ng g⁻¹ (peso seco) y en la mayoría de los lodos examinados el compuesto principal fue el fenantreno con concentraciones medias de 1.062 ng g⁻¹.

2.3.2.3. Microextracción en fase sólida

La microextracción en fase sólida (SPME) se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de un adsorbente, en la mayoría de los casos polimérico, seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico [206]. El pequeño tamaño de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en una jeringa. De esta forma, se facilita su manipulación y al mismo tiempo se protege la fibra cuando no se utiliza, ya que ésta permanece dentro de la aguja de la jeringa.

Su uso para la purificación de los extractos, obtenidos después de la extracción con disolventes de muestras sólidas y biológicas se está incrementando. Para este fin, se prefieren las fibras de SPME recubiertas de MIP. Por ejemplo, Hu et al. [207] desarrollaron una fibra de MIP de prometrin para la microextracción selectiva de triazinas. El MIP se polimerizó in-situ sobre la superficie interior del capilar de sílice activa y la fibra SPME se acopló on line con LC para la determinación de las triazinas en alimentos y extractos de suelos,

[205] C. Sánchez-Brunete, E. Miguel, J.L. Tadeo, J. Chromatogr. A 1148 (2007) 219.

[206] M.F. Alpendurada, J. Chromatogr. A 889 (2000) 3.

[207] X. Hu, Y. Hu, G. Li, J. Chromatogr. A 1147 (2007) 1.

previamente diluidos en benceno con el fin de favorecer las interacciones específicas cercanas a aquellas desarrolladas durante la síntesis del MIP en tolueno. Turiel et al. [208] obtuvieron una fibra MIP sintetizando un monolito dentro del capilar de sílice que actuaba como molde, siendo la sílice grabada después de la polimerización. Este MIP se sintetizó usando propazina como molde y se usó para la extracción de triazinas y dos metabolitos en verduras y extractos de suelo, previamente diluidos en el disolvente porogénico de síntesis (tolueno).

2.3.2.4. Disolventes supramoleculares

Los disolventes supramoleculares (SUPRAS) también se han empleado en los procesos de extracción de muestras sólidas, como una alternativa al uso de los disolventes orgánicos.

Modo de operación

El modo de operación es muy similar al seguido con las muestras líquidas aunque la formación del disolvente supramolecular puede llevarse a cabo en presencia o en ausencia de la muestra. En presencia de la muestra sólida, una disolución acuosa del tensioactivo a concentraciones por encima de la concentración micelar crítica se añade al bote y se establecen las condiciones de coacervación (Figura 10a). La mezcla se agita un determinado tiempo y a continuación se centrifuga para acelerar la separación del disolvente supramolecular que contiene los analitos (Figura 10b).

En ausencia de la muestra, el SUPRAS se sintetiza previamente en agua destilada (Figura 11) y después se añade a una pequeña cantidad de muestra sólida. La mezcla se agita en vortex para favorecer la transferencia de los analitos al disolvente supramolecular y a continuación se ultracentrifuga para

[208] E. Turiel, J.L. Tadeo, A. Martín-Esteban, Anal. Chem. 79 (2007) 3099.

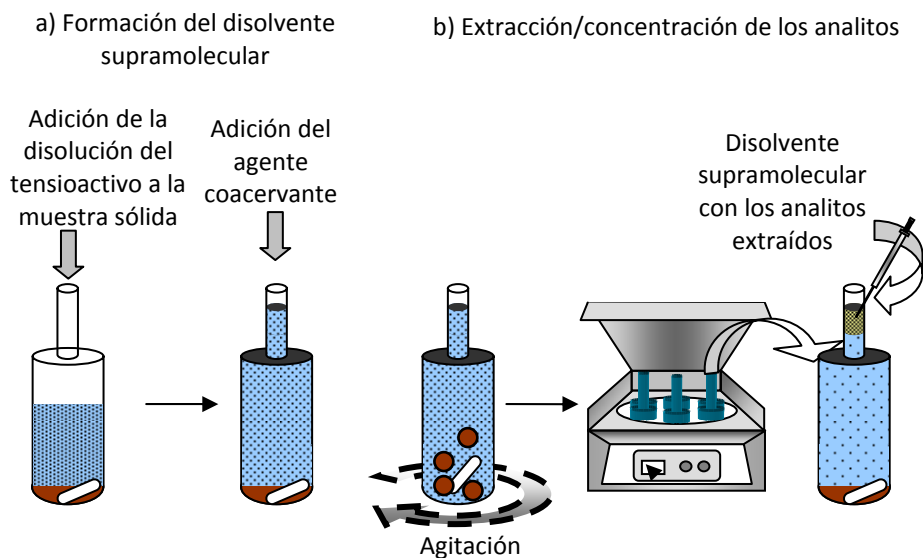


Figura 10. Modo de operación cuando se forma el disolvente supramolecular en presencia de una muestra sólida.

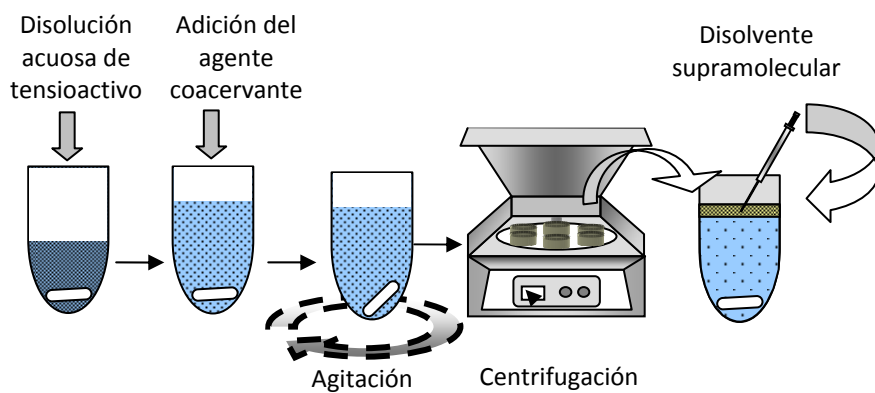


Figura 11. Formación del disolvente supramolecular en ausencia de muestra líquida.

separar la muestra del SUPRAS con los analitos solubilizados. Alícuotas de SUPRAS se inyectan en CL para la determinación de los compuestos de interés (Figura 12).

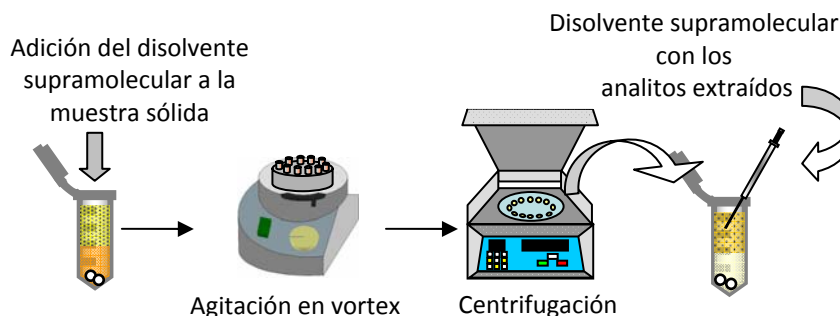


Figura 12. Extracción de los analitos de muestras sólidas mediante adición del disolvente supramolecular formado en ausencia de la muestra.

Aplicaciones

Aunque en menor medida si se compara con las aplicaciones en muestras acuosas, en la bibliografía se han descrito diferentes aplicaciones de disolventes supramoleculares de micelas no iónicas y micelas mixtas en procesos de extracción de contaminantes en muestras sólidas. Ejemplos de tales aplicaciones son la descontaminación de suelos [147] y la determinación de plaguicidas en frutas, cereales [209-211] y suelos [175] y de metales en suelos [156].

La introducción de los disolventes de micelas acuosas de tensioactivos aniónicos fue de gran utilidad para el tratamiento de muestras sólidas debido a

[209] Z. Zhou, J. Chen, D. Zhao, M. Yang, J. Agric. Food Chem. 57 (2009) 57.

[210] J. Chen, W. Zhao, W. Liu, Z. Zhou, M. Yang, Food Chem. 115 (2009) 1038.

[211] A. Snatlad, S. Srijarani, R. Burakham, J.D. Glennon, R.L. Deming, Anal. Bioanal. Chem. 394 (2009) 1307.

las drásticas condiciones ácidas en las que se producen, alrededor de 3 M, lo que permite obtener eficientes extracciones de los contaminantes que están fuertemente retenidos en matrices como suelos, sedimentos y lodos. Es en este campo donde estos disolventes supramoleculares han tenido mayor relevancia y entre las aplicaciones desarrolladas destacan la extracción de PAHs en suelos, lodos y sedimentos [212] y sobre todo la extracción de sustancias anfífilas tales como tensioactivos aniónicos (alquilbencenosulfonatos) [213], catiónicos (alquilamonio) [214] y no iónicos (alquilfenoles polietoxilados y alcoholes etoxilados) [215] en lodos. La formación de agregados mixtos entre los tensioactivos analitos y el tensioactivo aniónico que constituye el disolvente supramolecular ha permitido la extracción de los mismos con elevada eficiencia y factores de preconcentración entre 50 y 100.

En los últimos años nuestro grupo de investigación se ha centrado en el desarrollo de metodologías para el control y determinación de contaminantes orgánicos en alimentos mediante el uso de disolventes supramoleculares de micelas inversas y vesículas. Hasta la fecha, los disolventes supramoleculares de micelas inversas se han aplicado a la extracción de bisfenol A en frutas, verduras y alimentos grasos enlatados [216,217], de ocratoxina A en trigo [218] y de antibióticos en pescados y mariscos [219]. Los disolventes vesiculares han sido solo aplicados para la determinación de fungicidas bencimidazoles en frutas y verduras [220].

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

[213] F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 109.

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

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

[216] A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 617 (2008) 51.

[217] A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Food Addit. Contam.* 26 (2009) 265.

[218] S. García-Fonseca, A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2376.

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

[220] A. Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, *Anal. Chim. Acta* 650 (2009) 207.

2.3.3. Compuestos volátiles y semivolátiles

En esta área ha habido un crecimiento espectacular de aplicaciones que usan técnicas de microextracción con espacio de cabeza (HS) para el análisis de contaminantes en muestras ambientales [221], siendo las más interesantes microextracción en fase sólida (HS-SPME) y microextracción en una gota (HS-SDME).

Aplicaciones típicas de HS-SPME se realizan en combinación con cromatografía de gases donde, después de un paso de extracción, los analitos son desorbidos térmicamente en el inyector del cromatógrafo. Como ejemplo Yang et al. desarrollaron un método para la diferenciación y cuantificación de isómeros de xileno por combinación de HS-SPME/GC y espectrometría de masas con trampa iónica [222]. La aplicación de HS-SPME/GC al análisis de compuestos no volátiles e inestables térmicamente requiere una derivatización previa de los analitos. Normalmente esta derivatización se lleva a cabo en la muestra acuosa durante la etapa de extracción con espacio de cabeza, aunque también es posible incluir la derivatización sobre la fibra de SPME; sin embargo, esta segunda aproximación es más lenta que si se añade el agente derivatizante directamente a la muestra. Un ejemplo es la aplicación de HS-SPME para la extracción simultánea de metilmercurio (MeHg^+), monobutilestaño (MBT), dibutilestaño (DBT), tributilestaño (TBT), monofenilestaño, difenilestaño y trifenilestaño en sedimentos y biota con previa derivatización con tetraetilborato sódico [223]. El método de preconcentración optimizado se aplicó a la determinación de MeHg^+ y butil- y fenil-estaños en materiales de referencia certificados mediante el uso de GC con detección de plasma inducido por microondas.

[221] D.A. Lambropoulou, I.K. Konstantinou, T.A. Albanis, J. Chromatogr. A 1152 (2007) 70.

[222] C.H. Yang, N.A. Khan, H.F. Wu, J. Sep. Sci. 31 (2008) 3050.

[223] A. Delgado, A. Usobiaga, A. Prieto, O. Zuloaga, A. de Diego, J.M. Madariaga, J. Sep. Sci. 31 (2008) 768.

Muchas aplicaciones han tratado sobre el desarrollo de nuevos recubrimientos de fibra poliméricos con el fin de mejorar la selectividad y exactitud de los análisis. Así, Bagheri et al. [224] usaron la tecnología de recubrimiento sol-gel para sintetizar un nuevo polímero amino funcionalizado a partir de 3-(trimetoxisilil)propilamino como precursor. La novedosa fibra amino-funcionalizada se empleó para la HS-SPME de algunos clorofenoles importantes desde el punto de vista medioambiental, previamente derivatizados con anhídrido acético. La comparación de los resultados con los datos obtenidos usando una fibra cubierta de poliacrilato demostró que la fibra propuesta mostraba una sensibilidad hasta 2,6 veces mayor para la extracción de los fenoles de muestras acuosas.

Por otro lado, la técnica de HS-SDME parece muy atractiva, aunque sus métodos están todavía en un estado incipiente de desarrollo y se han publicado pocos trabajos. A diferencia de las fibras, las gotas se renuevan en cada extracción y es una estrategia para superar la limitada disponibilidad de recubrimientos para las fibras dado la amplia variedad de disolventes y agentes de atrapamiento que pueden usarse. En HS-SDME, una microgota de disolvente con alto punto de ebullición se suspende en la punta de la aguja de una microjeringa y se coloca en el espacio de cabeza de una disolución. Dado que sólo los compuestos que se volatilizan al espacio de cabeza pueden ser atrapados en la microgota, las interferencias procedentes de matrices complejas decrecen significativamente.

La derivatización in-situ es propuesta frecuentemente para extender la aplicabilidad de HS-SDME a compuestos polares. Por ejemplo, Xiao et al. [225] propusieron un método para la especiación de compuestos butilestaño en muestras ambientales y biológicas, el cual estuvo basado en HS-SDME en combinación con GC-ICPMS, con derivatización previa de los compuestos con tetraetilborato sódico. Los límites de detección obtenidos fueron $1,4 \text{ ng L}^{-1}$ para MBT, $1,8 \text{ ng L}^{-1}$ para DBT y $0,8 \text{ ng L}^{-1}$ para TBT. Las concentraciones de MBT, DBT

[224] H. Bagheri, E. Babanezhad, F. Khalilian, Anal. Chim. Acta 616 (2008) 49.

[225] Q. Xiao, B. Hu, M. He, J. Chromatogr. A 1211 (2008) 135.

y TBT en agua del mar fueron 31, 79 y 32 ng L⁻¹, respectivamente, mientras que las concentraciones en diferentes mariscos estuvieron en el intervalo de 11,6-30,4; 11,8-8,9 y 12,8-52,6 ng g⁻¹, respectivamente. Tratamientos teóricos y una evaluación experimental de derivatización en una gota fueron publicados por Fiamengos y Stalikas [226]. En este estudio, dos aldehídos de bajo peso molecular fueron derivatizados en una gota conteniendo 2,4,6-triclorofenilhidrazina. La teoría de la doble capa fue usada para explicar la transferencia de masa y para discutir el cálculo de los tiempos característicos y tasas específicas de absorción. Después de que los procesos relevantes de las diferentes partes de los sistemas de 3 fases fueran explicados, se confirmó el modelo de transferencia de masa en el sistema total así como en el espacio de cabeza con la gota orgánica.

Los líquidos iónicos (IL) tienen un gran potencial en HS-SDME debido a su alta viscosidad y no volatilidad que permite la formación de gotas estables. Zhao et al. [227] propusieron el uso del líquido iónico hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazolio en HS-SDME para la extracción de fenoles antes de GC-detección con ionización de llama (FID). El volumen de la microgota de líquido iónico usada fue 1 µL. Después de la extracción, se realizó la desorción de los analitos en la válvula de inyección y el IL no volátil se retiró con la microjeringa. El método se aplicó a la determinación de fenoles en agua de lago y aguas residuales.

Una de las principales ventajas de los ILs cuando se usan en SDME es que permiten la aplicación de tiempos de muestreo mayores así como el uso de volúmenes de gotas mayores, lo que permite incrementar la sensibilidad en LC. Vidal et al. [228] propusieron el uso de microgotas de 5 µL de hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio en HS-SDME para la extracción de clorobencenos en muestras acuosas ambientales antes de su separación por CL. Los límites de

[226] Y.C. Fiamengos, C.D. Stalikas, *Anal. Chim. Acta* 599 (2007) 76.

[227] F.Q. Zhao, J. Li, B.Z. Zeng, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 3045.

[228] L. Vidal, E. Psillakis, C.E. Domini, N. Grané, F. Marken, A. Canals, *Anal. Chim. Acta* 584 (2007) 189.

detección estuvieron comprendidos entre 0,102 y 0,203 $\mu\text{g L}^{-1}$ y el método se validó utilizando muestras fortificadas de agua de grifo, de pozo y residuales.

Independientemente del tipo de muestra ambiental considerada (acuosas, sólidas o gaseosas), es de gran interés el desarrollo de estrategias que integren todas las etapas del proceso de análisis químico y las simplifiquen, con el objeto de reducir tiempo y costes en los estudios de contaminación ambiental. Además existe la necesidad de desarrollar metodologías apropiadas para el análisis de contaminantes emergentes con el fin de poder estudiar y establecer su distribución y efectos tóxicos en el medio ambiente. Así, el objetivo de la Tesis ha sido el desarrollo de métodos para el análisis químico de contaminantes emergentes y prioritarios en muestras acuosas y biológicas que integren y simplifiquen las diferentes etapas previas del análisis (toma de muestra, extracción, preconcentración, limpieza y almacenamiento) y reduzcan el consumo de disolventes orgánicos en coherencia con los principios de la Química Verde. Esta filosofía química va dirigida hacia el diseño de productos y procesos químicos que impliquen la reducción o eliminación de productos químicos peligrosos para los materiales, las personas y el medioambiente.

Las estrategias que se abordan en esta Tesis para el análisis de las muestras acuosas se basan en el uso de hemimicelas y admicelas como materiales adsorbentes, en formato SPE convencional, y de disolventes supramoleculares. Ambos tipos de sistemas supramoleculares tienen capacidad para la retención y estabilidad de analitos de muy diferente polaridad gracias a las múltiples interacciones que proporcionan los diferentes microambientes que los constituyen. Respecto a la extracción de contaminantes en muestras de alimentos y biológicas se aborda con el uso de mezclas de disolventes acuosos y orgánicos de muy diferentes propiedades con el fin de mejorar su capacidad extractante y mediante el uso de nuevos disolventes supramoleculares como una alternativa muy ventajosa al uso de disolventes orgánicos.

2.4. Técnicas de separación y detección

La cromatografía líquida y gaseosa, en combinación con la espectrometría de masas (LC-MS, GC-MS) y sus tandem en MS (LC-MS/MS, GC-MS/MS) son las técnicas predominantes para la identificación y cuantificación de compuestos orgánicos, sus metabolitos y productos de transformación en el medio ambiente. Ambas se consideran necesarias para cubrir la necesidad del análisis de un amplio intervalo de contaminantes y matrices. GC-MS y LC-MS/MS se han usado como técnicas complementarias para cuantificar las 33 sustancias prioritarias de la lista europea del sistema de registro, evaluación y autorización de compuestos químicos [229].

Asimismo, los recientes avances en electroforesis capilar-espectrometría de masas (CE-MS) han hecho que esta técnica combinada sea más competitiva en el análisis de muestras ambientales aunque aún necesita proporcionar mayores prestaciones en su capacidad de detección debido a las cantidades traza de contaminantes presentes en el medio ambiente y la alta complejidad de la matriz de las muestras.

2.4.1. Cromatografía de gases/espectrometría de masas.

La cromatografía de gases en combinación con MS y los métodos multidimensionales proporcionan elevada resolución y sensibilidad en análisis ambiental.

Las últimas tendencias en este ámbito son el uso de técnicas de gran volumen de inyección (LVI) para incrementar la sensibilidad y reducir o eliminar la necesidad de etapas de preconcentración de los extractos [230] y el empleo

[229] J.B. Baugros, B. Giroud, G. Dessalces, M.F. Grenier-Loustalot, C. Cren-Olivé, *Anal. Chim. Acta* 607 (2008) 191.

[230] Y.T. Li, J. Whitaker, C. McCarty, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 32 (2009) 1644.

de GC capilar con programas de temperatura muy rápidos para hacer frente al procesado de gran cantidad de muestras [231].

Respecto a los detectores de masas, los cuadrupolares (Q) o de trampa iónica (IT) son los más utilizados en el análisis ambiental. Los espectrómetros de tiempo de vuelo (TOF) con resolución de unidades de masa a altas tasas de adquisición de datos (hasta 500 espectros/s) se acoplan a GC rápida o GC bidimensional mientras los de moderada tasa de adquisición de datos (20-25 espectros/s) pero con gran resolución de masas son más apropiados para la resolución de los analitos con relación a los componentes de la matriz. Durante los últimos años ha habido una gran tendencia a usar GC/ITMS dado que su capacidad de detección mediante MS/MS, basada en la selección de un ión precursor y el espectro de masas completo de sus iones producto, permite la identificación con gran fiabilidad de los analitos de interés a bajos límites de detección y bajo coste de operación.

Por último la capacidad de separación de GC bidimensional (GC x GC) hace que este tipo de cromatografía sea una elección excelente para el análisis cualitativo de muestras con matrices muy complejas. Una revisión sobre sus ventajas y desventajas ha sido realizada por Mondello et al. [232].

2.4.2. Cromatografía de líquidos/espectrometría de masas.

LC-MS y LC-MS/MS con triple cuadrupolo (QqQ) y trampa iónica (IT) son ahora técnicas ampliamente utilizadas para el análisis de contaminantes ambientales y de hecho incluso han reemplazado a GC/MS en muchas aplicaciones debido a su sensibilidad e idoneidad para determinar compuestos en amplios intervalos de masa y polaridad. La interfase de ionización electrospray (ESI) seguida de ionización química a presión atmosférica (APCI)

[231] M. Dömötöróvá, E. Matisová, J. Chromatogr. A 1207 (2008) 1.

[232] L. Mondello, P.Q. Tranchida, P. Dugo, G. Dugo, Mass Spectrom. Rev. 27 (2008) 101.

son las más usadas. La interfase de fotoionización a presión atmosférica (APPI) es la mejor selección en el caso de analizar compuestos quirales (los cuales suelen requerir el uso de LC en fase normal) ya que, a diferencia de otras interfases, no está sujeta a explosiones peligrosas cuando se usan disolventes inflamables en la fase móvil.

La LC actual ha evolucionado por un lado al empleo de ultrapresión (UPLC) para conseguir eficiencias de separación máximas y reducir el tiempo de análisis [233] y por otro lado, a la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) para mejorar la separación y sensibilidad por MS para compuestos muy polares [234]. UPLC usa columnas con partículas empaquetadas por debajo de 2 μm . El incremento de resolución y estrechez de los picos permite que los analitos coeluyan con menos interferencias y en caso de combinarse con MS reduce o evita totalmente los efectos matriz, lo cual evita la necesidad de usar estándares internos o adición estándar simplificando el procedimiento operacional. Su uso en combinación con MS se está incrementando en el análisis ambiental. HILIC se está haciendo muy popular para la separación de compuestos polares como aminoácidos, péptidos, drogas o metabolitos, en columnas polares con fases móviles acuosas-orgánicas con alto contenido en disolvente orgánico. Sin embargo, las aplicaciones de HILIC en análisis ambiental son todavía muy escasas.

Recientes avances en MS han llevado al desarrollo de analizadores QqQ de nueva generación e instrumentos híbridos como cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF), cuadrupolo-trampas lineales (Q-LITs) y trampa iónica lineal-Orbitrap (LTQ-Orbitrap). Las ventajas de estos nuevos analizadores en términos de velocidad de monitorización, exactitud de masa y sensibilidad en el análisis ambiental han sido discutidas por Barceló y Petrovic [235]. Q-LIT MS con posibilidad de MS^3 , LITs con alta sensibilidad para experimentos MS^n y Q-TOF

[233] A.B. Lambie, A. Agarwal, H. Fang, A. Hamsher, L. Hong, K. O'Neal, X. XU, S.G. Weber, Trends Anal. Chem. 26 (2007) 445.

[234] P. Jandera, J. Sep. Sci. 31 (2008) 1241.

[235] D. Barceló, M. Petrovic, Trends Anal. Chem. 26 (2007) 2.

MS para medidas de masa exactas de los iones producto son herramientas muy poderosas para identificar productos de transformación.

Actualmente, las investigaciones en el área de la LC-MS están enfocadas al desarrollo de análisis multiresiduo de contaminantes [236-239] y a la identificación y cuantificación de productos de degradación y metabolitos [240,241]. LC-QqQ es por ahora la técnica tandem más empleada para el análisis de multiresiduos, ya que en su modo MRM permite la determinación de un gran número de compuestos con LODs en el rango ng L⁻¹. Respecto al análisis de metabolitos y productos de degradación el modo más fácil e inequívoco de identificar metabolitos es usando materiales de referencia sin embargo, no siempre están disponibles. Un modo alternativo es empleando MS en modo full-scan y aunque los QqQs son la elección usual su sensibilidad en full-scan es inadecuada lo que está promoviendo el uso de IT-MS y TOF-MS [242], teniendo este último la ventaja añadida de alta resolución que permite medidas con alta exactitud de masa. Seguidamente es necesaria una caracterización estructural para lo cual MSⁿ es indispensable. Los cuadrupolos permiten realizar identificación estructural induciendo la fragmentación en la fuente; sin embargo, la disociación inducida por colisión (CID) en QqQ y IT proporciona mayor selectividad.

[236] I. Senta, S. Terzić, M. Ahel, *Chromatographia* 68 (2008) 747.

[237] L. Barron, J. Tobin, B. Paull, *J. Environ. Monitor.* 10 (2008) 353.

[238] A. Greulich, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 183.

[239] E. Vulliet, L. Wiest, R. Baudot, M.F. Grenier-Loustalot, *J. Chromatogr. A* 1210 (2008) 84.

[240] T. Kosjek, E. Heath, M. Petrovic, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 1076.

[241] H.K. Lim, J. Chen, C. Sensehauser, K. Cool, V. Subrahmanyam, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 1821.

[242] H. Gallart-Ayala, E. Moyano, M. T. Galceran, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 4039.

2.4.3. Electroforesis capilar.

Las técnicas de electroforesis capilar (CE), tanto en formato tradicional como en formato chip, se están haciendo un hueco dentro del análisis ambiental gracias a los recientes avances en este ámbito.

Aunque los métodos de detección ópticos siguen siendo los más ampliamente instalados en los instrumentos comerciales, la necesidad de mayor sensibilidad con esta técnica sigue siendo una prioridad en la investigación con CE. Las últimas mejoras en los sistemas de detección, los avances en preconcentración off- y on-line, los usos más recientes de electromigración en el análisis por microchip y la utilidad de estas metodologías en el análisis de muestras reales se encuentran recogidas en una revisión bibliográfica [243]. El interés por otros detectores como los electroquímicos está creciendo debido a su bajo coste, alta sensibilidad y excelente capacidad para miniaturización. Asimismo han surgido nuevas tendencias al acoplamiento de las técnicas de separación capilar con MS [244]. El desarrollo de interfases apropiadas que permitan la compatibilidad del buffer de separación en CE con los procesos de ionización, sin que conlleve pérdidas de sensibilidad, continúa siendo un gran reto para CE-MS dado que los límites de detección que se alcanzan son inadecuados para muchas aplicaciones ambientales. Respecto al uso de CE en microchips, esta técnica atrae mucho interés actualmente por las ventajas que de ella se derivan como es su gran portabilidad y mínimo consumo de disolventes y reactivos. Una revisión exhaustiva de sus aplicaciones en análisis ambiental ha sido realizada por Li y Lin [245] y Escarpa et al. [246].

[243] E. Dabek-Zlotorynska, V. Celis, M. M. Yassine, *Electrophoresis* 29 (2008) 310.

[244] C.W. Klampfl, W. Buchberger, *Anal. Bioanal. Chem.* 288 (2007) 533.

[245] H. Li, J.M. Lin, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 555.

[246] A. González-Crevillén, M. Hervás, M.A. López, M.C. González, A. Escarpa, *Talanta* 74 (2007) 342.

PARTE I

SISTEMAS SUPRAMOLECULARES PARA LA SIMPLIFICACIÓN DE OPERACIONES PREVIAS EN LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EN MUESTRAS ACUOSAS

OBJETO

La simplificación de las operaciones previas del proceso analítico es un objetivo prioritario en el ámbito del análisis químico. En este sentido, la extracción en fase sólida (SPE) es la técnica más recomendada para el análisis de muestras acuosas debido a su simplicidad y capacidad de integrar la extracción y preconcentración de los compuestos con la limpieza y conservación de la muestra.

Por ello, es interesante y objeto de parte de las investigaciones que se presentan en el bloque I de esta Tesis Doctoral el desarrollo de nuevas fases adsorbentes para SPE basadas en sistemas supramoleculares que aporten alternativas y mejoren las prestaciones de las ya existentes. Los agregados supramoleculares propuestos para alcanzar este objetivo han sido; (1) hemimicelas de dodecilsulfato formadas sobre alúmina como nueva fase adsorbente para la extracción, concentración y estabilización en fase sólida de tensioactivos de benzalconio y (2) admicelas mixtas de dodecilsulfato y tetrabutilamonio sobre alúmina como nueva fase adsorbente para la extracción, concentración y estabilización en fase sólida de distintas familias de plaguicidas.

El segundo objetivo de este bloque I es el empleo de la nueva metodología extracción líquido-líquido con disolvente supramolecular (SUPRAS) con la finalidad de integrar y simplificar las etapas previas del análisis de muestras acuosas. El SUPRAS propuesto está constituido por agregados de micelas acuosas de ácido dodecilsulfónico para la extracción, concentración y estabilización de hidrocarburos aromáticos policíclicos y tensioactivos de benzalconio. Los SUPRASs generados pueden almacenarse en viales de pequeños tamaño por lo que los requerimientos para su transporte y almacenamiento son mínimos.

El carácter multifuncional de los sistemas supramoleculares permite la extracción de contaminantes en un amplio intervalo de polaridad con elevada eficacia, dado los múltiples enlaces (hidrófobos, iónicos, π -catión, puentes de

Parte I

hidrogeno, agregados mixtos, etc.) que pueden establecerse entre los solutos y el extractante. Además tanto las hemimicelas/admicelas como los disolventes supramoleculares proporcionan microambientes donde los analitos se adsorben o solubilizan evitándose pérdidas por degradación o adsorción sobre los contenedores a lo largo del tiempo.

Hay que destacar también que los sistemas supramoleculares se adaptan a los principios de la química verde y sólo requieren para su aplicación material convencional en el laboratorio. Constituyen por tanto una alternativa interesante a los disolventes orgánicos y a los adsorbentes convencionales para su aplicación en análisis ambiental.

A continuación se presentan los resultados obtenidos de las investigaciones realizadas en este primer bloque de la Tesis Doctoral.

CAPÍTULO 1

Stability of benzalkonium surfactants on hemimicelles-based solid-phase extraction cartridges

Journal of Chromatography A 1094 (2005) 17-23.

Noelia Luque, Francisco Merino, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito

Abstract

The capability of hemimicelle-based solid-phase extraction cartridges for the preservation of organic compounds after their concentration from water samples was investigated for the first time. The approach is illustrated by studying the stability of benzalkonium homologue (C_{12} , C_{14} and C_{16}) surfactants (BASs) on monolayers of dodecyl sulphate (SDS) hemimicelles formed on alumina. The stability study included storage of cartridges at room temperature, at 4 °C and at -20 °C, during a period of up to 3 months. The influence of water matrix components was also investigated from parallel experiments using spiked distilled, river and wastewater samples. Complete recovery of BASs was obtained for all storage conditions tested. Recoveries were independent on the alkyl chain length of BAS homologues and water matrix. The SPE of BASs on the SDS hemimicelles had a strong stabilizing effect for the target compounds and their analysis can be accomplished after at least three months without the necessity of special storage conditions for cartridges. Because of the lack of data, an additional stability study was carried out for BASs in an aqueous matrix using traditional preservation methods such as acidification (pH 2)/refrigeration, addition of formaldehyde (5%)/refrigeration, and freezing (-20 °C). Only combination of chemical addition (e.g. nitric acid or formaldehyde)/refrigeration was found effective to preserve BASs in the short term (e.g. for a week), then losses up to 40 % were observed for these target compounds after a month.

Keywords: Benzalkonium; Cationic surfactant; Admicelle; Hemimicelle; Stability;

storage; SPE.

1. Introduction

Preservation of sample integrity during storage and transport constitutes an important issue in environmental monitoring programs. The preservation process encompasses both field and laboratory activities and includes a variety of techniques including chemical addition, temperature control and the choice of sampling containers [1]. Because trace enrichment is a necessary step for many pollutant analyses, an interesting alternative to traditional sample transport and storage has been to use on-site solid-phase extraction (SPE) of pollutants and stabilize organic compounds on the sorbent cartridge. In this way, environmental monitoring programs can be greatly simplified. Benefits of this strategy have been discussed for the extraction of a variety of pollutants (e.g. hydrocarbons [2], pesticides [3-7], phenols [8], dyes [9,10], non-ionic/anionic surfactants [11]) from environmental water samples, using different sorbent materials.

Hemimicelles and admicelles have been recently used as sorbent materials in SPE for the extraction of organic compounds [12-16].

-
- [1] J. Parr, M. Bollinger, O. Callaway, K. Carlberg, in: L.H. Keith (Ed.), *Principles of Environmental Sampling*, American Chemical Society, Washington, 1996. p.267 (Chapter 15).
- [2] D.R. Green, D. Le Pape, *Anal. Chem.* 59 (1987) 699.
- [3] S.A. Senseman, T.L. Lavy, J.D. Mattice, B.M. Myers, B.W. Skulman, *Environ. Sci. Technol.* 27 (1993) 516.
- [4] D. Barceló, S. Chiron, S. Lacorte, E. Martínez, J.S. Salau, M.C. Hennion, *Trends Anal. Chem.* 13 (1994) 352.
- [5] I. Ferrer, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 737 (1996) 93.
- [6] I. Liška, K. Bíliková, *J. Chromatogr. A* 795 (1998) 61.
- [7] I. Ferrer, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 161.
- [8] M. Castillo, D. Puig, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 301.
- [9] M.C. Alonso, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 889 (2000) 231.
- [10] M.C. Alonso, D. Barceló, *Analyst* 127 (2002) 472.
- [11] M. Petrović, D. Barceló, *Fresenius J. Anal. Chem.* 368 (2000) 676.
- [12] T. Saitoh, Y. Nakayama, M. Hiraide, *J. Chromatogr. A* 972 (2002) 205.
- [13] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6799.
- [14] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 76 (2004) 3878.

Hemimicelles consist of monolayers of surfactants adsorbing head down on an oppositely charged mineral oxide surface (e.g. alumina, silica, titanium dioxide, ferric oxyhydroxide). Admicelles are surfactant bilayers formed from hemimicelles, under addition of more surfactant, by interaction of surfactant hydrocarbon chains. A main characteristic of these sorbents is their versatility. On the one hand, the outer surface of the hemimicelle and admicelle is hydrophobic and ionic, respectively, providing different mechanisms for retention of organics. On the other hand, the number of surfactants commercially available is very high, so both the degree of hydrophobicity and the charge of the sorbent can be easily modified according to the nature of analytes. As a result, high extraction yields have been obtained for organic compounds of different nature such as hydrophobics [12,15], ionics [14] and amphiphilics [13,16]. Because the potential of hemimicelles and admicelles for the SPE of pollutants, their ability to preserve organic compounds after on-site extraction deserves to be researched.

This paper deals with the assessment of the performance of hemimicelles for the stabilization of benzalkonium surfactants (BASs) after their extraction from environmental water samples. These surfactants are used in large amounts as fabric softeners and disinfectants. The western European surfactants market is currently estimated at 2.2 M tonnes, of which about 9% are cationic (mainly ammonium quaternary salts) surfactants [17]. Most uses of BASs lead to their release to wastewater treatment systems where they adsorb strongly and rapidly to suspended solids and sludge [18]. As a result, levels of BASs in surface-water samples are in the low microgram-per-litre range which compels us to use a preconcentration step prior to chromatographic analysis [13,19].

[15] T. Saitoh, S. Matsushima, M. Hiraide, *J. Chromatogr. A* 1040 (2004) 185.

[16] M. Cantero, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 161.

[17] M. Deleu, M. Paquot, *C.R. Chim.* 7 (2004) 641.

[18] M.J. Scott, M.N. Jones, *Biochim. Biophys. Acta* 1508 (2000) 235.

[19] I. Ferrer, E.T. Furlong, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 2583.

Different sorbent materials have been proposed for SPE of BASs [13,19,20]. The use of nonpolar silica sorbents (e.g C18) is not recommended because the strong interaction of these cationic surfactants with the silanol groups which results in very broad elution bands. This problem can be solved using neutral polymeric sorbents, but BAS extraction recoveries are about 75% [19]. The use of sodium dodecyl sulphate (SDS) hemimicelles on alumina has proved to be a very convenient sorbent for these surfactants because both, the high BAS retention, derived from the formation of analyte:extractant mixed aggregates, and the easy BAS desorption, derived from the fast disruption of hemimicelles in the presence of organic solvents and the electrostatic repulsion between BASs and the positively charged alumina surface [13]. A similar approach, using dodecyl sulphate attached to an anion exchange resin has been recently proposed for extraction of BASs [20].

To our knowledge, no studies concerning the stability of BASs in SPE sorbents have been described. Known factors affecting BAS stability include adsorption on containers and microbiological degradation. Significant adsorption of BASs (around 90%) on glass, polypropylene and Teflon containers have been reported for filtered water samples stored at 4 °C [19], however no BAS adsorption on glass containers at pH 2 [13] or under addition of acetonitrile to make a 25% solution [18] has been detected. Studies on aerobic biodegradability of BASs, using biodegradation tests, have proved that C₁₂ and C₁₄ BAS homologues undergo complete primary biodegradation in the first week and are ultimately biodegradable (i.e. mineralised) with >80% of CO₂ release on the 11th day [21]. On the other hand, the extent of primary biodegradation found for C₁₆ BAS was only 30%, and non ultimate biodegradation was observed for this homologue [21]. Biodegradation of BASs in river water is considerably

[20] J.K. Autry, E.G. Vaught, E.D. Conte, *Microchem. J.* 80 (2005) 25.

[21] M.T. García, I. Ribosa, T. Guindulain, J. Sánchez-Leal, J. Vives-Rego, *Environ. Pollut.* 111 (2001) 169.

reduced by complexation with an anionic surfactant [22], and this behaviour is expected to be a stabilizing factor for BASs on SDS hemimicelle cartridges.

In this work, the storage stability of C₁₂, C₁₄ and C₁₆ BAS homologues on SDS hemimicelles-alumina cartridges was investigated during a period of 3 months at three different temperatures (-20 °C, 4°C and room temperature). The influence of light and matrix composition on BAS stability was also investigated. Because of the lack of data on the stability of BAS solutions treated with traditional preservation procedures, we also investigated the stability of BASs under acidification (pH 2)/refrigeration (4°C), addition of 5% formaldehyde/refrigeration (4°C), and freezing (-20°C). The final goal of this research was to contribute to the knowledge of the ability of supramolecular sorbents to stabilize organic compounds and to establish preservation conditions for BASs in environmental water samples.

2. Experimental

2.1. Chemicals and materials

Benzyltrimethylammonium bromide (BDDA), benzyltrimethyltetradecylammonium bromide (BDTA), benzyltrimethylhexadecylammonium chloride (BDHA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) surfactants were supplied by Aldrich (Milwaukee, WI). Nitric acid, ammonia (30% w/v), formaldehyde (35-40% w/v) and HPLC-grade methanol were obtained from Panreac (Madrid, Spain). Formic acid was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Bond Elut Jr. cartridge columns filled with 500 mg of acid alumina (particle size 25 µm) were obtained from Varian (Victoria, Australia).

[22] A. Utsunomiya, Y. Mori, K. Hasegawa, *Japan. J. Toxicol. Environ. Health* 44 (1998) 264.

Parte I

2.2. Stability studies

2.2.1. Sample preparation

Stability studies were carried out using spiked distilled water. For this purpose, stock standard solutions of BASs (60 mg L^{-1}) were prepared in methanol. Samples (0.25 L) in dark glass containers were spiked to obtain a final concentration of $48 \text{ }\mu\text{g/l}$ of each surfactant. Then, they were treated with different preservation methods [hemimicelle-based cartridges, acidification (pH 2)/refrigeration (4°C), addition of 5% formaldehyde/refrigeration (4°C), and freezing (-20°C)], and stored under different conditions. Duplicate samples were analysed for each experimental condition studied. Recoveries of BASs a time zero were established for each preservation method investigated and data on stability were normalised to these results. The matrix effect on the stability of BASs preconcentrated on hemimicelle-based cartridges was investigated using river and wastewater samples. River samples were taken from the Rabanales in Córdoba city. Treated sewage samples were collected from the wastewater treatment plant (WWTP) of Bailén in the south of Spain. Bailén WWTP receives ~40-50% industrial effluents (mainly from brickworks, and ceramic and olive oil industries) mixed with ~50-60% domestic wastewaters. Samples were collected in dark glass containers. Immediately they were filtered through $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ filters (Whatman GF/F, Osmonics, France) in order to remove suspended solids, and then they were spiked to obtain a final concentration of $48 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ of each surfactant. Blank river and wastewater samples were analysed prior to spiking BASs.

2.2.2. BAS preservation on hemimicelle-based SPE cartridges

Figure 1 shows the different steps followed to preserve BASs on hemimicelle-based SPE cartridges. Three kinds of experiments were designed to investigate the effect of using (a) different desiccation treatments, (b) dark conditions and (c) various temperatures, on BAS stability. The common protocol was as follows: spiked water samples were adjusted to pH 2 by the addition of

BAS preservation and determination

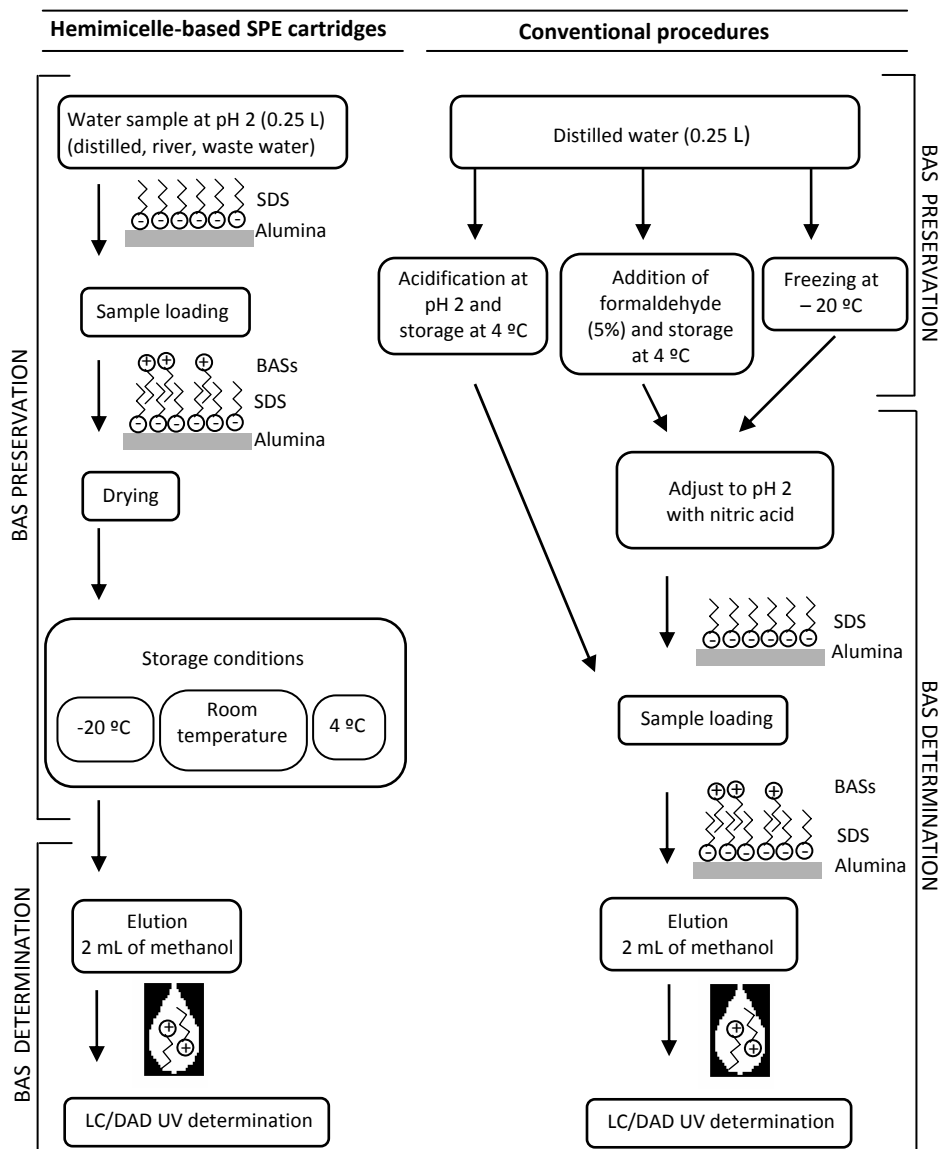


Figure 1. Scheme of the different steps followed for the preservation/determination of BAS using hemimicelles-based cartridges and conventional procedures for storage of samples.

Parte I

nitric acid to avoid the adsorption of BASs on the wall of sample containers [13]. Bond Elut Jr. cartridge columns were conditioned with 5 ml of distilled water (pH = 2). The hemimicelles were formed on the alumina by passing a 10 mL solution containing 12.5 mg of SDS at pH 2. The sorbent was not allowed to dry and then, 0.25 L of the spiked water samples were loaded on the hemimicelles using a vacuum pump (Eyela A35, Rikakikai Co., Tokyo), at a flow rate of 10 mL min⁻¹. Then, the percolated samples were subjected to the three kinds of experiments above specified: (a) Desiccation studies were carried out using the Eyela vacuum pump, for times ranging from 3 to 5 min (the time necessary to not observe water drops leaking out the cartridge) to 1 hour. Wet cartridges (i.e. without drying) were also analysed at the same times. (b) Dark conditions were obtained by initially wrapping the cartridges up with aluminium foil. Drying of the percolated samples was stopped when not water drops were leaked out the cartridge. It took about 3-5 min. The cartridges containing the preconcentrated BASs were stored at room temperature for a period of 1 month and BAS concentrations were determined weekly. Non-covered cartridges were also analysed at the same times. (c) The effect of the temperature on BAS stability was studied by using non-covered cartridges. After drying the percolated samples for 3-5 min, the preconcentrated BASs were stored at -20 °C, 4 °C and room temperature for a period of 3 months. BAS concentrations were analysed after 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 and 3 months. The cartridges at 4 °C and -20 °C were brought to room temperature for 15 min and 1 hour, respectively, prior to the determination of BASs.

2.2.3. BAS preservation using conventional procedures

The stability of spiked distilled water samples (0.25 L), contained in dark glass bottles, was also studied according to the following conventional procedures (see Figure 1):

- They were adjusted to pH 2 by the addition of concentrated nitric acid and stored at 4 °C.

- Formaldehyde was added to make a final concentration of 5% and then, the samples were stored at 4 °C.
- Samples were frozen at -20 °C

Stability measurements were performed at time zero and at each week for a month.

2.2.4. BAS determination

The sequence followed for BAS determination, after their storage under different conditions, is depicted in Figure 1. BASs stored on hemimicelle cartridges were eluted with 2 mL of methanol and aliquots of the eluate (typically 20 μ L) were injected into a LC/DAD UV system. Samples preserved by conventional procedures were adjusted at pH 2 and preconcentrated on SDS hemimicelles-based cartridges according to the procedure previously described (section 2.2.2). Then, elution with 2 mL of methanol and injection of an aliquot in the chromatograph was performed.

Liquid chromatographic analysis was made using a Waters 616 multisolvent pump and a 717 autosampler. The stationary-phase column was a 10-cm BDS Hypersil C18 column with 4.6 mm i.d. and 3 μ m particle diameter (ThermoQuest, San José, CA, USA). The mobile phase consisted in an isocratic mixture of 50 mM ammonium formate at pH 3.5 (5%) and methanol (95%), at a flow rate of 0.4 mL min⁻¹. The time required to complete the chromatogram was 20 min. Measurements were performed at 210 nm using a 996 diode array detector. External calibration was used for quantitative determination. Linearity was obtained for BAS concentrations between 2 and 40 mg L⁻¹.

3. Results and discussion

3.1. Analytical performance

Combination of SDS hemimicelle-based SPE with liquid chromatography/electrospray ionization in positive ion mode/ion trap mass spectrometry has been previously proposed by our research group for the quantification of BASs at the levels found in environmental waters (i.e. low $\mu\text{g/L}$) without interference of the major surfactants (i.e. anionic and non-ionic) and electrolytes [13]. Recoveries of BAS homologues from SDS hemimicelles were found quantitative and independent of the alkyl chain length under a wide range of experimental conditions. The strong retention of BASs was a consequence of their hydrophobic and electrostatic interactions with the surfactant coating the mineral oxide.

A simpler technique (i.e. liquid chromatography/UV detection) was used in this work to control the stability of BASs in SDS hemimicelles since its performance was enough for this purpose. BASs were monitored at 210 nm because of this wavelength provided the best signal to noise ratio in the range 210-250 nm. Recoveries of BASs from distilled water, river water and wastewater, spiked with $48 \mu\text{g L}^{-1}$ of each homologue, was nearly 100% and no interference was detected from the components of the different matrices using this detection system. No clean-up steps were required to determine benzalkonium surfactants in the environmental water samples analysed.

Calibration curves obtained for BAS homologues were linear in the concentration range $2\text{-}40 \text{ mg L}^{-1}$. These calibrations covered the whole concentration range in which the stability study was carried out taking into consideration the possibility of diminution of the concentration of BASs due to degradation. The instrumental detection limits were calculated from blank determinations by using a signal-to-noise ratio of 3. They ranged between 0.8 and 1.2 mg L^{-1} . The precision of the method was evaluated by extracting 11

independent spiked ($48 \mu\text{g L}^{-1}$) distilled water samples. The relative standard deviation was always between 4 and 6%.

3.2. Stability studies

3.2.1. Stability of BASs in water samples

The ability of traditional stabilization procedures to preserve BASs at the levels found in environmental water samples was assessed. In order to decrease microbiological degradation the strategies tested always included the use of refrigeration or freezing (see Figure 1). Adjustment of the pH solution at 2, to decrease BAS adsorption on the glass container, and addition of formaldehyde, a typical stabilizing agent for organic compounds, were used in combination with refrigeration. All experiments were carried out under dark conditions.

Figure 2 shows the results obtained for the study of the stability of BASs in spiked ($48 \mu\text{g L}^{-1}$) distilled water samples, for a period of a month, using the three conventional procedures specified in Figure 1. Combination of both chemical addition (i.e. nitric acid or formaldehyde) and decrease of the temperature was the only effective way to preserve BASs in the short term (i.e. for a week). Then progressive losses of these cationic surfactants, which were higher as the alkyl chain length increased, were found. Therefore, chemical addition/refrigeration is not a useful strategy for preservation of BASs in the medium-long term. Freezing of samples did not improve the stability of BASs suggesting that adsorption on containers was an important issue for the loss of these cationic surfactants.

