



**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**

Departament de Química Analítica i Química Orgànica

**APLICACIÓ DE TÈCNiques ACOBLADES A LA  
CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA PER A LA  
DETERMINACIÓ DE CONTAMINANTS ORGÀNICS  
EN AIGÜES I SEDIMENTS PORTUARIS**

**Memòria presentada per  
ROSA ANA GIMENO FERRERES  
per optar al grau de  
Doctora en Química  
Tarragona, 2003**





**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**  
Departament de Química Analítica  
i Química Orgànica

El Dr. FRANCESC BORRULL i BALLARIN, Catedràtic del Departament de Química Analítica i Química Orgànica de la Facultat de Química de la Universitat Rovira i Virgili, i

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

**CERTIFIQUEM:**

Que la present Tesi Doctoral, que porta per títol: "APLICACIÓ DE TÈCNiques ACOBLADES A LA CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA PER A LA DETERMINACIÓ DE CONTAMINANTS ORGÀNICS EN AIGÜES I SEDIMENTS PORTUARIS", presentada per ROSA ANA GIMENO FERRERES per optar al grau de Doctora en Química, ha estat realitzada sota la nostra direcció, a l'Àrea de Química Analítica del Departament de Química Analítica i Química Orgànica d'aquesta universitat, i que tots els resultats presentats són fruit d'experiències realitzades per l'esmentada doctoranda.

I, per a que consti, expedim aquest certificat a Tarragona, 30 de setembre de 2003.

Dr. Francesc Borrull i Ballarín

Dra. Rosa M. Marcé i Recasens



*Una vegada finalitzada la redacció d'aquesta tesi, m'agradaria donar les gràcies a tota la gent que, d'una forma o altra, ha contribuït a la seva realització.*

*En primer lloc, voldria donar les gràcies als meus directors, el Dr. Francesc Borrull i la Dra. Rosa M. Marcé, per haver-me donat l'oportunitat de realitzar aquesta tesi al seu grup d'investigació i per tota la seva ajuda i suport al llarg d'aquests anys.*

*També voldria expressar el meu agraïment al Dr. José Luis Beltrán del Grup d'Espectrocòpia Molecular de la Universitat de Barcelona per la bona acollida en el seu grup de recerca, així com al Dr. Xavier Rius i al Dr. Joan Ferré del Grup de Quimiometria i Qualimetria de la nostra universitat per la seva col·laboració.*

*També vull agrair a la Carme, al Maarten, a la Patricia i a l'Enric la seva contribució en la realització d'aquesta tesi. Gràcies per tot el que hem après junts.*

*No puc oblidar tampoc la resta de membres del grup d'investigació. Tots i cada un d'ells han contribuït d'una forma o altra. Gràcies pels vostres ànims, pels vostres consells i per tots els bons moments que hem passat al llarg d'aquests anys.*

*Vull donar també les gràcies als meus amics Javi, Joan, Sergio, Jordi B., Antonio, Alicia, Jordi C., i, especialment, a la Margarita, per la seva ajuda i suport. Gràcies per totes les bones estones que hem passat junts.*

*Finalment, voldria agrair als meus pares, a la meva àvia, a la meva germana Mavi i a Pep la seva paciència i suport. Gràcies per aguantar els meus maldecaps durant tots aquests anys i per estar sempre allà per animar-me i ajudar-me.*



## ÍNDEX

---





---

<b>OBJECTIU</b> .....	1
<b>CAPÍTOL I. INTRODUCCIÓ</b> .....	5
I.1. El medi marí i la contaminació.....	8
I.2. Aplicació de tècniques acoblades a la determinació de contaminants .....	21
I.2.1. Benzensulfonats i naftalensulfonats .....	21
I.2.1.1. Tècniques de separació .....	24
I.2.1.2. Tècniques d'extracció .....	27
I.2.2. Compostos aromàtics policíclics.....	29
I.2.2.1. Tècniques de separació .....	33
I.2.2.2. Tècniques d'extracció .....	35
I.2.2.2.1. Mostres aquoses .....	36
I.2.2.2.2. Mostres sòlides .....	40
I.2.3. Ftalats i adipats .....	44
I.2.3.1. Tècniques de separació .....	48
I.2.3.2. Tècniques d'extracció .....	49
I.2.3.2.1. Mostres aquoses .....	50
I.2.3.2.2. Mostres sòlides .....	52
I.2.4. Plaguicides antialgues.....	53
I.2.4.1. Tècniques de separació .....	57
I.2.4.2. Tècniques d'extracció .....	58
I.2.4.2.1. Mostres aquoses .....	58
I.2.4.2.2. Mostres sòlides .....	61

---

I.2.5. Determinació de contaminants orgànics en aigua de mar .....	63
I.3. Descripció de tècniques de calibració de segon ordre emprades en la determinació de contaminants.....	93
I.3.1. Tipus de dades i calibració .....	94
I.3.2. Mètodes de quantificació a partir de dades de segon ordre.....	96
I.3.2.1. Regressió amb mínims quadrats parcials de tres vies (3-PLS).....	98
I.3.2.1. Mètode generalitzat d'anihilació de rang (GRAM).....	103
I.4. Bibliografia .....	108
<b>CAPÍTOL II. PART EXPERIMENTAL I RESULTATS .....</b>	<b>123</b>
II.1. Determinació de compostos aromàtics sulfonats en aigua costanera mitjançant l'acoblament en línia de l'extracció en fase sòlida de parell iònic i la cromatografia líquida de parell iònic amb detecció UV .....	129
II.2. Determinació de naftalensulfonats en aigua mitjançant l'acoblament en línia de l'extracció en fase sòlida de parell iònic i la cromatografia líquida de parell iònic amb detecció de fluorescència d'escanejat ràpid .....	151
II.3. Determinació d'hidrocarburs aromàtics policíclics i compostos aromàtics heterocíclics derivats de sofre mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució amb fluorescència i espectrometria de masses amb ionització química a pressió atmosfèrica en mostres d'aigua de mar i sediments .....	171

---

II.4. Calibració bilineal de segon ordre per a la determinació de compostos aromàtics policíclics en sediments marins mitjançant l'extracció amb solvent i la cromatografia líquida amb detecció amb díodes en fila .....	195
II.5. Determinació de plastificants mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució i espectrometria de masses amb ionització química a pressió atmosfèrica en mostres d'aigua i sediments.....	215
II.6. Monitorització de plaguicides antialgues en aigua mitjançant l'acoblament en línia de l'extracció en fase sòlida i la cromatografia líquida amb espectrometria de masses amb ionització química a pressió atmosfèrica.....	239
<b>CAPÍTOL III. CONCLUSIONS .....</b>	<b>267</b>
<b>ANNEXOS .....</b>	<b>273</b>
I. Estructures .....	275
II. Abreviacions utilitzades.....	283
II. Publicacions.....	287



**OBJECTIU**

---



L'objectiu de la present tesi ha estat el desenvolupament de mètodes analítics per a la determinació de contaminants orgànics en el medi marí mitjançant l'acoblament de la cromatografia líquida a diferents tècniques. Dintre d'aquest objectiu principal, se'n poden destacar altres més específics:

- El desenvolupament de diferents mètodes cromatogràfics basats en l'acoblament de la cromatografia líquida d'alta resolució a diferents detectors, com el de fluorescència o l'espectrometria de masses.
- L'acoblament *on-line* i *off-line* de diferents tècniques d'extracció a la cromatografia líquida per a l'extracció i determinació de diferents famílies de contaminants orgànics en mostres d'aigua i sediments portuaris.
- L'aplicació de diferents mètodes de calibració de segon ordre a la quantificació de contaminants en presència de substàncies interferents.





**CAPÍTOL I**

---

**INTRODUCCIÓ**



Unes dues terceres parts de la superfície de la Terra estan cobertes d'aigua. Aquest recurs natural, que és essencial per a la vida, ha condicionat el desenvolupament de les espècies que habiten la Terra des dels seus inicis. L'home, com altres espècies, també ha depès d'ella per al seu desenvolupament.

Però el seu ús sempre ha estat condicionat per la presència de contaminants, que inicialment era el resultat de processos naturals com, per exemple, l'erosió de les roques. Amb el desenvolupament industrial, els problemes derivats de la contaminació s'han agreujat degut a diferents causes, com poden ser l'augment de la població, que ha afavorit l'assentament en àrees que en el passat no estaven habitades, l'impacte de les activitats humanes en els sistemes mediambientals, que sovint poden canviar la magnitud i freqüència en què els processos naturals tenen lloc, o l'aparició de nous contaminants degut al desenvolupament de noves tecnologies.

Actualment, molts dels problemes de contaminació de l'aigua es deuen a l'abocament intermitent o continuat de substàncies que incideixen directament o indirectament en llacs i rius. Això fa que sigui important el desenvolupament de mètodes analítics per tal de detectar la presència d'aquests contaminants i controlar-la a fi de poder utilitzar aquestes aigües.