This study indicates that, before using traditional preservation procedures for monitoring campaigns involving BAS, additional research should be developed to ensure that the integrity of these target compounds is kept.

Parte I

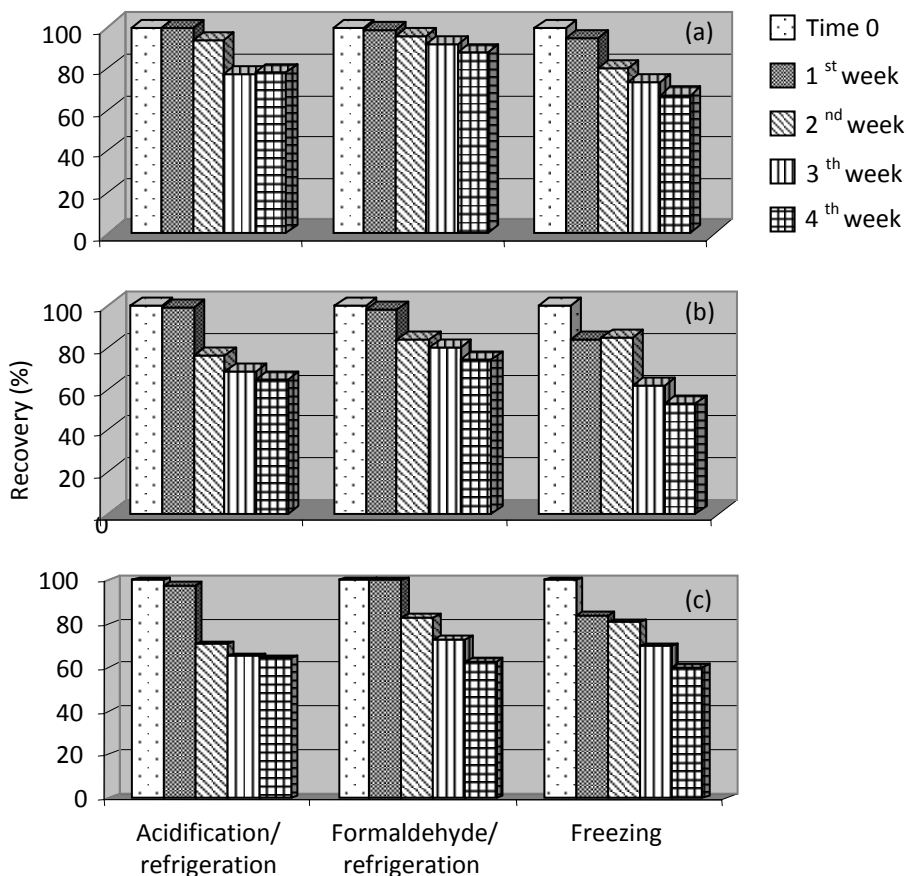


Figure 2. Recovery of (a) benzyldimethyldodecyl ammonium; (b) benzyldimethyltetradecyl ammonium and (c) benzyldimethylhexadecyl ammonium surfactants from spiked ($48 \mu\text{g L}^{-1}$) distilled water after storage under different conventional preservation methods.

Because of the convenience of using SPE cartridges to preserve pollutants in terms of transportation costs and simplicity, we focused in this research on the stability of BAS in hemimicelles and we did not try to find the optimal preservation conditions for BAS using conventional procedures.

3.2.2. Stability of BASs on hemimicelle-based SPE cartridges

3.2.2.1. *Effect of water removal and dark conditions on BAS stability.* Residual water surrounding the sorbent after sample filtration has been described to cause hydrolysis of susceptible compounds [23]. So, different desiccation treatments have been proposed to enhance the stability of analytes stored on SPE cartridges or disks [3-11]. The effect of water removal after percolation of the sample on the stability of BASs was assessed by drying the cartridges with a vacuum pump for times ranging between 3 min and 1 h. BAS recoveries decreased about 4-5% after their storage in wet cartridges at room temperature for 1 day. Partial drying of cartridges stabilized the target compounds and recoveries were quantitative after their storage at room temperature for at least a week. No effects of the drying time on BAS stability were observed. So, drying of cartridges for 3-5 min after percolation of the sample was proposed.

The storage of cartridges under dark conditions (i.e. using aluminium foil wrapped cartridges) was not necessary to achieve BAS stability. Recoveries obtained for the target compounds from aluminium foil wrapped cartridges (Table 1) and non-covered ones (top of Table 2), stored at room temperature for a month, were similar. Therefore, natural illumination in the lab (i.e. that from sunlight) did not affect BAS stability and further experiences were carried out using non-covered cartridges.

Table 1. Mean recoveries (%) of benzalkonium surfactants after storing the SDS-hemimicelles aluminium foil wrapped cartridges at room temperature.

Storage time (week)	BDDA (%)	BDTA (%)	BDHA (%)
0	100	100	100
1 st	100	98	97
2 nd	106	96	96
3 rd	98	105	96
4 th	103	95	102

[23] S.A. Senseman, T.L. Lavy, J.D. Mattice, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3064.

Adjustment of the pH of samples at 2 prevented the adsorption of BASs on the wall of the materials used in the analytical process, as it can be derived from the quantitative recoveries obtained for the target compounds under the different experimental conditions investigated.

3.2.2.2. Effect of the cartridge storage temperature on BAS stability. For this study, hemimicelle-based SPE cartridges loaded with spiked distilled water were analysed during a 3-month period. After preconcentration, the cartridges were dried and then stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and at room temperature, respectively. Before elution, cartridges at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ were kept at room temperature for a period varying between 5 min and 5 hours in order to defrost the sample and/or avoid variability problems. It was found that sorbents should be kept at room temperature before elution for at least 15 min and 1 hour when they are brought from storage conditions involving $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectively, in order to obtain quantitative and high precision results. So, these times were used through the whole experiment.

Table 2 shows the recoveries obtained for the three BAS homologues under study at the three temperatures examined. SDS hemimicelles had a high stabilizing effect on BASs; the integrity of the target compounds was kept for the whole period of time investigated, independently on the temperature used for storage of cartridges. No differences of recoveries were found for the three homologues, despite C_{12} and C_{14} are known to be more easily biodegradable than C_{16} [20]. The high stability afforded by BASs after formation of mixed aggregates with SDS is in agreement with the biodegradation reduction observed for cationic-anionic surfactant complexes in natural environments [22]. The fact that BASs are stable at room temperature for at least 3 months is an outstanding feature of the stabilizing strategy here proposed since it will permit an easy transportation of the samples preconcentrated on the cartridges to laboratories for analysis.

Table 2. Mean recoveries (%) of benzalkonium surfactants after storing the SDS-hemimicelles cartridges at different temperatures values.

Storage conditions	Storage time (week)	BDDA (%)	BDTA (%)	BDHA (%)
Room temperature	0	100	100	100
	1 st	96	97	98
	2 nd	97	101	97
	3 rd	94	97	99
	4 th	96	101	94
	8 th	101	97	94
	12 th	104	99	97
4°C	0	100	100	100
	1 st	102	98	100
	2 nd	105	104	105
	3 rd	114	103	98
	4 th	97	103	103
	8 th	103	98	96
	12 th	99	97	98
-20°C	0	100	100	100
	1 st	105	100	94
	2 nd	101	98	94
	3 rd	94	97	94
	4 th	95	95	95
	8 th	96	96	95
	12 th	94	94	95

3.2.2.3. Effect of the water matrix on BAS stability. In order to validate the preservation technique we have to take into account the character of samples since matrix components can degrade the stability of the target compounds. In previous studies using SDS hemimicelle-based SPE [13], no interference has been found for BAS determination from alkylbenzenesulphonates and nonylphenol/alcohol ethoxylates, at the concentration level found in sewage (mg L^{-1}), or from other matrix components. The stability of sorbed BAS was investigated using river and wastewater (effluent) samples. Since both kinds of

Parte I

samples contain non-ionic [16] and anionic [24] surfactants and other organic components (e.g. humic material), they were considered appropriate to this purpose. The concentration of BASs was undetectable because the practical detection limit of LC/UV (about $10 \mu\text{g L}^{-1}$) was superior to the concentrations usually found in these samples (e.g. between 0.1 and $6 \mu\text{g L}^{-1}$, [13,19]). So, spiked samples were used. The loaded cartridges were kept at room temperature and $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for a month. Measurements were carried out weekly for a month. The results obtained (Table 3) indicated that matrix components had not influence on the stability of BAS homologues, thus confirming the high resistance of SDS:BAS aggregates to degradation.

Table 3. Recoveries (%) of benzalkonium surfactants from spiked environmental water samples after storing the SDS-hemimicelles cartridges at 4°C for a month.

Time (week)	Waste water (effluent)			River water		
	BDDA (%)	BTDA (%)	BHDA (%)	BDDA (%)	BTDA (%)	BHDA (%)
0	100	100	100	100	100	100
1 st	96	100	96	98	102	94
2 nd	104	104	100	100	96	101
3 rd	101	102	95	106	97	101
4 th	103	101	94	103	105	104

4. Conclusions

From the results reported in this study, it can be concluded that SDS-hemimicelles onto alumina is a valuable sorbent to stabilize BASs after preconcentrating them from environmental samples. The recovery of BASs was found quantitative and independent of the alkyl chain length under the range of temperatures examined (from room temperature to $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$) for a period of 3 months. No complete removal of water after percolation of the sample was required for stabilization of BASs; drying the cartridges for 3-5 min with a

[24] F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, J. Chromatogr. A 1030 (2004) 109.

vacuum pump achieved the stabilization. Storage of cartridges under dark conditions was not required; natural illumination in the lab (i.e. sunlight) did not affect BAS stability.

On the contrary, conventional stabilization procedures, based on chemical addition/refrigeration, were only effective to stabilize BASs in the short term (e.g. for a week). So, the use of hemimicelle-based cartridges presents clear advantages over traditional stabilization methods. In addition to the easy shipping of the disposable SPE pre-columns and their easy storage in the laboratory, the high stability of BASs on the SDS hemimicelles makes possible to analyse the samples after several weeks without special storage conditions.

The results obtained open the possibility of using hemimicelles/admicelles as stabilizing agents in environmental monitoring programs thus extending the applicability of SPE for this purpose. Because of the high ability of these sorbents to concentrate a variety of organic compounds on the basis of different interaction mechanisms, the study on their capacity to stabilize the concentrated compounds is especially interesting in order to use them to integrate different steps of the analytical process, namely, concentration/transport/preservation/clean up. Research on this topic is being carried out by our group at the present.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge financial support from MCyT (Project BQU2002-01017). They also thank to the Bailén WWTP personnel for kindly collecting the sewage water samples.

CAPÍTULO 2

Extraction and stability of pesticide multiresidue from natural water on a mixed-mode admicellar sorbent

Journal of Chromatography A, DOI: 10.1016/j.chroma.2012.06.006

Noelia Luque, Soledad Rubio.

Abstract

The suitability of a mixed-mode sorbent made up of admicelles of sodium dodecyl sulphate (SDS) and tetrabutylammonium (TBA) to extract and preserve pesticides from river and underground water was assessed. Pesticides belonging to different structural groups (i.e. triazines, carbamates, phenylureas, anilides, chloroacetanilides, organophosphorus and phenoxyacids), most of them well-known by their instability, were selected for this purpose. Extraction of pesticides with the admicellar sorbent was optimized. Percolation of 250 mL of sample through the SPE cartridge, elution with 1 mL of methanol (neutral and basic pesticides) or 2 mL of 0.3 M NaOH:methanol (90:10 v/v) (acidic pesticides) and direct analysis of the extract by liquid chromatography/UV detection, permitted to obtain method detection limits in the range 2-60 ng L⁻¹. Their degradation on the SPE cartridges after sample percolation was investigated under a variety of experimental conditions, namely darkness, natural illumination and different temperatures (room temperature, 4°C and -20°C) for 3-months. Under darkness, most of pesticides were stable for 1 month at room temperature and 3 months at 4°C. Only atriazine and clorfenvinphos did not follow this general behaviour. No influence of matrix components on the stabilization of pesticides in the admicellar sorbent was observed. The stabilizing capability of surfactant aggregates surpassed that of C18 and black carbon and was similar to that obtained in some polymeric materials, which have the

disadvantage of requiring large volumes of solvents for analyte elution. The stabilization of pesticides on the admicellar sorbent was long enough to permit easy shipping and storage of the cartridges in monitorization campaigns.

Keywords: Pesticide multiresidue determination; pesticide preservation, natural waters, admicellar solid phase extraction; supramolecular sorbents

1. Introduction

The extensive use of pesticides in modern agriculture raises a number of environmental and health concerns. Pesticides are a common cause of soil and water pollution [1] and many of them are considered as carcinogenic [2] or endocrine disrupting chemicals [3]. Their analytical control is mandatory in different water bodies within the EU including drinking [4], groundwater [5] and surface waters [6].

Because of the spatial and/or temporal variability of pesticides in water bodies, their analysis usually requires the processing of a large number of samples. Field samples are not analysed immediately after collection, rather they are stored for variable periods of time. Problems of pesticide degradation

[1] M. Arias-Estevez, E. López-Periago, E. Martínez-Carballo, J. Simal-Gandara, J.C. Mejuto, L. García-Río, *Agric. Ecosyst. Environ.* 123 (2008) 247.

[2] K.L. Bassil, C. Vakil, M. Sanborn, D.C. Cole, J.S. Kaur, K.J. Kerr, *Can. Fam. Phys.* 53 (2007) 1704.

[3] R. McKinlay, J.A. Plant, J.N.B. Bell, N. Voulvoulis, *Sci. Total. Environ.* 398 (2008) 1.

[4] Council Directive 98/93 EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption, *Off. J. Eur. Comm.*, L330, 5.12.98, 32.

[5] Directive 2006/118/EC of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006 on the protection of groundwater against pollution and deterioration, *Off. J. Eur. Comm.*, L 372, 27.12.2006, 19.

[6] Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. *Off. J. Eur. Comm.* L348, 24.12.2008, 84.

Parte I

in water samples are well-known, major transformations being due to hydrolysis, biodegradation, photolysis and evaporation [7-13]. Strategies such as chemical addition and/or temperature control have been traditionally used to keep sample integrity until analysis. In this respect, addition of HgCl_2 or monochloroacetic buffer at 4°C has been proved to inhibit both chemical and biological degradation [14]. However, the nature of the agent required to stabilize some compounds may affect the stability of others [11,15] or the performance of the analytical procedure [16,17] and stabilization is only guaranteed for no more than 1-2 weeks. Stabilization of pesticides in water samples is also a need for the development of matrix reference materials [13].

In order to reduce effort and cost in environmental monitoring programs, strategies to avoid the transport and storage of a large number of refrigerated, high-volume water samples have been widely investigated. In this respect, solid phase extraction (SPE) has become one of the most accepted alternatives since it has the potential to combine sample treatment (e.g. extraction and concentration), preservation, easy transport and convenient lab storage [7-13,18-22]. Among available sorbents, carbon materials and

[7] C. Crescenzi, A. Di Corcia, M. Diab Madbouly, R. Samperi, *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 2185.

[8] S. Lacorte, N. Ehresmann, D. Barceló, *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 2834.

[9] C. Aguilar, I. Ferrer, F. Borrul, R.M. Marcé, D. Barceló, *Anal. Chim. Acta* 386 (1999) 237.

[10] T.L. Porter, M.A. Mohamed, H. Ali, J. Agri. *Food Chem.* 55 (2007) 204.

[11] I. Ferrer, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 161.

[12] I. Liska, K. Bilikova, *J. Chromatogr. A* 795 (1998) 61.

[13] J. Deplagne, J. Vial, V. Pichon, B. Lalere, G. Hervouet, M.C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 1123 (2006) 31.

[14] D.J. Munch, C.P. Frebis, *Environ. Sci. Technol.* 26 (1992) 921.

[15] T.C. Mueller, S.A. Senseman, K.H. Carson, A.S. Sciumbato, *J. AOAC Int.* 84 (2001) 1070.

[16] S.D. Winslow, B. Prakash, M.M. Domino, B.V. Pepich, D.J. Munch, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 1851.

[17] I. Ferrer, E.T. Furlong, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 2583.

[18] H. Sabik, R. Jeannot, E. Sauvard, *Analisis* 28 (2000) 835.

[19] L.E. Vera-Avila, J.C. Vázquez-Lira, R. Covarrubias-Herrera, M.P. García-Camacho, A.M. Nuñez-Gaytan, *Inter. J. Environ. Anal. Chem.* 77 (2000) 255.

[20] G.A. Peñuela, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 81.

highly cross-linked polymeric resins (e.g. styrene-divinylbenzene polymers) are the best choice for multiclass pesticide SPE because of their potential to simultaneously extract a wide polarity range compounds. Alkyl (C8 and C18) bonded silica provides high retention of non-polar and moderately polar compounds but it is not appropriate for polar analytes [22]. Preservation of pesticides on SPE materials is highly dependent on the structure of both analyte and sorbent. As a general rule, the stability of pesticides increases in polymeric resins compared to alkyl bonded silica and carbon materials but usually it is not longer than 1-2 weeks at room temperature. Some drawbacks associated to the use of these multiclass sorbents are the high solvent volume required to quantitatively desorb pesticides from polymeric resins (e.g. 5-15 mL) and the irreversible adsorptions occurring on carbon materials [23,24]. Frequently, organic extracts have to be evaporated to increase concentration factors, that resulting in long analysis times and losses of volatile and thermally unstable pesticides. So, the search for mixed-mode materials with highly preserving properties and easy elution for pesticides is desirable.

Hemimicelles and admicelles are mixed-mode sorbents [25,26] that have recently proved their suitability for the extraction of pesticide multiresidues from natural waters [27]. Hemimicelles consist of monolayers of ionic surfactants adsorbed head-down on an oppositely charged mineral oxide surface while the hydrocarbon chains protrude into solution with strong lateral interactions between them, which leads to tepee structures. Admicelles result

[21] C. de la Colina, F. Sánchez-Rasero, G. Dios, E. Romero, A. Peña, *Analyst* 122 (1997) 7.

[22] H. Sabik, R. Jeannot, B. Rondeau, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 217.

[23] C. Crescenci, A. Di Corcia, G. Passariello, R. Samperi, M.I. Turnes Carou, *J. Chromatogr. A* 733 (1996) 41.

[24] A. Di Corcia, M. Nazzari, R. Rao, R. Samperi, E. Sebastián, *J. Chromatogr. A* 878 (2000) 87.

[25] S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 81 (2009) 4601.

[26] A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, *Anal. Chem.* 83 (2011) 45679.

[27] A. Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 608 (2008) 61.

from the adsorption of surfactant molecules to these monolayers through interactions among the hydrocarbon chains and they closely resemble aqueous micelles. Their ability to extract analytes in a wide polarity range derives from the variety of interactions they offer. Thus, hydrophobic solutes are solubilised into the hydrocarbon region of the surfactant aggregates while polar/charged analytes may be solubilised in the surfactant head groups through electrostatic, π -cation, dipole-dipole interactions, hydrogen bonds, etc. Elution of analytes is facilitated by disruption of hemimicelles/admicelles in the presence of organic solvents or by desorption of the surfactant by pH modification. On the other hand, the ability of micelles and other surfactant aggregates to stabilize reactants, intermediates, transition states and products is well-known and it has been widely exploited in kinetic [28] and equilibrium [29] analytical methods.

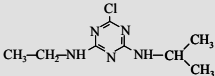
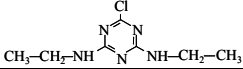
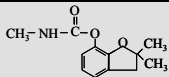
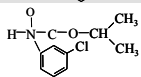
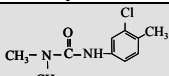
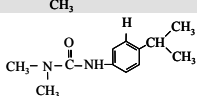
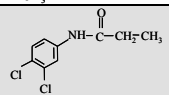
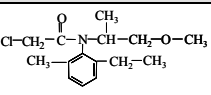
Research over the last decade dealing with hemimicelle/admicelle-based SPE sorbents was mainly related with the development of new applications (e.g. extraction of pollutants from environmental waters [30-34]), formats (e.g. use of magnetic nanoparticles as the mineral oxide [35,36]), adsorption mode (e.g. chemisorption [37]) and molecules (e.g. some ionic liquids with surfactant properties [38]). Also, theoretical studies intended for understanding the mechanisms of interaction governing the SPE process were performed [39]. However, the potential of these sorbents for stabilizing

-
- [28] M.L. Carreto, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Analyst* 121 (1996) R33
[29] S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *TrAC Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 470.
[30] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6799.
[31] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 76 (2004) 3878.
[32] S. Gangula, S.Y. Suen, E.D. Conte, *Microchem. J.* 95 (2010) 2.
[33] T. Saitoh, S. Matsushima, M. Hiraide, *J. Chromatogr. A*, 972 (2002) 205.
[34] M. Cantero, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 161.
[35] J. Li, X. Zhao, Y. Shi, Y. Cai, S. Mou, G. Jiang, *J. Chromatogr. A* 1180 (2008) 24.
[36] L. Sun, L. Chen, X. Sun, X. Du, Y. Yue, D. He, H. Xu, Q. Zeng, H. Wang, L. Ding, *Chemosphere*, 77 (2010) 1306.
[37] A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, *Anal. Chem.* 81 (2009) 9012.
[38] Q.L. Zhang, F. Yang, F. Tang, K. Zeng, K.K. Wu, Q.Y. Cai, S.Z. Yao, *Analyst* 135 (2010) 2426.
[39] A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 1823.

adsorbed solutes, thus reducing effort and cost in environmental campaigns, has been hardly explored [40].

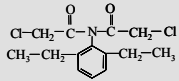
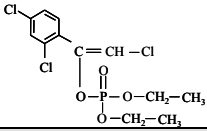
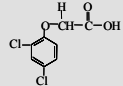
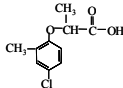
In this work, we assessed the capability of mixed sodium dodecyl sulphate (SDS)-tetrabutylammonium (TBA) admicelle-based SPE to preserve pesticides after their extraction/concentration from natural environmental waters. Pesticides known by their instability and belonging to different families and properties were selected for this purpose (Table 1). Preservation under different operation conditions was investigated. Main results are discussed below.

Table 1. Molecular structures, octanol-water partition coefficients ($K_{o/w}$) and ionization constants (pK_a) of the pesticides investigated.

Pesticide group	Compound	Structure	$\text{Log } K_{o/w}^a$	pK_a^a
<i>Bases/neutrals</i>				
Triazines	Atrazine		2.6	2.3
	Simazine		2.3	2.7
Carbamates	Carbofuran		1.7	12.3; -1.5
	Chlorpropham		3.6	13.1; -0.6
Phenylureas	Chlortoluron		2.4	14.4; 0.1
	Isoproturon		2.9	15.1; 0.8
Anilides	Propanil		3.4	13.6; -0.9
Chloroacetanilides	Metolachlor		3.0	1.4

[40] N. Luque, F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, J. Chromatogr. A 1094 (2005) 17.

Parte I

	Alachlor		3.1	1.2
Organophosphorus	Chlorfenvinphos		4.5	-
<i>Acids</i>				
	2,4-D		2.4	3.0
Phenoxyacids	Mecoprop		2.6	3.2

^aOctanol-water partition constants and ionization constant were obtained from Scifinder Scholar.

2. Experimental

2.1. Chemicals and materials

All chemicals were of analytical reagent grade. Standards of pesticides were supplied by Riedel-de-Haen (Seelze, Germany): alachlor, atrazine, simazine, carbofuran, chlorfenvinphos, chlorpropham, chlortoluron, isoproturon, mecoprop, metolachlor and propanil, and Aldrich (Steinheim, Germany): 2,4-D. Stock standard solutions for each pesticide were prepared in methanol at 2 g L⁻¹, except simazine at 0.5 g L⁻¹ and stored in glass vials at 4°C in darkness. The stock solutions were stable for at least 3 months. Hydrochloric acid, isopropanol, HPLC-grade methanol, acetonitrile, tetrahydrofuran (THF) and phosphoric acid were obtained from Panreac (Sevilla, Spain). Ultra-high-quality water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Madrid, Spain). Tetrabutylammonium chloride (TBA) was provided by Fluka (Buchs, Switzerland); sodium dodecyl sulphate (SDS) by Aldrich and sodium hydroxide (NaOH) by Merck (Darmstadt, Germany). An aqueous solution of TBA was prepared at 0.01 M. Bond Elut Jr-AL-A cartridge columns filled with 500 mg of alumina were obtained from Varian (Victoria, Australia). Acetyl-cellulose membrane filters 0.45 µm HA were supplied by Millipore (Bedford, MA, USA).

2.2. Sample collection and preparation

Extraction and stability studies were carried out using different types of waters (distilled, river and underground). River samples were taken from the Rabanales stream in Córdoba (South of Spain) and underground waters were drawn from two wells also located in Córdoba. All the samples were collected in amber glass containers and filtered through 0.45 μm acetyl-cellulose filters in order to remove suspended solids. Calcium in the samples was removed by precipitation with SDS [$\text{Ca}(\text{DS})_2$, $K_{\text{sp}} = 2.14 \times 10^{-10}$]. For this purpose, increasing volumes (at increments of 0.1 mL) of a 0.1 M SDS solution was added to the sample until the start of turbidity. Then, the calcium content in the sample was calculated from the minimum SDS concentration needed for precipitation and the corresponding volume of 0.1 M SDS solution required to reach a $[\text{SDS}]/[\text{Ca}^{+2}]$ molar ratio of 2 was added. The precipitate formed was separated from the sample by centrifugation at 3000 rpm for 10 min. Samples were acidified at pH 2 with hydrochloric acid and stored at 4°C in dark until their use.

2.3. Extraction and preservation of pesticides on TBA-SDS admicelle-based SPE cartridges

Solid phase extraction was performed using a Supelco Visiprep (Belefonte, PE, USA) vacuum manifold attached to a Rikakikai Eyela A35 (Tokyo, Japan) vacuum pump. The vacuum pressure was set at -15 kPa. Alumina cartridges were conditioned with 10 mL of 0.01 M hydrochloric acid. Then, hemimicelles were formed on the alumina by passing a 25 mL solution containing 40 mg of SDS at pH 2 and finally 250 mL of the pre-treated water, containing 30 μg of TBA, were loaded on the cartridges at a rate in the range 0.6-0.8 mL min^{-1} . The sorbent was dried under vacuum until no dripping drops were observed (around 5 minutes). In preservation studies, the cartridges were stored under different experimental conditions (e.g. natural illumination, darkness, several temperatures, etc) before analysis. Elution of pesticides was performed in two steps. Firstly, basic and neutral pesticides were eluted with 1 mL of THF and then, acid pesticides were eluted with 2 mL of 0.3 M

Parte I

NaOH:methanol (90:10 v/v) solution. Aliquots of each eluate (20 μL) were analyzed by liquid chromatography-photodiode array detection (PAD).

2.4. Pesticides determination

The chromatographic system used (LC-PAD UV, Water, Milford, Massachusetts) consisted of a 1525 binary pump, a 717 autosampler and a 996 photodiode array detector. The stationary-phase column was a 25 cm Kromasil- C_8 with 4 mm internal diameter and 5 μm particle diameter (Análisis Vínicos, Tomelloso, Spain). The mobile phase used for the separation of basic/neutral pesticides consisted of water (A) and acetonitrile (B) at 0.9 mL min^{-1} . The gradient profile during separation was: isocratic conditions (90%A-10%B) for 1 min and then successive linear gradients in which B was incremented as follows; 1-5 min, from 10 to 25%; 5-11 min, from 25 to 36.5%; 11-30 min, from 36.5 to 37.5%; 30-35 min, from 37.5 to 43%; 35-50 min, from 43 to 60%; 50-55 min, from 60 to 70%. For the separation of acid pesticides, water containing 0.015% of phosphoric acid (A) and acetonitrile (B) was employed at a flow-rate of 0.9 mL min^{-1} . The gradient used was: isocratic conditions (90%A-10%B) for 1 min: linear gradient from 10%B to 45%B for 6 min and isocratic conditions (55%A-45%B) for 18 min. Detection and quantitation of simazine, atrazine, metolachlor and alachlor was performed at 225 nm, 2,4-D and mecoprop at 229 nm, chlorpropham at 239 nm, chlortoluron, isoproturon and chlorfenvinphos at 245 nm, propanil at 252 nm and carbofuran at 280 nm. External calibration of standards in methanol was used for quantitative determination.

3. Results and discussion

3.1. Sorbent description and selection of optimal extraction conditions

Dodecyl sulphate adsorbs onto alumina at pH below the point of zero charge ($\text{pzc} = 8.5$) of the mineral oxide. At $\text{pH} \leq 2$ the alumina reaches the maximal positive charge density onto its surface as OH_2^+ , that permitting the adsorption of great amounts of the surfactant. A picture of the adsorption isotherm of pure SDS onto alumina and the different types of surfactant

aggregates formed according to the amount of SDS adsorbed is depicted in Figure 1A.

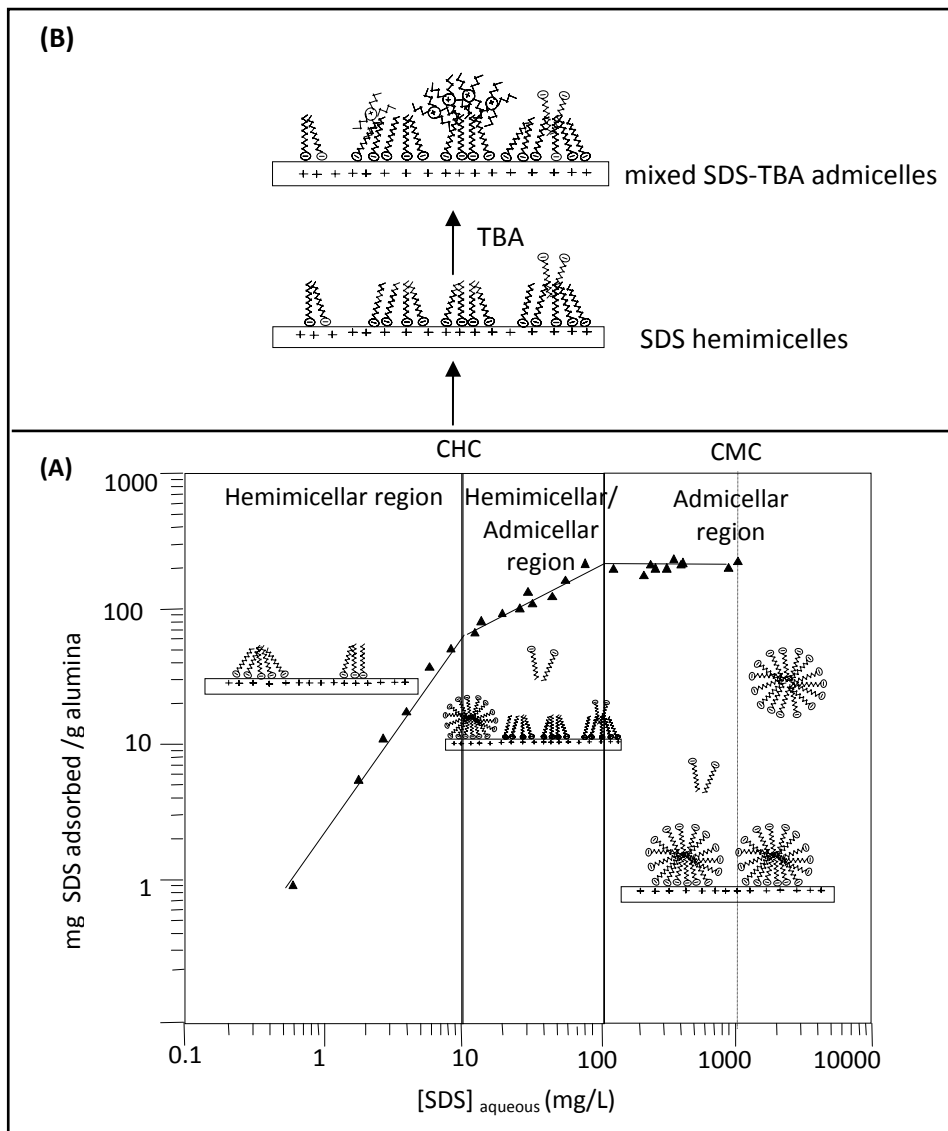


Figure 1. (A) Adsorption isotherm of SDS onto alumina and structure of the different sorbents produced as a function of the amount of surfactant. (B) Schematic of the formation of SDS-TBA mixed admicelles from SDS hemimicelles at the hemimicellar critical concentration (CHC).

Parte I

All these sorbents offer mixed-mode mechanisms for solubilisation of solutes, namely dispersion interactions in the hydrocarbon chain and ionic interactions in the polar group or the uncovered alumina. Hemimicelles, although predominantly hydrophobic, always contain patches of admicelles.

Most of the pesticides under study (Table 1) were neutrals at pH 2, so the major interactions expected to drive adsolubilization into the pure SDS surfactant aggregates were hydrophobic. Having into account that all of them have aromatic rings in their structure, mixed admicelles containing ammonium groups were expected to increase extraction yields because of their ability to establish π -cation interactions with pesticides. Based on these considerations, the capability to extract pesticides of sorbents made up of 80 mg SDS/g alumina (i.e. hemimicelles at the critical hemimicellar concentration, CHC, Figure 1A) and different amounts of tetrabutylammonium, was assessed. A likely structure of these sorbents is depicted in Figure 1B; first, all the alumina surface was covered by SDS and then mixed SDS-TBA admicelles were formed under addition of the ammonium quaternary salt. This figure, although some hypothetical, expresses the main interactions expected to be responsible of the retention of pesticides on the sorbent.

Experiments to assess adsolubilization were carried out by passing a 25 mL aqueous solution containing $10 \mu\text{g L}^{-1}$ of each pesticide at pH 2 through the different sorbents. Table 2 shows the results obtained. Quantitative retention was achieved for most of the pesticides on pure SDS hemimicelles, however, phenylureas required the presence of TBA to be quantitatively extracted. Carbofuran was only partially retained in all the sorbents investigated. According to these results, the sorbent selected for preservation studies was made of 80 mg of SDS and 6×10^{-2} mg of TBA/g alumina.

Breakthrough volumes were determined by passing increasing volumes (25-500 mL) of hydrochloric acid aqueous solutions (10^{-2} M), containing 100 ng of each of the pesticides, through the mixed SDS-TBA sorbent, and determining the concentration of each analyte in the eluates. The flow rate for sample

percolation was below 1 mL min^{-1} . Breakthrough was considered to occur when the recovery decreased about 5%. Quantitative retention on the sorbent was observed for triazines, anilides, chloroacetanilides, organophosphorus, phenoxyacids and chlorpropham at the maximal percolated sample volume (500 mL). Breakthrough problems were only detected for carbofuran (e.g. recovery of $22 \pm 1\%$ using 250 mL of sample) and phenylureas (e.g. recoveries of $34 \pm 1\%$ for chlortoluron and $51 \pm 3\%$ for isoproturon using 100 mL of sample).

Table 2. Percentage of adsolubilization (^amean value \pm standard deviation) of ^bpesticides on ^cSDS-TBA admicelles as a function of TBA concentration.

<i>Bases/Neutral</i>	mg TBA/ g alumina			
	0	6×10^{-3}	0.06	0.6
Triazines				
Atrazine	97 \pm 2	99 \pm 1	98 \pm 1	99 \pm 1
Simazine	100 \pm 1	98 \pm 3	104 \pm 2	100 \pm 1
Carbamates				
Carbofuran	30 \pm 2	45 \pm 2	50 \pm 3	40 \pm 1
Chlorpropham	98 \pm 1	97 \pm 1	99 \pm 2	100 \pm 2
Phenylureas				
Chlortoluron	60 \pm 1	80 \pm 1	86 \pm 1	78 \pm 1
Isoproturon	70 \pm 3	86 \pm 1	98 \pm 2	87 \pm 1
Anilides				
Propanil	93 \pm 1	99 \pm 2	97 \pm 1	99 \pm 3
Chloroacetanilides				
Metolachlor	98 \pm 2	97 \pm 1	100 \pm 2	97 \pm 1
Alachlor	100 \pm 1	100 \pm 2	103 \pm 4	100 \pm 2
Organophosphorus				
Chlorfenvinphos	99 \pm 2	100 \pm 1	98 \pm 3	99 \pm 4
Acids				
Phenoxyacids				
2,4-D	99 \pm 1	100 \pm 2	101 \pm 2	99 \pm 1
Mecoprop	98 \pm 1	101 \pm 1	103 \pm 1	101 \pm 1

^a n = 3

^b 25 mL of distilled water ($10 \mu\text{g L}^{-1}$ each pesticide)

^c SDS (80 mg/g alumina)

Parte I

Several organic solvents (methanol, isopropanol and tetrahydrofuran) were tested as eluents for desorption of pesticides. Basic and neutral pesticides were quantitatively eluted in 1 mL of THF and 2 mL of methanol or isopropanol while the elution of acid pesticides was negligible in all these solvents. The stronger solvent (THF, 1 mL) was chosen as eluent of basic and neutral pesticides. Quantitative elution of mecoprop and 2,4-D was achieved using 2 mL of 0.3 M NaOH-methanol (90:10 v/v). Under these experimental conditions, the charge of the alumina surface changed from positive to negative which caused disruption of the TBA-SDS aggregates. The presence of methanol in the eluent solution was mandatory to effectively desorb acidic pesticides. Methanol extracts contained high concentrations of TBA and SDS monomers but their prompt elution from the chromatographic column prevented them from interfering in the chromatographic determination of pesticides; both retention time or peak areas were identical to those obtained from standards in the absence of TBA and SDS. The flow rate required for quantitative desorption of pesticides under the optimal established conditions should be below 2 mL min^{-1} , otherwise the recoveries decreased.

Calcium in the samples caused precipitation of SDS in the admicellar sorbent and consequently, blocking of the cartridge during sample percolation. Precipitation of calcium with SDS [$\text{Ca}(\text{DS})_2$] is a well known phenomenon and it has been widely reported in the literature [41]. Calcium was removed in the sample before SPE by adding SDS at stoichiometric amounts according to the procedure detailed in section 2.2. Because of the very low solubility of this precipitate [$K_{\text{sp}} = 2.14 \times 10^{-10}$], residual SDS did not affect admicelle formation or extraction efficiency. The effect of matrix components on recoveries was assessed by comparison of the results obtained from 250 mL of spiked ($0.2 \mu\text{g L}^{-1}$) distilled, river and groundwater (Table 3).

[41] A. Zapf, R. Beck, G. Platz, H. Hoffmann, Adv. Colloid Interface Sci. 100 –102 (2003) 349.

Table 3. ^aMean recoveries (%) and standard deviation of pesticides from 250 mL spiked ($0.2 \mu\text{g L}^{-1}$) distilled and natural waters using mixed TBA-SDS admicellar-based SPE.

Compound	Water Sample		
	Distilled	River	Underground
Atrazine	99±1	97±4	103±4
Simazine	102±2	98±3	101±4
Carbofuran	22±1	24±3	20±1
Chlorpropham	106±2	98±4	101±3
Chlortoluron	24±2	21±1	26±2
Isoproturon	38±3	39±2	40±4
Propanil	103±5	96±4	99±3
Metolachlor	104±1	98±6	96±2
Alachlor	98±1	102±3	99±1
Chlorfenvinphos	98±5	100±7	100±3
2,4-D	99±3	104±4	97±1
Mecoprop	98±1	102±4	97±3

^a n = 3.

It was checked from previous analysis that natural waters were free from target compounds. Recoveries for fortified river and groundwater were similar to those found for distilled water, that indicating that no adsorption of the pesticides on the $\text{Ca}(\text{DS})_2$ precipitate occurred and matrix components did not affect the extraction capability of TBA-SDS admicelles.

3.2. Analytical performance

Liquid chromatography/UV detection was used for the determination and control of the stability of pesticides in TBA-SDS. Table 4 shows the figures of merit obtained for calibration curves run using standard solutions of basic and neutral pesticides and acid pesticides in methanol. Correlation between peak areas and pesticide concentrations was determined by linear regression and the coefficients of determination were in the range 0.9991-0.9999, indicating good fits. Instrumental detection (LODs) and quantitation (LOQs) limits were calculated from the lower concentrations of standards giving a signal-to-noise of 3 and 10, respectively. Method LODs and LOQs were obtained from the

Table 4. Analytical figures of merit of the proposed method.

Analytes	Linear range for instrumental calibration ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intercept $\pm s^a$ ($\times 10^4$)	Slope $\pm s^a$ ($\times 10^4$)	r	Method detection limits ^b (ng L^{-1})	Method quantitation limits ^b (ng L^{-1})	^c AA-EQS (ng L^{-1})
Simazine	2.5-2000	-1.9 \pm 0.2	30.2 \pm 0.1	0.9999	3	10	1000
Atrazine	2-2000	0.06 \pm 0.59	27.3 \pm 0.2	0.9995	2	8	600
Carbofuran	10-3000	0.008 \pm 0.058	1.81 \pm 0.05	0.9991	60	180	-
Chlorpropham	5-2000	-0.2 \pm 0.2	10.2 \pm 0.2	0.9995	6	18	-
Chlortoluron	2.5-2000	-0.04 \pm 0.2	11.8 \pm 0.2	0.9995	13	40	-
Isoproturon	2-2000	-0.3 \pm 0.3	12.3 \pm 0.3	0.9994	7	30	300
Propanil	5-2000	-0.3 \pm 0.2	11.7 \pm 0.2	0.9998	6	20	-
Metolachlor	15-3000	-0.07 \pm 0.10	6.4 \pm 0.1	0.9998	19	60	-
Alachlor	20-3000	-0.2 \pm 0.1	5.09 \pm 0.05	0.9999	26	80	300
Chlorfenvinphos	10-3000	0.03 \pm 0.1	3.1 \pm 0.07	0.9997	13	40	100
2,4-D	2-2000	-0.2 \pm 0.2	4.9 \pm 0.1	0.9992	3	10	-
Mecoprop	2-2000	-0.03 \pm 0.13	5.56 \pm 0.09	0.9999	3	8	-

^a Standard deviation.

^b Calculated from instrumental detection and quantitation limits, recoveries and concentration factors using 250 mL of water samples.

^c Annual average-environmental quality standards [6].

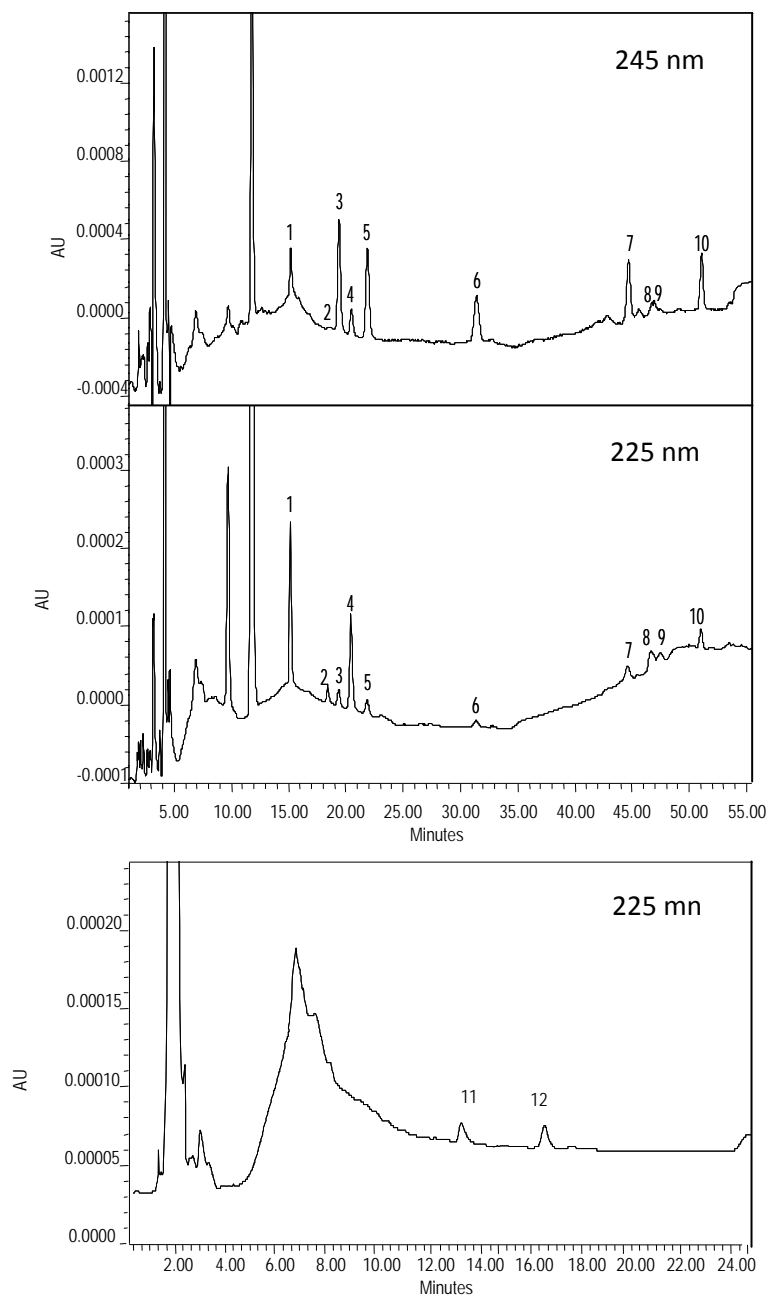


Figure 2. Chromatograms obtained from a river water sample fortified with $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$ of each pesticide. Peak identification: (1) simazine, (2) carbofuran, (3) chlortoluron, (4) atrazine, (5) isoproturon, (6) propanil, (7) chlorpropham, (8) metolachlor, (9) alachlor, (10) chlorfenvinfos, (11) 2,4-D and (12) mecoprop.

Parte I

respective instrumental limits taking into account the recoveries and concentration factors from the extraction of 250 mL of sample and elution with 1 mL (neutral/basic pesticides) or 2 mL (acid pesticides) of solvent. Method LOQs for pesticides regulated in the Directive 2008/105/EC [6] were lower than the environmental quality standards established.

The precision of the method was evaluated by extracting 11 independent fortified ($0.2 \mu\text{g L}^{-1}$) river and underground water samples. The values, expressed as relative standard deviation (RSD), were between 1 % and 6% for all the analytes.

Figure 2 depicts the chromatograms obtained from a spiked ($0.2 \mu\text{g L}^{-1}$) river water sample. No interferences were detected for any of the target pesticides under the recommended operation conditions (see section 2.4).

3.3. Stability studies of pesticides on mixed SDS-TBA admicelle-based SPE cartridges

Figure 3 shows the general procedure followed to study the capability of SDS-TBA cartridges to stabilize pesticides under a variety of experimental conditions. Cartridges were stored for three months at three temperatures (i.e. room, 4°C and -20°C) and the influence of darkness and natural illumination was evaluated. The effect of matrix components, well-known to affect pesticide stability, was investigated using river and underground water. In order to avoid hydrolysis of the pesticides in the residual water remaining in the cartridges after sample percolation, they were subjected to desiccation using a vacuum pump for 3-5 minutes.

Table 5 shows the results obtained for cartridges stored into transparent and opaque bags at room temperature for three months. Photolysis clearly caused degradation of triazines and chlorfenvinphos after storage for two weeks. The results obtained for the rest of pesticides under darkness and natural light were similar. So, the use of opaque bags is recommended as

admicellar cartridges are stored more than 1-week before analysis to avoid the degradation of the light-sensitive pesticides. The strong stabilising capability of surfactant aggregates allowed the pesticides to keep unaltered for 1 (triazines, phenylureas, organophosphorus), 2 (carbamates, anilides) or 3 (chloroacetanilides, phenoxyacids) months at room temperature under darkness (Table 5). So, shipping of samples from the site to the lab can be greatly facilitated.

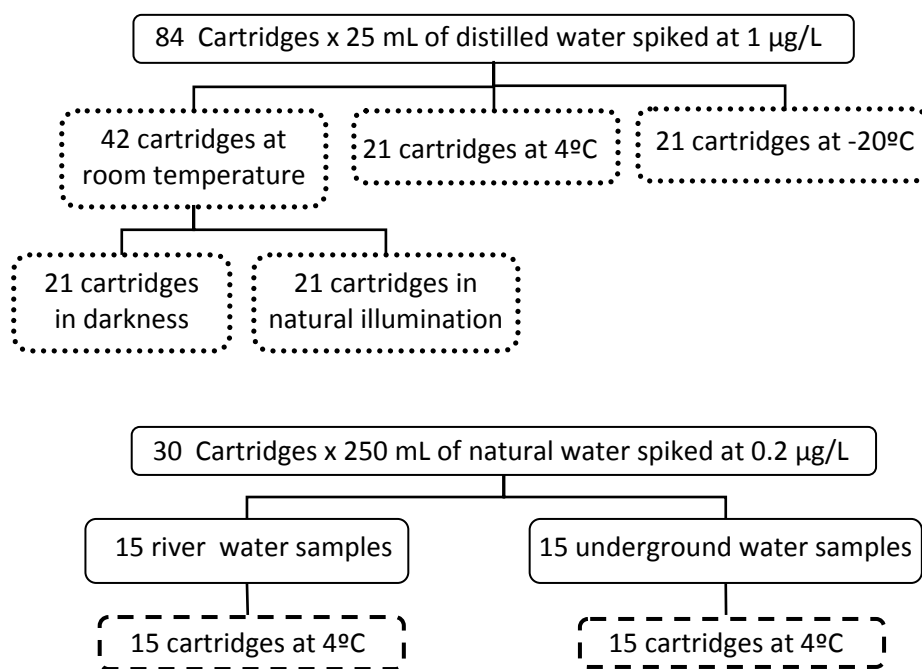


Figure 3. Experimental conditions for cartridges storage in the study of stabilization of pesticides in SDS-TBA admicellar sorbents.

The effect of decreasing the temperature (i.e. 4°C and -20°C) on the degradation of the more instable pesticides (i.e. triazines, phenylureas, organophosphorus, carbamates and anilides) was assessed for three months.

Table 5. Mean^a recoveries^b (%) and standard deviation of pesticides from 25 mL spiked (1 µg L⁻¹) distilled water after storage on mixed TBA-SDS admicellar-based SPE cartridges at room temperature under natural light and darkness conditions for 3 months.