Pel que fa al medi marí, la seva contaminació no ha estat tan estudiada, ja que les substàncies que s'hi aboquen, ja sigui directament des del focus emissor o des de rius o altres corrents que hi van a parar, es dilueixin degut al sistema de corrents marines, de manera que es disminueixen els seus efectes en les espècies que hi habiten. Però hi ha algunes zones on s'aboquen aquestes substàncies i en les quals aquest sistema no és tant eficient, ja sigui a causa de l'estancament de l'aigua o degut a què l'elevada concentració en què hi arriben fa que els corrents no siguin prou efectius. En aquestes zones, els contaminants es concentren fins a assolir nivells de concentració que poden ser nocives o, fins i tot, tòxiques per a les espècies

que hi habiten. És per això que hi ha un creixent interès en el desenvolupament de mètodes que permetin la identificació i determinació de contaminants en aquest medi.

## **I.1. EL MEDI MARÍ I LA CONTAMINACIÓ**

Els mars i oceans són unes grans extensions d'aigua salada en les quals es distribueix la majoria d'aigua de la Terra. La seva salinitat és deguda majoritàriament als ions sodi i clor, que es troben en una concentració mitjana de 34.75 g l<sup>-1</sup> [1]. La seva presència, així com la d'altres ions, és principalment el resultat de l'erosió de roques continentals, que dona lloc a la dissolució de sals, tot i que també hi poden haver altres materials derivats de focs d'origen natural en boscos, erupcions volcàniques i pol·lució atmosfèrica.

Altres sals presents a l'aigua marina són els fosfats i nitrats, que provenen de forma natural de les conques fluvials, de l'atmosfera o de la descomposició de la matèria a l'oceà, tot i que també hi ha fonts antropogèniques d'aquestes sals, com per exemple les aigües residuals urbanes o l'ús de pesticides [1]. Aquestes sals es troben presents en concentracions variables i són nutrients per tota una varietat d'organismes vius.

La salinitat produïda per la presència d'aquestes sals, juntament amb les variacions de la temperatura i la pressió determinen la densitat de l'aigua, la diferència de la qual origina moviments importants en els oceans [1-3]. Entre ells es poden distingir els corrents que recorren tots els oceans redistribuint l'aigua. Un altre moviment característic de l'aigua del mar són les onades, degudes principalment al vent, tot i que també poden ser causades per terratrèmols, explosions volcàniques, etc. Aquestes onades acceleren l'intercanvi de calor i gasos entre l'aigua i l'atmosfera. A més d'aquests

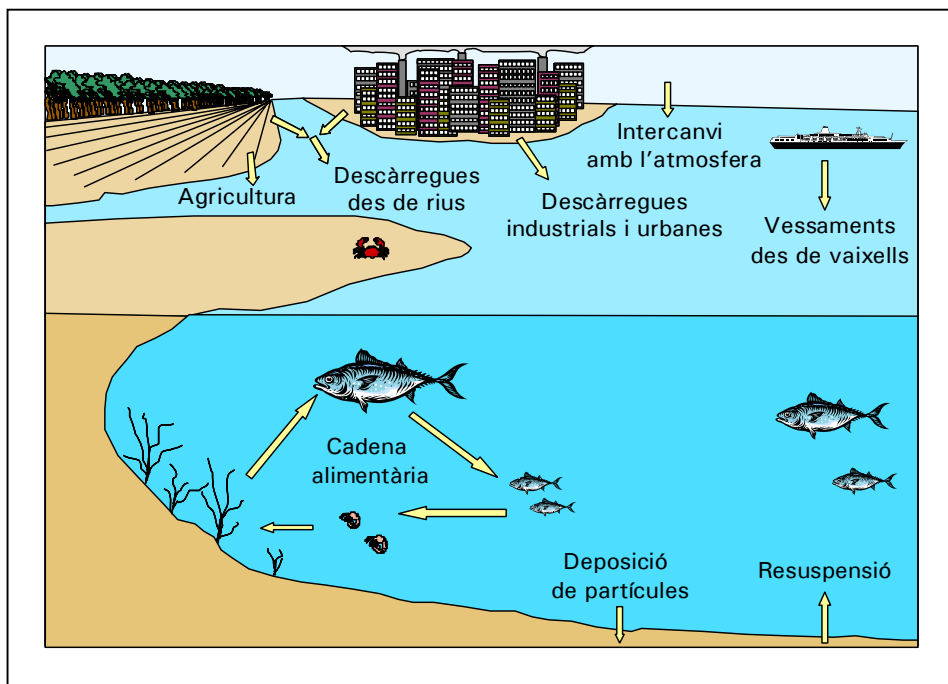
corrents, també estan les marees, que són el resultat de l'atracció gravitacional de la Lluna i el Sol.

La superfície que ocupen els oceans és molt extensa i aquests moviments de l'aigua fan que els residus i contaminants vessats es dilueixin. Això ha fet que durant anys s'introduïssin substàncies d'origen antropogènic als mars i oceans, tot i que aquests corrents de l'aigua també poden fer que la contaminació sigui propagada a una àrea més àmplia i, per tant, pot augmentar el risc ambiental. No obstant, segons el Programa Ambiental de les Nacions Unides, els oceans i mars oberts estan encara relativament nets [2]. En aquestes zones, les fonts més importants de contaminació són les descàrregues directes degudes a accidents marins, com són els vessaments de petroli, o les operacions de neteja.

Però la majoria de la contaminació marina es concentra al voltant de la zona costanera, en mars tancats o petits, on hi viu la meitat de la població del món. Tenint en compte que molt de l'augment que s'espera en un futur es concentrarà en aquestes zones, l'impacte de les activitats humanes és més obvi i pot afectar a l'ús o explotació de l'aigua de mar i els seus recursos. En aquestes zones, s'ha observat que la contaminació no es dispersa tan eficientment com en mar obert, de manera que els contaminants es poden concentrar i afectar als organismes que hi habiten.

Hi ha diferents fonts de contaminació del medi marí, algunes de les quals es mostren a la Figura 1. Com es pot veure a la Taula 1, on s'indica l'aportació d'algunes fonts de contaminació al medi marí, la majoria de la pol·lució que afecta a les zones costaneres té un origen terrestre, i arriba al mar des dels rius, l'atmosfera o el vessament directe al mar des dels propis vaixells [4]. En aquest cas, es poden distingir les fonts puntuals de contaminació, que vessen directament a l'aigua, com per exemple algunes indústries o el sistema de clavegueres urbanes, que són relativament fàcils d'identificar i controlar. Per tal de disminuir-ne l'impacte sobre el medi ambient, s'han introduït diferents normatives que regulen la presència d'alguns

contaminants en els residus generats en aquests tipus de fonts de contaminació [5]. No obstant això, també hi ha les fonts de contaminació difuses, que poden arribar a través dels rius, l'atmosfera o la pluja àcida, i que són resultat d'activitats que moltes vegades estan lluny del mar, de manera que són més difícils de controlar.



**Figura 1.** Fonts de contaminació del medi marí.

Tot i que la contaminació més important és la d'origen terrestre, inicialment la comunitat internacional va començar a regular la contaminació deguda a vessaments i descàrregues des del mar degut als accidents en el transport d'algunes substàncies i la seva manipulació. Aquest és el cas dels accidents de diferents petrolers que, al llarg de la història, han vessat una gran quantitat d'hidrocarburs al medi marí. Alguns exemples d'aquests accidents

són els soferts pels vaixells Torrey Canyon (1967), Urquiola (1976), Atlantic Express (1979), Castillo de Bellver (1983), ABT Summer (1991) i Erika (1999), entre d'altres [1]. Recentment, el petrolier Prestige es va enfonsar a la costa gallega degut a una esquerda al seu casc. Els efectes d'aquesta catàstrofe encara s'estan estudiant, així com el mètode per extreure el fuel que encara es troba als tancs del vaixell enfonsat.

**Taula 1.** Contribució d'algunes fonts de contaminants a la pol·lució marina.

Origen	Contribució
Transport marítim	12 %
Vessaments deliberats al mar	10 %
Producció a prop de la costa	1 %
Descàrregues d'origen terrestre	44 %
Atmosfera	33 %

Degut a la gravetat d'aquest tipus d'accident, s'han anat creant tota una sèrie d'organitzacions, agències i convenis internacionals per tal de regular aquest tipus de contaminació [3]. Els primers convenis es van signar a escala local per a alguns tipus de contaminació concreta, però durant les últimes dècades i tenint en compte l'augment de la problemàtica de la contaminació, s'han anat desenvolupant tota una sèrie de convenis i mesures a nivell internacional, ja que alguns d'aquests problemes no es poden resoldre a nivell local o nacional. Aquests convenis pretenen fer prendre consciència als estats dels problemes del medi ambient marí, així com intentar unificar els diferents convenis signats a nivell local. A la Taula 2 es mostren alguns dels més importants, la majoria dels quals s'han anat modificant posteriorment per tal d'anar incorporant noves mesures.

**Taula 2.** Principals iniciatives en matèria de contaminació marina [3].

<b>Any</b>	<b>Convenis internacionals</b>
1954	Primer conveni internacional que intenta establir les mesures d'actuació front a la contaminació per hidrocarburs
1972	Conveni sobre prevenció de la contaminació per vessaments de deixalles i altres matèries, Conveni de Londres
1972	Conveni sobre prevenció de la contaminació marina provocada per vessaments de vaixells i aeronaus, Conveni d'Oslo
1973	Conveni internacional per prevenir la contaminació de vaixells, 1973/78 MARPOL
1974	Conveni sobre prevenció de contaminació marina d'origen terrestre
1982	Convenció de les Nacions Unides sobre el Dret del Mar
1985	Directrius internacionals per a la protecció del medi ambient marí de la contaminació d'origen terrestre
1992	Agenda 21
<b>Convenis regionals</b>	
1972	Conveni d'Oslo
1974	Conveni de París
1974	Mar Bàltic: Conveni de Hèlsinki
1976	Mar Mediterrani: Conveni per a la protecció del mar Mediterrani de la contaminació
1978	Àrea del Golf: Conveni regional de Kuwait
1981	Àfrica central i occidental: conveni de Abidjan
1981	Pacífic SE: Conveni de Lima
1982	Mar Roig i golf d'Aden: Conveni de Jeddah
1983	Regió del Carib: Conveni de Cartagena
1985	Àfrica oriental: Conveni de Nairobi
1986	Pacífic sud: Conveni de Noumea
1991	Protocol sobre protecció ambiental per a l'Antàrtic
1992	Declaració de París

A més d'aquests convenis, també s'han creat programes, com el programa MAST III (1994-98), per tal de fomentar el desenvolupament de mètodes que permetin la determinació dels contaminants per tal d'avaluar-ne la seva presència en el medi ambient, així com els efectes que tenen en els éssers vius que hi habiten.



En general, aquests mètodes analítics han de ser molt sensibles donat els baixos nivells de concentració en què es troben els diferents tipus de contaminants al medi marí. Per això, es basen principalment en una tècnica d'extracció i preconcentració acoblada a una tècnica cromatogràfica amb un sistema de detecció sensible i selectiva.

Pel que fa a les tècniques cromatogràfiques, tot i que hi ha alguna aplicació utilitzant l'electroforesi capil·lar (CE), els alts nivells de detecció obtinguts generalment amb aquesta tècnica fan que no sigui la més utilitzada. Així, les tècniques més emprades són la cromatografia de gasos (GC) i la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) en fase inversa. Aquesta última està essent cada vegada més emprada, degut a l'interès creixent en el desenvolupament de mètodes que permetin la determinació de compostos de característiques diferents, com per exemple els alteradors endocrins.

L'HPLC es pot aplicar a la determinació de contaminants utilitzant els detectors d'UV-visible. No obstant, tenint en compte els baixos nivells de concentració que s'han d'assolir en l'anàlisi de contaminants en mostres reals, aquesta tècnica de separació se sol acoblar a detectors més sensibles, com el detector de fluorescència (FLD) o l'espectrometria de masses (MS).

La tècnica d'extracció utilitzada depèn del tipus de mostra a analitzar. Per a l'anàlisi de l'aigua de mar, com en altres tipus de mostres aquoses, la tècnica d'extracció més emprada és l'extracció en fase sòlida (SPE), tot i que la microextracció en fase sòlida (SPME) també s'ha aplicat darrerament a aquest tipus de mostra. L'extracció líquid-líquid (LLE) s'utilitza cada vegada menys degut a l'elevat consum de solvents orgànics que requereix i al llarg temps que es necessita per a la separació de les fases aquosa i orgànica.

Pel que fa a les mostres de sediments marins i de teixits de peixos i altres éssers vius del medi marí, s'han utilitzat diferents tècniques, si bé les més habituals consisteixen en posar un solvent en contacte amb la mostra,

afavorint el procés d'extracció en alguns casos mitjançant l'ús ultrasons o microones o amb l'aportació de calor, com en el cas de l'extracció Soxhlet.

D'entre les espècies contaminants presents en l'aigua costanera, unes molt estudiades són els nutrients, especialment els nitrats i fosfats. Aquestes espècies es troben al medi marí degut a causes naturals, com a resultat de la descomposició de la matèria o la deposició des de l'atmosfera d'altres espècies que contenen nitrogen o fòsfor i que, en entrar al medi marí, es transformen en nitrats i fosfats. Però també poden tenir un origen antropogènic, ja que poden arribar al mar a través d'aigües residuals urbanes que continguin matèria orgànica rica en aquestes espècies, a més de detergents, colorants, perfums i altres substàncies, o a través dels rius o aqüífers, que transportin pesticides o adobs, entre d'altres [1]. L'augment d'aquests nutrients dóna lloc a un augment en el creixement del fitoplancton que es troba en el medi marí. Aquest procés, a més de variar la coloració de l'aigua i augmentar-ne la seva terbolesa, redueix l'oxigen dissolt a l'aigua degut a què, quan aquests organismes moren, s'enfonsen i són descomposats per acció dels bacteris aeròbics del fons marí. La disminució d'aquest oxigen, que és necessari per a la vida d'altres espècies que viuen en aquest medi, altera les cadenes alimentàries i disminueix la diversitat biològica. Aquest procés, anomenat eutrofització [6], és especialment important en mars que es troben tancats, com el mar Negre o el mar Bàltic [7]. Per exemple, en aquest últim, l'entrada de nutrients es va incrementar en més de sis vegades durant els anys 80, de manera que l'eutrofització ha augmentat en més d'un 70 % [2].

Unes altres espècies inorgàniques molt estudiades al medi marí són els metalls pesats, que es troben presents al medi marí com a resultat de processos naturals com l'erosió de roques o l'activitat volcànica, així com processos derivats d'activitats humanes, com per exemple el seu ús en la fabricació de pesticides.

L'interès per aquestes espècies va començar a tenir més rellevància arrel d'alguns incidents importants. Entre aquests, cal destacar el desastre de la Bahia de Minamata (Japó), que va començar a finals dels anys 30, quan una de les principals indústries químiques del Japó va començar a vessar directament en aquesta zona els catalitzadors esgotats, que contenien mercuri, principalment en forma de metilmercuri. Aquesta espècie s'anava acumulant en els peixos i moluscs que posteriorment eren consumits pels pescadors i les seves famílies. Com a conseqüència d'això, va tenir lloc una epidèmia d'intoxicació neurològica que va afectar a milers de persones i va causar centenars de morts [8].

L'assimilació d'aquests metalls en el medi marí té lloc mitjançant una sèrie de cicles naturals i depèn de molts factors, com per exemple el pH i la salinitat de l'aigua. Aquests metalls s'incorporen a les cadenes tròfiques i es van concentrant en diferents esglaons a través de diferents vies, com són la ingestió de vegetació o fauna contaminada o pel sistema respiratori fins que els sistemes d'excreció dels éssers vius són incapaços de realitzar l'eliminació d'aquestes espècies, de manera que apareixen els efectes nocius.

A més, s'ha de tenir en compte que la presència de partícules en suspensió a l'aigua procedents de les zones continentals facilita l'adsorció d'aquests contaminants sobre elles, de manera que la sedimentació d'aquestes partícules fa que aquests metalls s'acumulin en els sediments marins.

D'entre tots els metalls, són d'especial interès la plata, el coure, el cadmi o el plom, a més del mercuri, ja que són particularment tòxics [8-9] i s'han trobat en elevades quantitats en alguns mars, com el mar Bàltic [10].

Uns altres contaminants d'interès són els compostos organometàl·lics derivats de l'estany. D'entre ells, cal destacar el tributilestany (TBT) així com els seus productes de degradació, el dibutilestany (DBT) i el monobutilestany (MBT). Aquests compostos, comunament coneguts com

compostos de tributilestany (TBTs), van començar a utilitzar-se als anys 60 com a additius en les pintures emprades en els vaixells per evitar el creixement d'algues i altres organismes en aquelles zones que es troben en contacte amb l'aigua. Durant els anys 70 es van començar a observar casos d'alteracions de sexe d'alguns éssers marins. Tot i això, no va ser fins a finals dels anys 70 i inicis dels 80 que, amb el desenvolupament de les tècniques analítiques, es va començar a relacionar aquestes alteracions amb la presència d'aquests compostos al medi. A causa d'això, es van començar a desenvolupar normatives de caràcter regional que pretenien regular-ne el seu ús. Posteriorment, per tal d'unificar aquestes normatives, la Unió Europea (EU) va desenvolupar-ne una que prohibia l'ús de pintures que contenien aquests compostos en vaixells de menys de 25 m. Recentment, aquesta normativa ha estat substituïda per una altra que prohibeix l'ús d'aquestes pintures per a qualsevol tipus de vaixell [11].

Tot i la restricció en el seu ús, aquests compostos encara es troben presents al medi marí degut a la seva persistència, de manera que tant la seva presència com la seva toxicitat encara estan essent estudiades. Actualment i degut a aquesta toxicitat per al medi marí, aquests compostos estan inclosos a la llista de substàncies que produeixen alteracions en el sistema endocrí dels éssers vius que ha estat publicada per l'EU [12].