Structural group	Pesticide	Storage conditions												
		Darkness						Natural light						
		Storage time (weeks)						Storage time (weeks)						
0	1 st	2 nd	3 rd	4 th	8 th	12 th	1 st	2 nd	3 rd	4 th	8 th	12 th		
Triazines	Simazine	100±3	99±3	97±4	95±4	89±6	12±1	5±1	98±4	70±2	43±1	35±2	10±1	6±1
	Atrazine	100±4	100±2	88±5	94±4	94±6	8±1	3±1	93±6	59±2	31±2	22±1	8±1	2±1
	Carbofuran	100±10	112±11	106±10	102±10	106±4	96±4	80±8	106±6	104±4	78±10	88±2	80±4	84±4
Carbamates	Chlorpropham	100±2	100±1	99±4	107±4	95±5	109±4	92±8	101±4	101±4	110±2	116±1	109±6	96±7
Phenylureas	Chlortoluron	100±8	108±7	92±6	100±7	97±1	83±10	70±2	106±8	94±4	97±9	101±4	87±8	73±3
	Isoproturon	100±7	107±5	97±7	107±6	102±1	84±11	78±4	105±4	99±4	103±7	108±2	88±8	79±3
Anilides	Propanil	100±4	103±3	95±6	109±2	106±1	98±8	87±2	101±4	95±4	102±5	103±2	96±4	90±2
Chloro-acetanilides	Metolachlor	100±5	97±1	107±3	112±5	112±3	104±8	100±5	100±3	105±5	108±1	106±4	108±1	98±4
	Alachlor	100±5	106±1	96±5	109±7	106±5	110±5	95±1	101±3	99±5	111±2	102±2	112±7	98±2
Organophosphorus	Chlorfenvinphos	100±3	93±1	93±3	101±5	92±3	7±2	0	98±8	68±10	36±10	34±4	11±2	6±2
Phenoxy-acids	2,4-D	100±7	88±2	95±4	88±6	104±3	91±4	99±3	96±5	92±3	91±4	102±4	97±2	92±2
	Mecoprop	100±8	80±3	90±3	97±4	95±1	101±3	92±3	97±6	91±1	100±3	97±2	98±4	92±3

^a n = 3; ^b Normalized extraction rates.

Table 6 shows the results obtained. Refrigeration completely stabilized most of the target compounds and greatly increased the stability of atrazine and clorfenvinphos compared to room temperature. Complete stabilization of these pesticides for three months was achieved by storing the cartridges at -20°C.

Table 6. Mean^a recoveries^b (%) and standard deviation for pesticides from 25 mL spiked (1 µg L⁻¹) distilled water after storage on mixed TBA-SDS admicellar-based SPE cartridges at different temperatures.

Structural group	Pesticide	Storage conditions						
		4°C			-20°C			
		Storage time (weeks)			Storage time (weeks)			
		0	4 th	8 th	12 th	4 th	8 th	12 th
Triazines	Simazine	100±3	102±3	97±5	97±3	109±1	102±4	100±3
	Atrazine	100±4	104±3	74±3	67±4	104±2	107±3	105±4
Carbamates	Carbofuran	100±10	102±8	102±2	110±6	98±6	100±6	104±4
	Chlorpropham	100±2	107±5	105±7	98±4	111±1	108±4	94±8
Phenylureas	Chlortoluron	100±8	103±1	101±1	105±6	100±8	108±5	97±5
	Isoproturon	100±7	115±4	100±1	103±1	108±2	101±4	107±7
Anilides	Propanil	100±4	106±1	109±1	103±1	103±1	100±4	99±4
Organophosphorus	Chlorfenvinphos	100±3	102±4	83±2	80±5	105±2	104±1	100±4

^a n = 3.

^b Normalized extraction rates.

The presence of matrix components on the stability of pesticides was investigated by extracting river and underground water and storing the cartridges at 4°C (Figure 3). Table 7 shows the results obtained. Similarly to those found for distilled water (see Table 6) only atrazine and clorfenvinphos showed some degradation under refrigeration conditions, which indicated that the possible matrix components adsorbed in the cartridges did not affect pesticide stability.

Comparison of the stability of the target pesticides in different sorbent materials is shown in Table 8. Data for chlorpyrifos were also included because few studies have been previously reported for the structurally analogous chlorfenvinphos, the selected pesticide in this study. Comparison from the data

Parte I

in Table 8 becomes a bit difficult because different periods of time were investigated in the different reported studies. However, on the whole, SDS-TBA admicelles were clearly superior to C18 or black carbon sorbents in terms of stabilization at any temperature while they were similar to that in polymeric materials, the last one with the disadvantage of the need of higher solvent volume for their elution [23,24]. The ability of micelles and other surfactant aggregates to stabilize compounds has been widely used in kinetic and equilibrium analytical methods, as it was stated in the Introduction. Although there is not a general mechanism to account for this stabilization, the microenvironments in the aggregates are expected to protect analytes from external conditions which cause their degradation.

Table 7. Mean^a recoveries^b (%) of pesticides from 250 mL of spiked (0.2 µg L⁻¹) natural water after storage on mixed TBA-SDS admicelles-based SPE cartridges at 4°C for 3 months.

Structural Group	Pesticide	River water				Underground water			
		Storage time (months)							
		0	1 st	2 nd	3 rd	0	1 st	2 nd	3 rd
Triazines	Simazine	100±4	105±1	98±2	93±6	100±4	91±6	97±1	101±9
	Atrazine	100±3	99±4	77±6	63±4	100±6	102±5	80±4	60±5
Carbamates	Carbofuran	100±5	107±1	96±3	100±5	100±6	93±2	101±6	104±4
	Chlorpropham	100±2	99±4	101±3	97±6	100±2	98±4	99±4	99±6
Phenylureas	Chlortoluron	100±3	100±5	90±5	97±3	100±5	100±3	100±8	110±3
	Isoproturon	100±4	98±2	102±4	101±6	100±6	97±6	101±5	98±6
Anilides	Propanil	100±8	99±9	101±7	98±10	100±7	93±10	93±5	105±7
Chloro-acetanilides	Metolachlor	100±7	98±2	96±8	105±8	100±8	104±10	104±10	100±5
	Alachlor	100±4	99±5	102±3	97±7	100±3	98±4	101±9	96±2
Organo-phosphorus	Chlorfenvinphos	100±8	103±8	85±1	78±2	100±3	99±4	86±8	80±6
Phenoxyacid	2,4-D	100±4	98±6	91±5	105±9	100±9	95±9	102±4	105±9
	Mecoprop	100±5	103±6	100±2	98±4	100±6	98±7	99±4	101±5

^a n = 3.

^b Normalized extraction rates.

Table 8. Comparison of the stability of the target pesticides in different sorbent materials.

	Room temperature		4°C		-20°C		
	C18	Black carbon	Black carbon	Polymeric carbon	C18	Polymeric carbon	SDS-TBA admicelles
Simazine	*3 m [42]	*3 m [9] *1 m [18] *10 d [10] *7 w [12]	*3 m [42]	*3 m [9] *2 m [18] *7 w [12]	*3 m [42]	*2 m [18] *3 m [9]	*3 m
Atrazine	<1m [42]	*1 w [7] <1w [18] *10 d [10] *7 w [12]	2 m [42]	*3 m [9] *1 w [18] *1 y [13] *7 w [12]	1 m	*3 m [42] *1 m [18] *3 m [9] *1 y [13]	*3 m
Carbofuran	*1 w [7]	*1 w [7] <1 w [9] *7 w [12]	<3 d [44]	*3 m [9] *7 w [12]	<3 d [44]	*3 w [7] *3 m [5]	*3 m
Chlorpropham							
Chlortoluron							
Isoproturon							
Metolachlor	<1 m [42]	*2 w [43] <1 w [18] *3 m [9] *10 d [10] *10 d [10]	1 m [42]	*1 m [18] *1 y [13]	1 m [42]	1 m [18] *3 m [9] *3 m [9]	*3 m
Alachlor							
Propanil	*1 w [7]	*1 w [7]					
Chlorfenvinphos	2 w [8]	2 w [8]					
Chlorpyrifos	<1 w [7] 2 w [8]	*1w [7] *10 d [10]	*3 m [8]				
2,4-D	*1 w [7]	*1 w [7]					
Mecoprop							

* Maximum time investigated,^a Data not shown in the manuscript, y: year; m: months; w: weeks; d: days

4. Conclusions

A sorbent made up of admicelles of SDS and TBA has been proved to extract and stabilize pesticides belonging to different structural groups from river and underground waters. The major benefits of this sorbent compared to other previously reported SPE-sorbents are: (a) *the variety of interactions it offers* (e.g. dispersion, ionic, hydrogen bonding), which makes it suitable for the extraction of pesticides in a wide polarity range; (b) *its multiligand capacity*, which increases extraction efficiency (recoveries for the more polar pesticides were similar to those obtained with highly cross-linked polymeric resins and much better than alkyl (C8 and C18) bonded silicas); (c) *the easy disruption of admicelles* in the presence of organic solvents or by pH modification, which allows the desorption of analytes using a low volume of eluent. In this way, low detection limits (2-60 ng L⁻¹ for the target pesticides) are obtained without evaporation of the extracts, analyses are speeded up and volatilization of some pesticides is avoided. On the contrary, styrene–divinylbenzene polymers require high solvent volumes to quantitatively desorb pesticides and irreversible adsorptions occur on carbon materials [23,24]; (d) *High capability to stabilize pesticides*, this being clearly superior to C18 or black carbon sorbents and similar to polymeric materials.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge financial support from Spanish MICINN (Project CTQ2011-23849), the Andalusian Government (Junta de Andalucía, Spain, Project P09-FQM-5151) and FEDER. Noelia Luque is also grateful to Spain's MEC for award of doctoral fellowships (Grants AP2004-3644).

[42] E. Martínez, D. Barceló, *Chromatographia* 42 (1996) 72.

[43] A. Di Corcia, M. Marchetti, *J. Chromatogr.* 541 (1991) 365.

[44] W.G. Johnson, T.L. Lavy, S.A. Senseman, *J. Environ. Qual.* 23 (1993) 1027.

CAPÍTULO 3

Use of coacervates for the on-site extraction/preservation of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzalkonium surfactants

Analytica Chimica Acta, 584 (2007) 181-188.

Noelia Luque, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito

Abstract

The suitability of coacervates for the preservation of organic pollutants after their extraction from water samples was investigated for the first time. Acid-induced sodium dodecanesulfonic acid (SDSA) micelle-based coacervates were selected for this purpose. Their capacity to preserve benzalkonium homologue (C_{12} , C_{14} and C_{16}) surfactants (BASs) and different polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) [benzo(a)pyrene (BaP), benzo(b)fluoranthene (BbF), benzo(k)fluoranthene (BkF), benzo(ghi)perylene (BghiP), benzo(a)anthracene (BaA) and indene(1,2,3-c-d)pyrene (IP)] was investigated. BASs and PAHs were efficiently extracted by the coacervate by formation of mixed aggregates and hydrophobic interactions, respectively. Their stability into the coacervate was investigated under three temperature conditions (room temperature, 4°C and -20°C) and two hydrochloric acid concentrations (3.75 M and 4.2 M), which was used to induce coacervation. No losses were observed during at least 3 months at the different experimental conditions tested. The increase of the temperature up to 35°C for a month did not affect the stability of the target compounds. No influence of the water matrix (distilled, river or wastewater) on the stabilization of BASs and PAHs was observed. The high-stabilizing capacity of the coacervate for the target compounds and its low volume make easy the transport and storage of analytes.

Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbons; Benzalkonium surfactants; Preservation; Micelle-based coacervates; Monitoring programs.

1. Introduction

European directives and the transpositions in the different countries bind the member states to establish vigilance and control of pollution in the aquatic environment to ensure that water quality standards are met. So, sampling and analysis of priority pollutants is periodically carried out. Owing to the low concentrations they are found, the collection of high-volume water samples is usually required to reach suitable detection limits after an appropriate preconcentration step. As a result, the reduction of effort and cost for transport and preservation of such high-volume samples has become an important topic in environmental monitoring programs.

Solid phase extraction (SPE) using a variety of sorbents has been proposed in the last few years for the preservation of pollutants [1-8]. The use of this strategy generally avoids the necessity of using large refrigerated transport units and because of the stabilizing effect of sorbents, it permits long holding times before pollutant determination. In addition, SPE permits the on-site simultaneous extraction/preconcentration of the target compounds, so it has become a valuable tool for monitoring programs.

Coacervates made of supramolecular assemblies are being increasingly used for the liquid-liquid extraction of organic pollutants [9]. They are water

-
- [1] W.G. Johnson, T.L. Lavy, J.A. Senseman, *J. Environ. Qual.* 23 (1994) 1027.
 - [2] M. Castillo, D. Puig, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 301.
 - [3] I. Ferrer, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 161.
 - [4] I. Liška, K. Bíliková, *J. Chromatogr. A* 795 (1998) 61.
 - [5] M. Petrovic, D. Barceló, *Fresenius J. Anal. Chem.* 368 (2000) 676.
 - [6] M.C. Alonso, D. Barceló, *Analyst* 127 (2002) 472.
 - [7] E. Turiel, A. Martín-Esteban, G. Bordin, A.R. Rodríguez, *Anal. Bioanal. Chem.* 380 (2004) 123.
 - [8] N. Luque, F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1094 (2005) 17.
 - [9] S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 470.

immiscible liquid phases produced in colloidal solutions by the action of a dehydrating agent (e.g. changes in the temperature or pH of the solution, addition of an electrolyte or addition of a water miscible solvent in which the macromolecule has low solubility) [10]. The coacervates are very rich in the colloid component and have the capacity to solubilize solutes, so they are suitable to develop organic solvent-free extraction procedures.

Application of the coacervation phenomenon to analytical processes has invariably involved the use of aqueous micelle-based coacervates (i.e. non-ionic [11-13], zwitterionic [14], cationic [15] and anionic [16]). The most used coacervates have been made of non-ionic micelles, which undergo coacervation by changes in the temperature of the aqueous solution. The corresponding methodology has been named “cloud point extraction” (CPE) and it has been extensively used for the extraction/concentration of nonpolar and moderately non-polar compounds [12,13]. Recently, anionic micelles made up of dodecanesulfonic acid (SDSA), which undergo coacervation under the addition of hydrochloric acid in the concentration range of 2.5–5 M, have been proven to efficiently extract hydrophobic [16-18] and amphiphilic [19-21], pollutants from environmental water and solid samples.

One of the most distinctive features of supramolecular assembly-based

-
- [10] IUPAC Compendium of Chemical Terminology 31 (1972) 611.
[11] W.L. Hinze, E. Pramauro, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 24 (1993) 133.
[12] E. Pramauro, E. Pelizzetti, in: S.G. Weber (Ed.), *Surfactants in Analytical Chemistry. Applications of Organized Amphiphilic Media*, Elsevier, New York, 1996.
[13] 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.
[14] T. Saitoh, W.L. Hinze, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2520.
[15] X. Jin, M. Zhu, E.D. Conte, *Anal. Chem.* 71 (1999) 514.
[16] I. Casero, D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4519.
[17] D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, N. Maniasso, E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 392 (1999) 29.
[18] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 962 (2002) 1.
[19] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 998 (2003) 143.
[20] F.J. Ruiz, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 109.
[21] M. Cantero, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1046 (2004) 147.

Parte I

coacervates is the special structure of the macromolecules making up them. Micelles have regions of different polarity where analytes of very different physical–chemical characteristics can be solubilized. A number of interactions can be established with analytes depending of the nature of the polar group of the coacervate (mainly hydrophobic or ionic interactions, formation of mixed aggregates, hydrogen bonds, etc.). So, they are very versatile extraction systems. On the other hand, the low volume of the coacervates permits both the extraction and preconcentration of analytes to be simultaneous performed.

This research deals, for the first time, with the study of the ability of coacervates for the preservation of organic compounds. The aim was to determine their applicability for the on-site extraction/preconcentration/preservation of pollutants in environmental monitoring programs. Anionic micelle-based coacervates [16] were used for this purpose. Benzalkonium surfactants (BASs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were selected as the target pollutants on the basis of the different types of interactions they establish with the coacervate (formation of mixed aggregates and hydrophobic interactions, respectively) and the instability problems they present in environmental water samples [22–24]. Their stability into the coacervates was investigated for a period of 3 months under different experimental conditions. The effect of matrix components on PAHs and BASs stability was assessed by using river and wastewater.

The main factor influencing the stability of BASs and PAHs in environmental waters is their adsorption on containers [22–24]. Significant adsorption of BASs (around 90%) on glass, polypropylene and Teflon containers has been reported for filtered water samples stored at 4°C [23]. On the other hand, the extent of the adsorption of PAHs on containers is dependent on the type of material used; it is quantitative for polyethylene and around 20–30% for

[22] M.J. Scott, M.N. Jones, *Biochim. Biophys. Acta* 1508 (2000) 235.

[23] K. Kummerer, A. Eitel, U. Braun, P. Hubner, F. Daschner, G. Mascart, M. Milandri, F. Reinthaler, J. Verhoef, *J. Chromatogr. A* 774 (1997) 281.

[24] L. Wolska, M. Rowa-Adkonis, J. Namieśnik, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1389.

glass [17]. Addition of acetonitrile at concentrations between 25% and 40% (v/v) has been used as a strategy to preserve both BASs [25] and PAHs [26,27]. However, this strategy was only successful in preventing losses of the target compounds for some days. It also produced a decrease in the recovery of BASs from SPE cartridges [25].

The solubilizing capacity of aqueous micelles has been exploited as a valuable strategy to preserve PAHs [17,26,28-31] as a prior step to their extraction and to recover them from humic acids [17,28]. On the other hand, our research group has recently described the preservation of BASs on dodecyl sulfate hemimicelles adsorbed on alumina [8]. The BASs were stable on these supramolecular assembly-based SPE sorbents at room temperature for at least three months. So, the known stabilizing capacity of supramolecular assemblies for BASs and PAHs is exploited here for their simultaneous extraction, preconcentration and preservation using coacervate-based liquid-liquid extraction.

2. Experimental

2.1. Chemicals

All chemicals were of analytical reagent grade. Analyte standards for analytes were supplied by Aldrich (Milwaukee, WI, USA): benzyldimethyldodecyl ammonium bromide (BDDA), benzyldimethyltetradecyl ammonium bromide (BDTA), benzyldimethylhexadecyl ammonium chloride

[25] I. Ferrer, E.T. Furlong, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 2583.

[26] A. López, E. Blanco, J.I. García, A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta* 264 (1992) 241.

[27] R. El Harrak, M. Calull, R.M. Marce, F. Borrull, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 64 (1996) 47.

[28] C. García, J.L. Pérez, B. Moreno, *Anal. Chem* 66 (1994) 874.

[29] V. Pino, J.H. Ayala, A.M. Afonso, V. González, *J. Chromatogr. A* 949 (2002) 291.

[30] W.L. Hinze, H.N. Singh, Z.S. Fu, R.W. Williams, D.J. Kippenber, M.D. Morris, F.S. Sadek, in: T. Vo-Dinh (Ed.), *Chemical Analysis of Polycyclic Aromatic Compounds*, John Wiley & Sons, New York, 1989, p. 151 (Chapter 5).

[31] E.R. Brouwer, A.N.J. Herms, H. Lingeman, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 669 (1994) 45.

Parte I

(BDHA), benzo(a)pyrene (BaP), benzo(b)fluoranthene (BbF), benzo(k)fluoranthene (BbF) and benzo(*ghi*)perylene (B*ghi*P), and Fluka (Madrid, Spain): benzo(a)anthracene (BaA), indene(1,2,3-*c-d*)pyrene (IP) and sodium dodecanesulfonic acid. Standard solutions of individual PAHs (100 mg L⁻¹) were prepared in acetonitrile and a mixed solution of BASs (1200 mg L⁻¹ of each homologue) was prepared in methanol. Hydrochloric acid, ammonia, HPLC-grade methanol and acetonitrile were obtained from Panreac (Madrid, Spain). Formic acid was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ultra-high-quality water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Madrid, Spain).

2.2. Apparatus

The BASs were separated and quantified by using a liquid chromatography/electrospray ion trap-mass spectrometry system (LC/(ESI-IT)-MS) (1100 Series LC/MSD, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), equipped with an automatic injector. For analysis of PAHs a liquid chromatographic system (Spectra System SCM 1000, ThermoQuest, San Jose, CA, USA) consisting of a P2000 binary pump, a UV 1000 absorbance detector, a FL3000 fluorescence detector and a PEEK rheodyne 7125 NS injection valve with a 20 µL sample loop was used. The stationary phase column was a 10 cm Kromasil-C18 with 4.6 mm i.d. and 5 µm particle diameter (Análisis Vínicos, Tomelloso, Spain). A centrifuge (Selecta Mixtasel) was employed to accelerate the separation of the coacervate from the solution.

2.3. Stability studies

2.3.1. Sample collection and preparation

Stability studies were carried out using different types of samples (distilled and river water and influent/effluent wastewater). River samples were taken from the Guadalquivir in Córdoba city (Spain). Influent wastewater samples were collected from three wastewater treatment plants (WWTP) in the

south of Spain: Bailén, Linares and Mengibar. Bailén WWTP receives ~60% industrial effluents (mainly from brickwork, ceramic and olive oil industries) mixed with ~40% domestic wastewater. Linares WWTP receives about the same levels of domestic and industrial wastewater, and Mengibar WWTP receives mainly domestic wastewater. Treated wastewater samples were taken from the WWTP of Bailén. River and wastewater samples were filtered through 0.45 μm filters (Millipore, Billerica, MA, USA) to remove suspended solids, acidified at pH 2 with hydrochloric acid and kept in amber glass containers at 4° C until spiking.

Distilled water was used to check the stability of BASs and PAHs on coacervates for 3 months at different storage conditions. River and wastewater (influent and effluent) were used to investigate matrix effects on the stability. The different influent samples were mixed in order to have a representative composition of the wastewater. Once the samples were spiked to obtain a final concentration of 0.19 $\mu\text{g L}^{-1}$ of each BASs or PAHs, they were immediately extracted with the coacervate and stored under a variety of experimental conditions which are detail in Section 2.3.2.

2.3.2. BAS and PAH preservation on coacervates

To study the influence of different factors on analyte preservation, 25 mL of sample were mixed in a narrow neck (7 mm internal diameter) centrifuge tube with hydrochloric acid and SDSA, in order to obtain a final concentration of 3.75 M or 4.2 M and 0.25% (w/v), respectively. The mixture was magnetically stirred for 5 min and then centrifuged at 2200 rpm for 10 min to accelerate phase separation. The coacervate containing the analytes was at the top. Its volume was calculated considering a cylindrical form for the neck of the centrifuge tube. The height of the coacervate phase and the internal diameter of the tube neck were measured using a digital Vernier caliper. Mean values of these volumes were 495 μL and 430 μL for coacervates induced by 3.75 M and 4.2 M of HCl, respectively. Then, the coacervate was collected with a microsyringe and transferred to a clip cap vial. The influence of four factors on the stability of BASs and PAHs in the coacervates was investigated: (a) the

Parte I

concentration of hydrochloric acid used to induce coacervation (3.75 M and 4.2 M), (b) the temperature of storage (35 °C, room temperature, 4 °C and -20 °C), (c) the exposition of vials to natural light (non-covered and aluminium foil-wrapped vials) and (d) matrix effects (using river and wastewater).

2.3.3. BAS and PAH determination

After storage under the different experimental conditions, the coacervates containing BASs or PAHs were made up to 1 mL with methanol or acetonitrile, respectively. Coacervates at 4 °C and -20 °C were gelatinous and required about 3–5 min to become liquid. Aliquots of the diluted coacervates were filtered through 0.45 µm nylon membrane filters (Análisis Vínicos, Tomelloso, Spain) and 20 µL injected into the chromatograph. For the determination of BASs, methanol and 50 mM ammonium formate buffer (pH 3.5) 80:20 (v/v) were used as eluent solvent for 30 min at a flow of 1 mL min⁻¹. The surfactant analysis was carried out in the “ESI (+)” mode. The set of parameters used was as follows: capillary voltage, -5.0 kV; capillary exit voltage, 30 V; skimmer, 30 V; trap drive, 30; source temperature, 350 °C; drying gas, 10 L min⁻¹; nebulizer gas, 80 psi; maximal accumulation time, 50 ms. Quantification was carried out under full-scan conditions by using the extracted molecular ion chromatogram for each homologue (C₁₂ at m/z 304, C₁₄ at m/z 332 and C₁₆ at m/z 360). Linearity was obtained for BASs concentrations between 1 µg L⁻¹ and 100 µg L⁻¹ with correlation coefficients ranging from 0.9997 to 0.998. For the determination of PAHs the gradient elution was 0–35 min from 60:40 (v/v) to 100:0 (v/v) acetonitrile:water at a flow-rate of 1 mL min⁻¹. Detection was performed with fluorescence wavelength programming in order to obtain optimum sensitivity. The excitation/emission wavelengths were set as follows: 286 nm/388 nm at 0 min for BaA, 300 nm/430 nm at 22 min for BbF, BkF and BaP, and 296 nm/496 nm or 290 nm/410 nm at 28 min depending if IP or BghiP was determined. Correlations between peak areas and PAH concentrations (0.2–20 µg L⁻¹) were determined by linear regression and were typically r = 0.9995. A scheme of the complete procedure used for stability studies is depicted in Fig. 1.

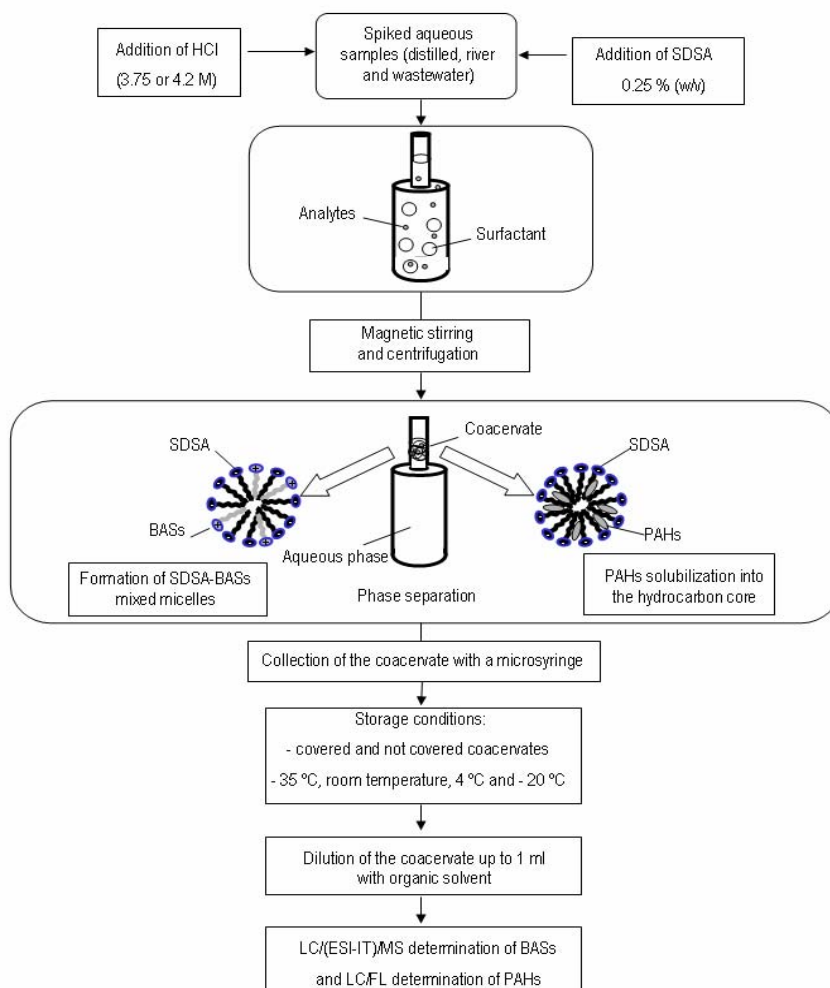


Figure 1. Scheme of the different steps followed for the preservation/determination of BASs and PAHs using anionic micelle-based coacervates.

3. Results and discussion

3.1. Analytical performance

The separation/quantification of BASs by LC/ion trap MS, after their extraction from sludge with anionic micelle-based coacervates, has been previously described by our research group [19]. In this work, we investigated the suitability of these coacervates for BASs extraction from environmental water samples. Different studies were carried out to determine the best experimental conditions. The extraction efficiency for the target compounds was very high in a wide range of conditions (2.5-4.5 M HCl, 20-60 °C, extraction time 3-60 min) because of the formation of mixed aggregates between SDSA and the cationic surfactants. Quantitative recoveries were found for the three BAS homologues for SDSA concentrations above 0.25%. These recoveries were independent of the water matrix investigated (distilled, influent/effluent wastewater or river). No interference was detected from the components of the different matrices using MS. No clean-up steps were required to determine BASs in the environmental water samples analysed. The instrumental detection limits were calculated from blank determinations by using a signal-to-noise ratio of 3. They were around $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$. The precision of the method was evaluated by extracting 11 independent spiked ($0.19 \mu\text{g L}^{-1}$) distilled and wastewater samples. The relative standard deviation was between 2% and 4%.

The separation/quantitation of PAHs by LC/fluorimetry, after their extraction from river and underground water using anionic micelle-based coacervates has been previously described [17]. This global procedure, with the modifications specified in Section 2, has been used in this study for the extraction of PAHs from wastewater. It was checked that recoveries for PAHs ranged between 84% and 109%, independently of the water matrix investigated. The instrumental detection limits were around $0.03 \mu\text{g L}^{-1}$ and the relative standard deviations ranged from around 3% in distilled water to 7% in wastewater.

3.2. Stability of BASs and PAHs into SDSA coacervates

The following compounds were selected as representative of BASs and PAHs to assess the influence of different storage conditions on their stability: C₁₂, C₁₄- and C₁₆-BAS, that are the BAS homologues used at the highest proportion in commercial formulations, and BaA, BaP and IP, which were considered as models for PAHs of four, five and six aromatic rings, respectively. All the experiments were made in triplicate.

The acid medium required for coacervation of the surfactant dodecane sulfonic acid was obtained by using hydrochloric acid [16,32]. The use of oxidizing acids, such as nitric or perchloric was avoided because of the likely gradual oxidation of the surfactant in these media. Also, the use of sulfuric acid was avoided because its handling usually requires special precautions. The stability studies were made at two hydrochloric acid concentrations (3.75 M and 4.2 M). They were selected on the basis that extraction efficiencies for the target compounds are independent of HCl in the concentration range in which coacervation is produced (2.5–4.5 M), and that preconcentration factors increase as the HCl concentration does. So, we restrict our stability studies at acid concentrations at which maximum preconcentration was achieved. Preconcentration factors around 50 and 60 were obtained by using 3.75 M and 4.2 M HCl, respectively. The recoveries of PAHs and BASs were quantitative at the two acid concentrations investigated.

The effect of the natural illumination in the laboratory (i.e. that from sunlight) on the stability was studied by storage of the coacervates containing BASs or PAHs into non-covered and aluminium foil-wrapped vials kept at room temperature. The coacervates were analysed daily for a period of a week. Recoveries obtained for the target compounds were similar for both types of vials. So, wrapping of the samples during storage was not necessary to achieve BASs or PAHs stability.

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

Parte I

To determine the effect of the temperature on BAS and PAH stability, the coacervates produced at two hydrochloric acid concentrations were stored at room temperature, 4 °C and -20 °C and analysed weekly during a 3-month period. Table 1 shows some of the recoveries obtained for the target compounds and Table 2 shows the concentrations found and the corresponding standard deviations. Recoveries ranged from 90% to 109%. The integrity of analytes was kept for the whole period of time investigated, independently of the temperature used for storage of the coacervates or the acid concentration added to induce coacervation. Although the hydrocarbon chain length of BASs can influence their biodegradability [33], no differences of recoveries were found for the three homologues.

A common source of instability of analytes is the temperature that samples can reach during storage in the field and transport in sunny areas. So, to assess this factor, we stored the coacervates containing the analytes at 35 °C for a month. The recoveries obtained proved that no problems of degradation were found for any of the pollutants investigated. Therefore, the coacervates have a high-stabilizing capacity for BASs and PAHs.

3.3. Effect of the water matrix on BAS and PAH stability

Since matrix components can affect the stability of BASs and PAHs, we tried the suitability of anionic micelle-based coacervates to keep the integrity of these pollutants after their extraction from wastewater and riverwater. Since the stability of PAHs was found to be independent of the number of aromatic rings (Table 1), the PAHs selected for this study were those for which the European Community Directive 98/83/CE about the quality of water supply [34] has established threshold values (BaP, BbF, BkF, IP and BghiP). No effort was made to separate IP and BghiP, which coeluted under the chromatographic conditions proposed, so the PAHs analysed were BaP, BbF, BkF and BghiP.

[33] J.K. Autry, E.G. Vaught, E.D. Conte, *Microchem. J.* 80 (2005) 25.

[34] *Off. J. Eur. Commu. L* 330 of 5th December 1998, p. 32. European Community Directive 98/93/EC.

Table 1. Mean^a recoveries^b (%) of benzalkonium surfactants and polynuclear aromatic hydrocarbons from spiked distilled water (0.19 µg L⁻¹ of each analyte) after storage of the acid-induced SDSA coacervates at different hydrochloric acid concentrations and temperature values.

Compound	Storage time (week)	Storage conditions					
		4.2 M			3.75 M		
		Room temperature	4°C	-20°C	Room temperature	4°C	-20°C
Benzalkonium Surfactants							
BDDA	0	100	100	100	100	100	100
	1 st	97	99	100	93	96	94
	8 th	92	94	94	92	94	95
	12 th	108	107	108	98	101	101
BDTA	0	100	100	100	100	100	100
	1 st	97	100	102	94	94	96
	8 th	92	94	93	92	93	94
	12 th	94	101	104	95	95	95
BDHA	0	100	100	100	100	100	100
	1 st	100	101	103	99	99	101
	8 th	94	94	96	95	99	96
	12 th	101	105	104	95	96	95
Polynuclear Aromatic Hydrocarbons							
BaA	0	100	100	100	100	100	100
	1 st	103	103	101	100	108	108
	8 th	103	103	101	105	104	109
	12 th	102	102	100	99	102	101
BaP	0	100	100	100	100	100	100
	1 st	95	100	103	100	105	108
	8 th	98	101	101	101	99	105
	12 th	96	97	99	97	99	100
IP	0	100	100	100	100	100	100
	1 st	102	99	102	100	105	105
	8 th	99	103	100	104	102	107
	12 th	90	95	94	94	96	98

Range for relative standard deviation of recoveries: 2-4 %.

^a n = 3.

^b Normalized extraction rates.

All the experiments were made in duplicate using 4 M of hydrochloric acid concentration to induce coacervation and the coacervates containing the analytes were stored at room temperature or 4 °C for a month. Tables 3 and 4

Parte I

Table 2. Mean^a concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$) of benzalkonium surfactants and polynuclear aromatic hydrocarbons from spiked distilled water ($0.19 \mu\text{g L}^{-1}$ of each analyte) after storage of the acid-induced SDSA coacervates at different hydrochloric acid concentrations and temperature values.

Compound	Storage time (week)	Storage conditions					
		4.2 M			3.75 M		
		Room temperature	4°C	-20°C	Room temperature	4°C	-20°C
Benzalkonium Surfactants							
BDDA	0	0.1919±0.005			0.193±0.006		
	1st	0.185±0.001	0.188±0.003	0.1915±0.0005	0.1799±0.0008	0.186±0.003	0.183±0.002
	8th	0.176±0.002	0.181±0.003	0.181±0.002	0.178±0.002	0.183±0.006	0.185±0.002
	12th	0.209±0.006	0.206±0.009	0.2072±0.0007	0.209±0.006	0.206±0.009	0.2072±0.0007
BDTA	0	0.190±0.004			0.192±0.007		
	1st	0.1844±0.0006	0.189±0.003	0.1937±0.0009	0.1801±0.0008	0.181±0.007	0.184±0.002
	8th	0.174±0.001	0.178±0.002	0.180±0.004	0.175±0.006	0.179±0.002	0.180±0.005
	12th	0.178±0.009	0.192±0.009	0.198±0.009	0.183±0.005	0.184±0.004	0.182±0.002
BDHA	0	0.188±0.006			0.19±0.01		
	1st	0.187±0.002	0.189±0.001	0.194±0.004	0.184±0.002	0.184±0.005	0.188±0.003
	8th	0.176±0.002	0.177±0.004	0.181±0.004	0.178±0.006	0.184±0.002	0.181±0.005
	12th	0.19±0.02	0.20±0.01	0.195±0.006	0.179±0.009	0.179±0.004	0.179±0.008
Polynuclear Aromatic Hydrocarbons							
BaA	0	0.1871±0.0008			0.183±0.004		
	1st	0.192±0.003	0.192±0.002	0.188±0.001	0.187±0.002	0.199±0.002	0.200±0.002
	8th	0.192±0.004	0.191±0.004	0.1885±0.0001	0.194±0.006	0.191±0.007	0.202±0.002
	12th	0.19±0.01	0.189±0.007	0.186±0.005	0.183±0.004	0.187±0.001	0.183±0.001
BaP	0	0.186±0.004			0.182±0.005		
	1st	0.176±0.002	0.186±0.002	0.188±0.006	0.183±0.008	0.1921±0.0001	0.1981±0.0004
	8th	0.183±0.006	0.188±0.001	0.185±0.001	0.184±0.005	0.181±0.004	0.192±0.004
	12th	0.179±0.005	0.181±0.004	0.185±0.009	0.178±0.004	0.181±0.003	0.182±0.005
IP	0	0.192±0.008			0.187±0.004		
	1st	0.19±0.01	0.190±0.006	0.195±0.002	0.187±0.005	0.1962±0.0004	0.197±0.001
	8th	0.190±0.004	0.197±0.004	0.192±0.002	0.194±0.006	0.189±0.004	0.200±0.004
	12th	0.1712±0.0003	0.181±0.007	0.181±0.003	0.175±0.003	0.180±0.001	0.183±0.007

^a n = 3.

show some of the recoveries and concentrations found for the target compounds in the analyses of environmental waters. No influence of matrix components on the stability was detected thus confirming the high-stabilization capacity of coacervates for the target pollutants. Fig. 2 depicts two typical chromatograms obtained in the analysis of BASs and PAHs in influent wastewater samples. The chromatographic peaks corresponding to BDDA and BDTA showed shoulders which probably corresponded to branched BAS

Table 3. Mean^a recoveries^b (%) of benzalkonium surfactants and polynuclear aromatic hydrocarbons from spiked environmental water samples (0.19 µg L⁻¹ of each analyte) after storing the acid-induced SDSA coacervates at 4°C for a month.

Time (weeks)	Wastewater (influent)			Wastewater (effluent)			River water		
Benzalkonium Surfactants									
	BDDA	BDTA	BDHA	BDDA	BDTA	BDHA	BDDA	BDTA	BDHA
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4 th	91	93	90	89	93	88	94	91	88
Time (weeks)	Wastewater (influent)			Wastewater (effluent)			River water		
Polynuclear Aromatic Hydrocarbons									
	BbF	BkF	BaP	B(ghi)P	BbF	BkF	BaP	B(ghi)P	BbF
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1 st	100	95	84	88	105	93	89	100	93
2 nd	93	93	85	104	95	90	89	94	103
3 rd	96	99	97	102	107	97	89	97	113
4 th	108	102	101	101	100	97	95	105	98

^a n = 2.

^b Normalized extraction rates.

Range for relative standard deviation of recoveries : BASs (2-4 %); PAHs (6-10 %).

isomers. Branched isomers are always present, at undefined proportion, in commercial formulations of linear surfactants.

3.4. Practical considerations

The on-site extraction/preservation of environmental water samples requires the use of rapid and simple sample handling procedures. Before extraction, a filtration step using 0.45 µm filters is mandatory if analysis of pollutants is to be made in the dissolved fraction. Suspended solid concentrations (SSC) in river and wastewater are highly variable.

Parte I

Table 4. Mean^a concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$) of benzalkonium surfactants and polynuclear aromatic hydrocarbons from spiked environmental water samples ($0.19 \mu\text{g L}^{-1}$ of each analyte) after storing the acid-induced SDSA coacervates at 4°C for a month.

Compound	Storage time (week)	Wastewater (influent)	Wastewater (effluent)	River water
Benzalkonium Surfactants				
BDDA	0	0.198±0.008	0.208±0.009	0.203±0.007
	4 th	0.181±0.002	0.186±0.006	0.191±0.005
BDTA	0	0.182±0.005	0.188±0.005	0.186±0.005
	4 th	0.1702±0.0004	0.175±0.002	0.17±0.02
BDHA	0	0.200±0.004	0.200±0.004	0.184±0.004
	4 th	0.1791±0.0009	0.176±0.002	0.17±0.002
Polynuclear Aromatic Hydrocarbons				
BbF	0	0.17±0.02	0.18±0.02	0.17±0.02
	1 st	0.18±0.01	0.190±0.003	0.164±0.002
	2 nd	0.163±0.004	0.170±0.005	0.181±0.007
	3 rd	0.17±0.02	0.19±0.02	0.1981±0.0007
	4 th	0.189±0.006	0.180±0.006	0.1716±0.0005
BkF	0	0.18±0.01	0.19±0.01	0.18±0.01
	1 st	0.169±0.008	0.177±0.006	0.16±0.01
	2 nd	0.165±0.004	0.172±0.005	0.182±0.003
	3 rd	0.177±0.003	0.185±0.006	0.188±0.006
	4 th	0.183±0.006	0.1851±0.0003	0.18±0.01
BaP	0	0.18±0.01	0.19±0.01	0.18±0.01
	1 st	0.150±0.007	0.169±0.003	0.16±0.02
	2 nd	0.152±0.004	0.168±0.006	0.178±0.002
	3 rd	0.1729±0.0003	0.169±0.002	0.175±0.002
	4 th	0.181±0.003	0.181±0.003	0.19±0.02
B(ghi)P	0	0.17±0.02	0.19±0.02	0.18±0.02
	1 st	0.150±0.01	0.186±0.003	0.174±0.009
	2 nd	0.18±0.01	0.18±0.02	0.191±0.003
	3 rd	0.175±0.005	0.179±0.005	0.181±0.006
	4 th	0.17±0.02	0.19551±0.0008	0.18±0.02

^a n = 3.

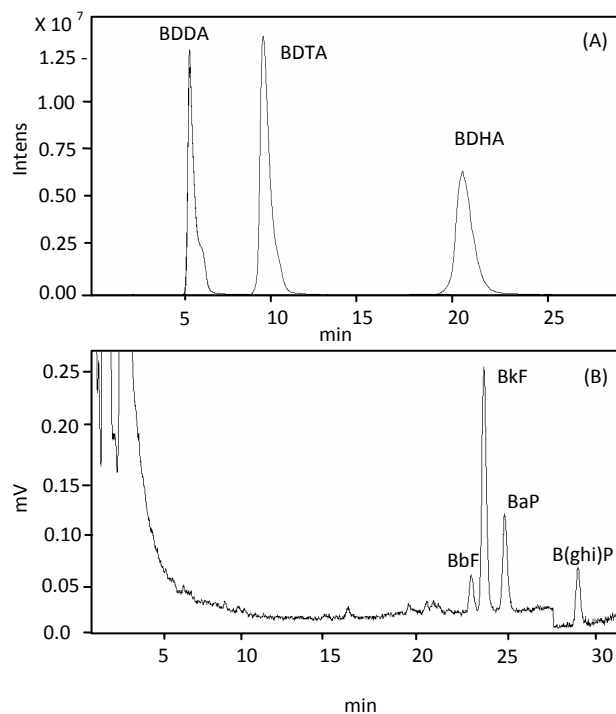


Figure 2. (A) LC-MS extracted ion chromatogram of BASs (BDDA at m/z 304, BDTA at m/z 322 and BDHA at m/z 360) and (B) LC-fluorescence chromatogram of PAHs (300 nm/430 nm at 0 min for BbF, BkF and BaP, and 290 nm/410 nm at 28 min for BghiP) obtained from spiked ($0.19 \mu\text{g L}^{-1}$) influent water sample.

In river, SSC do not usually exceed of 100 mg L^{-1} [35]. In domestic wastewater, SSC generally range between 120 and 450 mg L^{-1} [36], although SSC as high as 1100 mg L^{-1} have been found in some wastewaters [37]. So, the

[35] J.R. Gray, G.D. Glysson, L.M. Turcios, G.E. Schwarz, Comparability of suspended-sediment concentration and total suspended solids data, US Geological Survey, Water-Resources Investigations Report 00-4191, Reston, 2000.

[36] M. Henze, P. Harremoës, J. La Cour Jansen, E. Arvin, in: U. Förstner, R.J. Murphy, W.H. Rulkens (Eds.), Wastewater Treatment. Biological and Chemical Processes, Springer, Berlin, 1997.

[37] A. Katsoyiannis, C. Samara, Water Res. 38 (2004) 2685.

Parte I

sample handling will be considerably simplified if low sample volumes can be treated.

In coacervative extraction, preconcentration factors and recoveries of analytes are mainly dependent on the concentration of surfactants used for extraction and not on the sample volume used. Thus, once you have fixed the most appropriate surfactant concentration you can reduce the sample volume up to a limit value which is imposed by practical considerations (e. g. the volume of coacervate should be enough to make two chromatographic injections in a precise way). Our personal experience indicates that the coacervate volume obtained should be at least around 100 μL as the extraction is carried out in the batch mode. So, under the experimental conditions we have proposed in this study we could use around 5-6 mL of sample. This behaviour of coacervates, which is a general rule of solvents in liquid-liquid extractions, is a definite asset to the on-site simultaneous extraction/preconcentration/preservation of pollutants because it permits the handling of low sample volumes.

On-site filtration of low sample volumes can be easily carried out by using 5-50 mL syringes with a filter unit at the tip and pushing manually the piston. Filtered samples are extracted by coacervates using stirring and centrifugation and stored in small vials for transport at room temperature to the analyses laboratory.

4. Conclusions

This research proves that anionic micelle-based coacervates are a valuable tool for the on-site extraction/preservation of BASs and PAHs from environmental water samples (river and influent/effluent wastewater). The recoveries of the target compounds were quantitative and independent on their alkyl chain length or their number of aromatic rings under the different experimental conditions examined (from -20°C to 35°C , natural or artificial illumination, matrix components, acid concentration, etc). Besides the stabilizing capacity of coacervates, these supramolecular systems have

additional features that make their use interesting for monitoring programs: (1) the preconcentration factor does not depend on the sample volume but on the surfactant concentration, so we can treat low sample volumes which makes sample handling easy; (2) the extraction is simple and rapid and only low cost equipment is required; and (3) the low volume of coacervates permits to store them in vials which facilitate transport and storage.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge financial support from MEC (Project CTQ2005-00643). They also thank the Linares, Mengibar and Bailén WWTPs personnel for kindly collecting the sewage water samples. We specially thank the personnel from Aguas Jaén Company for their technical assistance.

PARTE II

NUEVAS METODOLOGÍAS PARA EL ANÁLISIS DE SUSTANCIAS PERFLUOROALQUILADAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

OBJETO

La determinación de las sustancias perfluoroalquiladas (PFASs) es objeto de estudio por parte de la comunidad científica desde que se descubriera su ubicuidad en el medio ambiente y bioacumulación a lo largo de la cadena trófica hace ya más de una década. El estudio de sus fuentes, rutas y destinos en el medioambiente y la evaluación de la exposición humana a estos contaminantes son líneas de investigación sobre las que se está discutiendo mucho en los últimos años. Para llevar a cabo estas tareas son necesarias metodologías para el análisis de las PFASs en los distintos compartimentos ambientales, en los alimentos como fuente principal de exposición humana y en muestras humanas como descriptor integrado de las distintas vías de exposición a las que estamos expuestos. Actualmente no existen niveles máximos permitidos en alimentos para estas sustancias aunque la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha establecido límites de tolerancia diaria de 1500 y 150 ng kg⁻¹ peso corporal día⁻¹ para el ácido perfluorooctanoico y el perfluorooctano sulfonato y ha recomendado su vigilancia en alimentos como fuente de exposición a dichos contaminantes[1]. Por otro lado, las PFASs se han incluido en las sustancias de relevancia que deben monitorizarse para evaluar el buen estado de las aguas marinas dentro del descriptor 9 de la Directiva Marco sobre Estrategia Marina “Contaminantes en peces y marisco para el consumo humano” [2]. Los métodos analíticos existentes para analizar muestras biológicas o de alimentos requieren un elevado consumo de disolvente orgánico y en muchos casos extracciones repetitivas y etapas de limpieza. Además proporcionan recuperaciones de PFASs muy dependientes del tipo de matriz y analito debido al amplio intervalo de polaridad de los mismos ya que incluyen sustancias desde 4 a 14 átomos de carbono.

[1] Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on Perfluorooctane sulfonate (PFOS), Perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts, The EFSA Journal 653 (2008) 1.

[2] Marine strategy framework directive. Task group 9 Contaminants in fish and other seafood, available at: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/111111111/13669/1/tg9%20report%20final_vii.pdf

Parte II

Así, las investigaciones que se presentan en este segundo bloque de la Tesis Doctoral tienen como objetivo el desarrollo de metodologías para la extracción y determinación de PFASs en distintas muestras biológicas; concretamente aves marinas, pescados y suero sanguíneo que resuelvan los problemas existentes y ofrezcan una alternativa adecuada a las metodologías existentes en cuanto a simplicidad, rendimientos de extracción independientes de la longitud de la cadena fluorocarbonada, exactitud, precisión y sensibilidad. Las metodologías propuestas para alcanzar este objetivo se han basado en;

(1) el empleo de mezclas tetrahidrofurano (THF):agua que poseen una excelente capacidad de solubilización para los compuestos anfifílicos, como es el caso de estos analitos. Estos disolventes presentan una gran diferencia en los valores respectivos de las constantes dieléctricas (ϵ agua= 80; ϵ THF= 7,5) y parámetros de solubilidad de Hildebrand (δ agua=23,3 cal^{1/2} cm^{-3/2}; δ THF=9,5 cal^{1/2} cm^{-3/2}). Gracias a estas diferencias la mezcla hidroorgánica proporciona un balance de interacciones (dispersivas, puentes de hidrógeno y polares) adecuadas tanto para la solubilización del grupo polar como de la cadena hidrófoba del tensioactivo.

(2) el empleo de microextracciones líquido-líquido basadas en la formación de disolventes supramoleculares de micelas inversas de ácido hexanoico. El uso de estos SUPRASs presenta un gran potencial a la hora de simplificar el tratamiento de muestra y una gran capacidad de extracción basada en las interacciones que proporcionan; hidrofóbicas en la región exterior hidrocarbonada y puentes de hidrógeno a través de los grupos polares en el núcleo de las micelas, lo cual lleva a la formación de agregados mixtos PFASs: ácido hexanoico.

(3) la mejora de la cuantificación de las PFASs trabajando en “modo aislamiento de iones” cuando se emplea espectrometría de masas con trampa iónica. Este modo de trabajo evita los problemas de selectividad provocados por el efecto espacio-carga a la vez que que mantiene la sensibilidad obtenida en modo barrido.

A continuación se presentan los resultados obtenidos de las investigaciones realizadas en este segundo bloque de la Tesis Doctoral.

CAPÍTULO 4

Analysis of perfluorinated compounds by microextraction with tetrahydrofuran and liquid chromatography/ ion isolation-based ion trap mass spectrometry

Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 3774-3782.