Degut a la restricció en l'ús dels TBTs, s'han buscat altres compostos que també permetin regular el creixement de les algues als vaixells. L'Irgarol 1051 va ser un dels primers compostos que es van utilitzar per a substituir els TBTs, tot i que també se n'utilitzen d'altres, entre els quals cal destacar el diuron, que, tot i que no és tan emprat com l'Irgarol 1051, és un herbicida molt utilitzat en agricultura.

Aquests compostos han estat molt estudiats, essent els dos compostos esmentats anteriorment els trobats amb més freqüència degut a què són molt utilitzats i són més persistents que altres compostos emprats amb la mateixa finalitat, com el diclofluanid, el clorotalonil o el Sea-Nine 211.

Actualment, l'Irgarol 1051 està inclòs a la llista de substàncies que estan essent estudiades per avaluar el seu possible efecte sobre el sistema endocrí dels éssers que habiten al medi marí, mentre que el diuron ja ha estat inclòs a la llista d'alteradors endocrins [12].

A més d'aquests compostos, al medi marí es pot trobar una gran varietat de contaminants orgànics derivats d'activitats antropogèniques. La majoria d'aquests contaminants entren, com s'ha comentat anteriorment, a través de corrents d'aigua, com per exemple els rius. No obstant, alguns estudis sobre la distribució de contaminants en els aerosols formats en la superfície dels mars i oceans han posat de manifest que la deposició de partícules sòlides que es troben a l'atmosfera i sobre les quals queden adsorbits alguns contaminants també contribueix a la contaminació marina [13].

En conseqüència, és en el medi aquós marí en el qual s'ha de trobar una major distribució d'aquest tipus de contaminants. No obstant això, l'efecte de la dilució del mar fa que els nivells de concentració en què es troben aquests contaminants siguin molt baixos. Això fa que es requereixin mètodes analítics molt sensibles, que permetin la determinació d'aquestes concentracions.

L'aplicació d'aquests mètodes ha permès la detecció d'una gran varietat de contaminants. D'entre ells, cal destacar, a més dels plaguicides antialgues esmentats anteriorment, els hidrocarburs aromàtics policíclics (PAHs) i els bifenils policlorats (PCBs), que pel seu caràcter cancerígen i d'alteradors endocrins i per la diversitat de fonts de contaminació en què es generen, han estat bastant estudiats en el medi marí. No obstant, la concentració en què es troben a l'aigua és baixa degut al seu caràcter hidrofòbic, que fa que quedin adsorbits a les partícules que es troben en suspensió, de manera que apareixen en més elevades concentracions als sediments, mostres en què han estat més estudiats.

Els benzensulfonats alquílics lineals (LAS) també han estat molt estudiats a l'aigua de mar, juntament amb els àcids sulfofenilcarboxílics, que són els seus productes de degradació, ja que aquests compostos són difícils d'eliminar en els processos de tractament de les aigües residuals.

A més d'aquests compostos, n'hi ha d'altres que, tot i que no han estat tan estudiats al medi marí, s'han trobat en algunes mostres. Entre ells, cal destacar alguns surfactants, com els etoxilats de nonilfenol (NPEO), alguns fenols, alguns ftalats i adipats, alguns compostos volàtils, com el ciclohexà o el toluè, i algunes drogues i productes utilitzats en la neteja personal, com són l'àcid clorhídric, el diclofenac, l'ibuprofen i la cafeïna, entre d'altres. A més dels antialgues, també es poden trobar altres plaguicides, com els hexaclorociclohexans (HCHs). A la Taula 3 es mostren alguns exemples dels nivells de concentració en què s'han trobat aquests compostos en mostres d'aigua de mar, ports o estuaris.

Pel que fa als sediments marins, la majoria de compostos que s'hi troben presents són el resultat de processos naturals, com l'erosió de les roques, o degut a la deposició de les partícules que es troben en suspensió a l'aigua de mar i sobre les quals queden adsorbides una sèrie de compostos que generalment presenten una certa hidrofobicitat. Entre aquests compostos, cal destacar, com s'ha esmentat anteriorment, els PAHs i els PCBs, que s'han trobat en molts estudis realitzats sobre aquest tipus de mostres. A més d'aquests compostos, però se n'han trobat altres, com per exemple, alguns LAS, alguns ftalats o alguns plaguicides. A la Taula 4 es mostren alguns exemples dels nivells de concentració trobats per a aquests compostos en mostres de sediments marins i d'estuaris.

**Taula 3.** Exemples de la presència de contaminants en mostres d'aigua de mar. Abreviacions no incloses al text: NP, nonilfenols; PCDDs: dibenzo-p-dioxines policlorades; PCDFs: dibenzofurans policlorats; DEET, N,N-dietiltoluenamida; DMPH, dimetilftalat; DEPH, dietilftalat; DBPH, di-n-butilftalat; EHPH, bis(2-etilhexil)ftalat; BBPH, benzilbutilftalat.

Mostra	Compostos	Concentracions	Referència
Oceà Àrtic	$\alpha$ - i $\gamma$ - HCHs	0.20-1.67 i 0.11-0.53 ng l <sup>-1</sup>	14
Estuari (Essex, UK)	Irgarol 1051, clorotalonil	016-0.68 i 0.36-1.38 $\mu\text{g l}^{-1}$	15
Costa de Catalunya i Almeria	Diuron, Irgarol 1051 i el producte de degradació, demetildiuron, Sea-Nine 211, diclofluamid	2-2190, 2-665, 120-440, 26-53, 2600-3700, 230-760 ng l <sup>-1</sup>	16
Platja de Castelldefels (Barcelona)	Fenol, 2,4,6-triclorofenol, o-clorofenol, 2,4-dimetilfenol, pentaclorofenol, 4-cloro-3- metilfenol, 2,4-diclorofenol	0.17-8.8 $\mu\text{g l}^{-1}$	17
Mar del Nord (Alemanya)	NP	1-33 ng l <sup>-1</sup>	18
Costa de Catalunya i Almeria	NPEO, NP i LAS	0.8-11, 0.3-4.1 i 2.4-92 $\mu\text{g l}^{-1}$	19
Port i platja de Barcelona	PCDDs i PCDFs	0.09-6.51 pg l <sup>-1</sup>	20
Port de Boston	Cafeïna	5.2-1600 ng l <sup>-1</sup>	21
Mar del Nord	Àcid clorofèbric, cafeïna, DEET	0.01-18.6, 2-16.1 i 0.03-1.09 ng l <sup>-1</sup>	22
Costa de Canàries	10 PAHs	0.06-0.27 $\mu\text{g l}^{-1}$	23
Port de Londres	DMPH, DEPH, DBPH, EHPH	0.3-31.7, 0.03-33.1, 2.8-121.9 i 0.06-197.6 $\mu\text{g l}^{-1}$	24
Port de Tarragona	BBPH, EHPH, DBPH	0.8, 0.12 i 0.48 $\mu\text{g l}^{-1}$	25

**Taula 4.** Exemples de la presència de contaminants en sediments marins i d'estuaris. Abreviacions no incloses al text: NP, nonilfenols; PCDDs: dibenzo-p-dioxines policlorades; PCDFs: dibenzofurans policlorats; DMPH, dimetilftalat; DEPH, dietilftalat; DiBPH, di-i-butilftalat; DBPH, di-n-butilftalat; BBPH, benzilbutilftalat.

Mostra	Compostos	Concentracions	Referència
Mar del Nord (Alemanya)	NPEO, NP i LAS	29-39, 10-153 i 72-106 ng g <sup>-1</sup>	18
Costa de Catalunya i Almeria	NPEO, NP i LAS	10-530, 15-1050 i 0.1-238 ng g <sup>-1</sup>	19
Mar del Sud de China	Dibenzotiofè	11-66 ng g <sup>-1</sup>	26
Costa de Canàries	10 PAHs	14-187 µg kg <sup>-1</sup>	23
Costa de Todos Santos (Mèxic)	16 PAHs	Suma total entre 7.6 i 813.1 ng g <sup>-1</sup>	27
Costa est del Mediterrani	24 PAHs	Suma total entre 2.22 i 1056.21 ng g <sup>-1</sup>	28
Costa de Catalunya	16 PAHs, 17 PCDDs i PCDFs, 12 PCBs	13.4-16.4, 0.71-17 i 1.1-311 ng g <sup>-1</sup>	29
Costa mediterrània de França	20 PCBs	Suma total entre 8.2 i 237 6 ng g <sup>-1</sup>	30
Mar del Japó	p,p'-DDT, p,p'-DDD, p,p'-DDE (DDTs) i α- i γ- HCHs	Suma total de DDTs i HCHs de 0.2-11.4 i 0.8-30.6 ng g <sup>-1</sup> respectivament	31
Costa de Preveza (Grècia)	Irgarol 1051	43 ng g <sup>-1</sup>	32
Estuari (Essex, UK)	Irgarol 1051, diclofluaniid, clorotalonil	3.2-222.3, 7.14-688.2 i 16-46.5 ng g <sup>-1</sup>	15
Port Inner, Vancouver (Canadà)	DMPH, DEPH, DiBPH, DnBPH, BBPH	Suma total entre 2 i 3.6 mg kg <sup>-1</sup>	33



## **I.2. APLICACIÓ DE TÈCNiques ACOBLADES A LA DETERMINACIÓ DE CONTAMINANTS**

Com s'ha comentat anteriorment, hi ha una gran varietat de contaminants presents en el medi ambient i que poden ser nocius i fins i tot tòxics per als éssers vius que habiten a les zones contaminades. No obstant, els baixos nivells de concentració en què es troben aquests compostos fa que sigui necessari el desenvolupament de mètodes analítics molt sensibles per a la seva determinació. Aquests mètodes es basen habitualment en una tècnica d'extracció i preconcentració acoblada a una tècnica de separació que permeti la separació dels diferents analits entre ells i d'altres substàncies interferents presents en la mostra, i a una tècnica de detecció que permeti detectar nivells molt baixos dels compostos estudiats.