Noelia Luque, Ana Ballesteros-Gómez, Stefan van Leeuwen, Soledad Rubio

Abstract

An analytical method combining both a simple, fast and efficient solvent microextraction and a sensitive and selective monitoring mode, based on ion isolation ion trap mass spectrometry (MS), was developed for analysis of perfluorinated compounds (PFASs) in biota. The method involved the vortex-shaking of 0.2 g of tissue sample and 800 μL of tetrahydrofuran (THF):water (75:25, v/v) for 7 min, subsequent centrifugation for 13 min and direct quantitation of PFASs in the extract against solvent-based calibration curves. Selection of solvent composition was based on Hildebrand solubility parameters and their components (i.e. dispersion, dipole-dipole and hydrogen bonding forces). Recoveries in samples for PFASs with hydrocarbon chain lengths between C_4 and C_{14} ranged from 85 to 111%, with relative standard deviations between 1 and 11%. The ion isolation monitoring mode, proposed for the first time for ion-trap MS quantitation, proved to be effective in avoiding space-charge effects caused by coeluting matrix components while keeping the sensitivity of full scan MS operation. Detection limits of the method were in the range 0.8-6 ng g^{-1} for perfluoroalkyl carboxylates (PFCAs) and 0.4-0.8 ng g^{-1} for perfluoroalkyl sulfonates (PFASs) in wet weight samples. The method was validated using a reference material made up of flounder muscle and by comparison with triple quadrupole MS measurements and it was applied to the determination of PFASs in liver and muscle samples from sea birds and fishes.

Only PFASs were found in samples at quantifiable levels (2.9 and 13.1 ng g⁻¹) while PFCAs were below the respective quantitation limits. This method allows quick and simple microextraction of PFASs with minimal solvent consumption, while delivering accurate and precise data.

Keywords: Perfluorinated compounds; biological samples; microextraction; ion isolation ion-trap mass spectrometry.

1. Introduction

Perfluorinated compounds (PFASs) have been used since the 1950's in numerous industrial and domestic applications due to their special surfactant properties. Examples include carpet, leather, textile, paper, food containers and cooking tools or additives in cosmetics and pesticides. Several PFASs are resistant to heat, acids and bases and even to biological attack due to the high stability conferred by the strong F-C bond [1]. The persistence and bioaccumulation potential provided by these properties explains the ubiquity of PFASs in the environment and biota [2-6] so that they are present worldwide, even in remote locations such as the Arctic [4,7-11]. As oceans play

[1] E. Kissa, Fluorinated Surfactants and Repellents, CRC Press, Surfactant Science Series, Vol. 97, 2nd Ed., 2001.

[2] K. Kannan, J. Koistinen, K. Beckmen, T. Evans, J.F. Gorzelany, K.J. Hansen, P.D. Jones, E. Helle, M. Nyman, J.P. Giesy, Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 1593.

[3] M. Houde, J.W. Martin, R.J. Letcher, K.R. Solomon, D.C.G. Muir, Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 3463.

[4] N. Yamashita, K. Kannan, S. Taniyasu, Y. Hori, G. Petrick, T. Gamo, Mar. Pollut. Bull. 51 (2005) 658.

[5] A. Jahnke, L. Ahrens, R. Ebinghaus, C. Temme, Environ. Sci. Technol. 41 (2007) 745.

[6] C.M. Butt, S.A. Mabury, D.C.G. Muir, B.M. Braune, Environ. Sci. Technol. 41 (2007) 3521.

[7] K. Kannan, S. Corsolini, J. Falandysz, G. Oehme, S. Focardi, J.P. Giesy, Environ. Sci. Technol. 36 (2002) 3210.

[8] J.W. Martin, M.M. Smithwick, B.M. Birgit, P.F. Hoekstra, D.C.G. Muir, S.A. Mabury, Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 373.

[9] R. Bosi, F.F. Riget, R. Dietz, C. Sonne, P. Fauser, M. Dam, K. Vorkamp, Environ. Pollut. 136 (2005) 323.

Parte II

a major role as sink for many persistent organic pollutants (POPs), PFASs are usually present in many fishes, sea birds and marine mammals, e.g. levels of perfluorooctane sulfonate (PFOS) in the range 0.3-173 ng g⁻¹, 1-1780 ng g⁻¹ and 0.4-4000 ng g⁻¹ respectively, have been reported [11,12]. High levels of PFASs have been also found in human blood (ng-µg mL⁻¹) [13], being food a possible primary route for human exposure [14]. These emerging contaminants have been recently included as priority hazardous substances in the European water legislation [15]. Although no regulations have been set yet concerning biota and foodstuff, the development of suitable analytical methods for the routine control of PFCs in these samples is highly desirable due to their ubiquity and toxic properties [16].

At present, liquid chromatography (LC)/negative electrospray ionization (ESI-)/triple-quadrupole MS/MS is by far the preferred technique for quantitation of PFASs in environmental and human matrices due to its sensitivity in the selective multiple reaction monitoring (MRM) mode (limits of detection 1-100 pg [17]). Monitored product ions for perfluoroalkyl sulfonates (PFASs) and perfluoroalkyl carboxylates (PFCAs) are [SO₃]⁻, m/z 80, and [M-COOH]⁻, respectively. A cheaper alternative to triple-quadrupole MS is ion-trap

[10] C.J. Young, V.I. Furdui, J. Franklin, R.M. Koerner, D.C.G. Muir, S.A. Mabury, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 3455.

[11] C.R. Powley, S.W. George, M.H. Russell, R.A. Hoke, R.C. Buck, *Chemosphere* 70 (2008) 664.

[12] Appendice 2 in Ecological Screening Assessment Report on Perfluorooctane Sulfonate, Its Salts and Its Precursors that contain the C₈F₁₇SO₂, C₈F₁₇SO₃ or C₈F₁₇SO₂N Moiety, available at: http://www.ec.gc.ca/ceparegistry/documents/subs_list/PFOS_SAR/PFOS_A2.cfm

[13] A. Karrman, B. van Bavel, U. Jarnberg, L. Hardell, G. Lindstrom, *Chemosphere* 64 (2006) 1582.

[14] EFSA Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. *The EFSA journal* 653 (2008) 653 1.

[15] Commission Notice No 2008/C 102 E/02 of 22 May 2007, amendment of annex to Directive 2000/60/EC, *Official J. Eur. Union*, C51 (2008) 105.

[16] C. Lau, K. Anitole, C. Hodes, D. Lai, A. Pfahles-Hutchens, J. Seed, *Toxicol. Sci.* 99 (2007) 366.

[17] U. Berger, I. Langlois, M. Oehme, R. Kallenborn, *Eur. J. Mass Spectrom.* 10 (2004) 10.

MS [17-19]. Ion-trap analyzers can also perform tandem analysis, including MSⁿ experiments, and are best suited for structure elucidation of PFASs isomers because their spectra contain very specific product ions [17]. Quantitation of PFCAs by ion-trap MS in the MRM mode is straightforward by measuring the product ion [M-COOH]⁻. Unfortunately, the fragmentation of PFASs yields a number of specific high m/z ratio ions with low intensity, which are not suitable for sensitive MRM. On the other hand, low m/z ratio ions (e.g. 80) cannot be monitored because of the inherent low mass cutoff derived from the collision-induced dissociation [17]. As a result, applications involving ion-trap quantitation of PFASs use the single MS mode after a thorough sample clean-up to remove interferences [18,19]. Co-eluting interferences often cause space-charge effects, which degrade severely the performance of the ion trap. So, there is the need for sensitive enough, more selective ion-trap-based methods for analysis of PFASs in order to develop alternatives to the straightforward (but expensive) triple quadrupole analyzer.

Analysis of PFASs in biota is highly challenging [20,21]. In addition to common problems in PFAS analysis (i.e. background contamination from labware and instrumentation, matrix effects leading to ionization suppression or enhancement, limited availability of mass labeled standards, need for high quality standards in terms of purity and isomeric composition, etc, [22]), sample extraction and clean-up are key steps for exact quantitation of PFASs in biota. The wide polarity range of PFASs (i.e. they include ionic, water soluble short chain and non-polar long chain compounds) makes solvent extraction efficiencies highly dependent on solvent polarity. Successive popular extraction

[18] A. Holm, S.R. Wilson, P. Molander, E. Lundanes, T. Greibrokk, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 1071.

[19] C. Tseng, L. Liu, C. Chen, W. Ding, *J. Chromatogr. A* 1105 (2006) 119.

[20] J.W. Martin, K. Kannan, U. Berger, P. de Voogt, J. Field, J. Franklin, J.P. Giesy, T. Harner, D.C.G. Muir, B. Scott, M. Kaiser, U. Jarnberg, K.C. Jones, S.A. Mabury, H. Schroeder, M. Simcik, C. Sottani, B. Van Bavel, A. Karrman, G. Lindstrom, S. van Leeuwen, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 248A.

[21] S.P.J. van Leeuwen, A. Karrman, B. van Bavel, F. de Boer, G. Lindstrom, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 7854.

[22] S.P.J. van Leeuwen, K. Swart, I. Van der Veen, J. de Boer, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 401.

Parte II

methods in this context have been the method of Hansen et al. [23] (extraction with methyl-tert-butyl-ether (MTBE) after ion-pairing with tetrabutylammonium), the method of Berger and Haukas [24] (extraction with methanol/water 50:50 v/v; 2 mM ammonium acetate) and the method of Powley et al. [11] (extraction with acetonitrile and subsequent clean-up with dispersed graphitized carbon), being the latter the preferred one because produces the highest recoveries (80-110%) and the cleanest extracts. Major drawbacks of the former ones include much hands-on time due to the need of repetitive washes and evaporation-reconstitution steps [23], low recoveries (<50%) for short- [23] or long-chain [24] PFASs and strong matrix effects that result in high recoveries (>200%) [23] or the need for matrix-matched calibration [24]. Current clean-up methods for biota include filtration, silica column fractionation, sulfuric acid treatment and dispersed graphitized carbon, their use involving some risk for extract contamination or PFAS losses during the clean-up procedure [25,26]. Because the trend towards short, low cost, straightforward and environmentally friendly sample treatments, especially as complex samples are involved, new methods for PFAS extraction from biota should be explored.

This research aims to develop a new method for the simultaneous monitoring of PFCAs and PFASs in biota by combining both a fast, simple and efficient solvent microextraction and a selective and sensitive ion-trap MS quantitation. Mixtures of THF and water were investigated for PFAS microextraction because of their high difference in both dielectric constants (ϵ) and Hildebrand solubility parameters (δ) [27]. That permitted us to get solvent compositions in a wide range of dispersion, dipole-dipole and hydrogen bonding forces. In this way, the most suitable solvent for PFASs, which are amphiphilic

[23] K. J. Hansen, L. A. Clemen, M. E. Ellefson, H. O. Jonson, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001)766.

[24] U. Berger, M. Haukas, *J. Chromatogr. A* 1081(2005) 210.

[25] S.P.J. van Leeuwen, J. de Boer, *J. Chromatogr. A* 1153 (2007) 172.

[26] A. Jahnke, U. Berger, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 410.

[27] J. Burke, in: B. Kanegsberg, E. Kanegsberg, *Handbook for Critical Cleaning*, CRC Press, New York, 2000. Chapter 1.2. p 21.

molecules with hydrogen bond donor and/or acceptor groups and hydrophobic perfluorinated alkyl moieties, was determined. The final aim was to provide guidelines for PFAS extraction based on the knowledge of the different types of intermolecular forces between analytes and solvents in order to avoid that method development can become a largely empirical, labor intensive and time-consuming trial and error process. Selectivity and sensitivity in ion-trap MS was investigated by isolation of the target ions before detection. The objective was to avoid the possible space-charge effects caused by co-eluting matrix components while keeping the sensitivity of full scan MS operation. The complete analysis cycle included the accumulation of the ions in the trap, the isolation of a specific or different m/z ions and the production of a spectrum by resonantly ejecting the ions from the trap to detector. Both extraction and ion-trap MS were optimized and the method was applied to the determination of PFASs in fish and bird tissues. Method validation was performed by analysis of a flounder fillet sample, which was used in the 2nd international interlaboratory study on PFASs [22]. The extracts were analyzed by both ion-trap and triple-quadrupole MS. Main results obtained in this research are described below.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Potassium perfluorobutane sulfonate (PFBS, 98%), perfluorooctanoic acid (PFOA, 96%), perfluorodecanoic acid (PFDA, 98%), perfluoroundecanoic acid (PFUnDA, 95%) and perfluorotetradecanoic (PFTeDA, 97%) were supplied by Aldrich (Steinheim, Germany). Perfluorohexanoic acid (PFHxA, 97%), potassium perfluorohexane sulfonate (PFHxS, 98%), potassium perfluorooctane sulfonate (PFOS, 98%), and ammonium acetate were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Sodium taurodeoxycholate hydrate was obtained by Sigma. The internal standard perfluorooctanoic acid $^{13}\text{C}_8$ ($^{13}\text{C}_8$ -PFOA, 99%), was supplied by Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, MA) as a solution of 50 mg L^{-1} in methanol. LC-grade THF and methanol were obtained from Panreac (Madrid, Spain). Ultra-high-quality water was obtained from a Milli-Q water

Parte II

purification system (Millipore, Madrid, Spain). Standard solutions (1 g L^{-1}) of individual PFASs were prepared in methanol and stored under dark conditions at 4°C .

2.2. Apparatus

The LC-MS system used was an Agilent 1100 series Ion Trap-SL mass spectrometer coupled to an 1100 liquid chromatograph with an electrospray interface operating in the negative ion mode. The stationary phase used was an Ascentis® C18 column (5 cm x 2.1 mm i.d, 3 μm) from Supelco. A Water Symmetry C18 guard column (3.9 cm x 2.0 mm i.d., 5 μm) was inserted before the LC column. A homogenizer Ultra-Turrax T25 Basic from Ika (Werke, Germany), a Reax Heidolph vortex (Schwabach, Germany) with an attachment for 10 test tubes and a High Speed Brushless centrifuge MPW-350R (Warsaw, Poland) were used for sample preparation and extraction.

2.3. Determination of PFASs in biota

2.3.1. Sample collection and preservation

Different species of fish [i.e. bullet tuna (*Auxis rochei rochei*) atlantic pomfret (*Brama brama*) and mackerel (*Scomber scombrus*)] and marine birds [herring gull (*Larus michahellis*) and northern gannet (*Morus bassanus*)] were analyzed. Fish samples were bought in local markets in Córdoba (Spain) while both birds were kindly provided by the “Migres Foundation”. This Organization was founded at the end of 2003, promoted by the Regional Government of Andalusia, for monitoring the migration of birds through the Strait of Gibraltar. Birds had just dead as they were picked up in Tarifa coast (Cádiz, Spain). The northern gannet was a two-three months aged native of Northern Europe, while the herring gull was a local individual around one year old, as their feathers indicated. Birds and fishes were frozen (-20°C) until extraction to perform muscle and/or liver analyses. A sample of flounder fillet, previously used as a

fish material in the 2nd international interlaboratory study on PFASs [22], was also analyzed for validation purposes.

2.3.2. Sample preparation and microextraction

Liver and muscle samples were obtained after dissection and were homogenized using an Ultra-Turrax homogenizer T25 equipped with S25N-8g and S25N-25g dispersing elements. Extraction of PFASs was performed by mixing a sample aliquot [0.2 g, wet weight (ww)], 600 μ L of THF and 60 μ L of water into a 1.5 mL polypropylene centrifuge microtubes. Taking into account the water content of samples (~70%) [28], the final composition of the solvent mixture was around 25:75 (v/v) water:THF. Four glass balls (3 mm diameter) were added to the microtubes to accelerate and enhance sample extraction. The samples were vortex-shaken for 7 minutes and then centrifuged (15,000 rpm, 10°C, 13 minutes) to clarify the supernatant. Aliquots of this supernatant (~150 μ L) were transferred to autosampler glass vials with inserts and capped with aluminum/silicone septum barriers (Supelco, Bellefonte, USA) and they were subjected to LC/MS analysis.

2.3.3. Quantitation of PFASs by LC(ESI)IT-MS

Separation and quantification of PFASs was carried out by LC coupled with an electrospray-ionization (ESI) operating in the negative ion mode prior to ion trap-mass spectrometry detection. The mobile phase consisted of water and methanol (both containing 1 mM of ammonium acetate) and was programmed as follows: linear gradient from 30% to 100% of methanol between 0 and 27.5 min and then reverting to initial conditions allowing 12 min for stabilization. The injection volume was 10 μ L, the flow rate 0.3 mL min⁻¹ and the column temperature 40°C. Operating conditions in the ESI source and the ion-trap were: capillary voltage 2500 V, source temperature 325°C, drying gas 9 L min⁻¹,

[28] USDA National Nutrient Database for Standard reference available at: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search>

Parte II

nebulizer gas 30 psi, octopole -1.7 V except for PFTeDA -2.1 V, ICC (ion-charge control) 30.000 and maximal accumulation time 100 ms. Values for the skimmer cone voltage, trap drive and capillary exit voltage for each of the PFASs analyzed are shown in Table 1. Quantitation of the target compounds was performed by using the ion isolation mode, which is a previous stage to fragmentation in ion traps, and measuring the peak areas (smoothing with the Gauss function: width=1points and cycles=1) of $[M-K]^-$ ions for PFASs and the sum of $[M-H]^-$ plus $[M-COOH]^-$ ions for PFCAs (see Table 1 for the corresponding ion m/z). Solvent based calibration curves were constructed in the PFAS concentration range 0.5-150 $\mu\text{g L}^{-1}$ using standards in water-THF (25:75, v/v).

Table 1. Quantitation ions and MS parameters used in the analysis of the target PFASs in biota.

	PFBS	PFHxA	PFHxS	PFOA	PFOS	PFDA	PFUnDA	PFTeDA
Quantitation ions	$[M-K]^-$	$[M-H]^-$	$[M-K]^-$	$[M-H]^-$	$[M-K]^-$	$[M-H]^-$	$[M-H]^-$	$[M-H]^-$
	$[M-COOH]^-$	$[M-COOH]^-$	$[M-COOH]^-$	$[M-COOH]^-$	$[M-COOH]^-$	$[M-COOH]^-$	$[M-COOH]^-$	$[M-COOH]^-$
	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z	m/z
	299	313+269	399	413+369	499	513+469	563+519	713+669
Skimmer cone voltage (V)	-40	-40	-41.5	-40	-41.5	-41.5	-41.5	-41.5
Capillary exit voltage (V)	-150	-75	-150	-100	-200	-150	-150	-150
Trap drive	49	45	44	45	52	54	54	64

3. Results and discussion

3.1. Sources and control of background contamination

One of the problems related to PFASs analysis is the background contamination coming from a variety of fluoropolymer materials that are components of LC instruments or labware [4,20]. We investigated for instrumental sources of PFASs in our lab by injecting blank solutions (10 μL of

THF:water 75:25, v/v) in the LC/ESI/ion trap mass spectrometer. Background signals were always observed for PFHxS and PFOA at concentrations near their quantification limits (0.5 and 4 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively). After replacing the PTFE septa, which were identified as the instrumental contamination source, by aluminum/silicone septa, the background signals disappeared. Procedural contamination was investigated by adding 800 μL of a water-THF (25:75, v/v) mixture into polypropylene centrifuge microtubes and subjecting them to extraction (i.e. vortex-shaken and centrifugation at variable times). No contamination was observed for the target PFASs above their detection limits. Anyway, procedural blanks were routinely injected during sample sequences to check possible contamination from the LC system and sample treatment.

3.2. Solvent extraction method development

3.2.1. Criteria for solvent selection

A good knowledge of the interactions between the solvent and PFASs is important for setting up an efficient extraction scheme. PFCAs and PFASs are amphiphilic molecules with highly hydrophobic hydrocarbon chains (lengths between C_3 and $\geq\text{C}_{14}$) due to the presence of fluorine. The polar groups of PFCAs are both donor and acceptor hydrogen bonding while those of PFASs are anionic and acceptor hydrogen bonding. These properties make PFAS extraction difficult because of the high polarity and non-polarity of the two regions present in their structure. Our initial hypothesis was that a good solvent for PFASs should provide both polar and non-polar interactions in a correct balance. For this purpose, we selected THF and water because of their differences in dielectric constants ($\epsilon_{\text{water}} = 80$; $\epsilon_{\text{THF}} = 7.5$), which are a measurement of solvent polarity, and Hildebrand solubility parameters ($\delta_{\text{water}} = 23.3 \text{ cal}^{1/2} \text{ cm}^{-3/2}$; $\delta_{\text{THF}} = 9.5 \text{ cal}^{1/2} \text{ cm}^{-3/2}$), which are numerical values that indicate the relative solvency behaviour of a specific solvent. They are derived from the cohesive energy density of solvents, which in turn are derived from vaporization heats [27].

Parte II

Solubility behaviour can be adequately described using Hildebrand values, but predictions become more consistent using Hansen parameters, which are the dispersion (δ_d), hydrogen bonding (δ_h) and dipole-dipole (δ_p) components of Hildebrand parameters (δ_{Total}) and relate to it through [27]:

$$\delta_{\text{Total}}^2 = \delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2$$

Hansen parameters for water and THF are shown in Table 2 and their values indicate that hydrogen bonding and dispersive forces are the major components in water and THF, respectively. So, solvents with very different solvency behaviour can be obtained by simply varying the composition of the THF:water mixture (the Hildebrand parameter for a solvent mixture can be easily calculated by averaging their components). In this way, the most suitable solvent for PFAS extraction and guidelines to determine the major forces involved in PFAS solubility can be found. On the other hand, water is a polar protic solvent able to provide adequate interactions with the polar groups of PFASs (i.e. ion-dipole interactions with PFASs and hydrogen bonding with both PFCAs and PFASs).

Table 2. Different solubility parameters for various pure solvents.

Solvent	Hildebrand parameters ($\text{cal}^{1/2} \text{cm}^{-3/2}$)	Hansen parameters ($\text{cal}^{1/2} \text{cm}^{-3/2}$)			Fractional parameters		
	δ_t	δ_d	δ_p	δ_h	100 f_d	100 f_p	100 f_h
Water	23.3	7.6	7.8	20.6	21	22	57
Tetrahydrofuran	9.5	8.2	2.8	3.9	55	19	26
Methanol	14.5	7.4	6.0	10.9	30	25	45
Acetonitrile	12	7.5	8.8	3.0	39	46	15

A convenient method for which solubility information can be illustrated is the Teas triangular graph. This simple planar three-component data graph is based on the hypothetical assumption that all solvents have the same Hildebrand value and solubility behaviour is determined by the relative amounts

that the three component forces contribute to the Hildebrand parameter. This allows us the convenience of related percentages rather than unrelated sums. Tea parameters, also called fractional parameters, are mathematically derived from Hansen values by calculating the relative amount that each Hansen parameter contributes to the whole [27]. Table 2 shows the Tea parameters for water and THF. These values express that an appropriate combination of both dispersive and hydrogen bonding forces can be obtained, while keeping constant the dipole-dipole one, by mixing water and THF at different proportions. Because Hildebrand values are not the same for all liquids, the Teas graph is an empirical system with little theoretical justification. This lack of theoretical foundation, however, does not prevent the Teas graph from being an accurate and useful tool, perhaps the most convenient method by which solubility information can be illustrated [27].

3.2.2. Optimization

A sample consisting of 12 homogenized bullet tuna livers was used for optimization of solvent extraction efficiency. Sample aliquots (0.1-0.35 g ww) were spiked with an appropriate volume of a 1 mg L^{-1} solution of PFASs in THF (spiking range $20\text{-}40 \text{ ng g}^{-1}$) two hours before extraction. Equilibration between PFASs and liver matrix for a longer period of time (i.e. overnight) did not change the extraction efficiency. Matrix matched-calibration was used for optimization until method development was complete in order to ensure accurate quantitation.

3.2.2.1. Solvent composition. The influence of solvent composition was investigated by using freeze-dried liver samples (0.2 g ww) since the high water content present in biological samples (70-75% for muscle and liver [28]) was expected to be an important contribution to the low solvent volume used in microextraction. We found that the water content in bullet tuna livers ($n=10$) was $70\pm 2\%$ and this value was considered for later calculations. Table 3 shows the recoveries obtained for the target compounds and the values for the Hildebrand parameter as a function of the composition of the THF:water

Parte II

mixture. To help discussion, the Teas parameters for water, THF and the mixed solvent at the proportions with the highest recoveries (Table 3) are depicted in Figure 1a.

Table 3. Hildebrand parameters (δ , $\text{cal}^{1/2} \text{cm}^{-3/2}$) and recoveries for PFASs (%) along with their respective standard deviations ($n=3$) as a function of solvent composition.

Solvent composition THF:water, v/v	δ	Recoveries \pm SD (%)							
		PFBS	PFHxA	PFHxS	PFOA	PFOS	PFDA	PFUnDA	PFTeDA
100:0	9.5	0	0	13 \pm 5	20 \pm 6	25 \pm 6	28 \pm 7	28 \pm 3	29 \pm 1
85:15	11.6	100 \pm 7	72 \pm 6	103 \pm 3	89 \pm 7	100 \pm 7	85 \pm 5	81 \pm 6	70 \pm 6
75:25	13.0	105 \pm 1	94 \pm 2	103 \pm 1	97 \pm 1	104 \pm 1	104 \pm 1	105 \pm 1	106 \pm 1
70:30	13.6	103 \pm 1	92 \pm 8	98 \pm 3	95 \pm 9	106 \pm 4	92 \pm 7	104 \pm 1	105 \pm 5
55:45	15.7	94 \pm 1	101 \pm 2	98 \pm 4	97 \pm 6	71 \pm 6	77 \pm 9	68 \pm 8	68 \pm 11
40:60	17.8	79 \pm 4	81 \pm 1	80 \pm 5	93 \pm 2	71 \pm 8	54 \pm 3	40 \pm 3	32 \pm 8
15:85	21.2	37 \pm 1	36 \pm 1	13 \pm 1	12 \pm 1	10 \pm 1	10 \pm 1	6 \pm 1	2 \pm 2
0:100	23.3	33 \pm 2	30 \pm 3	13 \pm 1	10 \pm 1	7 \pm 1	15 \pm 1	2 \pm 1	2 \pm 1

Sample: 0.2 g (wet weight) of fortified (40 ng g^{-1} ww) frozen-dried bullet tuna
Solvent volume: 600 μL

As expected, no extraction at all or very low recoveries were obtained for PFASs in pure THF or water (Table 3). The balance between polar (i.e. dipole-dipole plus hydrogen bonding) and non-polar (i.e. dispersion) forces for both solvents (Figure 1a) were not adequate for PFAS solubilization. Extraction efficiency greatly increased by mixing both solvents and recoveries were quantitative at water percentages between 15 and 30% for PFASs and 20-30% for PFCAs. Probably, the strong ion-dipole interaction between PFASs and water facilitated their solubilization at lower water proportions. A solvent mixture made of 75:25 (v/v) THF:water was chosen as optimal for extraction.

According to these results, solvents having Hildebrand parameter values around 12-14 (Table 3) and Teas parameters with polar ($f_h + f_p$)/non-polar (f_d) force ratios about 1.2 (e.g. a mixture 25:75 of water:THF, see Figure 1a) should

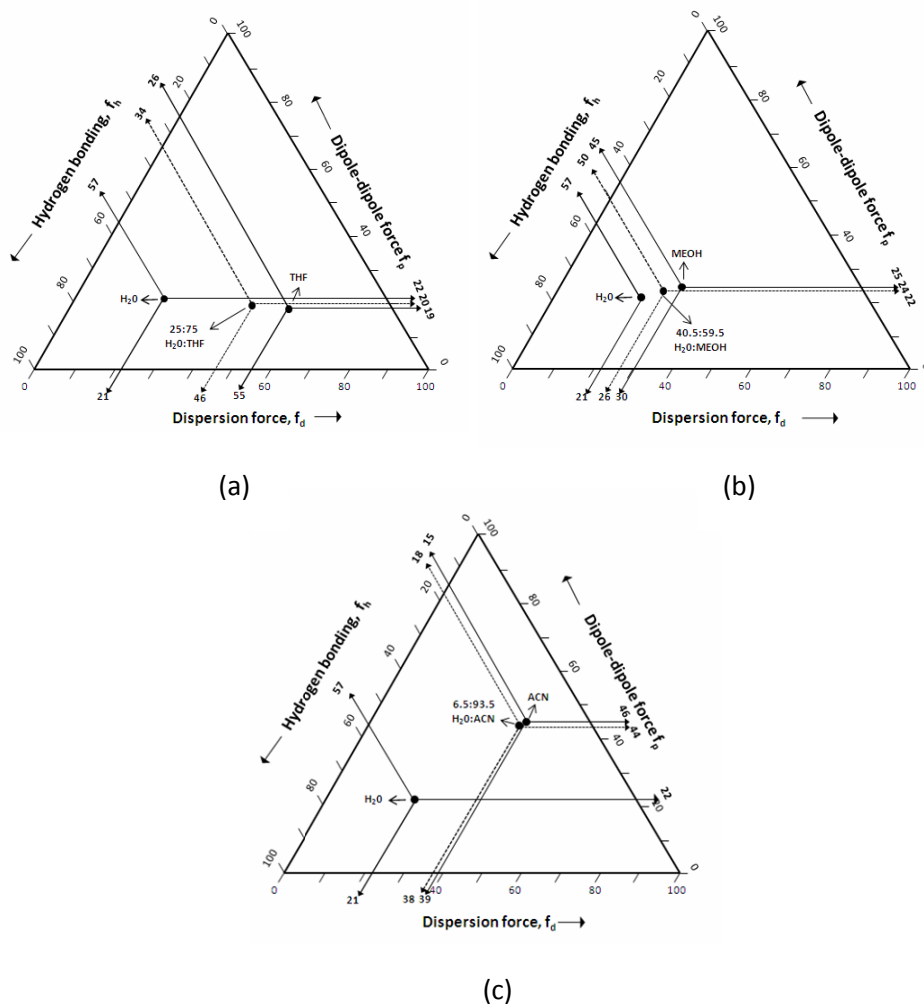


Figure 1. Teas graphs for pure solvents and their mixtures at the specified compositions: (a) THF and water; (b) methanol and water and (c) acetonitrile and water.

provide efficient extractions for PFASs. Because of the nature of the PFAS polar groups, these solvents should be able to provide both donor and acceptor hydrogen bonding and, probably, extraction is enhanced as polar forces mainly consist of hydrogen bonding (e.g. under optimal conditions, the Teas parameters with hydrogen bonding/dipole-dipole ratio was around 1.7, Figure

Parte II

1a). Solvents or solvent mixtures meeting these characteristics can be easily found from the knowledge of their structure, and their Hildebrand and Teas parameters, always taking into account the water content in samples.

For comparison, the Teas graph for two solvents widely used in the extraction of PFASs from biological samples, namely 50:50 methanol:water [24] and acetonitrile [11], were constructed. According to the reported procedures [11,24], calculations were based on 1 g of sample and 3 mL of 50:50 methanol:water or 10 mL of acetonitrile, respectively. The water content of the sample (around 0.7 mL) was also considered. Figure 1 depicts the percentages of the three forces contributing to the Hildebrand parameter for pure solvents (water and methanol in Figure 1b and water and acetonitrile in Figure 1c) and the corresponding solvent mixtures (including sample water) proposed for extraction. Solubility parameters for water and methanol are shown in Table 2. Hildebrand parameters for the methanol:water and acetonitrile:water mixtures were 19.8 and 12.7 cal^{1/2} cm^{-3/2}, respectively.

The reported low recoveries for long-chain PFASs (<50%) in methanol:water [24] could be possibly explained from Figure 1b. Although an appropriate hydrogen bonding/dipole-dipole ratio was obtained (i.e. ~2.1), the polar and non-polar forces were unbalanced (i.e. ratios of 2.8, far above the value of 1.2 obtained for water:THF mixtures) and, consequently, dispersion forces were at an unacceptable low proportion for extraction of the more hydrophobic PFASs. On the other hand, the balanced polar/non-polar force ratio obtained for acetonitrile (~1.6) explains the good recoveries obtained for PFASs in the whole range. However, the hydrogen bonding/dipole-dipole ratio was around 0.4, which possibly explains the higher solvent volume and extraction time required for quantitative recovery of PFASs compared to those demanded by the THF:water mixture.

3.2.2.2. Solvent volume. Once the composition of the solvent was optimized, we evaluated the volume needed for the extraction of PFASs from 0.2 g (ww) of fortified (40ng g⁻¹) sample aliquots previously freeze-dried. Solvent volumes of

25:75 v/v water:THF mixtures between 250 and 1000 μL were tested and recoveries higher than 90% were obtained for the target compounds in the whole range. Recoveries kept constant with the amount of sample used for extraction (ranged tested 0.1-0.35 g ww) provided that solvent volume/sample amount ratios were within the interval previously tested.

In order to directly extract wet biota samples, the water content in bullet tuna liver ($70\pm 2\%$) was considered to get the required final solvent composition (25:75 v/v THF:water). So, extraction efficiencies were investigated for fortified sample aliquots (0.2 g ww) by addition of 600 μL of THF and 60 μL of water, taking into account that ~ 140 μL of water came from the sample. Recoveries for both wet and frozen-dried samples were similar, so wet samples were used for PFAS analysis. Because of the important role that water plays in most of PFAS extractions, we strongly recommend to have it in consideration in related extraction discussions.

3.2.2.3. Extraction time. The time required to reach equilibrium conditions for extraction was investigated. For this purpose, samples were vortex-shaken in the interval comprised between 5 and 45 min. Equilibrium conditions were rapidly achieved, just 5 min, owing to the high solubilising capability of the solvent mixture used. An extraction time of 7 min was selected because the precision was slightly improved. Experiments were carried out using both fortified bullet tuna liver samples and a flounder fillet sample, previously used in the 2nd international interlaboratory study on PFASs [22], in order to check that the method used for sample fortification did not affect the time required for extraction.

3.3. Analytical performance of ion isolation-based ion-trap MS quantitation

Ion-trap MS measurements of PFASs in biological samples have been mainly carried out in the single ion monitoring (SIM) [19] and full scan [18] modes. Multiple reaction monitoring (MRM) has been also proposed for quantitation of PFCAs [18]. Because of both the strong matrix effects caused by

Parte II

non-rigorously cleaned-up sample extracts in SIM and Full scan modes and the absence of suitable product ions from PFASs in MRM, we investigated the sensitivity, selectivity and precision of the ion isolation mode for quantitation of PFASs.

3.3.1. Sensitivity

Firstly, the sensitivity (signal intensity for a given concentration) of different monitoring modes for PFASs was compared, namely full scan (range of m/z 100-750), MRM (only for PFCAs) and ion isolation (selected m/z values ± 4). Full scan was preferred over SIM because, in practice, switching from full scan to SIM on the ion trap eliminates the information available in full scan for only a slight gain in sensitivity since SIM on the ion trap does not monitor a single mass continuously as in quadrupole mass filters, but only shortens one part of the scan program [29].

Both ESI source and ion-trap parameters were optimized to get the highest sensitivity for PFASs in each of the selected monitoring modes. As previously reported [17-19], PFCAs underwent an inevitable in-source decarboxylation, its extent mainly depending on the voltages applied to the capillary and capillary exit. Voltages and other instrumental parameters were selected to give the highest possible amount of the following ions: $[M-K]^-$ for PFASs, the sum of $[M-H]^-$ and $[M-COOH]^-$ for PFCAs in both full scan and ion isolation modes and $[M-H]^-$ for PFCAs in MRM mode. Optimization of parameters was carried out by injecting standard solutions of analytes (1 mg L^{-1} prepared in the same solvent composition of mobile phase they are eluted from the analytical column) in the LC-ion-trap MS system using a KD Scientific, model 100, syringe pump (New Hope, MN) at $300 \mu\text{L h}^{-1}$. For MS/MS experiments, $[M-H]^-$ ions were isolated with the isolation width set at 4 m/z units, and then

[29] N.A. Yates, M.M. Booth, J.L. Stephenson, R. A. Yost in: R.E. March, J.F.J Todd (Eds), Practical Aspects of Ion Trap Mass Spectrometry. Volume III. CRC Press, London. 1995, p. 121.

fragmented with the resonance excitation set at the previously optimized values.

Table 4 shows the figures of merit obtained for calibration curves run using standard solutions (0.5-250 $\mu\text{g L}^{-1}$) of PFASs in THF/water (75:25 v/v) under the experimental conditions optimized for each of the monitoring modes. Similar sensitivity was achieved by full-scan and ion isolation modes, which indicated that the latter can be used for sensitive monitoring of PFASs. In contrast, quantitation of PFCAs by MRM was between 4 and 45-fold less sensitive. This decrease mainly resulted from the in-source fragmentation of parent ions and the low yield of the respective ion products into the trap.

A typical chromatogram obtained for standard solutions of PFASs under the ion isolation monitoring mode is shown in Figure 2a. Chromatograms for PFCAs show the two monitored ions (i.e. $[\text{M-H}]^-$ and $[\text{M-COOH}]^-$). Correlation between peak areas and PFAS concentrations (0.005-1.5 ng, absolute amount injected) was determined by linear regression. The coefficients of determination were in the range 0.9981-0.9999, indicating good fits. Instrumental detection limits (LOD) were calculated from the lower concentrations of standards giving a signal-to-noise ratio of 3 and they were found to be 1 pg for PFBS and PFOS, 3 pg for PFHxA and PFHxS, 5 pg for PFTeDA, 10 pg for PFOA and PFUnDA and 15 pg for PFDA. So, they were low enough for monitoring PFASs in biological samples.

3.3.2. Selectivity

Co-eluting matrix components cause two major types of interferences in ESI/ion-trap MS, namely ionization suppression or enhancement in the ESI source and space-charge effects in the ion-trap. On the other hand, matrix components with interfering masses are frequently detected in the MS analysis of some PFASs. Known interferences originated from the presence of bile salts in biota (e.g. bird livers) interfere with PFOS and endogenous human hormones interfere with PFHxS in human (e.g. serum) samples. This kind of interferences

Table 4. Figures of merit for quantitation of PFASs under different operation modes in ion-trap MS.

Analytes	Operation mode	Quantitation ions	(Slope \pm s ^c) x10 ³	r ²
PFBS	Full scan ^a	[M-K] ⁻ m/z 299	105 \pm 3	0.9980
	Ion isolation ^b	[M-K] ⁻ m/z 299	102.0 \pm 0.7	0.9990
PFHxA	Full scan ^a	[M-H] ⁻ m/z 313 + [M-COOH] ⁻ m/z 269	37.1 \pm 0.6	0.9992
	Ion isolation ^b	[M-H] ⁻ m/z 313 + [M-COOH] ⁻ m/z 269	39 \pm 2	0.9983
	MRM	m/z 313 > m/z 269	1.0 \pm 0.3	0.9974
PFHxS	Full scan ^a	[M-K] ⁻ m/z 399	89 \pm 2	0.9982
	Ion isolation ^b	[M-K] ⁻ m/z 399	89 \pm 3	0.9990
PFOA	Full scan ^a	[M-H] ⁻ m/z 413 + [M-COOH] ⁻ m/z 369	28.0 \pm 0.6	0.9994
	Ion isolation ^b	[M-H] ⁻ m/z 413+ [M-COOH] ⁻ m/z 369	26.8 \pm 0.2	0.9999
	MRM	m/z 413 > m/z 369	0.62 \pm 0.05	0.9921
PFOS	Full scan ^a	[M-K] ⁻ m/z 499	78 \pm 2	0.9983
	Ion isolation ^b	[M-K] ⁻ m/z 499	75 \pm 2	0.9981
PFDA	Full scan ^a	[M-H] ⁻ m/z 513 + [M-COOH] ⁻ m/z 469	14.8 \pm 0.4	0.9984
	Ion isolation ^b	[M-H] ⁻ m/z 513 + [M-COOH] ⁻ m/z 469	14.5 \pm 0.3	0.9993
	MRM	m/z 513 > m/z 469	1.86 \pm 0.06	0.9982
PFUnDA	Full scan ^a	[M-H] ⁻ m/z 563 + [M-COOH] ⁻ m/z 519	21.3 \pm 0.7	0.9983
	Ion isolation ^b	[M-H] ⁻ m/z 563 + [M-COOH] ⁻ m/z 519	18.1 \pm 0.5	0.9982
	MRM	m/z 563 > m/z 519	0.79 \pm 0.04	0.9951
PFTeDA	Full scan ^a	[M-H] ⁻ m/z 713 + [M-COOH] ⁻ m/z 669	18.6 \pm 0.4	0.9981
	Ion isolation ^b	[M-H] ⁻ m/z 713 + [M-COOH] ⁻ m/z 669	18.5 \pm 0.4	0.9993
	MRM	m/z 713 > m/z 669	1.24 \pm 0.07	0.9903

^a m/z range, 100-750. ^b selected m/z values \pm 4 in every segment. ^c Standard deviation.

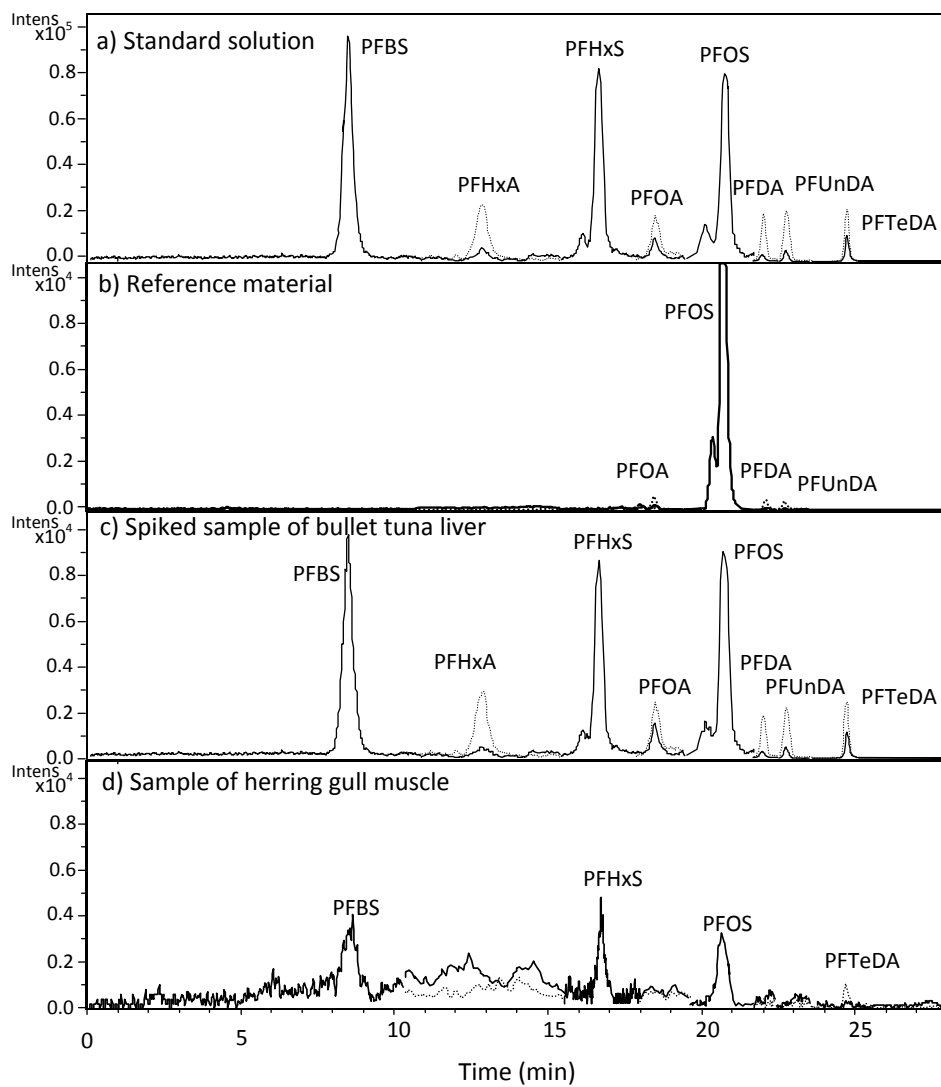


Figure 2. LC-ESI-ion trap-MS selected ion chromatograms of PFASs obtained from (a) a standard solution of $20 \mu\text{g L}^{-1}$, (b) the reference material, (c) a spiked (20 ng g^{-1}) bullet tuna liver sample and (d) herring gull muscle sample.

can be solved by using less sensitive interference-free transitions in MS/MS (option not available for ion-traps because of the low mass cut-off) or using perfluorinated stationary phases for interference separation [30-32]. Since mass interferences can be easily solved by using the appropriate chromatographic column, we only focused in this research on interferences influencing ionization or producing space-charge effects. Samples for which taurodeoxycholic acid (the major mass interference for PFOS) was detected (the m/z and the retention time for PFOS underwent a detectable shift) were discarded (e.g. livers from herring gull and northern gannet).

Ionization and space-charge type interferences were evaluated by comparison of the slopes of solvent-based calibration curves and matrix-matched calibration curves obtained from different biological blank samples (0.2 g of muscle tissues of bullet tuna and atlantic pomfret and livers of bullet tuna) fortified with PFASs in the range 20-800 ng g⁻¹. Extraction of samples was made in the entire range of solvent volumes for which quantitative recovery had been checked (250-1000 μ L). Ionization suppression was observed for sample extract volumes lower than 700 μ L (e.g. the slopes of calibration curves decreased around 10% for PFBS, PFHxA, PFHxS and PFOS and 45% for PFOA, PFDA, PFUnDA and PFTeDA by extracting with 600 μ L solvent and around 70-95% as 250 μ L of solvent was used for extraction). Higher volumes were interference-free as inferred from the comparison of both slopes by using an appropriate t student-test [33]. Thus, the calculated t-values were in the range 0.06–2.62 and were below the critical t-value (3.17), being significance established at 0.01 levels. Therefore, matrix components were not expected to interfere in the determination of the target compounds under the proposed conditions and solvent-based calibration curves are proposed for quantification.

[30] J.P. Benskin, M. Bataineh, J.W. Martin, *Anal. Chem.* 79 (2007) 6455.

[31] E. Chan, M. Shandhu, J.P. Benskin, M. Ralitsch, N. Thibault, D. Birkholz, J.W. Martin, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 1405.

[32] L.W.Y. Yeung, S. Taniyasu, K. Kannan, D.Z.Y. Xu, K.S. Guruge, P.K.S. Lam, N. Yamashita, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4950.

[33] L. Cuadros-Rodríguez, A.M. García-Campaña, F. Alés-Barrero, C. Jiménez-Linares, M. Román-Ceba, *J. AOAC Int.* 78 (1995) 471.

For more complex samples (such as foodstuffs, e.g. dairies) the inclusion of an additional clean-up step may be necessary.

The accuracy of the solvent-based calibration curve for quantitation of the target compounds was also investigated by spiking the same biological samples with 20 ng g⁻¹ of the mass labelled ¹³C₈-PFOA internal standard and permitted to equilibrate the spike in the sample overnight. Recoveries for this compound in the muscle tissues of bullet tuna and atlantic pomfret and livers of bullet tuna were between 96 and 99%.

The expected higher performance of the ion isolation monitoring mode over full scan mode to prevent space-charge effects was assessed. In the simplest sense, space-charge effects are a consequence of the mutual repulsion between particles of like charge and are produced when too many ions are stored in the trap overfilling it. High ion density causes that the ions in the center of the trap are shielded by outer ions and do not respond ideally to the RF field leading to lower mass resolution, mass misassignments and a loss of sensitivity [29,34]. Space charge effects are more marked on ions with lower m/z which are the first ones in leaving the trap.

Space-charge effects were evaluated, for both ion isolation and full scan modes, through the analysis of fortified (80 ng g⁻¹) bullet tuna samples according to the procedure specified in section 2.3 but varying the maximum accumulation time of ions in the trap and the ion charge control (ICC) between 100-200 ms and 5,000-50,000, respectively. The ejection of matrix ions from the ion trap during the isolation step of target ions prevented somehow the space charge effects on the detector and no space-charge effects were observed at all using the ion isolation monitoring mode. On the contrary, space-charge related interferences were detected for all the analytes under full scan conditions, the effects being more significant for the lower m/z ions. As an example, Figure 3 compares the mass spectra obtained for the analysis of PFOS in a standard

[34] K.A. Cox, C.D. Cleven, R.G. Cooks, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 144 (1995) 47.

Parte II

solution (a) and an extract of spiked bullet tuna liver (b,c). Spectra obtained for the sample using the ion isolation mode (c) were interference-free (compare with the spectrum of the standard in a) while space-charge effects were observed for sample extracts analyzed under full-scan conditions (b). The resonance for ions of each specific m/z value was spread over a range of frequencies given rise to broad peaks centered at a higher mass.

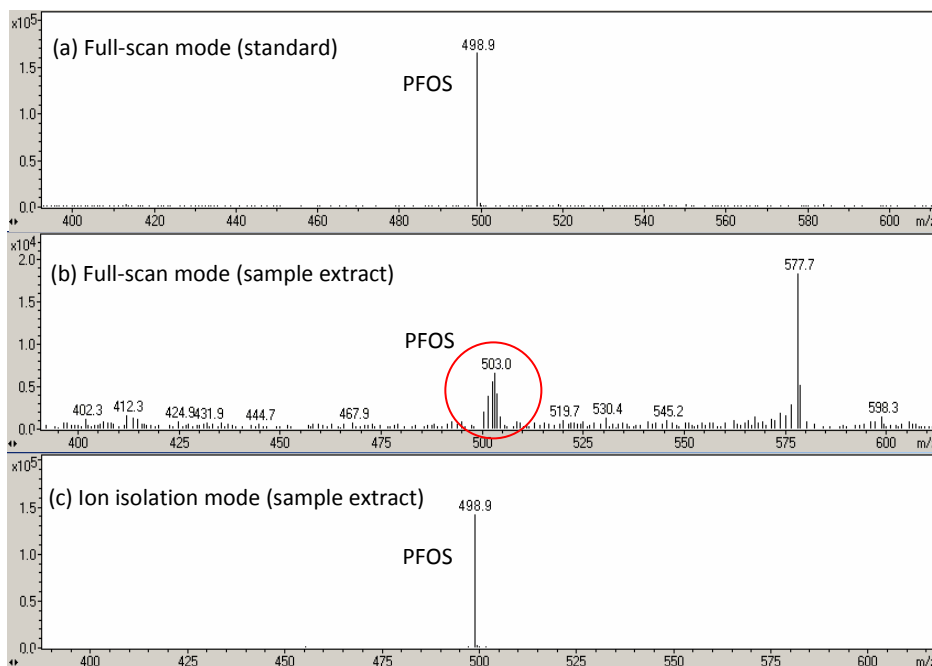


Figure 3. Ion trap-MS mass spectra obtained for PFOS from a standard solution of $20 \mu\text{g L}^{-1}$ when working in full-scan mode (a) and from a spiked (80 ng g^{-1}) extract of bullet tuna liver when working in full-scan (b) and isolation MRM (c) modes.

3.3.3. Precision

The precision of the method was evaluated by extracting 11 independent fortified (20 ng g^{-1}) liver and muscle (bullet tuna, atlantic pomfret,

mackerel and northern gannet) samples. The values, expressed as relative standard deviation (RSD), were between 5% and 9% for all the PFASs.

3.4. Method validation

Validation of both the solvent extraction method and the ion-trap monitoring mode here proposed for the determination of PFASs in biota was validated by analysing a flounder fillet sample, previously used in the 2nd international interlaboratory study on PFASs [22], according to the procedure specified in section 2.3. PFASs in sample extracts were also quantified by triple quadrupole MS/MS (6410 series Agilent Triple Quad, Palo Alto, CA) by monitoring the following transitions; PFBS, 299 →80; PFHxA, 313 →269; PFHxS, 399 →80; PFOA, 413 →369; PFOS, 499 →80; PFNA, 463 →419; PFDA, 513-469; PFUnDA, 563 →519; PFDoDA, 613 →569 and PFOSA, 498 →78). Quantification against solvent based calibration curves was used in both MS techniques.

Table 5 shows the summary statistics obtained in this study and Figure 2b shows the corresponding extracted ion chromatogram obtained by ion isolation ion-trap MS. Data reported for this sample from the 2nd international interlaboratory study are also included in Table 5 [22]. As available, the results obtained for PFASs by ion isolation ion-trap MS were always within the mean±S values reported for the reference material and they were in good agreement with those obtained by the most selective tandem MS. The results obtained by triple quadrupole measurements indicate that the proposed solvent extraction method is also a rapid and convenient alternative to existing extraction methods for this technique.

3.5. Analysis of biota samples

Muscle and liver samples from a variety of marine animals were analysed to prove the suitability of the proposed method to determine PFASs. First, the water content of samples was determined and it was always between 70 and 75%, as reported in the literature [28]. Then, detection and quantitation

Table 5. Summary statistics of results obtained in the analysis of a flounder fillet sample by using ion-trap and triple quadrupole MS and those provided by the laboratories (n=15) in the 2nd international interlaboratory study (2nd ILS) on perfluorinated compounds.

Analyte	Spike (ng g ⁻¹)	Ion isolation ion-trap MS		MRM Triple quadrupole MS		2 nd International interlaboratory study ^b				
		Mean± ^a S (ng g ⁻¹)	RSD (%)	Mean± ^a S (ng g ⁻¹)	RSD (%)	Mean (ng g ⁻¹)	S (ng g ⁻¹)	RSD (%)	Min (ng g ⁻¹)	Max (ng g ⁻¹)
PFBS	-	n.d.	-	n.d.	-	n.a.	-	-	n.a.	n.a.
PFHxA	-	n.d.	-	n.d.	-	n.a.	-	-	n.a.	n.a.
PFHxS	-	n.d.	-	n.d.	-	n.a.	-	-	n.a.	n.a.
PFOA	22.6	21±2	9	18.0±0.8	5	18.0	4.1	23	9.2	23.6
PFOS	145	194±8	8	177±12	7	150	44.0	29	49.9	230
PFNA	17.2	n.a.	-	17.7±1.5	8	17.5	4.6	26	8.9	27.3
PFDA	21.9	25.3±0.1	1	21.3±0.9	5	21.1	4.6	22	12.9	26.7
PFUnDA	17.8	20±1	7	17.5±1.3	7	15.9	4.1	26	9.0	21.0
PFDoDA	20.1	n.a.	-	23.0±0.8	4	17.3	5.2	30	8.5	23.6
PFTeDA	-	n.d.	-	n.a.	-	n.a.	-	-	n.a.	n.a.
PFOSA	3.2	n.a.	-	3.1±0.4	9	3.6	1.7	47	1.5	7.5

^an=3; n.d. non detected; n.a. non analyzed.

^bData taken from [22]

limits of the method for PFASs were determined by analysing sample blanks (n=11) and considering a signal-to-noise of 3 and 10, respectively. Method LODs and LOQs for the target PFASs were between 0.4 and 6 ng g⁻¹ and 2 and 16 ng g⁻¹ ww, respectively.

Table 6 lists the concentrations found for the target compounds and the recoveries obtained after spiking the samples at different concentration levels. Recoveries of PFASs ranged from 87% to 111% (n=9) with relative standard deviations (RSD) ranging from 1 to 11%.

Clean chromatograms, similar to those obtained for standards, were obtained for all the samples analyzed (e.g. Figure 2 c and d). PFASs were only present at quantifiable levels in Atlantic pomfret and herring gull although some other PFASs were clearly detected in some samples (e.g. see Figure 2d), but below the respective LOQ.

Table 6. Mean concentrations and recoveries and the respective standard deviations obtained for the target compounds in the analysis of biota samples using the proposed method.

Samples	Concentrations $\pm S^a$ (ng g ⁻¹) and recoveries $\pm S^a$ (%)							
	PFBS	PFHxA	PFHxS	PFOA	PFOS	PFDA	PFUnDA	PFTeDA
Bullet tuna muscle	n.d.	< LOQ	< LOQ	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.
Spiked sample	98 \pm 10	95 \pm 5	93 \pm 6	89 \pm 8	105 \pm 9	107 \pm 1	111 \pm 11	98 \pm 5
Atlantic pomfret muscle	n.d.	n.d.	2.9 \pm 0.6	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.
Spiked sample	105 \pm 6	100 \pm 1	105 \pm 7	93 \pm 4	109 \pm 7	106 \pm 11	100 \pm 5	103 \pm 1
Mackerel muscle	n.d.	< LOQ	< LOQ	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.
Spiked sample	95 \pm 7	87 \pm 6	94 \pm 6	87 \pm 6	102 \pm 9	97 \pm 1	101 \pm 3	97 \pm 4
Herring gull muscle	3.2 \pm 0.6	n.d.	< LOQ	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.	< LOQ
Spiked sample	97 \pm 3	105 \pm 6	111 \pm 3	105 \pm 8	110 \pm 5	104 \pm 1	105 \pm 6	105 \pm 1
Northern gannet muscle	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.
Spiked sample	90 \pm 1	109 \pm 3	100 \pm 11	94 \pm 6	100 \pm 1	98 \pm 10	97 \pm 1	88 \pm 11
Bullet tuna liver	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	13.1 \pm 0.2	n.d.	n.d.	n.d.
Spiked sample	105 \pm 1	94 \pm 2	103 \pm 1	90 \pm 10	104 \pm 1	104 \pm 1	105 \pm 1	106 \pm 1
Atlantic pomfret liver	8.9 \pm 0.3	n.d.	n.d.	n.d.	9.5 \pm 0.5	n.d.	n.d.	n.d.
Spiked sample	90 \pm 1	85 \pm 3	107 \pm 3	103 \pm 1	99 \pm 1	107 \pm 3	99 \pm 1	108 \pm 1

^an=3; n.d. non detected; spiked concentration: 20 ng g⁻¹ ww

4. Conclusions

A simple method has been developed for the analysis of PFASs in biota by combining an efficient microextraction procedure and an ion isolation monitoring mode in ion-trap MS. The mixture 75:25 (v/v) of THF and water constitutes a valuable alternative to the current solvents used for the extraction of PFASs. Major benefits of this mixture are the adequate balance between polar and non-polar forces and the possibility of establishing different types of interactions with the polar groups of PFASs (i.e. ion-dipole and hydrogen bonding). These properties make it possible to extract ionic and nonionic PFASs with carbon chain lengths between C₄ and C₁₄ from biota samples (i.e. muscle and/or liver of sea fish and birds) using low solvent volumes, which avoids the commonly required subsequent evaporation. Recoveries in spiked samples ranged between 85 and 111%. It was proved that the method not only worked

Parte II

with ion-trap MS, as here proposed, but also with other MS techniques as triple quadrupole. From this study, it can be inferred that Hildebrand solubility parameters and their components, illustrated by Teas diagrams, may offer a simple way to establish guidelines for solvent selection in extractions.

The ion isolation monitoring mode in ion-trap MS offers sensitivity and selectivity enough to determine PFASs in the THF:water extract of biota samples without the need of clean-up steps. Sensitivity of ion isolation monitoring mode is similar to the full scan mode, thus permitting detection limits for PFASs in the range 0.4-6 ng g⁻¹. The selectivity achieved is a consequence of the reduction/removal of the space-charge effects caused by matrix components. The method, however, does not solve mass interferences caused by bile salts in the analysis of PFASs in some biota samples such as bird livers. So, it is strongly recommended the use of perfluorinated stationary phases for mass interference separation [30-32] in order to extend the application of ion-trap MS to a wider type of samples.

Acknowledgments

Authors gratefully acknowledge financial support from Spanish MICINN (Project No CTQ-2008-01068). They specially thank to the staff of Migres Foundation for kindly providing the sea birds. The two firsts authors acknowledge the Spanish MEC for the postgrad fellowships award (AP20043644 and AP2005-4275).

CAPÍTULO 5

A simple and rapid extraction method for sensitive determination of perfluoroalkyl substances in blood serum suitable for exposure evaluation

Journal of Chromatography A 1235 (2012) 84-91

Noelia Luque, Ana Ballesteros-Gómez, Stefan van Leeuwen, Soledad Rubio

Abstract

In this work, we propose a microextraction method based on a new supramolecular solvent (SUPRAS) made up of reverse aggregates of hexanoic acid, combined with liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry (LC/QQQ MS-MS) for the determination of the perfluoroalkyl substances (PFASs) in blood serum. A SUPRAS is a nano-structured liquid made up of surfactant aggregates synthesized through a self-assembly process. The method involved the acidification of 765 μL of blood serum (600 μmol of hydrochloric acid per ml of serum) followed by the addition of hexanoic acid (97 μL) and tetrahydrofuran (THF) (600 μL), conditions under which the supramolecular solvent (~ 360 μL) formed in situ after vortex-shaking and centrifugation. Parameters affecting extraction efficiency and concentration factors were studied. The overall sample treatment took only 20 min and several samples (20-30) can be simultaneously analyzed using conventional lab equipments, making additional investments unnecessary. Recoveries for the internal standards in samples ranged from 75 to 89% with relative standard deviations between 1 and 15%. Calibration was based on the use of internal standards. The method was very sensitive with detection limits ranging from 2 to 20 pg mL^{-1} for PFASs. The approach developed was successfully applied to the determination of PFASs in different blood serum samples. The concentration of PFASs found in samples of animal origin ranged between 17 and 197.3 pg mL^{-1} .

and between 84 and 5168 pg mL⁻¹ in samples of human origin. Both the analytical and operational features of this method make it suitable for the evaluation of exposure to PFASs.

Keywords: Perfluoroalkyl substances; Blood serum; supramolecular solvent based-microextraction, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

1. Introduction

Per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) are emerging contaminants that comprise a large group of chemicals [1]. Attention has been focused on these chemicals due to the discovery of their global biospheric distribution explained by their persistence and bioaccumulation in biota [2-3]. The marketing and use of perfluorooctane sulfonate (PFOS) were restricted by the European directive 2006/122/EC [4]. PFOS has been included in the annex III of the Directive 2008/105/EC as part of the list of substances subject to review for identification as priority hazardous compounds in the framework of the European water policies [5]. PFASs have been also listed as contaminants of relevance to be monitored in fish and other seafood for human consumption for determining good environmental status of marine waters in the Marine Strategy Framework Directive [6]. In addition, PFOS, its salts and perfluorooctane sulfonyl fluoride (PFOSF) have been included in Annex B to the Stockholm

[1] R.C. Buck, J. Franklin, U. Berger, J.M. Conder, I.T. Cousins, P. de Voogt, A.A. Jensen, K. Kannan, S.A. Mabury, S.P.J. van Leeuwen. *Integr. Environ. Assess. Manage* 7 (2011) 513.

[2] J.P. Giesy, K. Kannan, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001)1339.

[3] C.R. Powley, S.W. George, M.H. Russell, R.A. Hoke, R.C. Buck, *Chemosphere* 70 (2008) 664.

[4] Directive 2006/122/EC of the European Parliament and of the Council, *Official J. Eur. Union*, L 372 (2006) 32.

[5] Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council, *Official J. Eur. Union*, L 348 (2008) 84.

[6] Marine strategy framework directive. Task group 9 Contaminants in fish and other seafood, available at: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/111111111/13669/1/tg9%20report%20final_vii.pdf

Convention on persistent organic pollutants (POPs) [7].

The presence of organic fluoride in humans was first reported by over 30 years ago [8] but studies to determine the concentration of PFASs in serum of workers with an occupational exposure (in the order of 1000-2000 ng mL⁻¹) and general population (about 100 times lower) did not begin until the 1990s and 2000s, respectively [9,10]. The exposure to PFASs is likely to occur via several routes e.g. ingestion (e.g. food, drinking water, dust, etc), dermal contact and inhalation [11] and they are widely distributed in the body and especially in blood, liver and kidney [12]. Major PFASs found in human serum are PFOS, perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorohexane sulfonate (PFHxS), although long chain perfluoroalkyl carboxylates (e.g. C₉-C₁₄) are also found in these biological matrices at relevant concentrations [13-16].

The determination of PFASs in blood samples (i.e. whole blood, serum and plasma) is mostly made by liquid chromatography (LC)-tandem mass spectrometry (MS/MS) with negative electrospray ionization (ESI-) interfaces [16,17]. Comparison of extraction and quantitation methods for PFASs in human

[7] The 9 new POPs under the Stockholm Convention, available at: <http://chm.pops.int/Programmes/New%20POPs/The%209%20new%20POPs/tabid/672/language/en-US/Default.aspx>.

[8] D.R. Taves, *Nature* 217 (1968) 1050.

[9] F.D. Gilliland, J.S. Mandel, *Am. J. Ind. Med.* 29 (1996) 560.

[10] K.J. Hansen, L.A. Clemen, M.E. Ellefson, H.O. Johnson, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 766.

[11] Y. Pico, M. Farre, M. Llorca, D. Barcelo, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51 (2011) 605.

[12] K. Kannan, *Environ. Chem.* 8 (2011) 333.

[13] K. Kannan, S. Corsolini, J. Falandysz, G. Fillmann, K.S. Kumar, B.G. Loganathan, M.A. Mohd, J. Olivero, N. van Wouwe, J.H. Yang, K.M. Aldous, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 4489.

[14] A.M. Calafat, L.L. Needham, Z. Kuklennyik, J.A. Reidy, J.S. Tully, M. Aguilar-Villalobos, L.P. Naeher, *Chemosphere* 63 (2006) 490.

[15] D.J. Ehresman, J.W. Froehlich, G.W. Olsen, S. Chang, J.L. Butenhoff, *Environ. Res.* 103 (2007) 176.

[16] L.S. Haug, C. Thomsen, G. Becher, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 385.

[17] A. Jahnke, U. Berger, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 410.

plasma, serum and whole blood has been reported [18]. Current sample treatments for PFASs analysis are mostly based on ion-pair extraction employing methyl-tert-butyl-ether after reaction with tetrabutylammonium [10], solvent extraction with acetonitrile [3,19] or solid phase extraction (SPE), both off-line [15,20,21] or column switching [16,22,23]. Organic solvent volumes around 10-15 mL [3,13,18] and times between 15 min and 16 h are spent by extraction [13,18,20,21]. Acidification [20,22], alkaline digestion [21] or addition of organic solvent to samples [3,16,18,23] are usually carried out prior SPE in order to prevent the clogging of pre/columns caused by the precipitation of blood proteins. Clean-up strategies include column washing [15,20,22], filtration [10,20], centrifugation [22], dispersive graphitized carbon with glacial acetic acid [3], and Wax SPE of extracts [19], being common the use of multiple-steps methods. Main drawbacks of these strategies are much hands-on time due to the need for repetitive washes [10], low recoveries for long-chain PFASs due to co-precipitation with serum protein [16,19], thorough washings of SPE cartridges after sample percolation [15,19], problems of contamination in the different procedural steps, lack of enrichment or even dilution of the samples (only online SPE techniques permit to concentrate them) or the need for additional column switching equipment investments [16,22,23]. In addition most of the developed methodologies require matrix-matched calibration for accurate quantitation of PFASs. Usual detection limits (LODs) are in the range 0.1-3 ng mL⁻¹ [17] although a method allowing PFAS quantification at concentrations as low as 0.05 ng PFAS mL⁻¹ serum has been reported [16]. According to the above statements, the development of new methods for exact

[18] W.K. Reagen, M.E. Ellefson, K. Kannan, J.P. Giesy, *Anal. Chim. Acta* 628 (2008) 214

[19] L.W.Y. Yeung, S. Taniyasu, K. Kannan, D.Z.Y. Xu, K.S. Guruge, P.K.S. Lam, N. Yamashita, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4950.

[20] A. Kärman, B. van Bavel, U. Järnberg, L. Hardell, G. Lindström, *Anal. Chem.* 77 (2005) 864.

[21] S. Taniyasu, K. Kannan, M.K. So, A. Gulkowska, E. Sinclair, T. Okazawa, N. Yamashita, *J. Chromatogr. A* 1093 (2005) 89.

[22] Z. Kuklennyik, L.L. Needham, A.M. Calafat, *Anal. Chem.* 77 (2005) 6085.

[23] A. Holm, S.R. Wilson, P. Molander, E. Lundanes, T. Greibrokk, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 1071.

quantitation of PFASs, which feature straightforward and reduced sample handling (thus reducing risk of contamination and loss of analytes) is necessary for large-scale human biomonitoring. With this aim, this article investigates the potential of amphiphile-based supramolecular solvents.

Supramolecular solvents (SUPRASs) are water-immiscible liquids made up of supramolecular assemblies dispersed in a continuous phase. The outstanding properties of SUPRASs for extractions derive from their special structure and the high concentration of the ordered aggregates that constitute them, which provide a huge amount of binding sites. SUPRASs have regions of different polarity that offer a variety of interactions (e.g. hydrophobic, hydrogen bonds, ion-dipole, π -cation) for the extraction of analytes with a wide polarity range. These properties permit the development of simple and robust sample treatment methods for most of the solutes, especially for amphiphilic compounds which form mixed aggregates with the ordered structures in the solvents. To date, SUPRASs based on non-ionic [24], zwitterionic [25], cationic [26] and anionic [27] aqueous micelles, reverse micelles [28] and vesicles [29] have been successfully used for the extraction of pollutants from biological, food and environmental samples. A review covering progress on both theoretical and practical aspects related to the use of supramolecular solvents for analytical extractions has been recently reported [30]. Applications have mainly focus on the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons, pesticides, surfactants, pharmaceuticals, vitamins, drugs, dyes, hormones, bisphenol A, phenols and toxins mainly in liquids [e.g. 28,31-34] and more recently in

[24] 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.

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

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

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

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

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

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

[31] A. García-Prieto, M.L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 630 (2008) 19.

solid samples [35-37]. Supramolecular solvents are compatible with LC but they have to be removed before injection in gas chromatography or capillary electrophoresis.

Against conventional organic solvents, SUPRASs are specially suited for the extraction of amphiphilic contaminants such as PFASs since analyte-extractant mixed aggregates are formed through both interactions between fluorocarbon chains and polar groups. The use of SUPRASs for the extraction of these emerging contaminants is here presented for the first time. With this aim, a SUPRAS made up of hexanoic acid reverse micelles was here synthesized for the first time through a self-assembly process, and then characterized and assessed for the extraction/concentration of PFASs from serum samples prior to LC/Triple quadrupole (QQQ) MS-MS determination. The selection of hexanoic acid (HA) was based on both the dispersion and hydrogen bonding interactions they can establish with PFASs and its short hydrocarbon chain length that allows an early elution from the chromatographic column thus preventing coelution with the PFASs usually found in blood (i.e. PFHxS, PFOS, PFOA and C₉-C₁₄ perfluoroalkyl carboxylates). Carboxylic acids with chain lengths shorter than hexanoic acid were not employed because of their high water solubility and accordingly low yield of SUPRAS production under the proper self-assembly conditions. Parameters affecting extraction efficiency and concentration factors were optimised and the applicability of the proposed method to the determination of PFASs in different sera was assessed.

[32] A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 530.

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

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

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

[36] S. García-Fonseca, A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 2376.

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

2. Experimental

2.1. Chemicals

The seven target PFASs studied were as follows: PFOA, perfluorononanoic acid (PFNA); perfluorodecanoic acid (PFDA), perfluoroundecanoic acid (PFUnDA); perfluorotetradecanoic acid (PFTeDA), potassium perfluoro-1-hexanesulfonate (PFHxS) and PFOS. PFOA, PFNA, PFDA, PFHxS and PFOS were supplied by Wellington Laboratories and PFUnDA and PFTeDA were obtained from Aldrich (Schenelldorpf, Germany). Stable isotope analogues, $^{18}\text{O}_2\text{PFHxS}$ (MPFHxS), $^{13}\text{C}_4\text{PFOA}$ (MPFOA), $^{13}\text{C}_5\text{PFNA}$ (MPFNA), $^{13}\text{C}_2\text{PFDA}$ (MPFDA), $^{13}\text{C}_4\text{PFOS}$ (MPFOS), $^{13}\text{C}_2\text{PFUnDA}$ (MPFUnDA) and $^{13}\text{C}_2$ -perfluododecanoic acid (MPFDoDA), supplied by Wellington Laboratories (Ontario, Canada), were used as internal standards (ISs) to control potential losses of PFASs during extraction and MS performance (e.g. ion suppression and enhancement).

Hexanoic acid, sodium taurodeoxycholate hydrate (TDCA) and ammonium acetate were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and LC-grade methanol, tetrahydrofuran (THF) and hydrochloric acid were obtained from Panreac (Madrid, Spain). Ultra-high-quality water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Madrid, Spain). Stock standard solutions, each containing a mixture of target PFASs or method ISs at 100 ng mL^{-1} , were prepared in methanol and stored in closed polypropylene tubes at 4°C . Standards were prepared by dilution of the stock solution with a 75:25 THF:water (v/v) mixture solution.

2.2. Apparatus and materials

The LC-MS system used was an AB Sciex 4000 Qtrap® mass spectrometer (Foster city, California, USA), with a negative-ion TurboSpray interface coupled to an Agilent 1200 Series LC system (Palo Alto, CA, USA). The stationary phase was a SymmetryShield™ RP 18 column (particle size $3.5\ \mu\text{m}$,

Parte II

i.d. 2.1mm, length 50 mm) from Waters (Milford, MA, USA). A SymmetryShield™ RP 8 guard column (particle size 3.5 μm , i.d. 3.9 mm, length 20 mm) was inserted before the analytical column. Coloumetric Karl Fischer titrator from Metrohm (Herisau, Suize) was used for determination of water content in the SUPRAS. Two ml-microtubes Safe-Lock from Eppendorf Iberica (Madrid, Spain), glass balls (3 mm diameter) from Albus (Córdoba, Spain), a Reax Heidolph vortex (Schwabach, Germany), with an attachment for 10 test tubes, a High Speed Brushless centrifuge MPW-350R (Warsaw, Poland), and a 50- μL microsyringe 750 NR from Hamilton (Bonaduz, Switzerland) were used for sample preparation and extraction. The volume obtained of SUPRASs under different experimental conditions was measured with a digital calliper from Medid Precision, S. A. (Barcelona, Spain).

2.3. SUPRAS characterization

The composition and volume produced of hexanoic acid-based SUPRASs, as synthesized through a process of self-assembly of the amphipile in mixtures of THF and water, were determined. Nonlinear regression was used to fit a model for the prediction of the volume of SUPRAS after separation from the equilibrium solution ($n=70$). The statistic program Statgraphic plus 3.0 was used for this purpose. Regarding SUPRAS composition, a variety of solvents were prepared from bulk solutions with concentrations of HA and THF in the ranges of 2-10% (v/v) and of 1-50% (v/v), respectively. Water content was determined by injecting aliquots of the SUPRASs in a coloumetric Karl Fisher titrator and THF was calculated by weighing after removing water and THF from a certain amount of SUPRASs (~1 g) by just allowing to stand at room temperature in open tubes for 7 days, period during which THF and water was completely evaporated. Water evaporation was checked by coulometric titration.

2.4. Determination of PFASs in serum samples

2.4.1. *Sample collection and preservation*

Animal serum samples (newborn calf, sheep, bovine, horse) were purchased from Invitrogen (Barcelona, Spain) and human serum samples were kindly provided by the laboratory of clinical analyses “José Ortega Cruz” (Córdoba, Spain) from anonymous donors. Samples were stored at -20°C until their analysis.

2.4.2. *Sample preparation and SUPRAS-based microextraction*

The frozen serum samples were allowed to thaw at room temperature and shaken until homogenization. Extraction of PFASs was performed by mixing a sample aliquot of 765 μL of serum, 38 μL of HCl (12 M), 97 μL of hexanoic acid, 600 μL of THF and 18 μL of ISs (100 ng mL⁻¹ in methanol) into a 2 ml polypropylene centrifuge microtube with 3-4 glass balls (3 mm diameter) at the bottom. Glass balls were added to accelerate and enhance sample mixing and extraction. The mixtures were vortex-shaken for 7 min and then centrifuged (15,000 rpm, 15°C, 13 minutes) to achieve the complete separation and clarification of the SUPRAS (i.e. the supernatant) formed into the bulk solution. The volume of SUPRAS (~360 μL) was calculated by measuring its height with a digital calliper. More information regarding synthesis of SUPRASs is detailed in 3.2.1. Finally, an aliquot of SUPRAS was withdrawn with a microsyringe and transferred to autosampler glass vials with inserts. Samples were capped with aluminum/silicone septum barriers (Supelco, Bellefonte, USA) and subjected to LC/MS/MS analysis.

2.4.3. *Quantitation of PFASs by LC(ESI-)QQQ-MS2*

The target PFASs were separated and quantified by using LC coupled with a turbo spray interface operating in the negative ion mode prior to the Qtrap mass spectrometer. Quantitative analyses were performed on the

Parte II

Scheduled MRM mode recording the transitions between the precursor ion and the two most abundant products ions. Table 1 shows the quantifier and qualifier ions used for each native PFAS and the quantifier ion for the ISs. The quantifier and qualifier ions for TDCA (a common interference for PFOS) are also given.

Table 1. Quantifier and qualifier ion transitions and MS parameters used to determine PFASs in serum samples.

	Target compound		Method ISs	MS parameters			
	Quantifier transition	Qualifier transition		DP (V)	CE (V)	CXP (V)	
PFHxS	399>119	399>119	¹⁸ O ₂ PFHxS	403>119	-95	-48	-1
PFOA	413>369	413>169	¹³ C ₄ PFOA	417>372	-45	-16	-9
PFOS	499>99	499>99	¹³ C ₄ PFOS	503>99	-100	-72	-15
PFNA	463>419	463>219	¹³ C ₅ PFNA	468>423	-40	-16	-21
PFDA	513>469	513>219	¹³ C ₂ PFDA	515>470	-40	-16	-21
PFUnDA	563>519	563>269	¹³ C ₂ PFUdDA	565>520	-50	-22	-37
PFTeDA	713>669	713>369	¹³ C ₂ PFDODA	615>570	-75	-16	-11
TDCA (PFOS interfe- rence)	498.3>107	498.3>80 498.3>124	-	-	-100	-72	-15

PFCAs precursor ion [M-H]⁻, quantifier product ion [M-COOH]⁻

PFHxS precursor ion [M-K]⁻, quantifier product ion [CF₃CF₂]⁻

PFOS precursor ion [M-K]⁻, quantifier product ion [FSO₃]⁻

DP; Declustering potential

CE; Collision energy

CXP; Collision cell exit potential

The injection volume used was 10 µL. The mobile phase consisted of 2 mM aqueous ammonium acetate (A) and methanol (B) at a flow rate of 0.3 ml min⁻¹. The temperature for the analytical column was set at 30 °C and the gradient elution was programmed as follows: linear gradient from 0 to 100% of methanol for 50 min, and then reverting to initial conditions allowing 10 min for stabilization. The eluates from the analytical column were diverted by switching valve to waste from 0 to 30.5 minutes in order to avoid the entry of hexanoic acid and the most polar matrix compounds in the mass spectrometer. The Turbo spray settings were as follows: curtain gas (N₂) 30 psi; ion spray voltage -4500 V;

temperature 450°C; nebulizer and turbo gas 70 psi. Declustering potential (DP), collision energy (CE) and collision cell exit potential (CXP) parameters were optimized for each analyte (Table 1). Unit resolution was used for both Q₁ and Q₃ quadrupoles. Calibration curves were constructed at concentrations of PFASs over the ranges stated in Table 2 with a concentration of the method ISs of 5 ng mL⁻¹.

Table 2. Figures of merit of the quantitation of PFASs with the proposed method.

PFASs	Solvent Calibration range (ng mL ⁻¹)	^a Correlation coefficient (<i>r</i>)	Retention time (min)	^b Method LOQ (pg mL ⁻¹)	^b Method LOD (pg mL ⁻¹)
PFHxS	0.1–30	0.9997	31.6	59	20
PFOA	0.01–30	0.9998	33.8	6	2
PFOS	0.05–30	0.9995	36.3	29	10
PFNA	0.01–30	0.9996	35.4	6	2
PFDA	0.05–30	0.9997	37.7	29	10
PFUnDA	0.05–30	0.9991	39.1	29	10
PFTeDA	0.05–30	0.9994	42.7	29	10

^a *n* = 8;

^b Calculated on the basis of 80% recoveries for PFCs (mean recoveries from all analyzed serum samples).

3. Results and discussion

3.1. Sources and control of background contamination

One typical problem in determining PFASs is the background contamination arising from the presence of a variety of fluoropolymer materials

Parte II

in the components of LC equipment or labware [38]. As a precautionary measure, an additional column (Water Symmetry® 3.5 µm, 4.6 mm × 75 mm) was inserted between the pump and injector in order to trap PFASs potentially released from the instrument. Contamination arising from labware was prevented by using disposable polypropylene tubes, aluminum/silicone septa, a glass microsyringe, nylon syringe filters and glass coated round magnetic stirring bars. Procedural contamination was investigated by adding distilled water at different hydrochloric acid concentrations (150-1500 mM) into polypropylene centrifuge microtubes, instead of serum samples, and subjecting them to different supramolecular microextraction conditions (i.e. several hexanoic acid and tetrahydrofuran concentrations and vortex-shaken and centrifugation at variable times). No contamination of PFASs was observed above the method detection limits. Appropriate control reagent blanks were routinely injected into the instrument during sample processing sequences in order to check for potential procedural or instrumental contamination.

3.2. Description and characterization of hexanoic acid-based SUPRASs

3.2.1. *Synthesis*

SUPRASs were synthesized by adding water to solutions containing hexanoic acid in THF. Water promoted the self-assembly of HA 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 were formed, leading to creaming and phase separation (coacervate phase or SUPRAS) from the bulk solution. 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. This

[38] N.Yamashita, K. Kannan, S. Taniyasu, Y. Horii, T. Okazawa, G. Petrick, T. Gamo, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 5522.

separation usually occurs upward, but the term may still be applied if the relative densities of the dispersed and continuous phases are such that the concentrated emulsion settles downward [39]. The process occurred from the protonated hexanoic acid form (pK_a 4.8 ± 0.1), so pH values below 4 were required for the formation of the SUPRAS.

Figure 1 shows the relative concentrations of THF and hexanoic acid at which coacervation occurred leading to the formation of the SUPRAS.

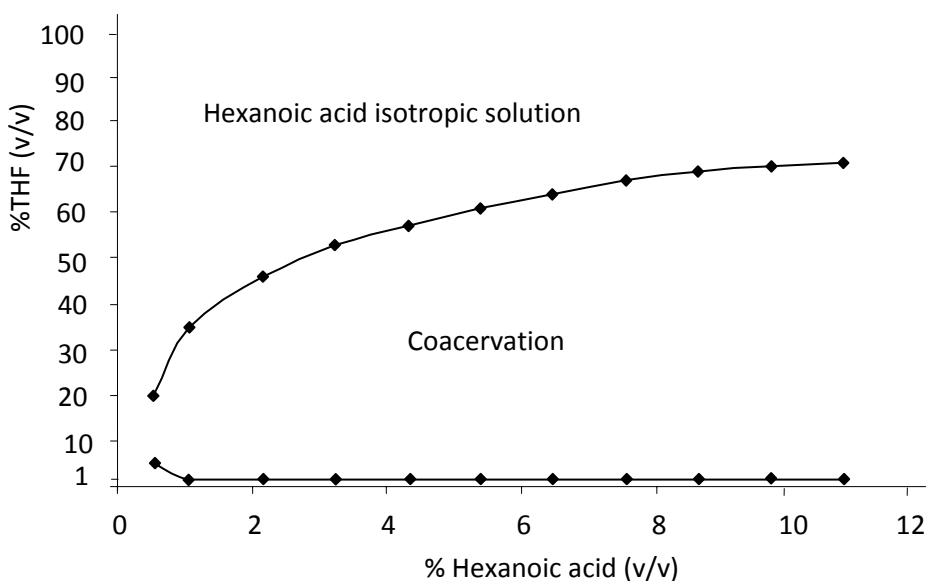


Figure 1. Phase diagram for the hexanoic acid in mixtures of tetrahydrofuran and water.

Only concentrations of HA within the range of analytical interest were investigated (e.g. below $\sim 10\%$). Water, the third component, is not represented in this figure but its concentration can be easily calculated as the difference

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

Parte II

between 100 and the sum of the percentages of HA and THF. Above the coacervation region, the SUPRAS solubilised in the THF:water bulk solution, the boundary being dependent on the amphiphile (i.e. hexanoic acid) concentration. On the other hand, the SUPRAS was only partially formed at percentages of THF below 1% where a miscible mixture of hexanoic acid and SUPRAS was obtained. It is worth mentioning the behavior found for the hexanoic acid in mixtures at relative concentrations of 0.5% for HA and 0.5-4.5% for THF. In these solutions HA was completely solubilized; however, the SUPRAS started to form at a concentration of 5% of THF, despite the fact of the higher solubility of HA in this medium.

3.2.2. Composition

Table 3 shows the composition of the SUPRASs obtained from bulk solutions containing THF, water and HA at different proportions. The percentage of HA incorporated in the SUPRAS from the amount initially present in the bulk solution is also included.

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 HA. On the other hand, the amount of hexanoic acid remaining in the bulk solution after SUPRAS separation was both THF and HA dependent. Thus, at HA concentrations above approximately 3%, the self-assembly of the amphiphile was favored as the THF in the bulk solution, and consequently in the SUPRAS, increased. Incorporation of HA to the coacervate phase was practically quantitative as the percentage of THF in the bulk solution ranged from 30 to 50%. The opposite was found for SUPRAS concentrations nearly and below 2%; solubilization of the amphiphile in the equilibrium solution was favored with increasing concentrations of THF and its incorporation into the SUPRAS did not exceed the 60% over the range investigated. This behavior, as it was expected, negatively influenced the extraction processes since solutes partitioned between the amphiphile in the SUPRAS and the

equilibrium solution. As an example, recoveries for PFASs ranged from 39 to 67% with SUPRASs synthesized from 2% of HA and 40% of THF and from 80 to 94% with SUPRAS synthesized from 5% of HA and 50% of THF despite the SUPRAS composition was practically the same (see Table 3). So, only SUPRASs synthesized at hexanoic acid concentrations above 3% were considered in this study.

Table 3. SUPRAS compositions and percentage of hexanoic acid (HA) incorporated into SUPRASs at different initial percentages of THF and HA in bulk solutions.

% THF (v/v)	% HA (v/v)											
	2				5				10			
	SUPRAS composition (w/w, %)			% of HA incorporated in SUPRAS	SUPRAS composition (w/w, %)			% of HA incorporated in SUPRAS	SUPRAS composition (w/w, %)			% of HA incorporated in SUPRAS
THF	water	HA	THF		water	HA	THF		water	HA		
0	-	5	95	-	-	6	94	-	-	5	95	-
1	9	6	85	48	6	6	88	78	5	6	89	72
2	14	7	79	50	10	7	83	76	9	6	85	75
3	25	8	67	53	13	8	79	81	10	7	83	84
5	27	8	65	56	21	9	70	85	20	8	72	86
10	36	9	55	67	33	9	58	82	31	9	60	83
20	57	10	33	56	53	10	37	81	48	10	42	91
30	67	14	19	39	61	12	27	98	58	11	31	98
40	70	20	10	25	69	15	16	91	64	12	24	104
50	-	-	-	-	70	19	11	95	67	14	19	110

3.2.3. Volume prediction

The volume of SUPRAS obtained through the self-assembly of hexanoic acid was both THF and amphiphile dependent. So, a series of experiments were

Parte II

carried out to develop an equation for the prediction of the volume of SUPRAS as a function of these components. The aim was to be able to predict the maximum concentration factor that could be obtained under given experimental conditions. For this purpose, a set of SUPRASs was prepared using a variety of amphiphile (3-10%) and THF (1-50%) concentrations within the range of analytical interest according to the results obtained in the above section.

Nonlinear regression was used to fit a model to the data obtained (n=60). This procedure uses the algorithm Marquardt as an iterative approach to minimize the sum-of-squares of the vertical distances of the experimental points to a proposed curve based on preliminary estimates [40]. The proposed model for predicting the volume of SUPRASs (y , μL) was $y = \theta_1 \text{HA} + \theta_2 \text{HA THF} + e^{\theta_3 \text{THF}}$, being the amount of hexanoic acid (HA, mg) and the percentage of THF (v/v) in the bulk solution, the independent variables. The units of the parameters θ_1 and θ_2 were $\mu\text{L mg}^{-1}$, while the parameter θ_3 was dimensionless. The resultant equation was

$$y = 0.69 \text{HA} + 0.0761 \text{HA THF} + e^{0.1047 \text{THF}} \quad [1]$$

The asymptotic standard errors of θ_1 , θ_2 and θ_3 were 0.05, 0.004 and 0.0006, respectively and the determination coefficient was 99.126 %, thus indicating a good capability of prediction of this equation. So, the maximum concentration factors that can be achieved with hexanoic acid-based SUPRASs under given conditions can be known a priori and this makes easier method selection and optimization.

[40] N.R. Draper, H. Smith, Applied Regression Analysis, third ed., Willey-Interscience, New York, 1998, 505

3.2.4. Handling of supramolecular solvents

Application of supramolecular solvents to the extraction of analytes from liquid samples (e.g. urine) always involves their spontaneous formation into the target sample after the addition of solvent ingredients (e.g. THF and hexanoic acid). Practical aspects related to the use of SUPRAS for the extraction of contaminants on liquid food have been reviewed [30,32]. As extraction of solid samples is of interest, supramolecular solvents made up of reverse micelles can be previously synthesized and then aliquots used for extraction [37]. In this case, the synthesis of SUPRASs is usually carried out in 100mL-glass centrifuge tube which permits to obtain enough volume to treat 10-20 samples. The SUPRAS is then withdrawn using a 1 mL-syringe, transferred to a hermetically closed storage glass vial to avoid THF losses and then stored at 4°C. Under these conditions, reverse micelle-based SUPRAS are stable for at least one month.

3.3. Optimization

Optimization of the microextraction process was carried out by extracting 622-979 μl of distilled water or newborn calf serum fortified with 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ of the target PFASs under a variety of experimental conditions: 4.3-7.5% (v/v) of hexanoic acid, 15-50% (v/v) of THF, 69-1800 mM of hydrochloric acid ($\mu\text{moles of HCl mL}^{-1}$ of serum); stirring time 0-40 min. The final volume was 1.5 ml. Extractions were carried out according to the procedure specified in the section 2.4.2 and varying each variable in turn while keeping the other constant. ISs were added just prior injection in order to correct MS performance and matrix effects and ensure accurate quantitation during optimization. Experiments were made in triplicate. Selection of the optimal conditions was based on the recoveries (R) and actual concentration factors [ACF = 0.01R (%) x phase volume ratio (PVR)] obtained for PFASs. Phase volume ratios were calculated as the ratio of sample volume over the SUPRAS volume, so they represented the maximum ACFs that could be obtained under given experimental conditions. Two criteria were considered for variable selection,

Parte II

namely the highest possible ACF and recoveries above 75%. The variables investigated were THF and HA concentrations, pH, analyte concentration and stirring time.

Because of the water content of serum, SUPRASs were spontaneously synthesized in these matrices, in a similar way to that occurring in aqueous solutions, as hexanoic acid and THF were added to the samples. The SUPRAS was clearly visible as an immiscible liquid after centrifugation according to the procedure in section 2.4.2. The volume of SUPRAS thus obtained fit to the equation [1] in the range of hexanoic acid and THF concentrations specified in the section 3.2.3. Proteins in the serum agglutinated at percentages of THF below 20% (v/v) and stood as a gelatinous layer between the SUPRAS and the serum after centrifugation. Proteins did not flocculate at percentages of THF in the range 25-50% (v/v) and remained as a dense precipitate at the bottom.

The acidity of the medium was found essential to efficiently extract PFASs from serum. On the contrary, extraction efficiency for these solutes from water (R = 90-100%) was rather independent of the pH in the range of existence of hexanoic acid-based SUPRASs (i.e. below 4). Interaction between PFASs and matrix components were expected to be the reason for the different behaviour observed in serum and water. Table 4 shows the recoveries obtained for PFAS-spiked serum as a function of the concentration of hydrochloric acid; they were maximal and above 75% from around 300 mM and then they kept constant up to 1800 mM. Increased acidity possibly favoured the break of PFAS-matrix bonds since the extraction efficiency for PFASs increased when HCl concentration did. A concentration of HCl of 600 mM (μmol of HCl/ml of serum) was selected as optimal in order to make the method robust against variations in the amount of matrix components present in the samples.

Table 5 shows the recoveries obtained for PFASs in serum as a function of both THF and hexanoic acid concentrations. The volume of SUPRAS, and so concentration factors, also varied with these reagents according to the equation 1. Recoveries above 75% and fluorocarbon chain length independent were

Table 4. Mean PFAS recoveries and standard deviation ($R \pm S$, %) from spiked serum samples as a function of the concentration of hydrochloric acid.

μmol of HCl/ml of serum	Analytes ($R \pm S^a$)						
	PFHxS	PFOA	PFOS	PFNA	PFDA	PFUnDA	PFTeDA
69	51 \pm 3	45 \pm 2	64 \pm 3	48 \pm 1	54 \pm 2	54 \pm 3	70 \pm 1
100	50 \pm 2	44 \pm 1	55 \pm 4	47 \pm 2	52 \pm 1	55 \pm 1	67 \pm 4
140	52 \pm 1	47 \pm 4	65 \pm 2	50 \pm 5	55 \pm 3	60 \pm 3	68 \pm 3
164	52 \pm 4	52 \pm 5	65 \pm 4	57 \pm 3	61 \pm 2	66 \pm 3	74 \pm 2
267	70 \pm 3	82 \pm 4	79 \pm 4	81 \pm 2	83 \pm 2	81 \pm 1	84 \pm 2
398	81 \pm 5	86 \pm 3	78 \pm 3	84 \pm 1	84 \pm 2	82 \pm 2	84 \pm 2
792	73 \pm 4	86 \pm 1	83 \pm 1	83 \pm 1	86 \pm 3	83 \pm 1	80 \pm 1
1500	77 \pm 5	82 \pm 2	84 \pm 4	82 \pm 2	81 \pm 1	80 \pm 1	80 \pm 2
1800	73 \pm 5	81 \pm 3	78 \pm 1	80 \pm 1	83 \pm 2	82 \pm 2	83 \pm 1

^a Hexanoic acid= 6.5% and THF= 40%; n = 3; spiked PFAS concentration = 5 $\mu\text{g L}^{-1}$.

obtained with SUPRASs made from 35% (v/v) of THF and 5.4% (v/v) of HA. Recoveries increased with the concentration of THF because this solvent facilitated the rupture of PFAS-protein interactions, however SUPRAS volume also increased and consequently concentration factors diminished. So, values of 40% of THF and 6.5% (v/v) of HA were selected as optimal, which provided recoveries of 79-83% and ACFs of 1.68-1.76. Simultaneous extraction/concentration of PFASs was based on the formation of mixed aggregates by dispersion and hydrogen bond analyte:extractant interactions.

Recoveries were in the intervals 73-90% for all the analytes in the whole range of concentration assessed (i.e. between 0.1 and 15 ng mL^{-1}).

The time for extraction (vortex-shaking, 2.300 rpm) was investigated in the interval 0-40 min. Equilibrium conditions were achieved after 5 min owing to the high solubilising capability of the SUPRAS. A time of 7 min was fixed for further experiments in order to get maximal reproducibility.

Parte II

Table 5. Mean recoveries and standard deviation ($R \pm S$, %) of PFASs from spiked serum samples at 600 μmoles of HCl/ml of serum as function of the concentration of hexanoic acid and THF.

THF ^a	Analytes ($R \pm S^c$)						
% (v/v)	PFHxS	PFOA	PFOS	PFNA	PFDA	PFUnDA	PFTeDA
25	51±7	67±7	55±1	64±2	64±5	66±7	71±2
30	61±2	78±2	73±4	74±2	75±2	75±3	77±2
35	68±1	83±1	81±1	78±1	80±1	81±1	81±1
40	83±6	83±3	79±4	81±1	83±2	82±1	83±2
45	79±1	88±4	82±2	84±2	83±2	87±2	85±4
50	80±1	97±5	92±5	92±4	86±2	92±2	94±5
HA ^b							
% (v/v)							
4.3	61±1	75±1	78±1	78±1	80±6	81±6	87±6
5.4	75±3	89±2	86±1	82±4	84±3	82±2	82±1
6.5	83±6	83±3	79±4	81±1	83±2	82±1	83±2
7.5	77±3	86±1	86±1	86±1	88±3	88±3	86±4

^a Hexanoic acid= 6.5% (v/v).

^b THF= 40% (v/v).

^c n = 3; spiked PFAS concentration = 5 $\mu\text{g L}^{-1}$.

The lack of a mass-labelled homologue for PFTeDA led us to examine the suitability of MPFDoDA as a method IS for this PFAS. Calf and human-1 sera samples were subjected to extraction and analysis after fortification with 5 ng mL⁻¹ of both mass-labelled and target PFASs. PFTeDA was accurately quantified with MPFDoDA (recoveries in the range 104-106%) due to the proximity in their retention time, similar extraction efficiency and lack of significantly different matrix effects in the elution window. The rest of PFASs recoveries were in the range 95-107%.

3.4. Analytical performance

3.4.1. Sensitivity

Table 2 shows the analytical figures of merit for the proposed method. The instrumental limits of quantitation (LOQs) and detection (LODs) were determined from standards prepared in 75:25 THF:water (v/v), containing a 5 ng mL⁻¹ of the method IS, and using a signal-to-noise ratio of 10 and 3, respectively. Each curve point was quantified using the overall calibration curve and reviewed for accuracy. Method calibration accuracy requirements of 100±25% were met for all analytes. The LOQs and LODs thus obtained were 0.1 and 0.03 ng mL⁻¹ for PFHxS; 0.05 and 0.02 ng mL⁻¹ for PFOS, PFDA, PFUnDA and PFTeDA; and 0.01 and 0.003 ng mL⁻¹ for PFOA and PFNA; respectively. Correlation between peak areas and PFAS concentrations was determined by linear regression and 1/x weighted calibration. The correlation coefficients were in the range 0.9991–0.9998 for all analytes indicating good fits.

Due to the lack of blank serum samples, method LOQs and LODs were estimated from the respective instrumental quantitation and detection limits and the mean actual concentration factor obtained (1.7) considering 80% as mean recovery for all PFASs (see Table 2). No significant differences in background noise were observed for serum samples and standards. A typical chromatogram obtained for a standard solution containing 5 ng mL⁻¹ of each PFAS is shown in Figure 2a.

3.4.2. Selectivity

Analysis of PFASs in serum is commonly confronted with the presence of co-eluting matrix components which can cause ionization suppression or enhancement in the ESI source and even perfluoroalkyl sulfonic acids (PFASs) peak misidentification. Thus, PFASs have been over-reported in serum due to

Parte II

co-eluting with TDCA and steroid sulfates when using C_{18} columns [19,41]. The masses of these compounds are too close to those of PFHxS and PFOS for accurate analysis by the one-unit resolution QQQ-MS and can lead to overestimation at the 499>80, 399>80 and 399>99 transitions. This problem has been addressed in various ways including the use of other columns providing more selective retention mechanisms (e.g. perfluorooctyl, Synergi hydro-RP or ion-exchange phase columns [19,41,42]) or the use of more selective—but also less sensitive—transitions (mainly 499–99 and 399-119 [41,42]). In this work we quantified PFASs in serum using a C_{18} column and the more selective transitions 399>119 and 499>99 to prevent PFAS misidentification. The presence of steroid sulfates in the human sera analyzed was confirmed by the transition 399>99 while TDCA isomers were detected in all the human and animal serum samples at the transitions 498.3>107 and 498.3>80. These interferences co-eluted, therefore using the 399>119 and 499>99 transitions was fundamental to quantify PFHxS and PFOS properly. Although the use of these transitions resulted in a somewhat decreased sensitivity, the overall method sensitivity was sufficient for analysis of human samples. Signal enhancement or suppression was estimated by comparing the response for ISs added to the SUPRAS extracts obtained after serum treatment, just prior injection (5 ng mL^{-1}), to the average response of ISs in the calibration solutions. The serum samples analysed exhibited low signal suppression ($\leq 12\%$) or enhancement ($\leq 6\%$) for all PFASs, including PFHxS and PFOS. Therefore, matrix effects on the ionization of PFASs were negligible in this method and further clean-up steps were not necessary.

3.4.3. Precision

The precision of the method was evaluated by extracting 11 independent fortified (5 ng mL^{-1}) serum samples (calf, horse and bovine). PFAS

[41] E. Chan, M. Sandhu, J.P. Benskin, M. Ralitsch, N. Thibault, D. Birkholz, J.W. Martin, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 1405.

[42] J.P. Benskin, M. Bataineh, J.W. Martin, *Anal. Chem.* 79 (2007) 6455.

recoveries ranged between 95 and 111%. The values, expressed as relative standard deviation (RSD), were between 1 and 6 % for all the PFASs.

3.5. Analysis of serum samples.

Serum samples from animals and humans (n=6) were analyzed in duplicate to prove the suitability of the proposed method to determine PFASs. Table 6 lists the concentrations found for the target compounds. Method recoveries expressed as recovery for the method ISs (concentration level; 5 ng mL⁻¹) ranged between 75 and 89%. Figure 2b shows the selected ion chromatogram for PFASs extracted from the sample of human serum 1.

Table 6. Mean concentrations (pg mL⁻¹) (n=2) obtained for the target compounds in the analysis of serum samples using the proposed method.