En la present tesi, s'han seleccionat quatre famílies de compostos, el control de les quals és important al medi marí, ja sigui per la seva toxicitat o persistència al medi ambient o perquè la seva eliminació durant els processos de tractament de les aigües residuals és difícil, la qual cosa fa que siguin abocats al medi ambient. Aquestes famílies són els benzensulfonats i naftalensulfonats, els compostos aromàtics policíclics, els ftalats i adipats i els plaguicides antialgues.

A continuació, es fa un estudi bibliogràfic que pretén resumir l'aplicació de diferents tècniques acoblades a la determinació d'aquests compostos en mostres ambientals.

### **I.2.1. Benzensulfonats i naftalensulfonats**

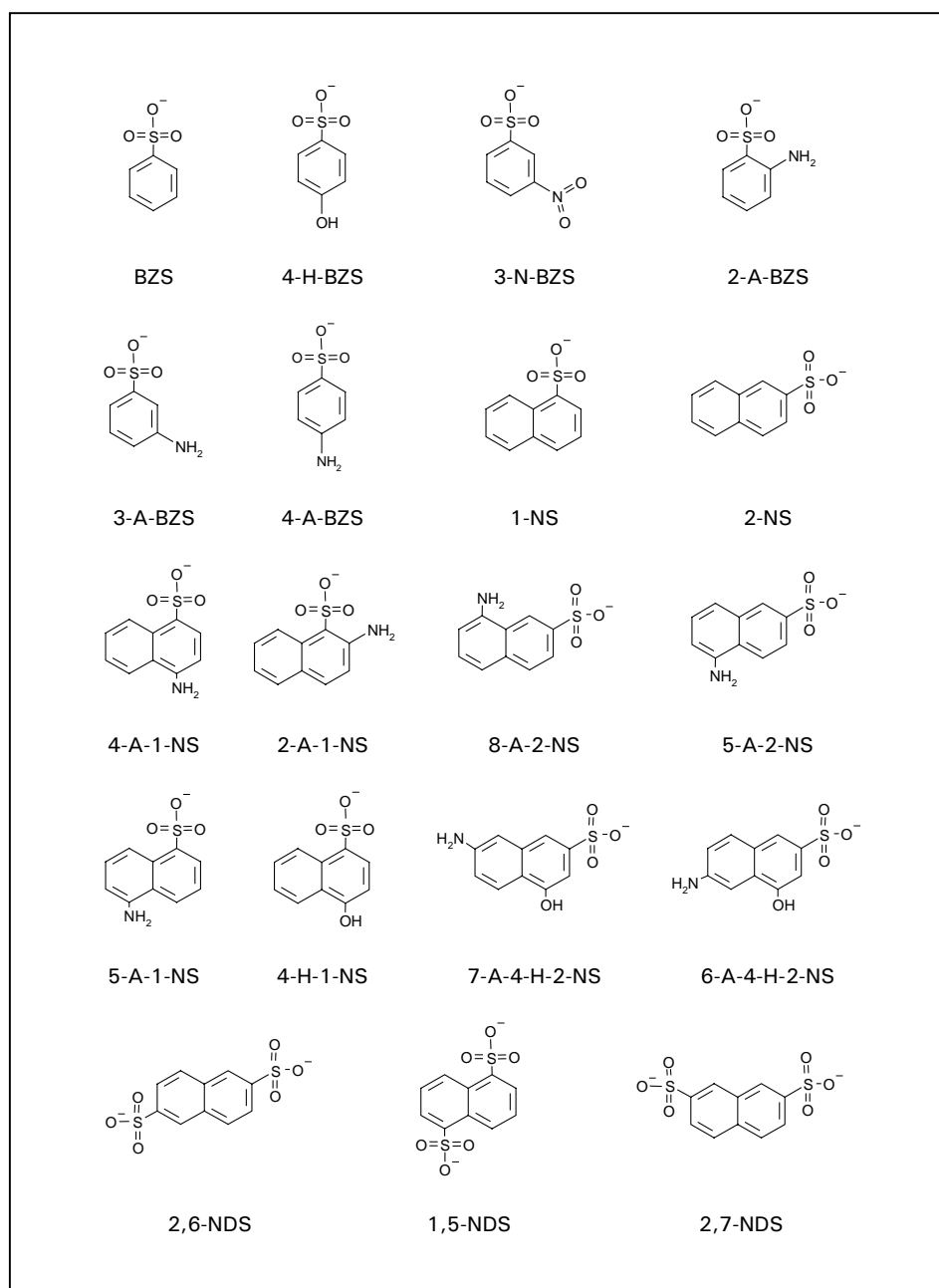
Dintre dels compostos aromàtics sulfonats, els benzensulfonats (BZS) i naftalensulfonats (NS) amb grups amino-, hidrox-, nitro- o sulfònic addicionals són molt utilitzats en la indústria com a productes intermedis en la síntesi de colorants, pigments i productes farmacèutics i agrícoles. Per

exemple, l'àcid 4-hidroxi-1-naftalensulfònic s'utilitza com a component d'unió en un ample interval de colorants tipus azo, mentre que l'àcid 3-nitrobenzensulfònic s'utilitza com a compost intermedi per a la síntesi de tints [34]. A la Figura 2 es mostren alguns dels compostos més utilitzats.

Una característica d'aquests compostos és la seva acidesa. En general, són compostos molt hidrofílics, amb constants d'acidesa molt baixes ( $pK_a < 1$ ), per la qual cosa són molt solubles en aigua. Tenen un baix coeficient de distribució n-octanol-aigua ( $\log K_{ow} < 2.2$ ) [35], de forma que la seva adsorció a la matèria orgànica és limitada, fet que fa que tinguin una mobilitat elevada. Això, juntament amb la seva baixa degradabilitat fa que siguin difícils d'eliminar durant els processos de tractament d'aigües residuals, sobretot aquells compostos que contenen grups amino-, hidroxi- o sulfònic addicionals [34]. Per això s'han trobat en diferents mostres ambientals, alguns exemples de les quals es mostren a la Taula 5.

Encara que aquests compostos fa temps que són utilitzats, la seva toxicitat no ha estat gaire estudiada. Tot i això, la seva baixa biodegradabilitat, sobretot en el cas dels compostos amb grups amino, fa que sigui interessant l'estudi de la seva presència al medi ambient, ja que podrien tenir una certa perillositat [35].

Les concentracions en què es troben aquests compostos en mostres reals són baixes, de manera que els mètodes desenvolupats per a la seva determinació, com en el cas de la majoria de contaminants orgànics presents al medi ambient, solen estar basats en una etapa d'extracció i concentració prèvia a una separació cromatogràfica.



**Figura 2.** Estructura d'alguns dels BZS i NS més utilitzats. Abreviatures no incloses al text: A, amino; H, hidroxí; N, nítr; NDS, naftalendisulfonat.

**Taula 5.** Exemples de determinació de BZS i NS quantificats en mostres ambientals. Abreviatures no incloses al text: A, amino; Cl, cloro; H, hidroxí; Me, metil; N, nitro; NDS, naftalendisulfonat; NTS, naftalentrissulfonat.

Mostra	Compostos	Concentració	Referència
Aigua de riu	5-N-2-Me-BZS, 2-A-5-Cl-4-Me-BZS, 1-NS, 2-NS, 1,5-NDS, 1,6-NDS, 1,7-NDS, 2,6-NDS, 2-A-1,5-NDS, 3-A-1,5-NDS, 2,7-NDS, 1,3,5-NTS, 1,3,6-NTS	0.02-5.6 µg l <sup>-1</sup>	36
	2-NS, 1,5-NDS, 1,6-NDS, 2,6-NDS, 2,7-NDS, 1,3,5-NTS, 1,3,6-NTS, 1,3,7-NTS	0.01-0.24 µg l <sup>-1</sup>	37
Aigua residual industrial no tractada	3-N-BZS, 4-Me-BZS, 4-Cl-BZS, 2-NS, 1-H-4-NS, 1-A-6-NS, 1-A-7-NS	0.8-2377 µg l <sup>-1</sup>	38
Efluent de depuradora	BZS, 3-N-BZS, 4-Me-BZS, 4-Cl-BZS, 1-NS, 2-NS	0.06-44.1 µg l <sup>-1</sup>	39
Lixiviats	1-NS, 2-NS, 1,5-NDS, 1,6-NDS, 2,7-NDS, 2-A-4,8-NDS	51-1188 µg l <sup>-1</sup>	40
Aigua de mar	1-NS, 2-NS	0.8 i 0.5 µg l <sup>-1</sup>	41
	BZS, 4-Me-BZS, 4-Cl-BZS, 3-N-BZS, 4-Cl-3-N-BZS, 1-NS, 2-NS, 1-A-5-NS, 1-A-4-NS, 1-A-6-NS, 2-A-1-NS, 1-A-7-NS, 1-H-6-A-3-NS	0.01-5.35 µg l <sup>-1</sup>	42

### I.2.1.1. Tècniques de separació

Per a la separació dels NS i BZS, s'han utilitzat la GC i CE, si bé la tècnica més utilitzada és l'HPLC en fase inversa utilitzant la formació de parells iònics (IPLC).