Simplex	PFHxS	PFOA	PFOS	PFNA	PFDA	PFUnDA	PFTeDA
Calf serum	<LOD	14.3±0.7	197.3±0.6	23±3	<LOQ	69±3	70±10
Bovine serum	<LOD	17±1	156±2	52±1	37±4	72±4	108±13
Horse serum	<LOD	35±2	<LOQ	45±2	<LOQ	71±5	<LOQ
Human serum 1	746±116	1735±35	5168±63	908±33	376±32	624±3	99±3
Human serum 2	678±66	1242±47	4597±171	565±33	261±5	548±23	86±5
Human serum 3	794±41	1219±20	4670±10	567±17	258±5	560±6	84±4

No PFHxS neither interferences coming from steroid sulfates were detected in the samples of animal origin; however, interferences co-eluting with PFHxS were detected in all the human samples analyzed at the transitions 399>80 and 399>99, so the selective transition 399>119 was employed for

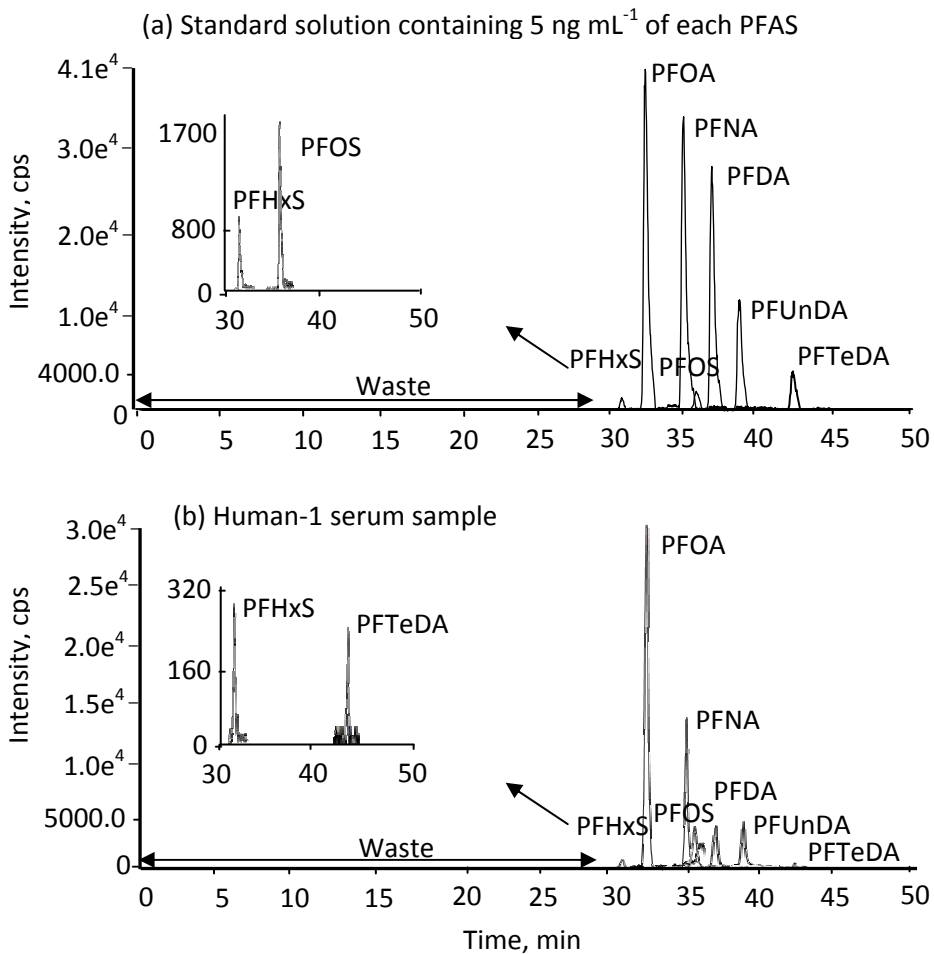


Figure 2. LC(ESI)-QQQ MS² selected ion chromatograms of PFASs obtained from (a) a standard solution containing 5 ng mL⁻¹ of each PFAS (inset; selected ion chromatogram of PFHxS and PFOS), and (b) a human-1 serum sample (inset; selected ion chromatogram of PFHxS and PFTeDA).

quantitation. Bile salts interfering with PFOS were detected in bovine, horse and human sera at the transition 499>80 and so the daughter ion 99 was used for quantitation. The concentrations of PFASs in animal samples ranged between 17 and 197.3 pg mL⁻¹ and between 84 and 5168 pg mL⁻¹ in human sera. RSDs were between 1 and 15%. The highest concentrations were found for PFOS and PFOA and both branched and linear PFOS were clearly observed in the

chromatograms for human samples. The presence of long-chain PFCAs (PFDA, PFUnDA and PFTeDA) in human sera highlights the need for their routine determination along with the most commonly found PFOA and PFOS.

4. Conclusions

A supramolecular solvent consisting of reverse aggregates of hexanoic acid in THF:water mixtures was here described and characterized for the first time and its suitability as a solvent for the microextraction of PFASs in serum was proved. The formation of the supramolecular solvent is spontaneous and requires minute volumes of THF (~600 μL per sample) that additionally provokes the breaking of PFAS-protein interactions. The method offers a valuable alternative to current approaches for the evaluation of human and animal exposure to these contaminants. The major benefits of this method compared to other previously reported are: (a) lower volume of organic solvent per sample extraction (e.g. 600 μL of THF); (b) shorter extraction times (e.g. 7 minutes); (c) no clean-up or evaporation of extracts required; (d) no need for additional steps or reagents different from those used for the extraction system itself for protein precipitation and no contamination or analyte losses produced during this step; (e) accurate quantitation obtained using IS solvent-based calibration; (f) high sensitivity (e.g. LODs 2-20 pg mL^{-1} and LOQs 6-59 pg mL^{-1}). The method meets the analytical and operational requirements to be used in large-scale epidemiological studies.

Acknowledgment

The authors gratefully acknowledge financial support from Spanish MICINN (Project CTQ2011-23849), the Andalusian Government (Junta de Andalucía, Spain, Project P09-FQM-5151) and FEDER. A. Ballesteros-Gómez and Noelia Luque are also grateful to Spain's MEC for award of doctoral fellowships (Grants AP2005-4275 and AP2004-3644).

RESUMEN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

1. INTRODUCCIÓN

En las investigaciones que se recogen en esta Tesis doctoral se han desarrollado metodologías analíticas para la determinación de diferentes contaminantes orgánicos en distintos tipos de muestras ambientales teniendo como objetivo general la simplificación, integración y mejora de las diferentes etapas del proceso analítico. Estas metodologías pueden englobarse en dos categorías cada una de las cuales pretende alcanzar unos objetivos más específicos; el primer bloque agrupa métodos para la extracción, preconcentración y estabilización de compuestos orgánicos en muestras acuosas ambientales y el segundo bloque recoge el desarrollo de nuevos métodos para la determinación de sustancias perfluoroalquiladas en muestras biológicas, en las que se aborda la mejora de los procesos de extracción, detección y cuantificación. Los sistemas extractantes empleados en nuestras investigaciones han sido adsorbentes supramoleculares, disolventes supramoleculares y mezclas hidroorgánicas.

En la Tabla 1 se resumen los problemas analíticos abordados con cada sistema extractante, los formatos empleados, las muestras analizadas, los analitos determinados con sus características más relevantes para los procesos de extracción considerados y las etapas del proceso analítico que se integran o mejoran con cada metodología desarrollada. A través de los diferentes apartados de esta sección se pretende ofrecer una panorámica general de los resultados más relevantes obtenidos en las diferentes etapas del proceso analítico.

Tabla 1. Resumen de los objetivos, sistemas extractantes empleados, muestras y analitos analizadas.

1. PROBLEMAS ABORDADOS	Simplificación de las etapas previas en campañas de monitorización ambiental		Desarrollo de nuevas metodologías para el análisis de sustancias perfluoroalquiladas
2. MUESTRAS	Aguas superficiales, subterráneas y residuales		Tejidos de pescado y aves y suero sanguíneo
3. ETAPAS DEL PROCESO ANALÍTICO INVESTIGADAS	Extracción, preconcentración, estabilización		Extracción y preconcentración
4. FORMATO	Extracción en fase sólida	Microextracción líquido-líquido	Microextracción líquido-líquido
5. SISTEMA EXTRACTANTE	Hemimicelas/Admicelas	Micelas acuosas	Tetrahidrofurano:agua (75:25,v/v)
6. ANALITOS	Plaguicidas	Tensioactivos de benzalconio	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
<i>Polaridad</i>	1,7-4,5	2,9-4,9	5,7-6,6
<i>Log Kow</i>	(-1,5)-15,1	-	-
<i>(Pka)</i>	Interacciones π -catión, iónicas, de dispersión y puentes de hidrogeno	Interacciones iónicas y de dispersión	Interacciones dipolo-dipolo, fuerzas de dispersión y puentes de hidrógeno
<i>Tipo de interacciones posibles</i>			1,7-10,8 (-3,6)-0,52
			Sustancias perfluoroalquiladas
			Interacciones de puentes de hidrógeno

2. SISTEMAS SUPRAMOLECULARES PARA LA SIMPLIFICACIÓN DE OPERACIONES PREVIAS EN LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EN MUESTRAS ACUOSAS.

Se han desarrollado tres metodologías, basadas en sistemas supramoleculares, para la simultánea extracción, preconcentración y estabilización de distintos tipos de contaminantes orgánicos, con el fin de integrar y simplificar las distintas etapas de las operaciones previas en los procesos analíticos correspondientes. Los sistemas empleados han sido disolventes supramoleculares y hemimicelas/admicelas las cuales están constituidas por agregados de tensioactivo que tienen el potencial de establecer diferentes tipos de interacciones con los analitos/matriz de la muestra y proporcionan elevados rendimientos de extracción debido a la gran cantidad de tensioactivo existente en los agregados por unidad de masa o volumen. Por otro lado, estos sistemas supramoleculares presentan ciertas características relevantes desde el punto de vista operacional como son: se generan mediante fenómenos de autoensamblaje al alcance de cualquier laboratorio; están constituidos por moléculas anfifílicas que son ubicuas en la naturaleza y en la industria, son biodegradables, de bajo coste y permiten la síntesis de agregados a la carta; presentan baja volatilidad e inflamabilidad; son compatibles con los sistemas de separación y detección usados en los procesos analíticos; y estabilizan los compuestos solubilizados permitiendo integrar la recogida de muestra, transporte, conservación, extracción y concentración de los contaminantes que se van a determinar.

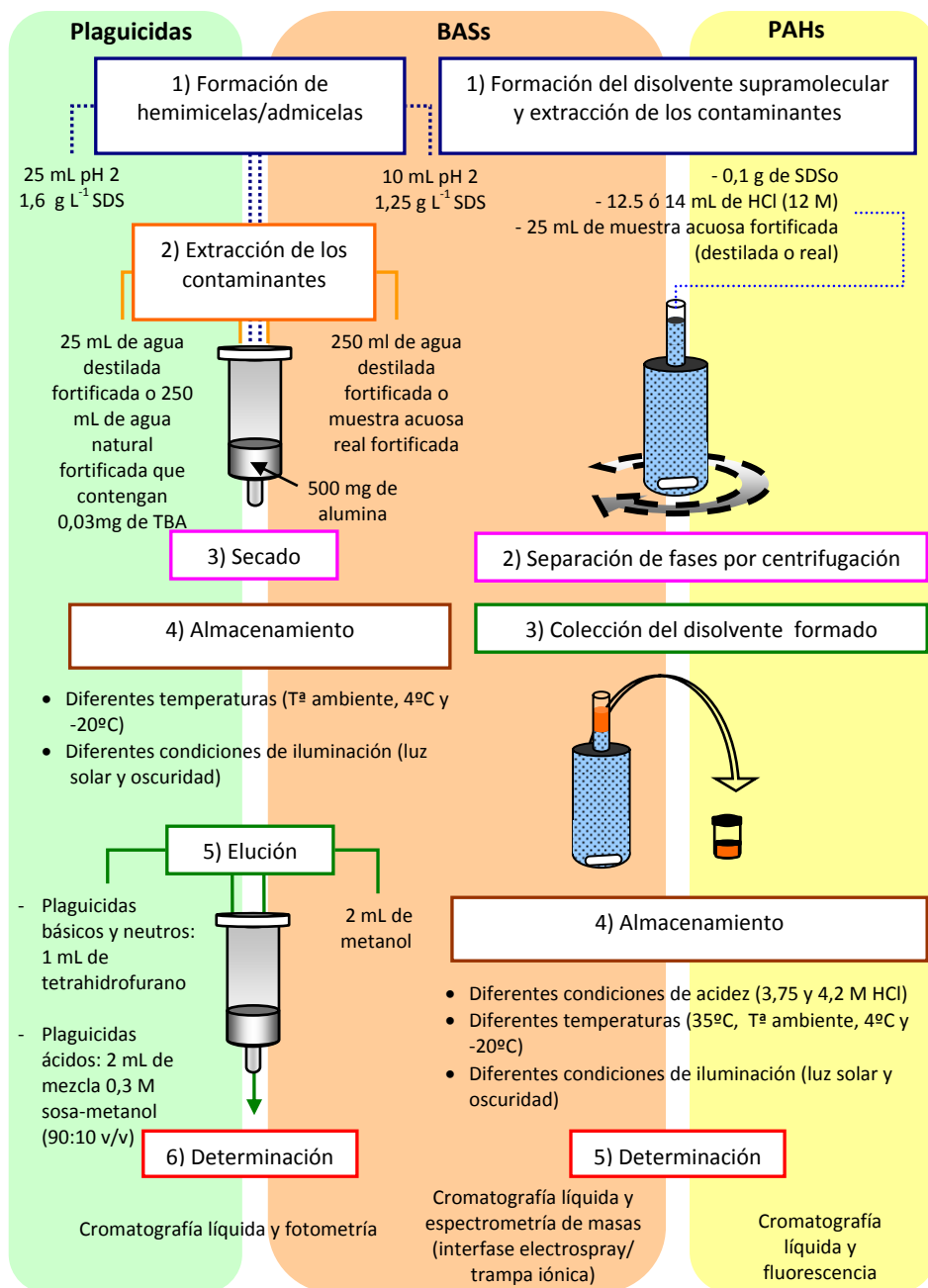
En el primer método se propone la determinación de tensioactivos de benzalconio en aguas fluviales y residuales mediante su extracción, concentración y estabilización en hemimicelas de dodecilsulfato sobre alúmina, como adsorbente de extracción en fase sólida, y su posterior cuantificación con cromatografía de líquidos y detección fotométrica. En el segundo método se propone la extracción, preconcentración y estabilización de plaguicidas en aguas de río y pozo, basándose también en el uso de un adsorbente supramolecular, en este caso constituido por admicelas mixtas de dodecilsulfato y

tetrabutilamonio. La separación analítica se realizó mediante cromatografía de líquidos y la cuantificación se llevó a cabo con un detector de diodos en fila. Por último, en el tercer método desarrollado se emplea un disolvente supramolecular constituido por micelas normales de dodecilsulfonato de sodio para la extracción, preconcentración y estabilización de los tensioactivos de benzalconio e hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de aguas fluviales y residuales. La cuantificación de los compuestos de benzalconio se realizó con un espectrómetro de masas con trampa iónica e interfase electrospray y los hidrocarburos se cuantificaron mediante detección fluorescente.

La Figura 1 resume los procedimientos operacionales llevados a cabo en las distintas metodologías y las condiciones de almacenamiento ensayadas en los estudios de estabilidad de los analitos. A continuación se presentan los principales resultados obtenidos en cada etapa del proceso analítico y se discuten los aspectos más relevantes de los mismos.

2.1. Muestras y analitos

En el desarrollo experimental de la primera parte de esta Memoria se abordó el análisis de distintas muestras ambientales acuosas. Los sistemas acuáticos escogidos fueron sistemas dinámicos con gran variabilidad espacial y temporal de contaminantes y las muestras objeto de estudio tuvieron diferente procedencia; la cuenca fluvial del Guadalquivir a su paso por la ciudad de Córdoba (ríos y arroyos); los influentes de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs) de Bailén, Linares y Mengibar (Jaén) y efluentes de la EDAR de Bailén; y aguas subterráneas (pozos) de la provincia de Córdoba. Las aguas residuales que llegan a las EDARs presentan una composición variable dependiendo de las actividades que se desarrollen en la zona donde se localice la planta depuradora. Así, los influentes que llegan a la EDAR de Mengibar son de origen principalmente doméstico, mientras que en Bailén y Linares el 50% de las aguas tratadas tienen procedencia doméstica y el otro 50% es de procedencia industrial principalmente de las industrias de materiales de



SDS: dodecil sulfato sódico; TBA: tetrabutil amonio; SDSo: dodecilsulfonato sódico; HCl: ácido clorhídrico

Figura 1. Esquema de las diferentes etapas seguidas para la extracción, conservación y determinación de los analitos usando fases adsorbentes y disolventes supramoleculares.

construcción, del aceite y del automóvil. En las aguas naturales, los factores que condicionan la composición del agua son múltiples, destacando de nuevo el tipo de actividad humana que se realice en la zona de muestreo y la naturaleza de los materiales del terreno con los que el agua entra en contacto. La cuenca del Guadalquivir está formada por sedimentos terciarios calizos (margas, calizas margosas, calizas y areniscas calizas) que al ser surcados por el río Guadalquivir y sus afluentes, quedaron cubiertos en parte por sedimentos fluviales cuyos restos forman las terrazas actuales. Estos suelos están dedicados principalmente a cultivos siendo por tanto la agricultura la actividad que mayor influencia tiene en la calidad de las aguas subterráneas y fluviales a su paso por la ciudad de Córdoba.

Todas las muestras se filtraron a través de membranas de nailon o acetato de celulosa, dependiendo de la naturaleza de los analitos, de 0,45 μm de tamaño de poro para eliminar las partículas suspendidas. A continuación, el pH de las muestras se ajustó a 2 con ácido nítrico o clorhídrico y se almacenaron en recipientes de vidrio ámbar a 4°C hasta su análisis. Puesto que las muestras acuosas se analizaron filtradas, sólo los componentes solubles de la matriz pueden interferir en la extracción y estabilización de los analitos. Aunque la composición de las aguas naturales y residuales puede ser muy variable dependiendo de su naturaleza y localización, por lo general los componentes mayoritarios de las mismas son materia orgánica (ácidos húmicos y fúlvicos, carbohidratos, grasas, proteínas y tensioactivos); coloides inorgánicos (óxidos de hierro y manganeso) y sales inorgánicas (carbonatos, bicarbonatos, cloruros, sulfatos, nitratos y nitritos, calcio, magnesio, sodio y potasio). Ninguno de estos componentes afecta a la formación o propiedades de los adsorbentes y disolventes supramoleculares utilizados en las investigaciones que se recogen en esta Memoria [1,2].

[1] A. García-Prieto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Anal. Bioanal. Chem. 388 (2007) 1823.

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

Los contaminantes orgánicos objeto de nuestro estudio se seleccionaron en base a los problemas de estabilización que presentan en las muestras acuosas ambientales y fueron; compuestos de benzalconio (BASs), hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y plaguicidas.

- Los BASs son un grupo de tensioactivos constituidos por sales de alquil-bencil-dimetil-amonio con longitudes variables de la cadena lineal. Comercialmente se ofrecen como mezclas de homólogos con longitudes de cadena hidrocarbonada de 12, 14 y 16 átomos de carbono. Los BASs analizados fueron bromuro de bencildimetildodecil amonio (BDDA); bromuro de bencildimetiltetradecil amonio (BDTA) y cloruro de bencildimetilhexadecil amonio (BDHA). Estos compuestos son muy empleados para evitar el crecimiento bacteriano en un buen número de productos de uso doméstico habitual. Su utilización provoca la introducción de estos compuestos en el ambiente acuático a través de la red de saneamiento de las ciudades, sin que las EDARs puedan eliminarlos completamente antes de ser vertidos a cauces fluviales naturales. En el medioambiente, los compuestos de benzalconio son causantes de efectos ecotoxicológicos sobre las poblaciones de organismos acuáticos habiéndose descrito daños incluso sobre mamíferos. A pesar de ello su presencia en aguas naturales no ha sido aún legislada. En la Figura 2 se muestran las estructuras de los BASs estudiados en las investigaciones que constituyen esta Tesis.

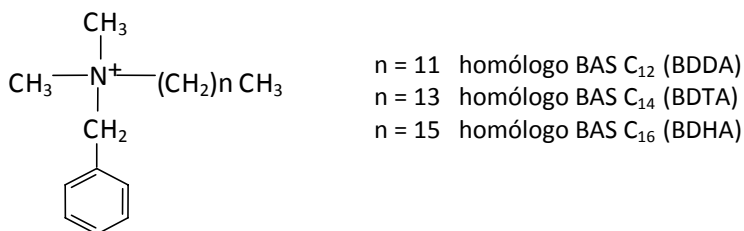


Figura 2. Estructuras de los homólogos del tensioactivo catiónico alquil-bencil-dimetil-amonio.

La escasa estabilidad de los BASs en muestras acuosas se debe principalmente a su gran capacidad de adsorción (alrededor del 90%) sobre los recipientes, independientemente del tipo de material (vidrio, polipropileno o teflón) [3], siendo necesario la acidificación del agua a pH 2 o la adición de acetonitrilo a una concentración del 25%(v/v) para evitar dichas pérdidas [4,5]. Estudios de biodegradación aeróbica también han demostrado que la estabilidad de los BASs está afectada por la acción microbiológica. Así, los homólogos BAS C₁₂ y BAS C₁₄ se degradan completamente en una semana mientras que la degradación del homólogo BAS C₁₆ es del 30% en el mismo periodo de tiempo [6]. Puesto que la biodegradación de los BASs en los sistemas acuáticos se reduce considerablemente debido a la formación de complejos con tensioactivos aniónicos [7], se espera que estos analitos se estabilicen en cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) al adsolubilizarse sobre las hemimicelas o admicelas de dodecilsulfato usadas como adsorbentes.

- Los PAHs son un grupo numeroso de sustancias derivadas del benceno que se forman cuando la materia orgánica se somete a temperatura elevada durante un tiempo determinado. Fuentes naturales como las erupciones volcánicas o los incendios forestales generan PAHs, pero las actividades humanas como el tráfico intenso de vehículos, las calefacciones domésticas o las plantas industriales que dependen de la combustión de derivados del petróleo y del carbón, son fuentes mucho más importantes. Los PAHs se hallan omnipresentes en el aire, suelo y agua y su análisis químico en estas muestras es de gran interés debido a que muchos de ellos son considerados agentes mutágenos y carcinógenos. El Benzo(a)pireno es el PAH más estudiado y es representativo de los efectos de los compuestos de este grupo. Este compuesto,

[3] I. Ferrer, E.T. Furlong, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 2583.

[4] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6799.

[5] M.J. Scott, M.N. Jones, *Biochim. Biophys. Acta* 1508 (2000) 235.

[6] M.T. García, I. Ribosa, T. Guindulain, J. Sánchez-Leal, J. Vives-Rego, *Environ. Pollut.* 111 (2001) 169.

[7] A. Utsunomiya, Y. Mori, K. Hasegawa, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health* 44 (1998) 264.

junto con el Benzo(b)fluoranteno, el Benzo(*ghi*)perileno, el Benzo(k)fluoranteno y el Indeno(1,2,3-*cd*)pireno, ha sido incluidos en la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. La Figura 3 muestra las estructuras de los PAHs estudiados en las investigaciones que constituyen esta Memoria.

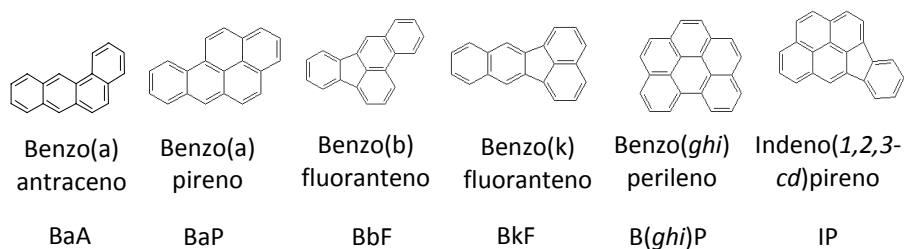


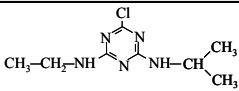
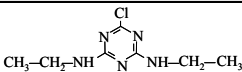
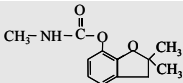
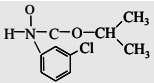
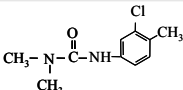
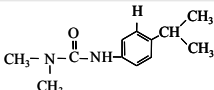
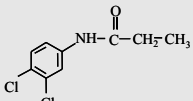
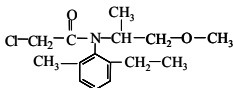
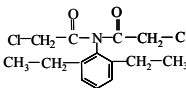
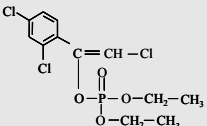
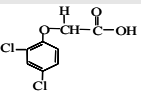
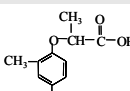
Figura 3. Estructuras de los hidrocarburos aromáticos policíclicos utilizados en nuestras investigaciones.

Al igual que ocurre con los BASs, los PAHs presentan baja estabilidad en muestras acuosas a causa de la importante adsorción que se produce en las paredes del recipiente [5]. El porcentaje de PAH adsorbido depende del material usado, produciéndose una adsorción total cuando se usan recipientes de polietileno y unas pérdidas de alrededor del 20-30% si el material es vidrio [8]. La adición de acetonitrilo en una concentración del 40% (v/v) es una de las estrategias a las que se recurre para preservar las muestras acuosas, sin embargo solo evita dichas pérdidas durante periodos de transporte y almacenamiento de pocos días. Otra desventaja que presenta la adición de disolventes orgánicos a las muestras para su estabilización es el decrecimiento que provoca en las recuperaciones de los analitos cuando se extraen mediante SPE debido a que se favorece su elución [3].

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

- Los plaguicidas incluyen un elevado número de sustancias con gran diversidad química, variabilidad en las propiedades físico-químicas y grandes diferencias en el comportamiento ambiental y toxicológico. Actualmente 18 de las 33 sustancias incluidas en la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas son plaguicidas. La Tabla 2 muestra las estructuras de los plaguicidas estudiados en las investigaciones que constituyen esta Tesis.

Tabla 2. Estructuras de los plaguicidas investigados.

Familias	Compuestos	
Triazinas	 <p>Atrazina</p>	 <p>Simazina</p>
Carbamatos	 <p>Carbofuran</p>	 <p>Clorprofam</p>
Fenilureas	 <p>Clortoluron</p>	 <p>Isoproturon</p>
Anilidas	 <p>Propanil</p>	
Cloroacetanilidas	 <p>Metolaclor</p>	 <p>Alaclor</p>
Organofosforados	 <p>Clorfenvinfos</p>	
Fenoxiacidos	 <p>2,4-D</p>	 <p>Mecoprop</p>

La degradación que experimentan los plaguicidas en las aguas naturales debido a hidrólisis, biodegradación, fotólisis o evaporación, es un problema ampliamente conocido [9] siendo las triazinas, los organofosforados y los carbamatos los grupos más afectados. Se han utilizado diferentes estrategias para su estabilización basadas en la adición de compuestos químicos y el control de la temperatura. Sin embargo, el uso de determinadas sustancias químicas para estabilizar una familia de plaguicidas puede afectar la estabilidad de otros grupos [10,11] y además, la estabilización sólo es efectiva durante 1 ó 2 semanas.

2.2. Extracción y concentración de los analitos

Se ha utilizado extracción en fase sólida (SPE) empleando dos tipos de fases adsorbentes supramoleculares; en una primera aplicación se extrajeron los BASs en aguas residuales y fluviales mediante un adsorbente hemimicelar de dodecil sulfato sobre alúmina y a continuación se desarrolló una segunda metodología basada en un adsorbente de admicelas mixtas de tetrabutil amonio y dodecil sulfato para la determinación de plaguicidas en aguas naturales. Por otro lado, la extracción de PAHs y BASs se realizó utilizando un disolvente supramolecular constituido por micelas de dodecilsulfonato sódico a pH ácido.

[9] D. Barceló, M.C. Hennion, en: *Techniques and instrumentation in analytical chemistry*, volume 19: Trace determination of pesticides and their degradation products in water, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2003.

[10] I. Ferrer, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 161.

[11] T.C. Mueller, S.A. Senseman, K.H. Carson, A.S. Sciumbato, *J. AOAC Int.* 84 (2001) 1070.

2.2.1. Síntesis y características de los sistemas supramoleculares empleados

a) Fases adsorbentes: hemimicelas de dodecil sulfato y admicelas mixtas de tetrabutil amonio y dodecil sulfato sobre alúmina.

Una de las características que diferencian a las fases adsorbentes supramoleculares de las tradicionalmente usadas en SPE es la posibilidad de modificar la naturaleza del adsorbente en función de la concentración de tensioactivo utilizada. La isoterma de adsorción del dodecilsulfato sódico (SDS) sobre alúmina a pH 2 nos permite identificar las regiones de formación de las diferentes fases adsorbentes (hemimicelas, hemimicelas/admicelas y admicelas) en función de la cantidad de tensioactivo. El pH al que se produce la adsorción determina la cantidad de tensioactivo que puede adsorberse ya que de este parámetro depende la densidad de carga de la superficie del óxido mineral. El punto de carga cero (pcz) de la alúmina es aproximadamente 8.5 lo que implica que la superficie del óxido tiene carga positiva a valores de pH inferiores a 7, siendo pH 2 el utilizado en las metodologías desarrolladas por alcanzarse la máxima densidad de carga. La formación de hemimicelas de SDS se produce in situ al filtrar una disolución del tensioactivo (pH 2) a través de una típica columna de extracción en fase sólida que contiene 500 mg de alúmina, previamente acondicionada con una disolución de ácido nítrico 10^{-2} M. La adsorción de SDS sobre el óxido mineral se produce a través de interacciones electrostáticas, aunque también existen fuertes interacciones entre las cadenas hidrocarbonadas del tensioactivo lo que produce las típicas estructuras de “tepee” que conforman las hemimicelas. Además también existe la posibilidad de formar admicelas mixtas. La ventaja de los agregados mixtos es que añaden un nuevo mecanismo de retención de los analitos mediante el establecimiento de interacciones π -catión entre el grupo aromático de éstos y el grupo amonio del tetrabutilamonio.

Las condiciones propuestas para la extracción de nuestros analitos son: 25 mg de SDS absorbidos por gramo de alúmina que dan lugar a la formación de

hemimicelas de SDS en el caso de extracción de los BASs, y 80 mg de SDS y 0,06 mg de TBA por gramo de alúmina que originan admicelas mixtas para la extracción de los plaguicidas (Figura 4). En ambos casos la concentración de SDS que se eluirá durante la filtración de la muestra será despreciable y por tanto se mantiene constante la composición del adsorbente.

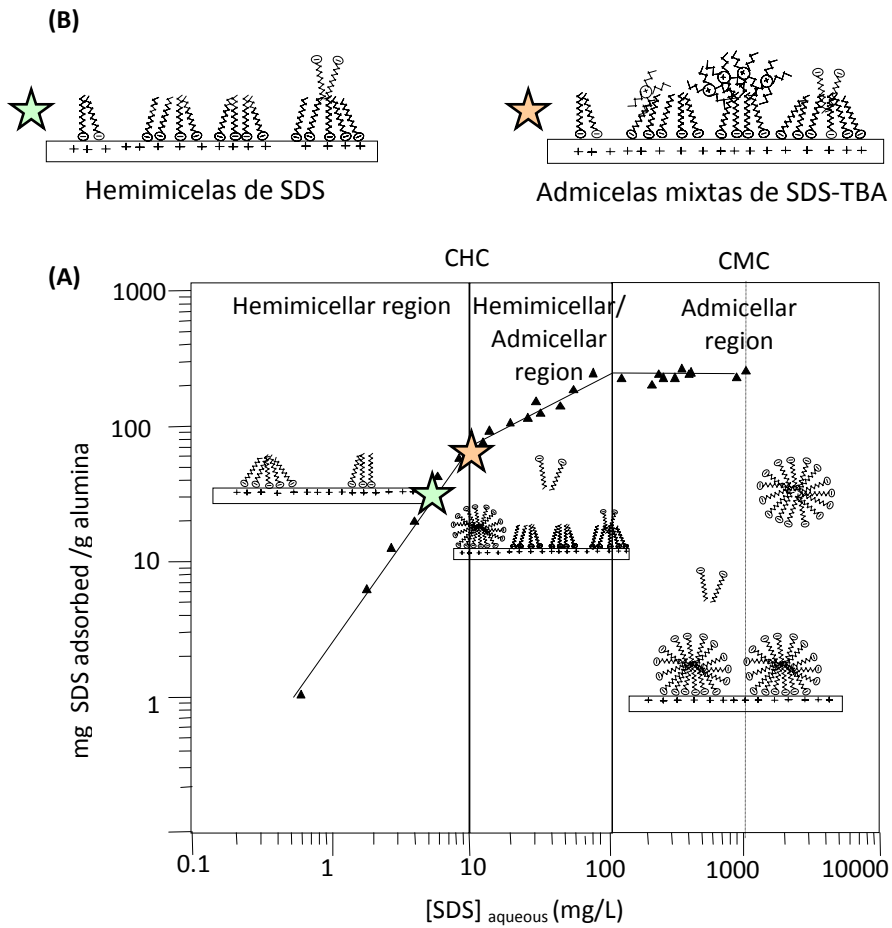


Figura 4. (A) Isotherma de adsorción del SDS a pH 2 y (B) adsorbentes supramoleculares seleccionados para la extracción de los BASs y plaguicidas.

b) Disolvente supramolecular constituido por micelas de ácido dodecilsulfónico

El disolvente supramolecular (SUPRAS) se forma in situ en la muestra que contiene los analitos mediante dos procesos secuenciales de autoensamblaje. Para ello, inicialmente se forman micelas acuosas de dodecilsulfonato sódico al añadir el tensioactivo a la muestra a concentraciones superiores a la concentración micelar crítica. A continuación se adiciona ácido clorhídrico, lo que provoca la neutralización de las cargas del tensioactivo y facilita la interacción entre las micelas, incrementándose su tamaño y produciendo el fenómeno de la coacervación. La formación de la nueva fase líquida, inmisible con la primera, sólo requiere la agitación de la mezcla durante 5 minutos. Para acelerar la separación del disolvente de la mezcla agua/ácido clorhídrico la disolución se centrifuga durante 10 minutos. La nueva fase líquida inmisible con el agua se sitúa en la parte superior del tubo lo cual constituye una ventaja para la medida de su volumen y posterior recolección. En la Figura 5 se muestra el diagrama de fases del dodecilsulfonato sódico (SDSA) en disolución acuosa donde L indica la región líquida homogénea en la cual todavía no ocurre la separación de las fases; L-L es la región donde se produce la coacervación inducida por el ácido; E corresponde a una zona de emulsión, y S indica las condiciones donde ocurre la precipitación del tensioactivo. La región L-L es la utilizada con fines analíticos y en ella el SUPRAS actúa como extractante y la propia muestra acuosa elimina interferencias al proporcionar una fase donde los compuestos menos hidrófobos quedan solubilizados.

Las condiciones propuestas para la extracción de los BASs y PAHs son 25 mL de muestra acuosa con una concentración final de 3,75 M o 4,2 M de ácido clorhídrico y 0,25 % (w/v) de dodecilsulfonato sódico.

En estos experimentos se utilizan tubos especialmente diseñados por nuestro grupo de investigación y fabricados por la empresa Pobel, los cuales están basados en un cono de centrifuga cuya zona superior ha sido estrechada (7 mm d.i.), para una mejor lectura y recuperación del volumen del disolvente supramolecular.

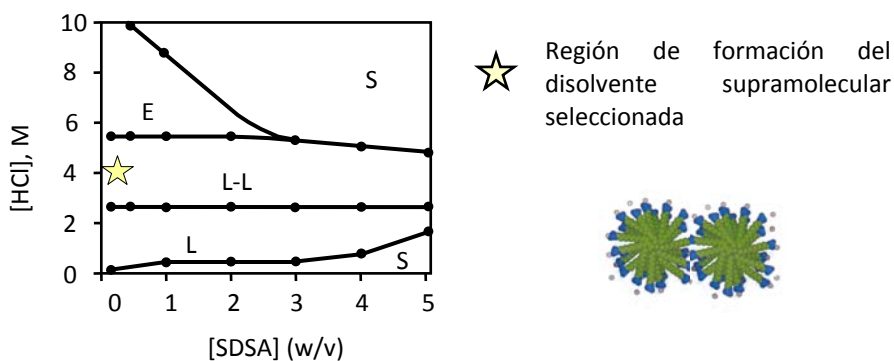


Figura 5. Diagrama de fases del dodecilsulfonato sódico (SDSA) en disolución acuosa y disolvente supramolecular seleccionada para la extracción de los BASs y PAHs.

2.2.2. Extracción y preconcentración

a) Plaguicidas.

La capacidad de adsorbilización de varias familias de plaguicidas en adsorbentes supramoleculares había sido previamente demostrada por nuestro grupo de investigación [12]. Las investigaciones que se presentan en esta Memoria demostraron que las admicelas mixtas de SDS-tetrabutylamonio (80 mg de SDS y 0,05 mg de TBA/g de alúmina) son el adsorbente más apropiado para la extracción simultánea de distintos grupos de plaguicidas dado que además de las fuerzas de dispersión de las cadenas hidrocarbonadas del SDS e interacciones iónicas del grupo polar del SDS o de la alúmina sin recubrir proporciona interacciones π -catión entre el tetrabutylamonio y los anillos

[12] A. Moral, M.D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Anal. Chim. Acta 608 (2008) 61.

aromáticos presentes en todas las estructuras de los plaguicidas investigados (Figura 4B). El calcio presente en las muestras acuosas debe precipitarse con SDS antes de su percolación por los cartuchos ya que los complejos π -catión entre el calcio y los plaguicidas desfavorecen las interacciones analito-TBA afectando a las extracciones.

Los eluyentes tradicionalmente usados para la desorción de los analitos de los adsorbentes supramoleculares son disolventes orgánicos o disoluciones acuosas a un pH adecuado que tienen la capacidad de destruir los agregados de tensioactivo sobre el óxido mineral. En la aplicación desarrollada se ensayaron los disolventes orgánicos metanol, isopropanol, tetrahidrofurano y la mezcla 0,3 M hidróxido sódico-metanol (90:10 v/v) a diferentes volúmenes, obteniéndose las mejores recuperaciones de plaguicidas básicos y neutros (carbamatos, fenilureas, triazinas, anilidas, organofosforados y cloroacetanilidas) con 1 mL de tetrahidrofurano. La desorción de los pesticidas ácidos se llevó a cabo empleando una segunda etapa de elución con 2 mL de la mezcla 0,3 M hidróxido sódico-metanol (90:10 v/v), la cual al percolarse por los cartuchos cambia la carga de la alúmina de positiva a negativa causando la ruptura de los agregados TBA-SDS. La pequeña proporción de metanol en la mezcla es necesaria para obtener la desorción de los pesticidas ácidos. Las recuperaciones de los plaguicidas ensayados fueron cuantitativas a excepción del carbofuran ($50\pm 3\%$).

Los resultados del estudio de volumen de ruptura (volumen de muestra para el cual la recuperación de analitos disminuye en un 5%) para el método propuesto mostraron recuperaciones cuantitativas para la mayoría de los plaguicidas con el máximo volumen de muestra ensayado (500 mL). Sin embargo, las recuperaciones para carbofuran y fenilureas disminuyeron alrededor de un 50% al percolar 250 mL y 100 mL de muestra acuosa respectivamente. Así, el volumen de muestra propuesto para este método fue de 250 mL como solución de compromiso. Los factores de preconcentración fueron de 250 (250 mL de muestra y 1mL de eluyente) para los plaguicidas básicos y neutros y 125 (250 mL de muestra y 2mL de eluyente) para los

plaguicidas ácidos. En base a estos resultados podemos decir que el adsorbente admicelar mixto propuesto es una herramienta válida para la extracción y preconcentración de multiresiduos de pesticidas en base a las diferentes interacciones que puede establecer con los analitos. Otra característica destacable del método es el bajo volumen de disolvente orgánico necesario para la desorción de los analitos lo cual evita la etapa de evaporación y reconstitución de los extractos que generalmente es necesaria cuando se usan adsorbentes poliméricos con un elevado grado de entrecruzamiento o de negro de carbón.

b) Compuestos de benzalconio.

La adsolubilización de los diferentes homólogos de BASs en las diferentes regiones de la isoterma de SDS sobre alúmina había sido investigada por nuestro grupo de investigación [4]. Las recuperaciones de estos compuestos catiónicos eran cuantitativas independientemente del tipo de fase adsorbente utilizada (hemimicelas, hemimicelas/admicelas o admicelas) debido a la formación de agregados mixtos con fuertes interacciones de dispersión e iónicas entre los grupos polares de carga opuesta de los BASs y del SDS. Sin embargo, la formación de admicelas lleva aparejado un reparto de tensioactivo entre el sólido mineral y el tensioactivo en disolución que tiene como consecuencia la pérdida de tensioactivo, lo que obliga a añadir a la muestra la cantidad adecuada de SDS para mantener el equilibrio. Debido a ello es preferible trabajar en la zona hemimicelar en la que no es necesario añadir tensioactivo durante la percolación de la muestra. La cantidad de SDS seleccionada fue de 25 mg/g de alúmina, después de comprobar que altas concentraciones de electrolito (hasta 0.2 M NaCl) no tenía influencia en la adsolubilización de estos compuestos al inicio de la región hemimicelar. La elución de los BASs se llevó a cabo con 2 mL de metanol. Recuperaciones cuantitativas se obtienen al menos con muestras de hasta 1 L (no se estudiaron volúmenes mayores), lo que implica factores de preconcentración de 500. Otras fases adsorbentes habían sido previamente propuestas en bibliografía para la determinación de BASs, sin embargo los adsorbentes poliméricos neutros proporcionan recuperaciones del 75% [3] y los adsorbentes no polares tipo C_{18} no se recomiendan debido a las

fuertes interacciones entre los BASs y los grupos silanoles lo que implica la utilización de grandes volúmenes de disolvente orgánico para su elución [4,13]. Por ello el uso del adsorbente admicelar propuesto en esta memoria supone una gran ventaja debido a su eficacia de extracción y fácil elución.

En las investigaciones que hemos desarrollado en esta Memoria se ha propuesto también la extracción de los BASs utilizando SUPRASs de micelas acuosas de ácido dodecilsulfónico. El método de extracción propuesto implica la adición de 0,1 g de dodecilsulfonato sódico y un volumen de 12,5 o 14 mL de ácido clorhídrico (12 M) a 25 mL de muestra acuosa, para dar lugar a una concentración final de 0,25 % (w/v) y 3,75 M o 4,2 M, respectivamente. Cuando se usan estos disolventes supramoleculares el factor de preconcentración y la eficacia de extracción dependen fundamentalmente de la cantidad de tensioactivo utilizado, ya que éste determina el volumen de disolvente formado. Cuanto más disolvente se produzca mayor será la eficacia de extracción pero menor será el límite de cuantificación del método. La concentración de ácido clorhídrico utilizada también influye en el factor de preconcentración, aunque en menor medida, ya que cuanto mayor sea la concentración de ácido empleada para inducir la coacervación, menor contenido de agua presentan los disolventes formados. En este caso los volúmenes medios obtenidos fueron 430 μ L y 495 μ L dependiendo de la concentración de ácido empleada. Debido a la alta viscosidad y acidez que presentan, estos disolventes se diluyeron con metanol hasta 1 mL justo antes de su inyección cromatográfica, por lo que el factor de preconcentración final fue 25 considerando que las recuperaciones son cuantitativas para los 3 homólogos (BDDA, BDTA, BDHA). La formación de agregados mixtos entre los BASs y el dodecilsulfonato proporciona dos tipos de interacciones para la solubilización de los analitos: fuerzas de van der Waals con las cadenas hidrocarbonadas e interacciones iónicas con los grupos polares del tensioactivo de carga opuesta que forma las micelas.

[13] J.K. Autry, E.G. Vaught, E.D. Conte, *Microchem. J.* 80 (2005) 25.

c) Hidrocarburos aromáticos policíclicos.

En la extracción de los PAHs con el disolvente supramolecular constituido por micelas de ácido dodecilsulfónico, las interacciones de dispersión entre los anillos de los PAHs y las cadenas hidrocarbonadas del núcleo de las micelas son las responsables de su solubilización. Las condiciones experimentales para su extracción fueron las mismas que se utilizaron para los BASs obteniéndose recuperaciones cuantitativas independientemente de su hidrofobicidad (valores de $\log K_{ow}$ comprendidos entre 5,6-6,6).

2.3. Estabilización de los contaminantes en muestras acuosas

Dado el gran potencial que presentan las hemimicelas, admicelas y disolventes supramoleculares para la extracción de compuestos orgánicos, las siguientes investigaciones se centraron en confirmar si una vez retenidos los contaminantes, el microambiente proporcionado por los agregados les confiere estabilidad y evita su degradación. De esta forma se integrarían las etapas de extracción, preconcentración y estabilización simplificando el procedimiento para la determinación de los compuestos orgánicos y evitando transportar elevados volúmenes de agua. Además, el pequeño volumen que ocupan los formatos empleados facilita su almacenamiento y refrigeración en caso de que fuera necesario para la conservación de las muestras. En el transcurso de esta Tesis se investigó por primera vez la estabilidad de los plaguicidas, BASs y PAHs (todos ellos analitos con problemas de conservación) en diferentes tipos de sistemas supramoleculares y condiciones de almacenamiento; tiempo, temperatura, luz, acidez y naturaleza de la matriz. La Figura 6 muestra un esquema que resume las diferentes experiencias ensayadas.

Compuestos y muestras	Condiciones de almacenamiento de los adsorbentes hemimicelares/admicelares			
	Tª ambiente		4°C	-20°C
	Oscuridad	Luz solar		
BASs en agua destilada	1 mes	3 meses	3 meses	3 meses
BAS en muestras ambientales	-	-	1 mes	-
Plaguicidas en agua destilada	3 meses	3 meses	3 meses	3 meses
Plaguicidas en muestras ambientales	-	-	3 meses	-

Compuestos y muestras	Condiciones de almacenamiento de los disolventes supramoleculares				
	35°C	Tª ambiente		4°C	-20°C
	Oscuridad	Oscuridad	Luz solar		
BASs en agua destilada	1 mes	1 semana	3 meses	3 meses	3 meses
BAS en muestras ambientales	-	-	-	1 mes	-
PAHs en agua destilada	1 mes	1 semana	3 meses	3 meses	3 meses
PAHs en muestras ambientales	-	-	-	1 mes	-

Figura 6. Esquema de las diferentes condiciones de almacenamiento ensayadas en los estudios de estabilidad de los analitos en diferentes agregados supramoleculares.

2.3.1. Estabilización en adsorbentes hemimicelares/admicelares

a) Efecto de secado del adsorbente

Se sabe que el agua residual que impregna el adsorbente en SPE después de la percolación de la muestra puede causar hidrólisis de los analitos retenidos, por lo tanto es importante su total eliminación para evitar problemas de degradación. El secado de los cartuchos de SPE, conteniendo BASs adsorbidos en el adsorbente supramolecular se llevó a cabo empleando una bomba de vacío durante diferentes periodos de tiempo, comprendidos entre 3

minutos y 1 hora. Paralelamente, también se almacenaron cartuchos que no se habían sometido al proceso de secado del adsorbente. Las recuperaciones de los BASs en estos últimos disminuyeron un 5% en tan sólo 1 día, mientras que las recuperaciones de los cartuchos sometidos a secado fueron cuantitativas después de una semana para todos los tiempos de secado ensayados. Se propone por consiguiente, secar siempre los cartuchos durante 3-5 minutos para eliminar el agua residual después de la percolación de la muestra.

b) Efecto de la exposición a la luz solar.

La influencia de la luz solar sobre la estabilidad de los compuestos en las fases adsorbentes estudiadas se investigó comparando los resultados obtenidos con cartuchos expuestos a la luz (iluminación natural del laboratorio) y cartuchos almacenados en condiciones de oscuridad (bien envolviéndolos en papel de aluminio o bien guardándolos en cajas de cartón opacas) durante uno o 3 meses a temperatura ambiente. En el caso de los BASs y la mayoría de las familias de plaguicidas estudiadas (carbamatos, fenilureas, anilidas, cloroacetanilidas y fenoxiácidos) las recuperaciones obtenidas fueron cuantitativas independientemente de las condiciones de iluminación; sin embargo, como se puede ver en la Tabla 3, los plaguicidas organofosforados y las triazinas se degradaron muy rápidamente a partir de la primera semana cuando se almacenaron sin protección de la luz solar.

Por lo tanto, la determinación de multiresiduos de plaguicidas con adsorbentes supramoleculares requiere el almacenamiento de los cartuchos en bolsas opacas cuando se prevea que el tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y los análisis va a ser superior a 7 días. Esta recomendación puede obviarse para el análisis de los BASs ya que éstos no se degradan por la luz solar cuando se encuentran en el microambiente proporcionado por el adsorbente hemimicelar.

Tabla 3. Recuperaciones^a medias (n = 3; %) de los analitos de muestras de agua destilada fortificadas (BASs: 48 µg L⁻¹ y plaguicidas: 1 µg L⁻¹) después de ser almacenados en los adsorbentes supramoleculares investigados a temperatura ambiente y diferentes condiciones de iluminación durante 1 mes.

Compuestos	Condiciones de almacenamiento									
	Temperatura ambiente y Oscuridad					Temperatura ambiente y luz natural				
	Tiempo (semanas)					Tiempo (semanas)				
	0	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	
BDDA	100±5	100±1	106±5	98±5	103±5	96±1	97±3	94±2	96±5	
BDTA	100±4	98±1	96±2	105±6	95±6	97±3	101±3	97±3	101±3	
BDHA	100±6	97±2	96±1	96±1	102±5	98±1	97±2	99±4	94±1	
Simazina	100±3	99±3	97±4	95±4	89±6	98±4	70±2	43±1	35±2	
Atrazina	100±4	100±2	88±5	94±4	94±6	93±6	59±2	31±2	22±1	
Carbofuran	100±10	112±11	106±10	102±10	106±4	106±6	104±4	78±10	88±2	
Clorprofam	100±2	100±1	99±4	107±4	95±5	101±4	101±4	110±2	116±1	
Clortoluron	100±8	108±7	92±6	100±7	97±1	106±8	94±4	97±9	101±4	
Isoproturon	100±7	107±5	97±7	107±6	102±1	105±4	99±4	103±7	108±2	
Propanil	100±4	103±3	95±6	109±2	106±1	101±4	95±4	102±5	103±2	
Metolaclor	100±5	97±1	107±3	112±5	112±3	100±3	105±5	108±1	106±4	
Alaclor	100±5	106±1	96±5	109±7	106±5	101±3	99±5	111±2	102±2	
Clorfenvinfos	100±3	93±1	93±3	101±5	92±3	98±8	68±10	36±10	34±4	
2,4-D	100±7	88±2	95±4	88±6	104±3	96±5	92±3	91±4	102±4	
Mecoprop	100±8	80±3	90±3	97±4	95±1	97±6	91±1	100±3	97±2	

^a Tasas de extracción normalizadas.

c) Efecto de la temperatura.

Para este estudio, muestras de agua destilada fortificadas con los analitos (48 µg L⁻¹ para los BASs y 1 µg L⁻¹ para los plaguicidas) se pasaron por los cartuchos rellenos con los adsorbentes supramoleculares y estos se

almacenaron a distintas temperaturas (ambiente, 4°C y -20°C) durante 3 meses. Antes de la elución, los cartuchos conservados a 4 °C y -20°C deben mantenerse a temperatura ambiente durante al menos 15 minutos y una hora respectivamente para evitar variabilidad en la cuantificación.