Tot i que s'han descrit algunes aplicacions, la GC no ha estat gaire utilitzada en la determinació de BZS i NS, degut a què aquests compostos són poc volàtils, la qual cosa fa que es necessiti una etapa de derivatització prèvia a

la separació cromatogràfica. Aquesta etapa es pot dur a terme mitjançant diferents processos com, per exemple, la desulfonació amb àcids o la formació de derivats amb dibutilamida [43], però solen ser processos llargs que incrementen de forma considerable el temps d'anàlisi [43]. Darrerament han aparegut alguns mètodes que permeten la derivatització *on-line*, disminuint així el temps d'aquesta etapa [44]. Tot i això, la derivatització es veu dificultada per la presència d'altres grups funcionals com grups amino- i hidroxil-, la qual cosa fa que aquesta tècnica tingui una limitada aplicació en la determinació de BZS i NS amb diferents característiques.

Pel que fa a la CE, les tècniques electroforètiques més utilitzades són l'electroforesi capil·lar per zones (CZE) [45-47] i la cromatografia micel·lar electrocinètica (MEKC) [48-50], tot i que també s'han descrit algunes aplicacions utilitzant l'electrocromatografia capil·lar (CEC) [51,52]. Els detectors més utilitzats amb aquestes tècniques són els d'UV-visible [50,53], si bé una limitació dels mètodes desenvolupats amb aquest detector són els elevats límits de detecció obtinguts. Per tal de disminuir aquests límits de detecció i aprofitant la propietat fluorescent dels analits, s'ha desenvolupat diferents mètodes emprant detectors de fluorescència [47,54] i de fluorescència induïda per làser (LIFD) [55,56]. El desenvolupament de nous sistemes d'acoblament també ha permès la utilització de l'espectrometria de masses amb electrospai (ES-MS) [39,57].

Una altra alternativa per disminuir els límits de detecció utilitzant la CE és l'aplicació d'algunes tècniques de preconcentració al capil·lar, com el *sample stacking* mitjançant la injecció de grans volums de mostra (LVSS) [58] o aplicat a la MEKC [50] o la isotacoforesi (ITP) [59,60]. Amb aquestes tècniques es pot arribar a tenir un augment del senyal de fins a 700 vegades respecte a l'obtingut amb la injecció hidrodinàmica habitual, la qual cosa permet la determinació dels compostos estudiats en algunes mostres reals que els continguin en concentracions de pocs  $\mu\text{g l}^{-1}$ .

De totes formes, la tècnica que més s'utilitza per a la separació de BZS i NS és l'HPLC [61]. Dintre d'aquesta, s'ha aplicat la cromatografia de bescanvi iònic [62-64], però aquesta tècnica permet separar millor els compostos monosulfonats que els que presenten més d'un grup sulfònic [65]. És per això que la tècnica més utilitzada és l'IPLC. Els reactius més utilitzats són el bromur de tetrabutilamoni [66], el sulfat de tetrabutilamoni [67] o el clorur de cetiltrimetilamoni [68]. La formació d'aquest parell iònic depèn, entre d'altres, del pH, de manera que és necessari l'ús de solucions tampó en la fase mòbil per tal de mantenir aquest paràmetre constant al llarg de l'anàlisi.

Amb l'IPLC, la detecció es pot dur a terme utilitzant un detector d'UV-visible [36,66,69]. Ara bé, una de les característiques d'aquest tipus de compostos és que són fluorescents, de manera que és aconsellable l'ús del FLD [34,67,70] degut a la major sensibilitat i selectivitat que presenta aquest tipus de detecció. La MS també és interessant com a tècnica de detecció, perquè a més de què és molt sensible i selectiva, permet la identificació i confirmació dels compostos en mostres reals. Aquest detector s'ha utilitzat amb diferents interfases, com per exemple la de feix de partícules (PB) [63], però la més habitual és l'electrosprai (ES) [34,42,71].

Si s'utilitza la MS com a tècnica de detecció, les sals adicionades a la fase mòbil per a formar el parell iònic amb els analits han de ser més volàtils que les emprades habitualment amb l'IPLC. S'ha descrit un sistema que, mitjançant la introducció d'un cartutx de bescanvi iònic prèviament a la interfase, permet l'eliminació d'aquestes sals abans de la detecció [72]. Tot i que aquest sistema és, per tant, compatible amb la MS, la solució més acceptada és l'ús de sals amb una major volatilitat. Per exemple, T. Storm *et al.* [71] van comparar tres amines volàtils, la trietilamina, la N,N-dimetil-n-butilamina i la tri-n-butilamina, per a la determinació d'un grup de compostos aromàtic sulfonats. Els resultats van ser bons per a les tres amines, si bé finalment es va triar la tercera degut a què permetia una millor separació dels compostos amb més d'un grup sulfònic. Altres treballs han fet servir la primera sal, obtenint també bons resultats [38,42].

### I.2.1.2. Tècniques d'extracció

La tècnica de preconcentració més utilitzada és la SPE en fase inversa [61]. Però, degut a les característiques polars d'aquests compostos, la retenció és baixa per a la majoria de sorbents, de manera que se sol afegir un agent de formació de parell iònic prèviament a la preconcentració de la mostra.

Inicialment, es van emprar sorbents de sílice enllaçada amb grups C<sub>18</sub> [70,73]. Però, tot i l'addició a la mostra del reactiu per formar el parell iònic, les recuperacions per als compostos més polars són baixes. Una alternativa per a millorar les recuperacions és saturar el cartutx amb l'agent generador del parell iònic, de manera que es genera una columna d'intercanvi iònic [74], però, si bé s'obtenen recuperacions millors, els volums de mostra a partir del qual els analits no queden suficientment retinguts en el sorbent, és a dir, els volums de ruptura, són baixos.

Els sorbents polimèrics també s'han aplicat a la determinació d'aquests compostos. Per exemple, s'han utilitzat polímers de poliestirè-divinilbenzè (PS-DVB), com el PLRP-s [41,66]. El Harrak *et al.* [66] van comparar el C<sub>18</sub> i el PLRP-s com a sorbents en la preconcentració en línia d'una barreja de NS i les recuperacions van ser millors per al sorbent polimèric. Però en utilitzar aquest polímer en l'anàlisi de mostres de riu, les recuperacions van disminuir considerablement, sobretot per als compostos més polars. Aquesta disminució es va atribuir a la presència de substàncies orgàniques i inorgàniques, que afecten a la formació del parell iònic, com s'ha vist en altres estudis [69].

Per tal d'intentar millorar les recuperacions en mostres reals, s'han aplicat els polímers altament entrecruats. Dintre d'aquests, els més utilitzats són els de PS-DVB, com el LiChrolut EN [34,47] i l'Isolute ENV+ [34,38,53]. Alonso *et al.* [34] van comparar aquests dos sorbents per a la SPE *off-line*. En aquest cas, no es formava el parell iònic abans de la preconcentració, sinó que aquest únicament s'utilitzava en l'etapa d'elució. En aquestes

condicions i per a un volum de mostra de 150 ml, van obtenir-se millors resultats per l'Isolute ENV +, sobretot per als compostos amb més d'un grup sulfònic. Un any més tard, Loos *et al.* [53] van dur a terme un estudi similar, incloent un altre polímer altament entrecreuat de PS-DVB, el HR-P, que té una àrea superficial superior als dos esmentats anteriorment, i en aquest cas, les recuperacions obtingudes van ser millors per al LiChrolut EN que per a l'Isolute ENV +. Aquest comportament diferent respecte al treball anterior es va atribuir a un canvi en el procés de síntesi del segon polímer, que anteriorment introduïa grups nitrogen addicionals, que augmentaven la retenció dels compostos. Tot i això, en aquest estudi els millors resultats es van obtenir per al HR-P, si bé tampoc s'aconseguia millorar la recuperació dels compostos que tenien més d'un grup sulfònic. Per tant, es va concloure que per a l'extracció eficaç d'aquests compostos s'ha d'afegir un reactiu generador del parell iònic a la mostra abans de la seva preconcentració.