Los BASs no se degradaron a lo largo del tiempo bajo ninguna de las condiciones de temperatura a las que los cartuchos fueron expuestos demostrando la gran capacidad estabilizadora de los agregados supramoleculares para estos analitos (ver recuperaciones de los BASs en las Tablas 3 y 4). Debido a la falta de datos en bibliografía sobre la estabilidad de los BASs en muestras acuosas empleando técnicas de conservación tradicionales, se llevó a cabo una serie de experiencias para comprobar su estabilidad en agua destilada bajo diferentes procedimientos durante 1 mes; acidificación a pH 2 con ácido nítrico/refrigeración a 4°C; adición de formaldehído a una concentración del 5% (v/v)/refrigeración a 4°C; y congelación de las muestras acuosas. La congelación de las muestras a -20°C no mejoró la estabilidad de los BASs, probablemente debido a su adsorción sobre el vidrio, y aunque la presencia de aditivos químicos (ácido nítrico o formaldehído), unido a refrigeración (4°C) de las muestras para inhibir la degradación microbológica, produjo mejores resultados, estos procedimientos sólo son efectivos para conservar las muestras durante cortos periodos de tiempo ya que pasada una semana comienza a producirse la degradación de los BASs con una magnitud que depende de la longitud de la cadena hidrocarbonada. En base a estos resultados podemos concluir que el uso de agregados hemimicelares, en formato SPE, presenta claras ventajas, con respecto a los métodos convencionales para la estabilización de los homólogos de BAS. Así, una vez adsorbidos en hemimicelas, los BASs permanecen estables al menos durante 3 meses a temperatura ambiente, facilitando de esta forma el transporte de las muestras en campañas de monitorización si el filtrado de las mismas se realiza on-site.

Tabla 4. Recuperaciones^a medias (n=3, %) de los analitos de muestras de agua destiladas fortificadas^b después de ser almacenados en los adsorbentes supramoleculares investigados a 4°C y -20°C durante 3 meses.

Compuestos	Condiciones de almacenamiento																		
	4°C							-20°C											
	Tiempo de almacenamiento (semanas)							Tiempo de almacenamiento (semanas)											
0	1 ^o	2 ^o	3 ^o	4 ^o	8 ^o	12 ^o	1 ^o	2 ^o	3 ^o	4 ^o	8 ^o	12 ^o	1 ^o	2 ^o	3 ^o	4 ^o	8 ^o	12 ^o	
BDDA	100±5	102±1	105±2	114±7	97±6	103±5	99±3	105±4	101±3	94±5	95±1	96±1	94±2						
BDA	100±4	98±1	104±3	103±1	103±1	98±5	97±1	100±1	98±2	97±1	95±2	96±1	94±2						
BDHA	100±6	100±1	105±3	98±5	103±4	96±6	98±1	94±5	94±1	94±1	95±1	95±1	95±1						
Simazina	100±3	111±2	108±2	99±4	102±3	97±5	97±3	111±2	98±3	104±1	109±1	102±4	100±3						
Atrazina	100±4	106±1	109±1	105±1	104±3	74±3	67±4	115±2	98±3	112±2	104±2	107±3	105±4						
Carbofuran	100±10	112±6	106±6	90±4	102±8	102±2	110±6	114±2	94±8	92±2	98±6	100±6	104±4						
Clorprofam	100±2	104±2	106±2	100±4	107±5	105±7	98±4	105±2	100±4	100±1	111±1	108±4	94±8						
Clortoluron	100±8	109±4	110±6	97±11	103±1	101±1	105±6	107±7	95±6	94±9	100±8	108±5	97±5						
Isoproturon	100±7	112±2	108±5	99±2	115±4	100±1	103±1	107±8	105±6	103±7	108±2	101±4	107±7						
Propanil	100±4	107±2	106±4	98±1	106±1	109±1	103±1	107±5	97±6	102±7	103±1	100±4	99±4						
Metolaclor	100±5	99±6	109±8	109±2	98±3	96±7	94±5	102±1	108±3	101±1	104±2	104±6	91±3						
Alaclor	100±5	105±2	93±5	105±6	106±4	110±6	97±2	104±2	91±6	102±6	106±4	111±6	99±3						
Clorfenvinfos	100±3	99±5	105±1	103±2	102±4	83±2	80±5	102±2	99±4	104±1	105±2	104±1	100±4						
2,4-D	100±7	99±5	92±1	85±3	101±4	89±1	91±3	98±5	94±1	89±1	100±3	89±3	96±2						
MCPP	100±8	91±1	88±3	95±2	93±1	96±4	88±4	86±1	88±3	94±1	93±1	94±4	92±3						

^a Tasas de extracción normalizadas; ^b 48 µg L⁻¹ para los BASS y 1 µg L⁻¹ para los plaguicidas.

En el caso de los plaguicidas, la temperatura afectó su estabilidad en los agregados admicelares (ver Tabla 3 y 4). Ningún plaguicida investigado mostró degradación en 3 meses cuando los cartuchos se almacenaron a -20°C . Sin embargo, atrazina y clorfenvinfos comenzaron a degradarse a 4°C a partir de un mes mientras que la estabilidad de los analitos a temperatura ambiente dependió del grupo estructural. Así, la estabilidad fue de un mes para triazinas, fenilureas y organofosforados, dos meses para carbamatos y anilidas y 3 meses para cloroacetanilidas y fenoxiácidos. De nuevo las triazinas y el clorfenvinfos fueron los más afectados por la temperatura al igual que ocurrió con la luz solar.

La comparación de la capacidad del adsorbente admicelar mixto empleado en estas investigaciones para estabilizar plaguicidas respecto a la de otros adsorbentes descritos en bibliografía no es fácil debido a las diferentes condiciones y periodos de tiempo investigados, pero en general puede decirse que los adsorbentes admicelares presentan una capacidad estabilizadora muy similar a la de los adsorbentes poliméricos y mejor que los adsorbentes C18 o negro de carbón a cualquier temperatura.

Por lo tanto, los cartuchos admicelares conteniendo los plaguicidas pueden transportarse y permanecer sin control de temperatura durante un 1 mes sin que la integridad de los compuestos extraídos se vea afectada; pasado ese tiempo deben almacenarse en el frigorífico o congelador dependiendo de cuando vayan a realizarse los análisis.

d) Efecto de los componentes de la matriz

Las aguas de los sistemas acuáticos naturales y sobre todo las aguas residuales tienen una composición muy variable y presentan componentes en la matriz que pueden afectar a la estabilidad de los analitos. Por este motivo se comprobó la estabilidad de los analitos en los adsorbentes supramoleculares almacenados durante 1 mes a 4°C empleando diferentes tipos de muestras acuosas (fluviales, subterráneas y residuales) con el fin de validar la aplicabilidad de esta metodología a muestras reales. Los resultados mostraron que los

componentes de la matriz no afectan a la estabilidad de los analitos confirmando la gran resistencia a la degradación que presentan en estos agregados supramoleculares. Los BAS-C₁₂ y -C₁₄ presentaron la misma estabilidad que su homólogo -C₁₆ en las muestras de agua de río y residuales a pesar de ser más fácilmente biodegradables [8]. La formación de agregados mixtos entre los compuestos de benzalconio y el SDS minimiza su degradación al igual que ocurre en las aguas naturales cuando se forman complejos entre tensioactivos aniónicos y catiónicos [9].

2.3.2. Estabilización en disolventes supramoleculares

El disolvente supramolecular utilizado para la extracción de los BASs y PAHs, se separó de las muestras acuosas mediante una jeringa y se depositaron los extractos en pequeños viales de vidrio que se almacenaron en diferentes condiciones para estudiar la estabilidad de los analitos solubilizados.

a) Efecto de la concentración de ácido clorhídrico

En primer lugar se comprobó si la acidez de los disolventes formados [inducidos con dos concentraciones de ácido clorhídrico (3,75 M y 4,2 M)] tenían influencia en la estabilidad de los BASs y PAHs. Los resultados mostraron que no existían diferencias entre los dos tipos de SUPRASs y las recuperaciones fueron siempre cuantitativas para todos los analitos (ver Tabla 5).

b) Efecto de la exposición a luz solar.

El efecto de la luz natural en la estabilidad de los analitos solubilizados en los disolventes se estudió exponiendo unos viales a la luz solar y envolviendo otros con papel aluminio durante una semana a temperatura ambiente. Ninguno de los compuestos analizados mostró degradación en las condiciones de almacenamiento ensayadas por lo que no es necesario mantener en oscuridad los viales a temperatura ambiente.

Tabla 5. Recuperaciones^a medias (n = 3, %) de los analitos después de su extracción de muestras de agua destilada fortificadas (0,19 µg L⁻¹) y almacenamiento en los disolventes supramoleculares en diferentes de condiciones de acidez y temperatura durante 3 meses.

Compuestos de Benzalconio							
Compuestos	Tiempo (semanas)	Condiciones de almacenamiento					
		4,2 M			3,75 M		
		T ^a ambiente	4°C	-20°C	T ^a ambiente	4°C	-20°C
BDDA	0	100±3			100±4		
	1 ^a	97±1	99±2	100±1	93±1	96±2	94±1
	8 ^a	92±1	94±2	94±1	92±1	94±3	95±1
	12 ^a	108±3	107±4	108±1	98±3	101±4	101±1
BDTA	0	100±2			100±4		
	1 ^a	97±1	100±2	102±1	94±1	94±4	96±1
	8 ^a	92±2	94±1	93±2	92±3	93±1	94±3
	12 ^a	94±5	101±5	104±5	95±3	95±2	95±2
BDHA	0	100±1			100±4		
	1 ^a	100±1	101±1	103±2	99±1	99±3	101±2
	8 ^a	94±1	94±2	96±2	95±3	99±1	96±3
	12 ^a	101±4	105±5	104±3	95±5	96±2	95±4
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos							
Compuestos	Tiempo (semanas)	Condiciones de almacenamiento					
		4,2 M			3,75 M		
		T ^a ambiente	4°C	-20°C	T ^a ambiente	4°C	-20°C
BaA	0	100±1			100±2		
	1 ^a	103±2	103±1	101±1	100±1	108±1	108±1
	8 ^a	103±2	103±2	101±1	105±3	104±4	109±1
	12 ^a	102±4	102±4	100±3	99±2	102±1	101±1
BaP	0	100±2			100±3		
	1 ^a	95±1	100±1	103±3	100±4	105±1	108±1
	8 ^a	98±3	101±1	101±1	101±3	99±2	105±2
	12 ^a	96±3	97±2	99±5	97±2	99±2	100±3
IP	0	100±4			100±2		
	1 ^a	102±4	99±3	102±1	100±3	105±1	105±1
	8 ^a	99±2	103±2	100±1	104±3	102±2	107±2
	12 ^a	90±1	95±4	94±2	94±2	96±1	98±4

^a Tasas de extracción normalizadas.

c) Efecto de la temperatura.

La influencia de la temperatura en la conservación de las muestras también se comprobó guardando los viales a 35 °C, temperatura ambiente, 4°C y -20°C durante 3 meses. La tabla 5 muestra un resumen de los resultados obtenidos. Las recuperaciones de los analitos estuvieron comprendidas entre 90 y 109% demostrando que una vez solubilizados en los SUPRASs no experimentan degradación, independientemente del número de anillos aromáticos presentes en su estructura o la longitud de la cadena hidrocarbonada. El hecho de que también sean estables, independientemente de las condiciones de acidez e iluminación, facilita el transporte y almacenamiento de las muestras durante el trabajo de campo, sobre todo en zonas calurosas y soleadas.

d) Efecto de los componentes de la matriz

En este caso el efecto de los componentes de la matriz sobre la estabilidad de BASs y PAHs se comprobó empleando aguas de río y residuales y almacenando los SUPRASs formados a temperatura ambiente y 4°C durante un mes. La Tabla 6 muestra algunos de los resultados obtenidos; los analitos mantienen su estabilidad en el tiempo objeto de estudio.

Tabla 6. Recuperaciones^a medias (n=3, %) de los analitos después de su extracción de muestras de agua residuales y fluviales fortificadas (0.19 µg L⁻¹) y almacenamiento en los disolventes supramoleculares a 4°C durante 1 mes.

Compuestos de benzalconio								
Tiempo (días)	Agua residual (influyente)			Agua fluvial (Guadalquivir)				
	BDDA	BDTA	BDHA	BDDA	BDTA	BDHA		
0	100±4	100±3	100±2	100±3	100±3	100±2		
30	91±1	93±1	90±1	94±3	91±7	88±10		
Hidrocarburos aromáticos policíclicos								
Tiempo (días)	Agua residual (influyente)				Agua fluvial (Guadalquivir)			
	BbF	BkF	BaP	B(ghi)P	BbF	BkF	BaP	B(ghi)P
0	100±10	100±6	100±6	100±10	100±8	100±6	100±6	100±11
30	108±3	102±3	101±2	101±9	98±1	102±6	105±5	100±9

^a Tasas de extracción normalizadas.

Como conclusión de este apartado, se puede afirmar que los agregados supramoleculares, tanto disolventes como adsorbentes, presentan gran capacidad de estabilización para los contaminantes orgánicos en muestras acuosas ambientales.

2.4. Cuantificación

Los extractos supramoleculares son compatibles con cromatografía líquida acoplada a distintos detectores. En las investigaciones llevadas a cabo en esta Tesis Doctoral, se han empleado absorbancia, fluorescencia y espectrometría de masas. Los agregados micelares que constituyen los SUPRAS de SDSA se destruyen cuando el extracto se diluye con metanol justo antes de la inyección cromatográfica, con objeto de disminuir su viscosidad y acidez, mientras que los agregados de hemimicelas/admicelas se destruyen por el disolvente orgánico utilizado para la elución en SPE. En ambos casos los extractos además de contener los analitos poseen una elevada cantidad de monómeros de tensioactivo. Ya que tanto dodecilsulfonato como dodecilsulfato son iónicos, eluyen rápidamente en los procesos cromatográficos y generalmente se envían a desecho cuando CL está acoplada a espectrometría de masas para evitar que la fuente de ionización se ensucie. La gran ventaja de estos tensioactivos con respecto a los no iónicos desde el punto de vista de la detección, es que los primeros se comercializan como monómeros puros de estructura definida, mientras los tensioactivos no iónicos sólo se comercializan como una mezcla de homólogos e isómeros. Este hecho, unido a que la mayoría de los tensioactivos no iónicos presentan estructuras aromáticas, y mayores tiempos de retención, hace que se obtengan picos cromatográficos de banda ancha lo que dificulta o impide la adecuada resolución cromatográfica de los analitos polares y medianamente polares (ejemplo Figura 7).

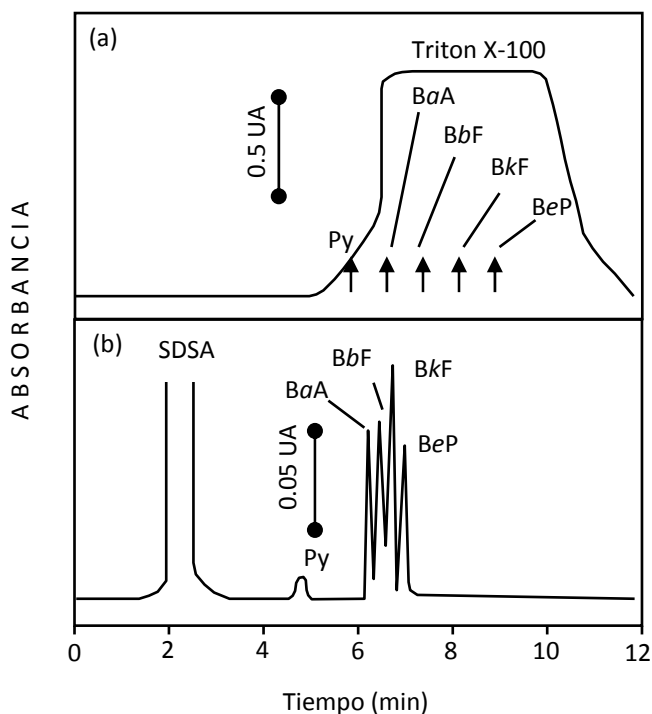


Figura 7. Cromatogramas obtenidos para varios PAHs [Pireno (Py), benzo[*a*]antraceno (BaA), benzo[*b*] fluoranteno (BbF), benzo[*k*] fluoranteno (BkF), benzo[*e*]pireno (BeP)] extraídos por: (a) un disolvente supramolecular de Triton X-100 y (b) un disolvente supramolecular de ácido dodecano sulfónico (SDSA).

La cuantificación de los plaguicidas una vez extraídos de las muestras de aguas naturales mediante SPE con admicelas mixtas se realizó empleando un cromatógrafo de líquidos acoplado a un detector ultravioleta-visible de diodos en fila, mientras que los PAHs solubilizados en el disolvente supramolecular se analizaron en un cromatógrafo de líquidos acoplado a un detector fluorimétrico. Los BASs se cuantificaron utilizando cromatografía líquida acoplada a dos detectores distintos dependiendo de la técnica de extracción empleada; en el caso de SPE hemimicelar fue un detector de diodos en fila y en el caso de su extracción coacervativa se empleó un espectrómetro de masas con trampa iónica. La cuantificación de los BASs mediante espectrometría de masas es la

opción más recomendable siempre que sea posible, en base a los límites de cuantificación instrumentales que presenta ($\mu\text{g L}^{-1}$) en comparación con su detección fotométrica (mg L^{-1}), y su capacidad de confirmación.

Las curvas de calibrado obtenidas con patrones de los analitos y extractos de muestras fortificadas sometidas a los procedimientos propuestos presentaron las mismas características analíticas, lo cual permitió la cuantificación de los compuestos usando calibración externa. Ello fue posible entre otros factores a la separación completa del tensioactivo de los analitos en el sistema cromatográfico y a la adecuada selectividad a pesar de la ausencia de etapa de limpieza en los métodos desarrollados.

Los límites de detección del método se calcularon teniendo en cuenta los límites de detección instrumentales de cada analito, así como las recuperaciones y los factores de preconcentración. Las características analíticas de los métodos de extracción en fase sólida con adsorbentes supramoleculares se muestran en la Tabla 7.

Cabe destacar que los límites de detección y cuantificación alcanzados con el método propuesto para la determinación de los plaguicidas están por debajo de las normas de calidad ambiental para los plaguicidas regulados como sustancias prioritarias y otros contaminantes por la Directiva 2008/105/CE [14], por lo que puede utilizarse para el control de plaguicidas en aguas superficiales.

El análisis de BASs en aguas naturales no está legalmente regulado ni existen límites máximos permitidos para ellos. Los límites de cuantificación alcanzados con SPE hemimicelar y detección fotométrica fueron suficientes para estudiar la estabilidad de estos compuestos en los cartuchos, sin embargo las concentraciones de BASs en aguas naturales suelen ser de pocos $\mu\text{g L}^{-1}$ por lo

[14] DO L 348 de 24.12.2008, p. 84. Directiva 2008/105/CE del parlamento europeo y del consejo de 16 de diciembre de 2008 relativas a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican y derogan ulteriormente las Directivas 82/176/ CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE y 86/280/CEE del Consejo, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE.

Tabla 7. Características analíticas de los métodos basados en extracción en fase sólida supramolecular.

Analitos	Intervalo de linealidad ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r	LDM ^a (ng L^{-1})
BDDA	2-40($\times 10^3$)	0.9994	6400
BDTA	2-40($\times 10^3$)	0.9992	6400
BDHA	2-40($\times 10^3$)	0.9980	9600
Simazina	2.5-2000	0.9999	3
Atrazina	2-2000	0.9995	2
Carbofuran	10-3000	0.9991	60
Clorprofam	5-2000	0.9995	6
Clortoluron	2.5-2000	0.9995	13
Isoproturon	2-2000	0.9994	7
Propanil	5-2000	0.9998	6
Metolaclor	15-3000	0.9998	19
Alaclor	20-3000	0.9999	26
Clorfenvinfos	10-3000	0.9997	13
2,4-D	2-2000	0.9992	3
Mecoprop	2-2000	0.9999	3

^a Límite de detección del método calculado aplicando el proceso analítico completo a muestras reales.

que se aconseja su cuantificación empleando SPE hemimicelar y espectrometría de masas cuyos límites de cuantificación del método bajan hasta 2 ng L^{-1} . La determinación de estos compuestos usando espectrometría de masas también se llevó a cabo con la metodología de extracción coacervativa. En este caso los límites de cuantificación alcanzados para los BASs son de 40 ng L^{-1} debido al menor factor de preconcentración del método. La combinación de estas dos metodologías, SPE hemimicelar y extracción con disolventes supramoleculares, con espectrometría de masas (interfase electrospray/trampa iónica) para la determinación de estos tensioactivos catiónicos había sido previamente estudiada por nuestro grupo de investigación [3,6] comprobándose que los componentes de la matriz no causaban supresión de la ionización ni efectos espacio carga.

Las características analíticas de los métodos desarrollados empleando disolventes supramoleculares se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Características analíticas de los métodos basados en extracción coacervativa.

Analitos	Intervalo de linealidad ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r	LDM ^a (ng L^{-1})
BDDA	1-1000	0,998	8
BDTA	1-1000	0,9996	8
BDHA	1-1000	0,9997	8
BaA	0,05-20	0,9996	0,5
BbF	0,2-20	0,9993	2,5
BkF	0,05-20	0,9994	0,5
BaP	0,1-20	0,9995	1
IP	0,2-20	0,9991	2.5
B(ghi)P	0,1-20	0,9998	1

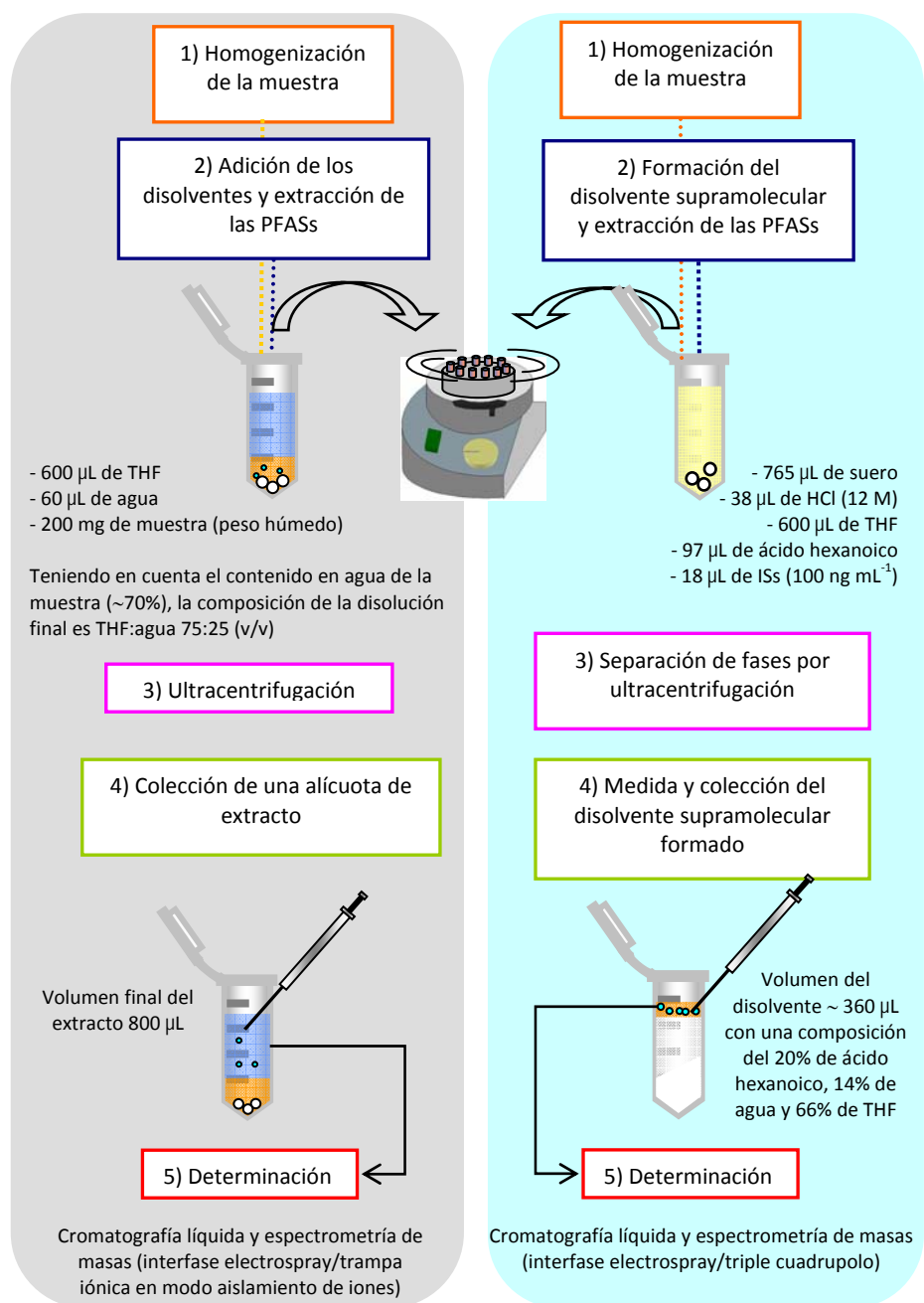
^a Límite de detección del método calculado aplicando el proceso analítico completo a muestras reales.

El método desarrollado para los PAHs permite su detección a niveles de entre 0,5 y 2,5 ng L^{-1} , siendo sus concentraciones máximas admisibles en aguas superficiales continentales 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el BaP, 0,03 $\mu\text{g L}^{-1}$ para la suma de BbF y BkF, y 0,002 $\mu\text{g L}^{-1}$ para la suma de IP y B(ghi)P.

3. DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS PERFLUOROALQUILADAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.

En este segundo bloque se han desarrollado 2 metodologías para mejorar la determinación de sustancias perfluoroalquiladas en distintas muestras biológicas mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas. En ambos casos la interfase es electrospray en modo negativo (ESI-). El primer método se basa en una microextracción sólido-líquido usando una mezcla hidroorgánica de tetrahidrofurano:agua 75:25 (v/v) que se aplicó a músculo e hígado de diferentes peces y aves marinas. El detector empleado fue una trampa iónica y se ha propuesto por primera vez trabajar en modo aislamiento de iones para mejorar la cuantificación de estas sustancias en muestras complejas ya que así se evita el efecto espacio-carga causado por la coelución de componentes de la matriz, a la vez que se mantiene la sensibilidad del modo de operación "full-scan". El segundo método desarrollado se propone para análisis de suero sanguíneo y se emplea por primera vez un disolvente supramolecular de micelas inversas de ácido hexanoico para la microextracción líquido-líquido de los compuestos perfluorados. En este caso el detector de masas fue un 4000 Q-Trap[®] trabajando en modo triple cuadrupolo.

En la Figura 8 se resumen los procedimientos llevados a cabo en las dos metodologías desarrolladas y a continuación se discuten los resultados y aspectos más relevantes de cada etapa del proceso analítico.



PFASs: sustancias perfluoroalquiladas, THF: tetrahidrofurano, HCl: ácido clorhídrico, ISs: estándares internos

Figura 8. Esquema de los diferentes pasos seguidos para la microextracción y determinación de las sustancias perfluoroalquiladas usando mezclas hidroorgánicas de disolventes y disolventes supramoleculares.

3.1. Muestras y analitos

Las sustancias polifluoroalquiladas y perfluoroalquiladas (PFASs) son contaminantes emergentes cuyo interés surgió en el año 2.000 debido al descubrimiento de su ubicuidad a nivel global, incluyendo áreas remotas como las regiones polares. Las PFASs son un grupo de sustancias que contienen una cadena alquílica con una longitud de entre 4 y 16 átomos de carbono, la cual puede estar parcial o totalmente fluorada, y un grupo hidrofílico terminal. Cuando la cadena está totalmente fluorada las moléculas se denominan sustancias perfluoroalquiladas y dentro de este subgrupo de tensioactivos orgánicos perfluorados destacan por su importancia el perfluorooctano sulfonato (PFOS) y el ácido perfluorooctanoico (PFOA). Las PFASs tienen un amplio uso en aplicaciones industriales y de consumo que incluyen revestimientos antimanchas de tejidos y moquetas, revestimientos lipofóbicos destinados a productos de papel aptos para el contacto con los alimentos, espumas extintoras, tensioactivos para pozos de extracción minera o petrolífera, abrillantadores de suelos y fórmulas de insecticidas [15,16]. PFASs como el sulfonato de perfluorooctano y el ácido perfluorooctanoico, así como sus sales y precursores se han detectado en el medio ambiente, los peces, las aves y los mamíferos (por ejemplo, PFOS en peces, aves y mamíferos marinos a concentraciones de 0,3-173, 1-1780 y 0,4-4.000 ng g⁻¹, respectivamente) [17,18].

En la actualidad existe una gran preocupación por la exposición humana a las PFASs. Los niveles hallados de estos compuestos en suero sanguíneo en la

[15] OECD Hazard assessment of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and its salts. Report RNV/JM/RD (2002) 17/FINAL, 2002.

[16] K. Prevedouros, I.T.Cousins, R.C. Buck, S.H. Korzeniowski, Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 32.

[17] C.R. Powley, S.W. George, M.H.Russell, R.A. Hoke, R.C.Buck, Chemosphere 70 (2008) 664.

[18] Appendice 2 in Ecological Screening Assessment Report on Perfluorooctane Sulfonate, Its Salts and Its Precursors that Contain the C₈F₁₇SO₂, C₈F₁₇SO₃ or C₈F₁₇SO₂N Moiety, disponible en: <http://www.ec.gc.ca.ceparegistry/documents/subslist/PFOSSAR/PFOS A2.cfm>.

población general son del orden de ng mL^{-1} [19] y aumenta hasta concentraciones de $\mu\text{g mL}^{-1}$ en personas con exposición ocupacional [20]. En 2008, la Comisión Técnica constituida por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) para el estudio de contaminantes que afectan a la cadena alimentaria preparó un informe científico en el que se concluía que era poco probable que el PFOS y PFOA estén teniendo efectos nocivos en la población general, pero manifestaba ciertas dudas respecto a las repercusiones en el desarrollo de organismos vivos. La recomendación final de este estudio fue que se recogiesen más datos sobre los niveles de sustancias perfluoroalquiladas en alimentos y personas, con el fin de determinar las tendencias en la exposición a dichas sustancias [21].

Aunque no existe aún legislación sobre PFASs en alimentos o medio ambiente, el PFOS fue incluido en el año 2008 en la lista de sustancias sometidas a revisión para su posible identificación como sustancias prioritarias o sustancias peligrosas prioritarias en el ámbito de la política europea de aguas [14] y en 2010 la comisión europea adoptó una recomendación relativa a la vigilancia de las sustancias perfluoroalquiladas en los alimentos durante 2010 y 2011 [22] por la que se recomendaba a los Estados miembros el análisis de distintos productos alimenticios con el fin de estimar hasta que punto están presentes en los alimentos los compuestos PFOS y PFOA y, en la medida de lo posible, de sus precursores, como son el perfluorooctano sulfonamida (PFOSA), el N-sulfonamidoetanol perfluorooctano etílico (NEtFOSE) y el 8:2 alcohol fluorotelomer, y de compuestos similares al PFOA y PFOS con una longitud de cadena diferente ($\text{C}_4\text{-C}_{15}$), así como los tensioactivos fosfatos de

[19] K. Kannan, S. Corsolini, J. Falandysz, G. Fillmann, K.S. Kumar, B.G. Loganathan, M.A. Mohd, J. Olivero, N. van Wouwe, J.H. Yang, K.M. Aldous, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 4489.

[20] G.W. Olsen, J.M. Burris, D.J. Ehresman, J.W. Froehlich, A.M. Seacat, J.L. Butenhoff, L.R. Zobel, *Environ. Health Perspect.* 115 (2007) 1298.

[21] Dictamen de la Comisión técnica de contaminantes de la cadena alimentaria sobre los sulfonatos de perfluorooctano (PFOS) y el ácido perfluorooctanoico (PFOA) y sus sales, *The EFSA Journal* 653 (2008) 1.

[22] DO L 68 de 18.3.2010, p. 22 Recomendación de la Comisión de 17 de marzo de 2010 relativa a la vigilancia de las sustancias perfluoroalquiladas en los alimentos (2010/161/UE).

polifluoroalquilo (PAPS) como el 8:2 diPAPS y el 8:2 monoPAPS. La vigilancia debe comprender una amplia variedad de productos alimenticios que reflejen los hábitos de consumo, entre los que se incluyen alimentos de origen animal como el pescado, la carne, los huevos, la leche y productos derivados, y alimentos de origen vegetal, para poder estimar la exposición de forma precisa.

Por otro lado el Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes, el cual exige a las partes signatarias que vigilen estos contaminantes, sus alternativas y los contaminantes que se propone añadir al Convenio, ha incluido al PFOS, sus sales y el fluoruro de perfluorooctano sulfonilo (PFOSF) en el anexo B, que recoge las sustancias sujetas a restricciones de producción y uso [23].

La Tabla 9 muestra una selección de PFASs que se han encontrado en diversas matrices humanas y ambientales, destacándose en negrita los compuestos estudiados en las investigaciones recogidas en esta Memoria.

Las muestras biológicas analizadas en esta segunda parte de la memoria se clasificaron en dos grupos: suero sanguíneo de humanos y animales, y músculo e hígado de distintos peces y aves marinas. Las especies de peces y aves marinas fueron; melva (*Auxis rochei rochei*), palometa (*Brama brama*), caballa (*Scomber scombrus*), gaviota patiamarilla (*Larus michahellis*) y alcatraz (*Morus bassanus*). Antes de llevar a cabo la extracción, las muestras se homogenizaron usando un homogeneizador tipo “ultraturrax” a potencia máxima (4.500 rpm). Cuando las muestras no se analizaron de forma inmediata, estas se congelaron a -20°C en porciones de 1 g hasta el momento de su análisis. Adicionalmente y con el fin de validar el método se analizó una muestra de filete de platija (*Platichthys flesus*), que había sido previamente usada como material de referencia en el 2º estudio interlaboratorio internacional sobre PFASs. Esta muestra había sido irradiada con rayos γ y se mantuvo a

[23] The 9 new POPs under the Stockholm Convention. (Disponible en: <http://chm.pops.int/Programmes/New%20POPs/The%209%20new%20POPs/tabid/672/language/en-US/Default.aspx>).

temperatura ambiente y oscuridad hasta su análisis. Por otro lado, las muestras sanguíneas fueron almacenadas en botes de polipropileno a -20°C hasta el momento del análisis.

Tabla 9. Nombres, abreviaturas y fórmulas químicas de una selección de PFASs.

Nombre	Abreviatura	Formula química
Ácidos perfluoroalquilcarboxílicos	PFCAs	
Ácido perfluorobutanoico	PFBA	$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_2\text{COOH}$
Ácido perfluorohexanoico	PFHxA	$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_4\text{COOH}$
Ácido perfluoroheptanoico	PFHpA	$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_5\text{COOH}$
Ácido perfluorooctanoico	PFOA	$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_6\text{COOH}$
Ácido perfluorononanoico	PFNA	$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7\text{COOH}$
Ácido perfluorodecanoico	PFDA	$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_8\text{COOH}$
Ácido perfluoroundecanoico	PFUnDA	$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_9\text{COOH}$
Ácido perfluorododecanoico	PFDoDA	$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_{10}\text{COOH}$
Ácido perfluorotridecanoico	PFTTrDA	$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_{11}\text{COOH}$
Ácido perfluorotetradecanoico	PFTeDA	$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_{12}\text{COOH}$
Ácido perfluoropentadecanoico	PFPeDA	$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_{13}\text{COOH}$
Ácidos perfluoroalcanosulfónicos	PFSAs	
Perfluorobutano sulfonato	PFBS	$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_3\text{SO}_3^-$
Perfluorohexano sulfonato	PFHxS	$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_5\text{SO}_3^-$
Perfluorooctano sulfonato	PFOS	$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7\text{SO}_3^-$
Perfluorodecano sulfonato	PFDS	$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_9\text{SO}_3^-$

3.2. Extracción de los analitos

El análisis de las muestras biológicas se llevó a cabo empleando dos metodologías diferentes dependiendo del tipo de muestra. La mayoría de los métodos que se emplean para la extracción de las PFASs en alimentos y muestras biológicas utilizan disolventes orgánicos de polaridad media, tales como metanol y acetonitrilo. Sin embargo, las recuperaciones de los PFASs con estos disolventes dependen en gran medida de la longitud de la cadena y los grupos polares que presenten los compuestos, por lo que estos métodos suelen proporcionar recuperaciones bajas para los PFASs iónicos de cadena corta

solubles en agua (C₄₋₅) así como para los no polares de cadena larga (C₁₃₋₁₄). Con el propósito de mejorar las recuperaciones de estos compuestos en las muestras biológicas, se desarrolló un primer método basado en el uso de mezclas hidroorgánicas de tetrahidrofurano (THF) y agua, disolventes que presentan constantes dieléctricas ($\epsilon_{\text{agua}} = 80$; $\epsilon_{\text{THF}} = 7,5$) y parámetros de solubilidad de Hildebrand ($\delta_{\text{agua}} = 23,3 \text{ cal}^{1/2} \text{ cm}^{-3/2}$; $\delta_{\text{THF}} = 9,5 \text{ cal}^{1/2} \text{ cm}^{-3/2}$) muy diferentes. Así, al ir variando la composición de la mezcla THF:agua se obtienen disolventes con muy diferente poder de solvatación. El segundo método desarrollado consistió en una microextracción líquido-líquido de los PFASs en muestras de suero sanguíneo mediante el uso de un disolvente supramolecular constituido por micelas inversas de ácido hexanoico dispersas en una fase continua agua:THF. El tratamiento de muestra se simplificó considerablemente en comparación con la mayoría de los métodos empleados para la determinación de PFASs en muestras de suero que usualmente requieren de varias etapas de extracción y limpieza de los extractos o procedimientos más complicados de SPE on-line.

3.2.1. Síntesis y características de los sistemas extractantes empleados

a) Mezcla hidroorgánica tetrahidrofurano:agua

La extracción de los PFASs en las muestras biológicas sólidas (distintos tejidos de aves y peces) se llevó a cabo mediante la mezcla hidroorgánica THF:agua 75:25 (v/v). El contenido de agua presente en este tipo de muestras es alto (70-75%) por lo que esta cantidad debe tenerse en cuenta en la relación THF:agua 75:25 (v/v) utilizada para la extracción. Así, el análisis de 0,2 g de muestra sin liofilizar requiere la adición de 600 μL de THF y 60 μL de agua, mientras que las muestras liofilizadas requieren 800 μL de la mezcla (600 μL de THF y 200 μL de agua).

b) Disolvente supramolecular constituido por micelas inversas de ácido hexanoico.

Estos SUPRASs se forman mediante procesos de autoensamblaje al añadir agua a la disolución de ácido hexanoico en THF. El agua provoca una desolvatación parcial de las micelas inversas de ácido hexanoico lo cual facilita la interacción micela-micela formándose espontáneamente gotas de SUPRAS que van uniéndose hasta formar un conglomerado de gotas individuales. La densidad de este conglomerado es menor que la densidad de la disolución a partir de la cual se ha formado, observándose por tanto una separación de fases. En nuestro sistema de extracción, la propia muestra (suero sanguíneo) es el agente inductor de la coacervación ya que el 93% de su contenido es agua. La nueva fase líquida inmiscible con el suero es menos densa que éste, lo cual constituye una ventaja para la medida de su volumen y posterior recolección. Dado que las micelas inversas se producen en la forma protonada del ácido hexanoico ($pK_a 4,8 \pm 0,10$), las muestras fueron acidificadas con ácido clorhídrico a un valor de pH por debajo de 4 para la formación del disolvente supramolecular.

La Figura 9 ilustra el diagrama de fases del ácido hexanoico (HA) donde se muestra la región de coacervación que puede utilizarse con fines analíticos. Por encima de la región de coacervación, los SUPRASs se solubilizan en la disolución THF:agua, mientras que por debajo encontramos mezclas de SUPRASs y ácido hexanoico. Merece la pena comentar el caso particular de las disoluciones de ácido hexanoico a concentración 0,5 % (v/v) en mezclas agua:THF (concentraciones de THF entre 0,5-4,5% v/v) donde el anfifilo se solubiliza completamente, sin embargo al aumentar la concentración de THF al 5% comienza a formarse el SUPRAS a pesar de la mayor solubilidad del HA en este medio.

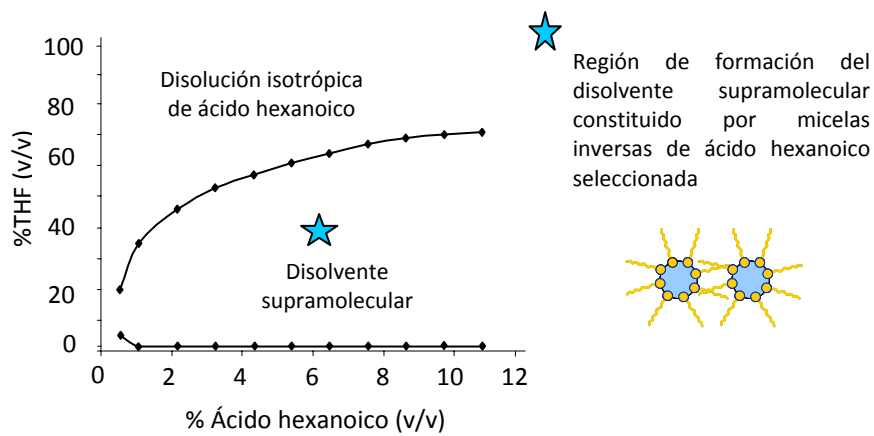


Figura 9. Diagrama de fases del sistema ternario ácido hexanoico: agua: tetrahydrofurano empleado para la extracción de los PFASs. El porcentaje de agua puede calcularse restando a 100 la suma de los porcentajes de ácido hexanoico y THF.

Las condiciones experimentales utilizadas para la producción del SUPRAS utilizado en el método analítico propuesto fueron: 6,5% (v/v) de ácido hexanoico y 40% (v/v) de THF. La composición del SUPRAS generado fue: 20% de ácido hexanoico, 14% de agua y 66% de THF.

La composición del SUPRAS varía principalmente en función del porcentaje de THF utilizado para su formación; así cuanto mayor es el porcentaje de THF mayor es el contenido de THF y agua en el disolvente y por consiguiente menor el contenido de ácido hexanoico. Por otro lado, la incorporación del anfífilo (HA) en los SUPRASs sigue un patrón muy diferente dependiendo de la concentración inicialmente presente en la disolución. Concentraciones de HA inferiores al 3% muestran mayor solubilización del anfífilo en la disolución en equilibrio conforme aumenta la concentración de THF; sin embargo disoluciones de HA por encima del 3% presentan un comportamiento opuesto, incorporándose más HA en el SUPRAS a medida que

aumenta el % de THF hasta llegar a incorporación cuantitativa a partir del 30% (v/v) de THF.

Mediante el algoritmo de Marquardt, se desarrolló una ecuación para predecir el volumen de SUPRAS generado en función de las concentraciones de ácido hexanoico y THF en la disolución. El objetivo es poder conocer a priori el factor de preconcentración que puede alcanzarse bajo unas condiciones experimentales dadas y simplificar así la selección de variables durante la optimización del método. La ecuación resultante fue:

$$y = 0,69 \text{ HA} + 0,0761 \text{ HA THF} + e^{0,1047 \text{ THF}}$$

El valor de y viene expresado en μL y los valores de HA y THF en mg y % (v/v) respectivamente. Porcentajes de HA por debajo del 3% no cumplen esta ecuación, ya que la incorporación del HA en el SUPRAS en función del THF presenta un comportamiento opuesto al observado en las disoluciones con concentraciones a partir del 3%. Los porcentajes de THF que puede aplicarse en esta ecuación van desde 1% hasta valores cercanos al límite superior del diagrama de fases. El coeficiente de determinación fue 99,126 % lo cual indica una buena capacidad de predicción de esta ecuación.

3.2.2. Extracción y preconcentración

a) Muestras biológicas sólidas

La extracción de PFASs en las muestras biológicas sólidas se llevó a cabo mediante la adición directa de 600 μL de THF y 60 μL de agua a 0,2 g de muestra en un tubo de microcentrifuga que se coloca en un agitador tipo “vortex” durante 7 minutos a máxima potencia (aproximadamente 2.500 rpm). Para favorecer el contacto y la disgregación de los componentes, se añaden 4 esferas de vidrio de 3 mm de diámetro. Tras agitar la muestra y extraer las PFASs, el microtubo se ultracentrifuga a 15.000 rpm durante 13 minutos para separar el

disolvente de la muestra y eliminar las partículas sólidas en suspensión. Alícuotas de este sobrenadante se recogen y transfieren a viales de vidrio para ser inyectadas en el sistema cromatográfico. Las PFASs analizadas fueron PFCAs (C₆-C₁₄) y PFSAAs (C₄-C₈).

En la optimización del procedimiento de extracción de las PFASs se consideraron las siguientes variables: (1) la composición de la mezcla hidroorgánica, (2) el volumen de disolvente y (3) los parámetros operacionales relativos a la extracción. El objetivo de la optimización fue conseguir un tratamiento de muestra simple y rápido con recuperaciones cuantitativas para las PFASs independientemente de la longitud de la cadena y límites de cuantificación adecuados a los niveles presentes en las muestras.

(1) Influencia de la composición de la mezcla hidroorgánica. Los porcentajes de agua y THF en la disolución empleada para extraer las PFASs influyen decisivamente en la eficacia de extracción de los analitos. Por ello es necesario un buen conocimiento de las interacciones entre el disolvente y las PFASs para establecer mezclas hidroorgánicas de THF:agua que sean capaces de solubilizar a todos las PFASs independientemente de la longitud de su cadena. Tanto PFCAs como PFSAAs pueden establecer puentes de hidrógeno a través del grupo polar e interacciones de dispersión a través de la cadena hidrocarbonada. Para que la extracción sea eficaz es necesario que el disolvente empleado pueda establecer un balance adecuado entre las interacciones polares (interacciones dipolo-dipolo y puentes de hidrógeno) y las no polares (fuerzas dispersivas). En esta investigación se propone un extractante constituido por la mezcla de THF y agua en base a las diferentes capacidades de solvatación que presentan, como puede deducirse de los valores de los respectivos parámetros de solubilidad de Hildebrand ($\delta_{\text{agua}} = 23,3 \text{ cal}^{1/2} \text{ cm}^{-3/2}$; $\delta_{\text{THF}} = 9,5 \text{ cal}^{1/2} \text{ cm}^{-3/2}$). El parámetro de Hildebrand (δ_T) viene dado por la suma de las fuerzas de dispersión (δ_d), dipolo-dipolo (δ_p) y puentes de hidrógeno (δ_h). Los valores individuales de estas fuerzas son conocidos como parámetros de Hansen ($\text{cal}^{1/2} \text{ cm}^{-3/2}$) y se relacionan con el parámetro de Hildebrand mediante la expresión:

$$\delta_{\text{Total}}^2 = \delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2$$

Los parámetros de Hansen para agua, THF y otros disolventes comúnmente empleados para la extracción de PFASs se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Valores de los parámetros de solubilidad para varios disolventes.

Disolvente	Parámetros de Hildebrand (cal ^{1/2} cm ^{-3/2})	Parámetros de Hansen (cal ^{1/2} cm ^{-3/2})			Parámetros fraccionales		
	δ_t	δ_d	δ_p	δ_h	100 f_d	100 f_p	100 f_h
Agua	23,3	7,6	7,8	20,6	21	22	57
THF	9,5	8,2	2,8	3,9	55	19	26
Metanol	14,5	7,4	6,0	10,9	30	25	45
Acetonitrilo	12	7,5	8,8	3,0	39	46	15

Según los valores de los parámetros de Hansen, en el agua predominan las interacciones de puentes de hidrógeno mientras que en el THF predominan las fuerzas de dispersión, por lo tanto pueden obtenerse disolventes con diferentes capacidades de solvatación simplemente variando la composición de la mezcla THF:agua. Esta información puede representarse de modo gráfico mediante el triángulo de Teas. Para ello es necesario convertir los parámetros de Hansen en parámetros de Teas (también conocidos como parámetros fraccionales) calculando la cantidad relativa que aporta cada parámetro de Hansen al total (Tabla 10). En la Figura 10 se muestra una gráfica de Teas en la que se ilustran los parámetros de Hildebrand (δ_T) y los fraccionales (f_h , f_d , f_p) para los disolventes puros agua y THF y una mezcla de ambos.

La Tabla 11 muestra las recuperaciones obtenidas para las PFASs y los valores de los parámetros de Hildebrand en función de la composición de las mezclas agua:THF. La influencia de la composición del disolvente se estudió usando muestras liofilizadas.

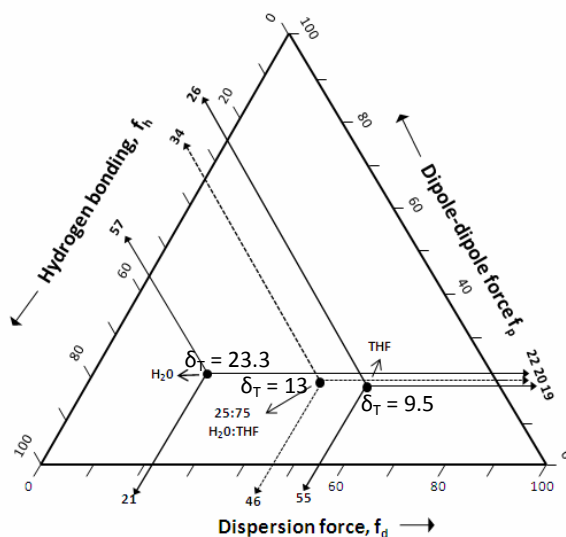


Figura 10. Gráfica de Teas para agua y tetrahidrofurano y su mezcla agua: tetrahidrofurano a la composición 25:75, v/v.

Tabla 11. Parámetros de Hildebrand (δ , $\text{cal}^{1/2} \text{cm}^{-3/2}$) y recuperaciones de los PFASs con sus desviaciones estándar ($n = 3$) en función de la composición del disolvente.

Composición del disolvente	δ	Recuperaciones \pm DE (%)								
		PFBS	PFHxA	PFHxS	PFOA	PFOS	PFDA	PFUnDA	PFTeDA	
100:0	9.5	0	0	13 \pm 5	20 \pm 6	25 \pm 6	28 \pm 7	28 \pm 3	29 \pm 1	
85:15	11.6	100 \pm 7	72 \pm 6	103 \pm 3	89 \pm 7	100 \pm 7	85 \pm 5	81 \pm 6	70 \pm 6	
75:25	13.0	105 \pm 1	94 \pm 2	103 \pm 1	97 \pm 1	104 \pm 1	104 \pm 1	105 \pm 1	106 \pm 1	
70:30	13.6	103 \pm 1	92 \pm 8	98 \pm 3	95 \pm 9	106 \pm 4	92 \pm 7	104 \pm 1	105 \pm 5	
55:45	15.7	94 \pm 1	101 \pm 2	98 \pm 4	97 \pm 6	71 \pm 6	77 \pm 9	68 \pm 8	68 \pm 11	
40:60	17.8	79 \pm 4	81 \pm 1	80 \pm 5	93 \pm 2	71 \pm 8	54 \pm 3	40 \pm 3	32 \pm 8	
15:85	21.2	37 \pm 1	36 \pm 1	13 \pm 1	12 \pm 1	10 \pm 1	10 \pm 1	6 \pm 1	2 \pm 2	
0:100	23.3	33 \pm 2	30 \pm 3	13 \pm 1	10 \pm 1	7 \pm 1	15 \pm 1	2 \pm 1	2 \pm 1	

Muestra: Melva liofilizada 0,2 g (peso húmedo) y fortificada (40 ng g⁻¹ peso húmedo)
 Volumen de disolvente: 600 μ L.