També s'han utilitzat polímers altament entrecreuats que no es basen en PS-DVB. Aquest és el cas del Oasis HLB, que és un copolímer de divinilbenzè-N-vinilpirrolidona. Aquest polímer també es va incloure en el treball anterior [53], però tot i que es van obtenir bones recuperacions per a alguns compostos, els resultats en general van ser pitjors que per als altres polímers altament entrecreuats de PS-DVB avaluats. Els autors, però, apunten la possibilitat d'augmentar la quantitat de sorbent en els cartutxos, ja que els utilitzats en aquest estudi només contenien 60 mg de polímer.

A més dels polimèrics, també s'han utilitzat altres tipus de sorbents, com per exemple, alguns sorbents d'intercanvi iònic [75]. En aquest cas, es van obtenir bones recuperacions per als compostos monosulfonats, però les recuperacions per als compostos amb més d'un grup sulfònic van ser baixes. Un altre inconvenient quan s'utilitza aquest tipus de sorbents és que els volums de ruptura solen ser baixos [61].



També s'han aplicat els sorbents de carbó grafititzat per a la preconcentració de compostos aromàtics sulfonats [40,67]. Per exemple, Alterbach *et al.* [67] van utilitzar aquest tipus de sorbent per a la determinació d'un grup de compostos que inclou vint-i-sis BZS i NS amb grups metil, amino, hidroxil, carboxil, nitro, cloro i sulfònic addicionals. En aquest cas, les recuperacions per als compostos que contenen grups amino- i hidroxil- van ser baixes, tot i que es van obtenir recuperacions superiors al 86% per a la majoria dels compostos estudiats.

### **1.2.2. Compostos aromàtics policíclics**

Els compostos aromàtics policíclics (PACs) són un grup de compostos que es caracteritzen per tenir dos o més anells aromàtics fusionats en la seva estructura. Aquest grup engloba els hidrocarburs aromàtics policíclics (PAHs) i els seus derivats, tant aquells que contenen grups amino, alquil, carboxil o ciano, com els que inclouen àtoms d'oxigen, sofre o nitrogen en els seus anells.

Aquests compostos es formen generalment com a resultat de combustions incompletes de matèria orgànica que poden originar-se tant de forma natural (incendis forestals, erupcions volcàniques, etc.) com degut a l'activitat humana, com pot ser el consum de combustibles fòssils o la incineració de residus. En aquestes combustions, aquests compostos són alliberats directament a l'atmosfera on poden ser dispersats i transportats a llargues distàncies degut als vents i els corrents d'aire [76]. En l'atmosfera, aquests compostos es troben distribuïts entre la fase gas i les partícules, principalment en la fracció respirable (partícules menors de 5 µm), en funció de la seva volatilitat. Aquestes partícules són arrossegades per les gotes de pluja, com s'ha observat en alguns estudis en què s'ha detectat la presència d'aquests compostos [76], de manera que són introduïdes a les aigües superficials.

A més de la deposició atmosfèrica [77], els PACs també entren a la hidrosfera degut a descàrregues de residus municipals i industrials, entre d'altres. En els últims anys, s'han publicat nombrosos estudis sobre la presència dels PAHs en diferents tipus d'aigua i s'han trobat en aigües de depuradora [78], riu [79,80], llac [81,82] i mar [23,83].

Tot i que es troben en mostres aquoses, la concentració d'aquests compostos en aquest tipus de mostra sol ser baixa degut a què són poc solubles en aigua, la qual cosa fa que tendeixin a quedar adsorbits en les partícules que es troben en suspensió [84] i que són dipositades als sediments, com es demostra en alguns estudis sobre la distribució de PAHs a diferents profunditats en el mar, en què s'observa un augment de la concentració en la zona més pròxima al fons marí degut a una resuspensió d'aquests compostos des dels sediments [85].

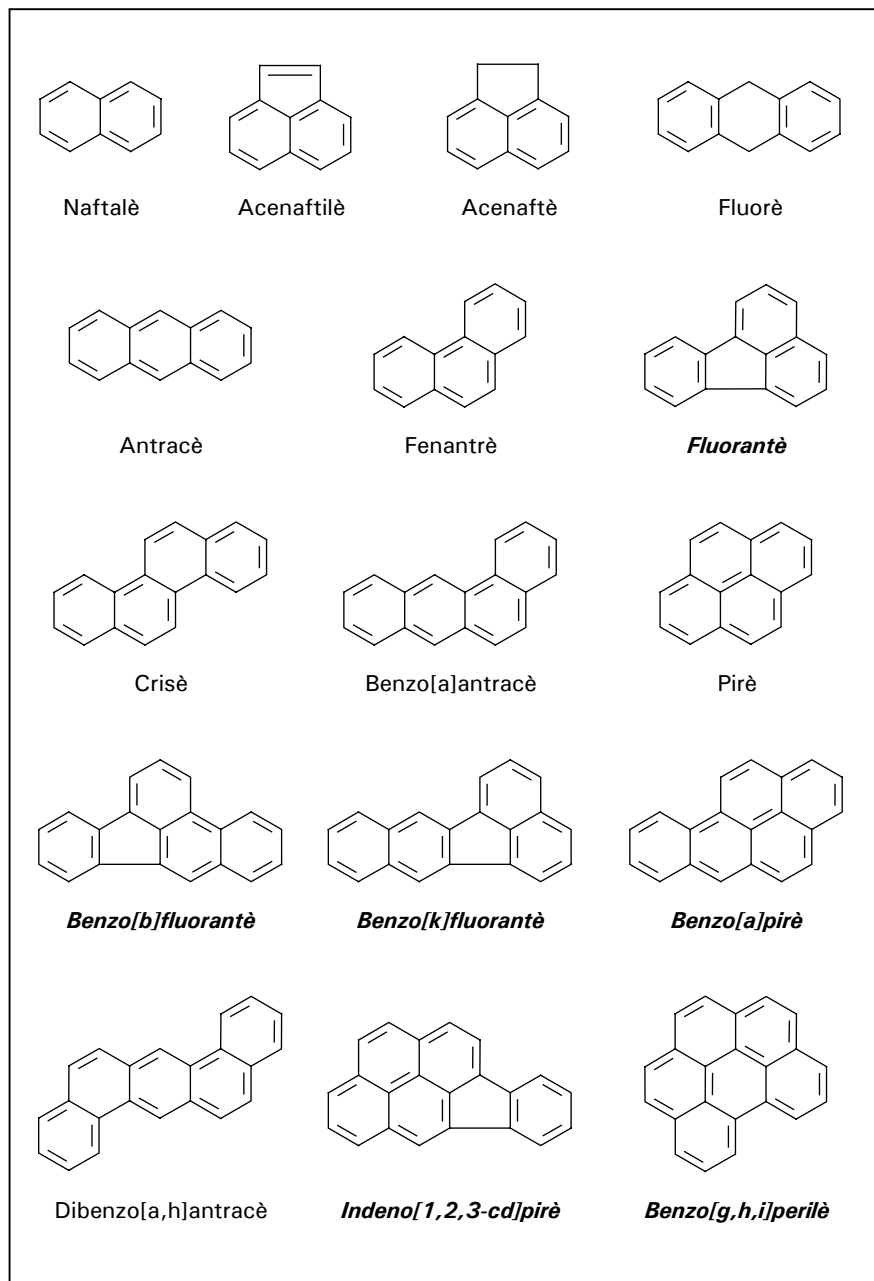
A la Taula 6 es mostren alguns exemples de mostres en les quals s'han quantificat alguns PAHs.

Pel que fa a la seva toxicitat, s'han realitzat diferents estudis sobre l'efecte en els éssers vius, sobretot en el cas dels PAHs. Aquests compostos presenten activitat cancerígena [7,90,91] i alguns d'ells són sospitosos de ser alteradors endocrins [12].

És per això que s'han desenvolupat diferents normatives per tal de regular-ne la seva emissió al medi ambient. En aquest sentit, la Unió Europea (EU) ha inclòs sis compostos en la llista de contaminants prioritars, limitant-ne la concentració en aigües destinades al consum humà a  $0.01 \mu\text{g l}^{-1}$  per al benzo[a]pirè i  $0.2 \mu\text{g l}^{-1}$  com a contingut de PAHs total [92]. Als Estats Units, l'Agència de Protecció Ambiental (EPA) ha inclòs un grup de PAHs, en aquests cas, setze, en la llista de contaminants prioritars [7]. A la Figura 3 es mostra l'estructura dels compostos regulats per aquestes institucions.

**Taula 6.** Exemples de determinació de PACs en mostres ambientals. Compostos: Np, naftalè; Acy, acenaftilè; Ace, acenaftè; F, fluorè; An, antracè; Fl, fluorantè; B[b]F, benzo[b]fluorè; Ph, fenantrè; B[a]An, benzo[a]antracè; B[b]Fl, benzo[b]fluorantè; B[k]Fl, benzo[k]fluorantè; Chry, crisè; Py, pirè; Pe: perilè; B[ghi]Pe, benzo[ghi]perilè; B[a]Py, benzo[a]pirè; B[e]Py, benzo[e]pirè; dB[a,h]An, dibenzo[a,h]antracè; dB[a,c]An, dibenzo[a,h]antracè; I[1,2,3-cd]Py, indeno[1,2,3-cd]pirè; 9-MeAn, 9-metilntracè; 1-MeNp, 1-metilnaftalè; 2-MeNp, 2-metilnaftalè.