La extracción de PFASs en agua o THF es muy baja debido al inadecuado equilibrio en estos disolventes entre fuerzas polares y no polares. La eficiencia de extracción aumentó considerablemente al emplear mezclas de agua:THF, siendo cuantitativa a porcentajes de agua entre 15-30% para los PFASs y entre 20-30% para los PFCAs. Al ser el agua un disolvente prótico es capaz de proporcionar interacciones ión-dipolo con los grupos polares de los PFASs y puentes de hidrógeno con los grupos polares de los PFCAs y los PFASs. Según los datos de las recuperaciones, disoluciones con valores de Hildebrand comprendidos entre 12-14 y valores de Teas con una relación entre fuerzas polares ($f_h + f_p$)/ no polares (f_d) de alrededor de 1,2 serán las idóneas para una adecuada solubilización de las PFCAs, independientemente de su estructura. La mezcla 75:25 (v/v) THF:agua se escogió como óptima para la extracción de las PFASs siendo su relación $f_h/f_p = 1,7$, de lo cual se deduce la importancia de los puentes de hidrógeno en este disolvente. Este método cumple la recomendación de la Comisión Europea relativa a la vigilancia de las sustancias perfluoroalquiladas en los alimentos (2010/161/UE) donde se establece que los porcentajes de recuperación deben estar comprendidos entre el 70% y el 120% [22].

En los disolventes comúnmente empleados para extraer PFASs, metanol:agua (50:50 v/v) y acetonitrilo, la relación entre fuerzas polares ($f_h + f_p$) y no polares (f_d) es de 2,8 y 1,6, respectivamente. En el caso del metanol la proporción de fuerzas de dispersión es demasiado baja lo cual explica las bajas recuperaciones de PFASs de cadena larga obtenidas con este método y en el caso del acetonitrilo aunque su balance de fuerzas polares/no polares es adecuado y esto proporciona buenas recuperaciones para las PFASs de C_{8-12} y los PFCAs de C_{6-12} , su relación de $f_h/f_p = 0,4$ es muy baja lo cual sea posiblemente la causa de que este método requiera elevado volumen de disolvente orgánico y un largo tiempo de extracción si se compara con la mezcla agua:THF propuesta en esta investigación.

(2) *Influencia del volumen de disolvente.* El volumen de disolvente usado (250-1000 μ L) para la extracción de las PFASs no afectó a la eficiencia de extracción en muestras liofilizadas siendo las recuperaciones superiores al 90%.

Se seleccionó como óptimo un valor de 800 μL ya que se observó supresión de la ionización de las PFASs en extractos inferiores a 700 μL . También se comprobó que la eficiencia de extracción en muestras húmedas era equivalente a la obtenida con muestras liofilizadas, por lo que se propone trabajar con muestras sin liofilizar pero teniendo en cuenta su contenido en agua (70-75%) en la relación agua:THF (25:75 v/v) y en el volumen final de disolvente.

(3) *Influencia de los parámetros operacionales.* Los parámetros operacionales se optimizaron con el fin de minimizar el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio de extracción y asegurar una completa separación del extracto obtenido de la matriz de la muestra. El equilibrio de distribución de las PFASs entre las muestras y el disolvente se estableció rápidamente (~ 7 min) y el tiempo de centrifugación se fijó en 13 minutos a 15.000 rpm.

b) Muestras de suero sanguíneo

Durante la extracción de las PFASs en las muestras de suero sanguíneo el disolvente supramolecular actúa como extractante mientras que la disolución de equilibrio (THF:agua) incorpora una etapa de limpieza simultánea al proporcionar un medio donde los compuestos hidrofílicos de la matriz son solubilizados. El método de extracción propuesto consiste en la adición en un microtubo de centrifuga de 18 μL de una disolución de patrones internos marcados isotópicamente (ISs) en metanol de concentración 100 ng mL^{-1} , 765 μL de suero, 38 μL de ácido clorhídrico (12 M), 600 μL de THF y 97 μL de ácido hexanoico para dar lugar a una concentración final de 6,5 % (v/v) de ácido hexanoico y un 40% (v/v) de THF, condiciones bajo las cuales se forma espontáneamente alrededor de 360 μL de SUPRAS. La adición de los ISs desde el principio es fundamental para corregir cualquier pérdida durante el proceso de extracción y el posible efecto matriz. La extracción requiere agitación con vortex durante 7 minutos a máxima potencia (aproximadamente 2.500 rpm) y ultracentrifugación a 15.000 rpm durante 13 minutos. Se añaden 3 bolitas de vidrio de 3 mm de diámetro para facilitar la homogenización de la mezcla durante la agitación ya que las proteínas del suero sanguíneo precipitan

después de la adición del ácido clorhídrico y el disolvente orgánico. La extracción de los PFASs se basa en la formación de agregados mixtos analito:ácido hexanoico mediante fuerzas de dispersión y puentes de hidrógeno. La Figura 11 representa esquemáticamente las interacciones que se producen en la formación de agregados mixtos. Alícuotas del disolvente supramolecular formado se recogen y se transfieren a viales de vidrio para ser inyectadas en el sistema cromatográfico. Las PFASs analizadas fueron los ácidos perfluorados (C_8 - C_{14}) y los sulfonatos perfluorados (C_6 - C_8).

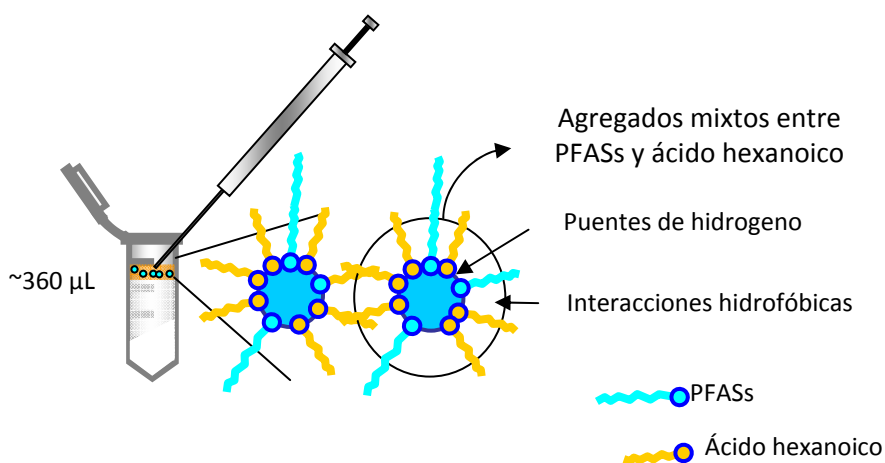


Figura 11. Representación de los agregados mixtos PFASs y ácido hexanoico y las interacciones implicadas en su formación.

En la optimización del procedimiento de extracción se consideraron las siguientes variables: (1) concentración de ácido clorhídrico, (2) la composición del disolvente supramolecular y (3) los parámetros operacionales.

(1) *Influencia de la acidez.* Durante el proceso de optimización se observó que el rendimiento de extracción de las PFASs en las muestras de suero dependían de la acidez del medio. La ruptura del enlace de las PFASs con las

proteínas es incompleta cuando la concentración de ácido clorhídrico en el medio es inferior a 267 mM. Las recuperaciones aumentaron hasta ~80% y se mantuvieron constantes en el intervalo 400-1800 mM de HCl, por lo que se seleccionó un valor de 600 mM para el proceso de extracción.

(2) *Influencia de la composición del disolvente supramolecular.* La composición del disolvente supramolecular varía con el porcentaje de THF y ácido hexanoico presente en la disolución a partir de la cual se genera. En la tabla 12 se muestran los resultados obtenidos para la extracción de PFASs en función de la concentración de THF y ácido hexanoico utilizado para la síntesis del disolvente supramolecular. La recuperación de PFASs aumentó en función del porcentaje de THF ya que este disolvente facilita la ruptura de la interacción PFAS-proteína y por lo tanto la precipitación de las mismas. Se obtuvieron máximas recuperaciones para porcentajes de THF del 50% (v/v), sin embargo en esas condiciones no se conseguía preconcentración alguna por lo que se escogió el valor de 40% de THF como óptimo en base a los factores de preconcentración alcanzados (1.68-1.76). El porcentaje de ácido hexanoico seleccionado fue un 6.5 % (v/v) obteniendo recuperaciones para los analitos entre el 79 y el 83%.

El porcentaje de ácido hexanoico incorporado en el SUPRAS bajo las condiciones seleccionadas es del 91%, lo cual explica las buenas recuperaciones obtenidas ya que la formación de agregados mixtos PFCs:ácido hexanoico en la disolución en equilibrio es mínima. Un ejemplo de cómo la incompleta incorporación del HA al SUPRAS puede influir negativamente a las extracciones es el caso de las recuperaciones obtenidas con SUPRASs generados a partir de un 2% de HA y 40% de THF o los generados a partir de un 5% de HA y un 50% de THF. En ambos casos la composición del SUPRAS es prácticamente la misma (70% de THF, 20% de agua y 10% de HA) pero el grado de incorporación de HA es muy diferente; siendo de un 25% en el primer caso con recuperaciones de PFASs entre el 39 y 67% y de un 95% en el segundo caso con recuperaciones entre el 80 y 90%.

Tabla 12. Recuperaciones de las PFASs con sus desviaciones estándar (n=3) en función de la concentración de tetrahidrofurano y ácido hexanoico.

Analitos							
% (v/v)	R ± DE (%)						
THF ^a	PFHxS	PFOA	PFOS	PFNA	PFDA	PFUnDA	PFTeDA
25	51±7	67±7	55±1	64±2	64±5	66±7	71±2
30	61±2	78±2	73±4	74±2	75±2	75±3	77±2
35	68±1	83±1	81±1	78±1	80±1	81±1	81±1
40	83±6	83±3	79±4	81±1	83±2	82±1	83±2
45	79±1	88±4	82±2	84±2	83±2	87±2	85±4
50	80±1	97±5	92±5	92±4	86±2	92±2	94±5
HA ^b							
4.3	61±1	75±1	78±1	78±1	80±6	81±6	87±6
5.4	75±3	89±2	86±1	82±4	84±3	82±2	82±1
6.5	83±6	83±3	79±4	81±1	83±2	82±1	83±2
7.5	77±3	86±1	86±1	86±1	88±3	88±3	86±4

Muestras fortificadas a 5 ng mL⁻¹ y 600 μmoles de HCl/ml de suero.

^a 6.5 % (v/v) de ácido hexanoico.

^b 40% (v/v) de THF.

(3) *Influencia de los parámetros operacionales.* Los parámetros operacionales se optimizaron con el fin de minimizar el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio de extracción y asegurar una completa separación del disolvente supramolecular obtenido de la disolución en equilibrio. El equilibrio de distribución de las PFASs entre la muestra y el disolvente se estableció rápidamente (~7 min) y el tiempo de centrifugación se fijó en 13 minutos a 15.000 rpm.

3.3. Cuantificación

La cuantificación de las PFASs se realizó empleando cromatografía líquida acoplada a dos tipos de analizadores de espectrometría de masas; una trampa iónica (IT) y un triple cuadrupolo (QqQ). No debemos olvidar, como ya se comentó anteriormente, que cuando se trabaja con metodologías basadas en sistemas supramoleculares en combinación con espectrometría de masas debe

tenerse en cuenta que el flujo procedente de la columna cromatográfica debe enviarse a desecho durante el tiempo en que el tensioactivo se eluye, ya que no es aconsejable la introducción de altas concentraciones de tensioactivos en el espectrómetro de masas. La ventaja de usar un disolvente supramolecular de ácido hexanoico es que debido a su corta cadena presenta mayor polaridad que los PFASs de C₆-C₁₄ lo cual permite el análisis de las mismas sin problemas de coelución.

El instrumento estándar para la cuantificación de las PFASs es LC/ESI/triple cuadrupolo MS/MS debido a los límites de detección que proporciona en modo multiple reaction monitoring (MRM) (1-100 pg) [24]. Otra alternativa más barata al QqQ es el detector de trampa de iones con capacidad para trabajar también en modo MSⁿ y recomendado para la elucidación de estructura de los isómeros de PFASs ya que sus espectros proporcionan iones producto muy específicos [25,26]. Sin embargo, el empleo de este detector presenta una serie de inconvenientes que deben tenerse en cuenta. En primer lugar, los iones producto de las PFASs más sensibles; [SO₃]⁻ y [FSO₃]⁻ con m/z 80 y m/z 99 respectivamente, no pueden monitorizarse por IT debido al cut-off a masas bajas propio del detector de trampa iónica. Y en segundo lugar, la coelución de interferencias con los analitos puede provocar efectos espacio-carga en la trampa de iones que impiden el correcto funcionamiento de este analizador.

Debido a los problemas causados por efecto espacio-carga en el análisis de extractos de muestras que no se han sometido a una severa etapa de limpieza cuando se trabaja en modo single ion monitoring o barrido y a la imposibilidad de determinar las PFASs en MRM por la ausencia de iones producto adecuados, se investigó la posibilidad de cuantificar las PFASs trabajando en modo aislamiento de iones. El modo aislamiento de iones

[24] U. Berger, I. Langlois, M. Oehme, R. Kallenborn, Eur. J. Mass Spectrom. 10 (2004) 10.

[25] A. Holm, S.R. Wilson, P. Molander, E. Lundanes, T. Greibrokk, J. Sep. Sci. 27 (2004) 1071.

[26] C. Tseng, L. Liu, C. Chen, W. Ding, J. Chromatogr. A 1105 (2006) 119.

consiste en trabajar en MRM sin llegar a fragmentar los iones precursores después de su aislamiento en la trampa. A continuación se comentan las características analíticas de los dos métodos desarrollados; en el primero las PFASs se determinaron con trampa iónica en modo aislamiento y en el segundo con triple cuadrupolo.

3.3.1. Sensibilidad

La sensibilidad obtenida para las PFASs empleando IT en modo aislamiento de iones (valores de m/z seleccionados ± 4) se comparó con los modos convencionales de trabajo de este analizador; barrido y MRM. Debido a la inevitable fragmentación “en fuente” que experimentan los iones precursores de los PFCAs antes de llegar a la trampa, todos los voltajes y parámetros instrumentales en los modos barrido y aislamiento se optimizaron para obtener la máxima sensibilidad de los iones $[M-K]^-$ en el caso de los PFSAs y como la suma de iones $[M-H]^- + [M-COOH]^-$ en el caso de los PFCAs. La fragmentación de los PFCAs [24-26] se debe a la descarboxilación de los mismos en la interfase del cromatógrafo de líquidos y espectrómetro de masas. En modo MRM los parámetros se optimizaron para conseguir la máxima cantidad de iones precursores $[M-H]^-$ para fragmentar en la trampa. Las curvas de calibrado empleando disoluciones patrón (0,5-250 $\mu\text{g L}^{-1}$) obtenidas en modo barrido y modo aislamiento presentaron las mismas características analíticas para todos los analitos, demostrando que el modo aislamiento puede usarse para monitorizar las PFASs sin perder sensibilidad. Sin embargo, la cuantificación de los PFCAs en modo MRM fue entre 4 y 45 veces menos sensible, dependiendo de los analitos, debido a que el número de iones precursores que llegan a la trampa para ser fragmentados es drásticamente menor como consecuencia de la fragmentación en fuente. Los límites de detección instrumentales en modo aislamiento estuvieron en el intervalo de 1-3 pg para los PFSAs y entre 3-15 pg para los PFCAs.

En el análisis de las muestras de suero, la sensibilidad alcanzada empleando el analizador 4000 Q-Trap® en modo “Scheduled MRM” fue

considerablemente mejor gracias a su fuente de iones Turbo V™ que consigue una excelente desolvatación del flujo proveniente del cromatógrafo e introduce un mayor número de iones en el analizador. Además, presenta la ventaja de trabajar en modo Scheduled MRM que programa al instrumento para monitorizar cada ión sólo durante una pequeña ventana de tiempo a lo largo del cromatograma en función del tiempo de retención esperado para cada analito. El dwell time se ajusta automáticamente para cada transición y mejora la sensibilidad. Los límites de detección instrumentales en patrones bajaron a 0,2-0,3 pg para los PFSA's y 0,03-0,2 pg para los PFCAs.

Independientemente del tipo de analizador empleado, la sensibilidad del método puede verse afectada por la coelución de componentes de la matriz que provocan supresión o incremento de la ionización en la interfase ESI. En el caso del analizador de trampa iónica la supresión o incremento de la ionización se comprobó comparando las pendientes de curvas de calibrado con patrones y curvas de calibrado asociadas a la matriz de la muestra. Los extractos fortificados se obtuvieron a partir de muestras blanco (0,2 g) empleando diferentes volúmenes (250-1000 µL) de mezcla hidroorgánica que proporcionan recuperaciones cuantitativas y se observó que las PFASs experimentaban supresión de la ionización en extractos obtenidos con volúmenes inferiores a 700 µL (extractos de 600 µL provocaba una supresión del 10-45% y aumentaba hasta el 70-95% en extractos de 250 µL). Las pendientes de rectas obtenidas a partir de extractos superiores a 700 µL no mostraban diferencias significativas cuando se comparaban con la recta preparada en disolvente mediante un test de t-student (valores de t calculados estuvieron entre 0,06 y 2,62 siendo el valor de t crítico 3,17, nivel de significancia 0,01). La Figura 12 compara el cromatograma obtenido mediante LC-IT MS en modo aislamiento de iones de un patrón de 20 µg L⁻¹ con el de una muestra de filete de melva fortificada con 80 ng g⁻¹ y extraída con 800 µL de mezcla hidroorgánica.

Adicionalmente se fortificaron muestras con el patrón interno ¹³C₈-PFOA y se calculó su recuperación mediante calibración externa. Las recuperaciones estuvieron comprendidas entre el 96-99% demostrando la ausencia de efecto

matriz y la exactitud conseguida con el método mediante calibración con patrones en disolvente hidroorgánico (25:75 agua:THF). Puede decirse por tanto que los componentes de la matriz de este tipo de muestras no interfieren en la determinación de las PFASs en las condiciones de trabajo propuestas en esta metodología.

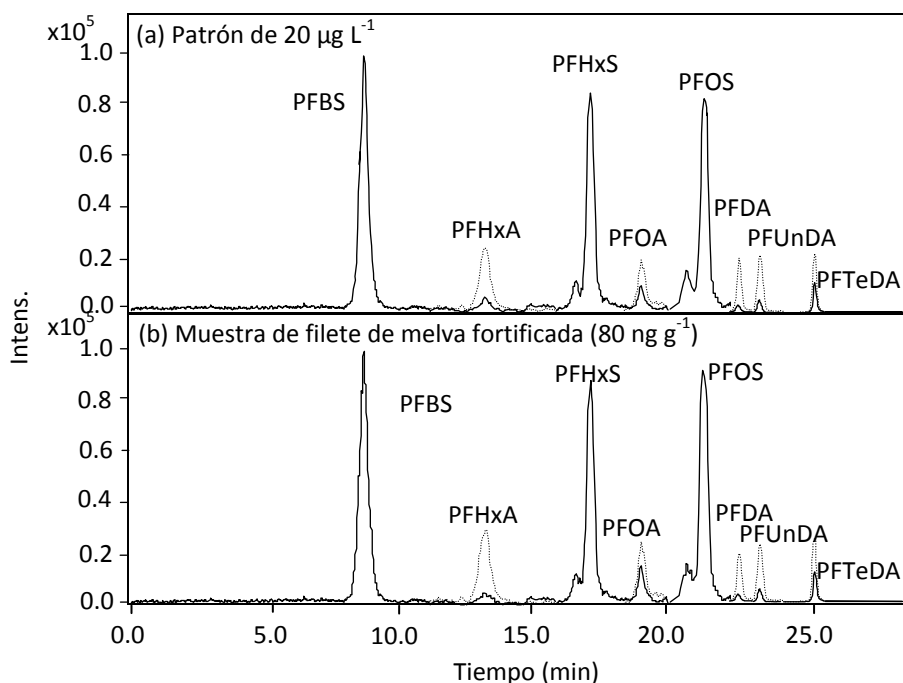


Figura 12. Cromatogramas obtenidos empleando IT en modo aislamiento de iones a partir un patrón de 20 µg L⁻¹ y una muestra de filete de melva fortificada con 80 ng g⁻¹.

El estudio de la supresión o incremento de la ionización en el segundo método desarrollado se llevó a cabo comparando la señal de los patrones internos marcados isotópicamente (ISs) añadidos justo antes de la inyección a los SUPRAS obtenidos de muestras de suero con la señal de los ISs obtenida en patrones preparados en THF:agua de la misma concentración (5 ng mL⁻¹). Los

componentes de la matriz no interfirieron significativamente en la señal de los ISs, siendo la supresión de la ionización del 12% y el incremento de la misma del 6% en el peor de los casos, por lo que los límites de detección en muestras reales no se vieron afectados. Además, esta metodología emplea ISs para cada analito que corrigen las pequeñas variaciones en la señal asegurando una correcta cuantificación. Los límites de cuantificación del método estuvieron comprendidos entre 6 y 59 pg mL^{-1} . La tabla 13 muestra un resumen de las características analíticas de los dos métodos desarrollados para el análisis de PFASs en muestras biológicas.

Tabla 13. Resumen de las características analíticas de los dos métodos desarrollados.

Analitos	Intervalo de linealidad (ng mL^{-1})		Coeficiente de correlación (r)		LOQ del método	
	IT	QqQ	IT	QqQ	IT (ng g^{-1})	QqQ (pg mL^{-1})
PFBS	0,5-250	-	0,9990	-	2	
PFHxA	1-250	-	0,9983	-	2	
PFHxS	1-250	0,1–30	0,9990	0,9997	2	59
PFOA	3-250	0,01–30	0,9999	0,9998	12	6
PFOS	0,5-250	0,05–30	0,9981	0,9995	2	29
PFNA	-	0,01–30	-	0,9996	-	6
PFDA	4-250	0,05–30	0,9993	0,9997	16	29
PFUnDA	3-250	0,05–30	0,9982	0,9991	12	29
PFTeDA	1,5-250	0,05–30	0,9993	0,9994	6	29

3.3.2. Selectividad

Las principales interferencias conocidas para la cuantificación de las PFASs son las hormonas endógenas humanas (sulfatos esteroides) y las sales

biliares (isómeros del ácido taurodeoxicólico) que coeluyen con el PFHxS y el PFOS respectivamente cuando se usan fases estacionarias C18. Poseen m/z muy parecidas a las de los analitos e incluso comparten los iones producto más intensos comúnmente empleados para cuantificar los sulfonatos en tandem MS (i.e. 499>99 para PFOS y 399>99, 399>80 para PFHxS), lo cual ha llevado en numerosas ocasiones a una sobreestimación de las concentraciones de los PFASs en muestras biológicas. Actualmente este problema puede resolverse usando columnas analíticas con mecanismos de retención más específicos que separan estas interferencias de los analitos de interés (por ejemplo, columnas perfluoradas, de intercambio iónico o tipo Synergi hydro-RP) o empleando las transiciones más selectivas aunque menos sensibles 499>99 y 399>119 cuando se determinan por tandem MS/MS con QqQ [27-29]. La estrategia empleada para evitar una identificación incorrecta del PFHxS y PFOS durante los análisis de PFASs en las muestras de suero sanguíneo fue emplear las transiciones 399>119 y 499>99 ya que la columna analítica empleada fue una C18. Las muestras de suero animal analizadas no presentaron interferencias procedentes de sulfatos esteroides aunque sí se detectaron sales biliares en el suero de oveja y de caballo al monitorizar la transición 499>80. Las tres muestras de suero humano analizadas presentaron interferencias coeluyendo con el PFHxS y el PFOS en los cromatogramas obtenidos en las transiciones 399>80, 399>99 y 499>80, demostrando la importancia de cuantificar empleando las transiciones 399>119 y 499>99 para obtener selectividad.

Sin embargo, cuando se emplea IT la opción de cuantificar los PFASs mediante las transiciones selectivas no es válida debido al problema de cut-off que presenta este tipo de detector y que se ha comentado anteriormente. Ya que el problema de este tipo de interferencias es de fácil solución usando columnas analíticas más apropiadas, nuestra investigación se centró en otro de

[27] L.W.Y. Yeung, S. Taniyasu, K. Kannan, D.Z.Y. Xu, K.S. Guruge, P.K.S. Lam, N. Yamashita, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4950.

[28] J.P. Benskin, M. Bataineh, J.W. Martin, *Anal. Chem.* 79 (2007) 6455.

[29] E. Chan, M. Sandhu, J.P. Benskin, M. Ralitsch, N. Thibault, D. Birkholz, J.W. Martin, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 1405.

los problemas de selectividad que los componentes de la matriz de muestras biológicas puede provocar en este analizador; los efectos espacio-carga. El efecto espacio-carga ocurre cuando demasiados iones son confinados en la trampa y su consecuencia es que las trayectorias ideales de los iones se ven alteradas a causa de las repulsiones entre ellos, lo que finalmente conlleva a una asignación incorrecta de masas y pérdida de sensibilidad [30,31]. Los efectos espacio-carga se evaluaron comparando los espectros de masa de los analitos en un patrón ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) y en dos tipos de muestras; filete e hígado de melva fortificadas (80 ng g^{-1}) obtenidos en modo barrido con los obtenidos en modo aislamiento de iones. Los resultados demostraron la ventaja de trabajar en modo aislamiento de iones ya que proporcionó espectros de masa correctos sin pérdida de sensibilidad en ninguno de los casos debido a la expulsión de los iones de la matriz durante la etapa de aislamiento evitando así los problemas de espacio-carga en el detector. Por el contrario, los espectros obtenidos en modo barrido presentaron problemas de selectividad, siendo mayor el efecto espacio-carga para los iones con menor m/z que son los primeros en salir de la trampa. La Figura 14 compara los diferentes espectros de masas del PFOS obtenidos del análisis de una disolución patrón (a) y un extracto de muestra en modo barrido (b) y del mismo extracto de muestra en modo aislamiento de iones (c). Puede observarse cómo los componentes de la matriz de la muestra no afectan a la resolución del analizador cuando se trabaja en modo aislamiento de iones, mientras que en modo barrido proporciona espectros con asignación de m/z desplazada. La m/z del analito aparece como un intervalo de m/z en torno a una m/z mayor de la que verdaderamente corresponde al PFOS (498,9), lo cual lleva asociado a su vez pérdida de sensibilidad. Estos problemas no desaparecieron en modo barrido a pesar de modificar los parámetros que controlan el número de iones que entran en la trampa; control de carga de iones (ICC) entre 5.000 y 50.000 y tiempo máximo de acumulación entre 100-200 ms.

[30] K.A. Cox, C.D. Cleven, R.G. Cooks, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 144 (1995) 47.

[31] N.A. Yates, M.M. Booth, J.L. Stephenson, R.A. Yost, en: *Practical Aspects of Ion Trap Mass Spectrometry*, vol. III, p. 121, CRC Press, London, 1995.

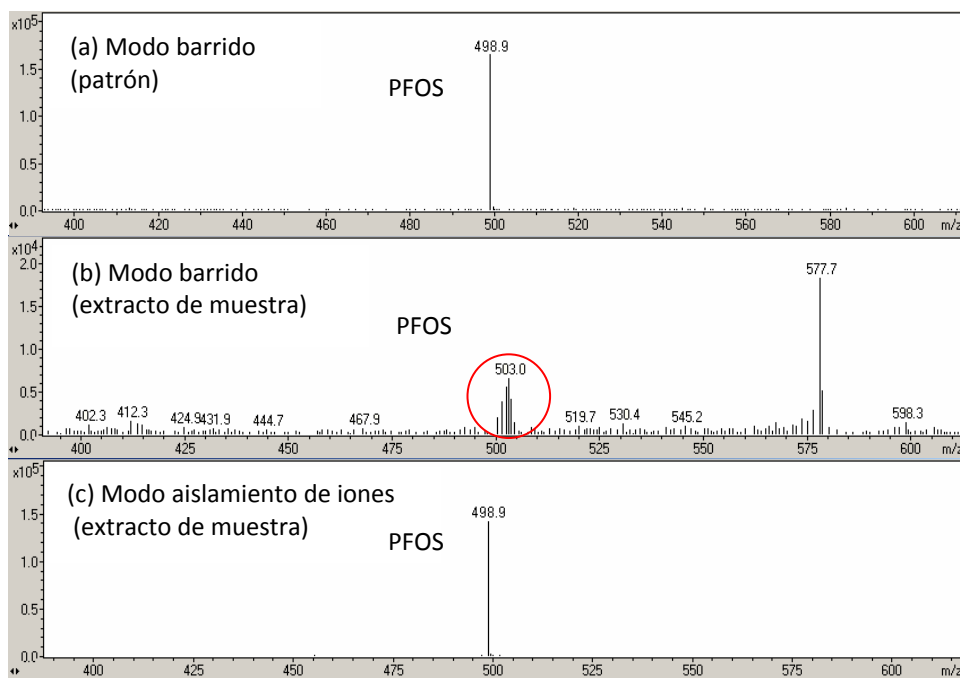


Figura 13. Espectros de masa obtenidos con trampa de iones de (a) una disolución de PFOS de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ trabajando en modo barrido, (b) un extracto de muestra de hígado de melva fortificada a 80 ng g^{-1} trabajando en modo barrido y (c) un extracto de muestra de hígado de melva fortificada a 80 ng g^{-1} trabajando en modo aislamiento de iones.

3.3.3. Control de la contaminación

El problema de la contaminación de fondo proveniente del material de laboratorio y de los componentes del LC-MS fabricados con fluoropolímeros [29] se monitorizó constantemente durante el desarrollo de las metodologías, ya que puede conducir a cuantificación inexacta de las PFASs. Una de las fuentes de contaminación identificadas fueron los septa de Teflon/goma de los tapones de los viales, por lo que éstos se sustituyeron por septa de aluminio/silicona tras lo cual la señal de fondo observada para el PFHxS y el PFOA en inyecciones

blanco (10 µL de disolución THF:agua 75:25) en el LC-MS/IT desapareció. Esta sustitución no fue suficiente para eliminar la contaminación de fondo en las inyecciones blanco realizadas en el LC-MS/QqQ por lo que se insertó una columna adicional (SymmetryShield™ RP8 guard column, 3.5 µm, 3.9 mm × 20 mm) entre la bomba y el inyector de modo que las PFASs provenientes del instrumento quedaron retenidas temporalmente en dicha columna evitando así su coelución con las PFASs presentes en la muestra. Asimismo, aunque no se observó contaminación aportada por el material de laboratorio empleado en ninguno de los dos procedimientos, se inyectaron blancos reactivo control rutinariamente durante las secuencias cromatográficas como medida de precaución.

3.3.4. Veracidad

La veracidad del método desarrollado para análisis de PFASs en biota, se evaluó mediante el análisis del material de referencia (MR) empleado en el 2º estudio interlaboratorio internacional cuyo contenido en PFASs se especifica en la Tabla 14. Los extractos se analizaron con IT en modo aislamiento de iones y con QqQ en modo MRM empleando las siguientes transiciones; PFBS, 299>80; PFHxA, 313>269; PFHxS, 399>80; PFOA, 413>369; PFOS, 499>80; PFNA, 463>419; PFDA, 513>469; PFUnDA, 563>519; PFDoDA, 613>569 y PFOSA, 498>78. La separación cromatográfica de los análisis realizados en QqQ se llevó a cabo con una columna FluoroSep para evitar problemas de interferencias ya que como se comentó en el apartado 3.3.2. las transiciones escogidas en este caso para cuantificar los PFASs son las más intensas pero no las más selectivas. Los resultados obtenidos, expresados como valor medio (n=3), se muestran en la Tabla 14. La veracidad expresada como porcentaje [(concentración detectada/concentración asegurada por el MR) x 100] estuvo en el intervalo 80-130 % para todos las PFASs demostrando la buena concordancia con los valores del MR independientemente del tipo de MS empleado para su cuantificación.

Al no disponerse de MR para las PFASs en suero sanguíneo, la veracidad del segundo método desarrollado se evaluó mediante el análisis de muestras de

Tabla 14. Resultados obtenidos del análisis del MR del 2º estudio interlaboratorio internacional sobre PFASs mediante el método desarrollado empleando IT y QqQ para su cuantificación.

Analitos	Concentración en el MR (ng g ⁻¹)	Concentración±DE (ng g ⁻¹)	
		Trampa iónica en modo aislamiento	Triple cuadrupolo en MRM
PFBS	-	n.d.	n.d.
PFHxA	-	n.d.	n.d.
PFHxS	-	n.d.	n.d.
PFOA	22.6	21±2	18.0±0.8
PFOS	145	194±8	177±12
PFNA	17.2	n.a.	17.7±1.5
PFDA	21.9	25.3±0.1	21.3±0.9
PFUnDA	17.8	20±1	17.5±1.3
PFDoDA	20.1	n.a.	23.0±0.8
PFTeDA	-	n.d.	n.a.
PFOSA	3.2	n.a.	3.1±0.4

n.d., no detectado

n.a., no analizado

suero de ternera fortificadas con los analitos (5 ng mL⁻¹). Debido a la ausencia de muestras blanco para todos los analitos el porcentaje de recuperación se calculó como $100 \cdot (x_2 - x_1) / x$ fortificado; siendo x_1 el valor medido en blanco y x_2 el valor medido en la porción enriquecida. Las recuperaciones obtenidas variaron entre el 79 y el 83%, considerándose valores aceptables. Estas pequeñas pérdidas ocurridas durante el proceso de extracción se corrigieron gracias al empleo de patrones internos (ISs) en las muestras, obteniéndose valores de recuperación entre 95-107% y asegurándose por tanto una cuantificación exacta y precisa.

3.3.5. Precisión

La precisión de los métodos se evaluó mediante el análisis de 11 muestras fortificadas, en el caso de muestras de hígado y filete de pescado a una concentración de 20 ng g⁻¹ y en las muestras de suero a 5 ng mL⁻¹. Las desviaciones estándar relativas obtenidas de los análisis de muestras sólidas y

muestras de suero estuvieron comprendidas entre 1-11% y entre 1-6% para todos las PFASs, respectivamente.

3.3.6. Análisis de muestras

Finalmente la aplicabilidad de los métodos propuestos se demostró determinando las PFASs en muestras fortificadas y sin fortificar de diferentes pescados, aves y sueros. El nivel de fortificación fue 20 ng g^{-1} en las muestras de hígado y músculo obteniéndose recuperaciones entre el 87 y 111%. La composición de la matriz no tuvo influencia en la extracción cuantitativa de las PFASs con diferente longitud de cadena, siendo la principal diferencia el contenido en lípidos que variaba entre el 1% en la platija y el 15% en las caballas. Por otro lado, las recuperaciones en las muestras de suero estuvieron entre el 75 y 89%, expresadas como recuperación de los ISs del método (5 ng mL^{-1}). La Tabla 15 muestra las concentraciones de analitos encontradas en las muestras analizadas. El PFOS estuvo presente en todas las muestras de peces y aves marinas aunque sólo pudo cuantificarse en los hígados de melva y palometa a concentraciones de $14,3 \pm 0,7$ y $9,5 \pm 0,5 \text{ ng g}^{-1}$, respectivamente. Niveles cuantificables de otros PFASs también se encontraron en músculo de gaviota ($3,2 \pm 0,6 \text{ ng g}^{-1}$ de PFBS), hígado de palometa ($8,9 \pm 0,3 \text{ ng g}^{-1}$ de PFBS) y filete de palometa ($2,9 \pm 0,6 \text{ ng g}^{-1}$ de PFHxS). El resto de analitos detectados en las muestras sólidas estuvo por debajo de su límite de cuantificación. Las muestras de suero analizadas presentaron PFASs entre 17 ± 1 y $197,3 \pm 0,6 \text{ ng mL}^{-1}$ en el suero procedente de animales y entre 84 ± 4 y $5.168 \pm 63 \text{ ng mL}^{-1}$ en suero de humanos. PFOS y PFOA presentaron las mayores concentraciones, independientemente de la procedencia de la muestra, seguidos del PFHxS en las muestras de suero humano. Sin embargo este analito no se encontró en ninguna de las muestras de suero animal. La presencia de PFASs de cadena larga en todas las muestras de suero analizadas pone de manifiesto la necesidad de monitorizar estos analitos de manera rutinaria junto con el PFOS y PFOA. La Figura 14 muestra el cromatograma obtenido para la muestra de suero humano-1 sin fortificar.

Tabla 15. Concentraciones medias de PFASs encontradas en las muestras biológicas analizadas (expresadas en ng g⁻¹ en las muestras sólidas y en pg mL⁻¹ en las muestras de suero).

Muestras	PFBS	PFHxA	PFHxS	PFOA	PFOS	PFNA	PFDA	PFUnDA	PFTeDA
Filete de melva	n.d.	< LOQ	< LOQ	n.d.	< LOQ	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.
Hígado de melva	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	13,1±0,2	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.
Filete de palometa	n.d.	n.d.	2,9±0,6	n.d.	< LOQ	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.
Hígado de palometa	8,9±0,3	n.d.	n.d.	n.d.	9,5±0,5	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.
Filete de caballa	n.d.	< LOQ	< LOQ	n.d.	< LOQ	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.
Músculo de gaviota	3,2±0,6	n.d.	< LOQ	n.d.	< LOQ	n.a.	n.d.	n.d.	< LOQ
Músculo de alcatraz	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.
Suero vacuno	n.a.	n.a.	n.d.	14,3±0,7	197,3±0,6	23±3	<LOQ	69±3	70±10
Suero bovino	n.a.	n.a.	n.d.	17±1	156±2	52±1	37±4	72±4	108±13
Suero equino	n.a.	n.a.	n.d.	35±2	<LOQ	45±2	<LOQ	71±5	<LOQ
Suero humano-1	n.a.	n.a.	746±116	1.735±35	5.168±63	908±33	376±32	624±3	99±3
Suero humano-2	n.a.	n.a.	678±66	1.242±47	4.597±171	565±33	261±5	548±23	86±5
Suero humano-3	n.a.	n.a.	794±41	1.219±20	4.670±10	567±17	258±5	560±6	84±4

n.a.; no analizado

n.d.; no detectado

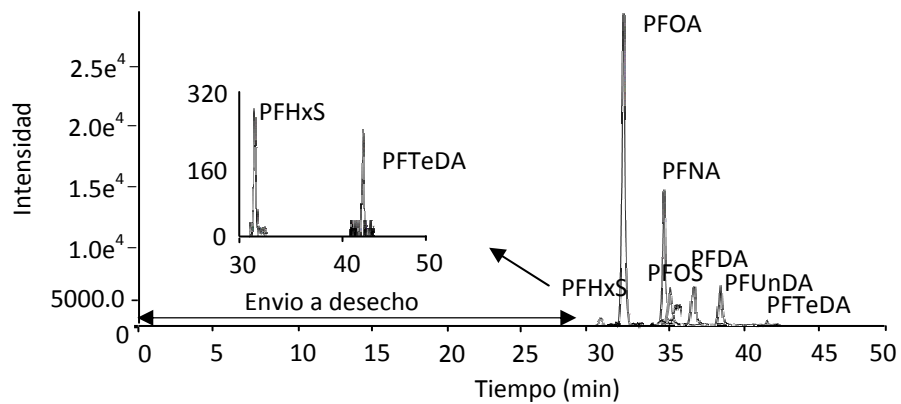


Figura 14. Cromatograma obtenido a partir de una muestra de suero humano mediante QqQ. Insertado en la figura aparece una ampliación del cromatograma con los analitos de menor intensidad.

CONCLUSIONES

Las investigaciones que se recogen en la Memoria de esta Tesis Doctoral han demostrado la capacidad que presentan los sistemas supramoleculares para integrar y simplificar las etapas del proceso analítico en el análisis de muestras acuosas y biológicas. Esto ha permitido desarrollar métodos que extraen, preconcentran y estabilizan contaminantes orgánicos en una sola etapa gracias al empleo de diferentes agregados supramoleculares. Además, se han puesto a punto dos nuevas metodologías para la determinación de sustancias perfluoroalquiladas y se ha mejorado su cuantificación cuando se emplea espectrometría de masas con trampa iónica. A continuación se resumen las principales conclusiones obtenidas en cada una de las Partes de esta Memoria.

PARTE I: SISTEMAS SUPRAMOLECULARES PARA LA SIMPLIFICACIÓN DE LAS OPERACIONES PREVIAS EN LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EN MUESTRAS ACUOSAS.

Los sistemas supramoleculares empleados para la extracción, preconcentración y conservación de los contaminantes (tensoactivos de benzalconio, PAHs y plaguicidas) analizados en muestras acuosas han sido adsorbentes hemimicelares de dodecilsulfato sobre alúmina, adsorbentes admicelares mixtos de dodecilsulfato y tetrabutilamonio sobre alúmina y disolventes supramoleculares (SUPRASs) constituidos por micelas normales de ácido dodecilsulfónico en mezclas ácido clorhídrico/agua mediante un proceso de autoasociación.

Las principales ventajas de las metodologías desarrolladas empleando estos agregados son:

- 1) Simplicidad. Las etapas de extracción, preconcentración, limpieza y conservación se integra en una simple etapa.
- 2) Gran eficacia de extracción gracias a la alta capacidad de solubilización y a los diferentes tipos de interacciones que proporcionan los sistemas supramoleculares; fuerzas dispersivas, interacciones iónicas, puentes de

hidrógeno e interacciones π -catión para la extracción de los compuestos orgánicos.

- 3) Elevados factores de preconcentración sin necesidad de evaporación de los extractos. En el caso de los adsorbentes supramoleculares, las fuertes interacciones que se establecen entre los agregados y los contaminantes permiten utilizar volúmenes de muestra de 0,25 L y 1L para la determinación de los plaguicidas y los compuestos de benzalconio, respectivamente, lo cual unido al pequeño volumen de eluyente necesario para la desorción de los analitos (1-2 mL) permite alcanzar factores de preconcentración suficientemente elevados (25-500) para obtener la sensibilidad requerida para el cumplimiento de la legislación. El empleo de bajos volúmenes de disolvente orgánico para la elución es una característica diferencial de los adsorbentes supramoleculares respecto a otros adsorbentes como los poliméricos.
- 4) En el caso de las extracciones con disolventes supramoleculares, la fase en equilibrio obtenida después de la formación del SUPRAS constituye un medio donde se retienen las interferencias más polares actuando como etapa de limpieza simultánea a la extracción.
- 5) Gran capacidad de estabilización de los contaminantes. Una vez retenidos los analitos, el microambiente proporcionado por los agregados supramoleculares les confiere estabilidad y evita su degradación. Además, el pequeño volumen de los formatos empleados; cartuchos de SPE y pequeños viales para los SUPRASs, facilita su transporte, almacenamiento y refrigeración si fuera necesaria.

PARTE II: NUEVAS METODOLOGÍAS PARA EL ANÁLISIS DE SUSTANCIAS PERFLUOROALQUILADAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.

Se ha sintetizado un nuevo disolvente supramolecular constituido por micelas inversas de ácido hexanoico en mezclas THF/agua mediante un proceso

de autoasociación. Es la primera vez que se propone un disolvente con una cadena hidrocarbonada tan corta y el estudio realizado ha demostrado que su comportamiento es diferente en algunos aspectos a los disolventes supramoleculares sintetizados a partir de cadenas hidrocarbonadas de mayor longitud. Así, debido a la gran solubilidad en agua de ácido hexanoico, se requieren porcentajes de éste y THF de al menos 4% y 30% (v/v), respectivamente, para la completa incorporación del tensioactivo en el SUPRAS, lo cual es clave para conseguir rendimientos cuantitativos de extracción. El mecanismo de extracción se basa en la formación de agregados mixtos HA:PFASs dadas las similitudes estructurales entre los analitos y el extractante. Por otro lado, la concentración de HA en el SUPRAS es elevada (0,25 mg/ μ L), lo cual posibilita llevar a cabo microextracciones líquido-líquido con pequeños volúmenes de SUPRAS debido al elevado número de centros activos presentes. El volumen de SUPRAS generado puede predecirse y es función de la cantidad de HA y porcentaje de THF presentes en la mezcla de producción del disolvente.

El conocimiento de los mecanismos que llevan a la formación de los agregados inversos de ácidos carboxílicos en mezclas THF y agua ha permitido aplicar este concepto a la determinación de PFASs utilizando mezclas de estos dos disolventes que presenten un balance de fuerzas polares/apolares de 1,2. Así, dentro de las investigaciones incluidas en este bloque se ha desarrollado otro método para la microextracción de PFASs en muestras biológicas (pescado y aves marinas) basado en la formación de agregados inversos de los analitos en un mezcla de THF y agua. También se ha mejorado la cuantificación de estos compuestos mediante espectrometría de masas con trampa iónica trabajando en modo “aislamiento de iones”. Este modo de trabajo mantiene la sensibilidad alcanzada trabajando en modo “full-scan” a la vez que evita el indeseado efecto espacio-carga que suelen afectar a la selectividad y sensibilidad de las determinaciones realizadas con trampa de iones.

Las principales ventajas de los métodos desarrollados para la determinación de las PFASs son:

- 1) La elevada eficacia de extracción para todos los PFASs (80-100%), independientemente de la longitud de su cadena fluorocarbonada, en diferentes muestras biológicas (pescado, aves marinas y suero sanguíneo).
- 2) La simplicidad de tratamiento de la muestra. Las extracciones se llevan a cabo en una única etapa. No se requiere precipitación adicional de las proteínas ni etapas de limpieza y la presencia de efecto matriz es despreciable.
- 3) La elevada frecuencia de muestreo. La extracción de los analitos se realiza en 20 minutos y dada la simplicidad de los procedimientos analíticos utilizados es posible tratar varias muestras simultáneamente.
- 4) El bajo volumen de disolvente orgánico empleado en las extracciones (0,6 mL de THF por muestra) en comparación con otras metodologías comúnmente utilizadas.
- 5) Elevada sensibilidad. Los límites de cuantificación alcanzados para el análisis de peces y aves ($2\text{-}16\ \mu\text{g kg}^{-1}$) permiten la monitorización rutinaria de estos compuestos en muestras biológicas. Asimismo, el método para la determinación de las PFASs en muestras de suero es muy sensible (límites de cuantificación entre $6\ \text{y}\ 60\ \text{pg mL}^{-1}$) permitiendo estudiar la exposición humana a PFASs incluso para los ácidos perfluoroalquilcarboxílicos de cadena superior a 8 átomos de carbono que suelen encontrarse en sangre a muy bajas concentraciones.

APÉNDICES

APÉNDICES A. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL

- 1. Stability of benzalkonium surfactants on hemimicelle-based solid-phase extraction cartridges.**

Noelia Luque, Francisco Merino, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito.
Journal of Chromatography A, 1094 (2005) 17-23.
(Factor de Impacto 2011: 4.531; Posición: Primer decil)

- 2. Use of coacervates for the on-site extraction/preservation of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzalkonium surfactants.**

Noelia Luque, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito.
Analytica Chimica Acta 584 (2007) 181-188.
(Factor de Impacto 2011: 4.555; Posición: primer decil)

- 3. Analysis of perfluorinated compounds in biota by microextraction with tetrahydrofuran and liquid chromatography/ion isolation-based ion-trap mass spectrometry.**

Noelia Luque, Ana Ballesteros-Gómez, Stefan van Leeuwen, Soledad Rubio.
Journal of Chromatography A 1217 (2010) 3774-3782.
(Factor de Impacto 2011: 4.531; Posición: Primer decil)

- 4. A simple and rapid extraction method for sensitive determination of perfluoroalkyl substances in blood serum suitable for exposure evaluation.**

Noelia Luque, Ana Ballesteros-Gómez, Stefan van Leeuwen, Soledad Rubio.
Journal of Chromatography A 1235 (2012) 84-91.
(Factor de Impacto 2011: 4.531; Posición: Primer decil)

- 5. Extraction and stability of pesticide multiresidues from natural water on a mixed-mode admicellar sorbent**

Noelia Luque, Soledad Rubio.

Journal of Chromatography A, DOI: 10.1016/j.chroma.2012.06.006
(Factor de Impacto 2011: 4.531; Posición: Primer decil)

APÉNDICES B. COMUNICACIONES A CONGRESOS

1. Stability of benzalkonium surfactants on dodecylsulfate hemimicelles-coated alumina cartridges.
Póster
Noelia Luque, Francisco Merino, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito.
29th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Estocolmo, Suecia (2005).
2. Stability of amphiphilic and hydrophobic pollutants in anionic micelle-based coacervates.
Póster
Noelia Luque, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito.
34th International Symposium on Environmental Analytical Chemistry, Hamburgo, Alemania (2006).
3. Extracción y estabilización de plaguicidas mediante sorbentes admicelares mixtos.
Póster
Noelia Luque, Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito.
GRASEQA 2008; XI Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica, Huelva, España (2008).
4. Técnicas integradas-simplificadas en las etapas previas del análisis ambiental con el uso de agregados supramoleculares.
Comunicación oral.
Noelia Luque, Soledad Rubio.
I Congreso Científico de Investigadores en Formación, Córdoba, España (2009).
5. Analysis of perfluoroalkyl compounds in biota by solvent microextraction and liquid chromatography/ion isolation-based ion trap mass spectrometry.

Póster

Noelia Luque, Ana Ballesteros-Gómez, Stefan van Leeuwen y Soledad Rubio.

4th International Symposium on RECENT ADVANCES IN FOOD ANALYSIS, Praga, República Checa (2009).

6. Stability of amphiphilic and hydrophobic pollutants in nanostructured liquids based on anionic micelles.

Póster

Noelia Luque, Soledad Rubio.

II Encuentro sobre Nanociencia y Nanotecnología de investigadores y tecnólogos de la Universidad de Córdoba. Córdoba, España (2010).

7. Analysis of perfluorinated compounds in blood serum by supramolecular solvent-based microextraction and liquid chromatography/ion isolation-based ion trap mass spectrometry.

Póster

Noelia Luque, Ana Ballesteros-Gómez, Stefan van Leeuwen y Soledad Rubio.

Dioxin; 30th International Symposium on Halogenated persistent organic pollutants (POPs). Texas, USA (2011)

8. Análisis de compuestos perfluorados en suero sanguíneo mediante microextracción con disolventes supramoleculares y cromatografía líquida/espectrometría de masas con trampa iónica.

Póster

Noelia Luque, Ana Ballesteros-Gómez y Soledad Rubio.

III Encuentro sobre Nanociencia y Nanotecnología de investigadores y tecnólogos Andaluces. Córdoba, España (2011).

9. Urine Bisphenol A levels in different pregnancy trimesters and in 4 year old children- are they correlated?

Póster

Maribel Casas, Noelia Luque, Ana Ballesteros-Gómez, Marieta Fernández, Monica Guxens, Holger Koch, Michelle Méndez, Soledad Rubio y Martine Vrijheid.

Child Health and Environment. INMA project-Environment and Childhood. Conferències Científiques. Barcelona, España (2011).