Mostra	Compostos	Concentracions	Referència
Aigua de pluja	Ace, Fl, B[b]Fl, B[k]Fl, B[ghi]Pe, B[a]Py, I[1,2,3-cd]Py	1.5-75 ng l <sup>-1</sup>	80
	Np, F, An, Fl, Ph, B[a]An, B[b]Fl, B[k]Fl, Chry, Py, B[ghi]Pe, B[a]Py	2.5-540 ng l <sup>-1</sup>	86
Aigua de depuradora	Np, Ace, F, An, Fl, Ph, B[a]An, B[b]Fl, B[k]Fl, Chry, Py, B[ghi]Pe, B[a]Py, B[e]Py, dB[a,h]An, I[1,2,3-cd]Py	3-100 (entrada) i 6-100 (sortida) ng l <sup>-1</sup>	78
Aigua de riu	Np, Ace, F, An, Fl, Ph, B[a]An, B[b]Fl, B[k]Fl, Chry, Py, B[ghi]Pe, B[a]Py, dB[a,h]An, I[1,2,3-cd]Py	5-32.1 ng l <sup>-1</sup>	79
	Fl, B[b]Fl, B[k]Fl, B[ghi]Pe, B[a]Py, I[1,2,3-cd]Py	1.3-20 ng l <sup>-1</sup>	80
	F, An, Fl, Ph, Py, B[a]Py, I[1,2,3-cd]Py	0.1-58.8 ng l <sup>-1</sup>	87
Aigua de mar	Np, F, Fl, Ph, B[a]An, B[b]Fl, Py, B[ghi]Pe, B[a]Py	0.06-0.27 µg l <sup>-1</sup>	23
Sediments de llac	Np, F, An, Fl, Ph, B[a]An, B[b]Fl, B[k]Fl, Chry, Py, B[ghi]Pe, B[a]Py, dB[a,h]An, I[1,2,3-cd]Py	1-60 µg kg <sup>-1</sup>	82
Sediments marins	Np, F, Fl, Ph, B[a]An, B[b]Fl, Py, B[ghi]Pe, B[a]Py, 9-MeAn	14-187 µg kg <sup>-1</sup>	23
	Np, Ace, An, Fl, Ph, B[a]An, B[b]F, B[b]Fl, B[k]Fl, Chry, Py, B[ghi]Pe, B[a]Py, B[e]Py, dB[a,h]An, I[1,2,3-cd]Py, 1-MeNp, 2-MeNp	0.01-34 µg kg <sup>-1</sup>	88
Sòl	Np, F, Ph, B[a]An, B[b]Fl, Chry, Py, B[ghi]Pe, B[a]Py, I[1,2,3-cd]Py	3-9.65 µg g <sup>-1</sup>	89



**Figura 3.** Estructura dels compostos regulats per l'EPA en aigües de beguda. En negra i cursiva, es destaquen els compostos regulats per la UE.

Pel que fa al desenvolupament de mètodes analítics que permetin la seva determinació en mostres ambientals, un problema important és la pèrdua dels compostos en el mostreig i l'emmagatzemament degut a la seva hidrofobicitat, que fa que quedin retinguts a les parets del material amb què es troben en contacte. A més, es necessita una tècnica que permeti la seva extracció de forma eficaç i, si és possible, que elimini possibles substàncies interferents, així com l'aplicació d'una tècnica de separació compatible amb sistemes de detecció sensibles.

#### **1.2.2.1. Tècniques de separació**

Per a la determinació de PAHs, les dues tècniques de separació més utilitzades són l'HPLC i la GC, tot i que també s'han utilitzat la cromatografia de fluids supercrítics (SFC), la CE i la CEC.

Una tècnica de separació que s'ha aplicat a la determinació de PAHs és la SFC [93-95]. Però, tot i que permet la separació dels 16 PAHs regulats per l'EPA de forma ràpida, aquesta tècnica no s'utilitza tant com d'altres degut a la complexitat del sistema i a les poques avantatges que presenta front l'HPLC.

Les tècniques d'electroforesi també s'han aplicat a la determinació de PAHs, però, degut a la hidrofobicitat d'aquests compostos, la seva separació és difícil utilitzant, per exemple, la CZE [96]. Tot i això, s'han recollit alguns estudis aplicant la MEKC, tant en medi aquós [97,98] com no aquós amb l'addició d'alguns dels reactius convencionals emprats per a la separació en IPLC, com per exemple el bromur de tetrabutilamoní o el bromur tetraetilamoní [99]. També s'ha aplicat la CEC [100], si bé aquesta tècnica és bastant recent i encara no està gaire estesa. Pel que fa a la detecció, el detector d'UV-visible és el més utilitzat amb les tècniques d'electroforesi [98,99], tot i que per incrementar la sensibilitat del mètode, també s'ha aplicat el LIFD [97,100].

La GC és una tècnica molt utilitzada per a la determinació de PAHs. Per exemple, el mètode 610 de l'EPA [101] suggereix, a més de l'HPLC amb detecció UV-visible o fluorescència, la GC amb un detector d'ionització de flama (FID) per a la determinació dels 16 PAHs regulats per aquesta institució en aigües residuals, tot i que aquesta última tècnica no permet la separació completa de quatre parells de compostos (antracè-fenantrè, crisè-benzo[a]antracè, benzo[b]fluorantè-benzo[k]fluorantè i dibenzo[a,h]antracè-indeno[1,2,3-cd]pirè). Tot i que el FID s'ha utilitzat amb la GC per a la determinació de PAHs, el més utilitzat és la MS [87,102,103], degut a la baixa selectivitat del primer.

L'HPLC és la tècnica més usual per a la determinació de PAHs, degut a l'existència de columnes cromatogràfiques específiques que permeten la separació de tots els isòmers regulats per l'EPA, inclosos els parells de compostos que no es poden separar mitjançant la GC. La més utilitzada és l'HPLC en fase inversa [79,89,104], tot i que també s'han desenvolupat mètodes amb l'HPLC en fase normal [105,106] i l'HPLC miscel·lar [23,107]. Com a detectors, s'han utilitzat els d'UV-visible [89,104,108], si bé és més recomanable l'ús del FLD [79,82,109] degut a la seva sensibilitat i selectivitat. En aquest últim cas, però, l'acenaftilè dona un senyal baix, de forma que, per a aquest compost, es recomana el detector UV-visible [104].

Un altre detector que es pot utilitzar amb l'HPLC és l'electroquímic. Nirmaier *et al.* [80] van utilitzar-lo per a la determinació de vuit PAHs, inclòs l'acenaftilè, i van obtenir una sensibilitat superior (5-10 vegades) a l'obtinguda amb la detecció UV-visible.

La MS també s'ha utilitzat per a la determinació de PACs, realitzant l'acoblament amb l'HPLC mitjançant diferents tipus d'interfases. Per exemple, Anacleto *et al.* [110] van avaluar l'ús de la PB per a la determinació de diferents PACs en quitrà [110], però s'obtenien alts límits de detecció i les corbes de calibració obtingudes no eren lineals.

L'ES no és la interfase més adequada per a la determinació de PAHs degut a la baixa polaritat d'aquests compostos, que fa que sigui difícil la seva ionització amb aquesta interfase. No obstant, s'ha proposat la formació de complexos amb substàncies acceptores d'electrons, com per exemple el catió tropili [111] o la plata (I) [112], que es formen addicionant els reactius corresponents posteriorment a la separació i que permeten l'ús d'aquesta interfase per a la determinació d'aquests compostos.

La interfase més utilitzada per a l'acoblament de l'HPLC i la MS en la determinació de PAHs és la interfase d'ionització química a pressió atmosfèrica (APCI) [106,113,114]. En aquest cas, s'obtenen espectres que normalment contenen únicament l'ió molecular [114], ja que calen voltatges de fragmentació molt elevats per tal d'obtenir informació estructural [110]. A més de la difícil fragmentació, cal esmentar que alguns autors han descrit una disminució de la sensibilitat deguda a una baixa ionització dels compostos de pes molecular més alt quan aquests elueixen en fases mòbils que contenen un elevat percentatge de solvent orgànic [106,114].

Recentment, s'ha introduït una nova interfase, la de fotoionització a pressió atmosfèrica (APPI) [115], que permet millorar la ionització mitjançant la utilització d'una substància dopant que és ionitzada mitjançant l'aplicació de radiació UV i que produeix la ionització posterior dels analits. Aquesta interfase, que és, doncs, especialment indicada per a PAHs, s'ha aplicat a la determinació d'alguns compostos de baixa polaritat, incloent el naftalè, i s'ha obtingut una millor ionització que amb l'APCI [115].

#### **1.2.2.2. Tècniques d'extracció**

Els PAHs han estat molt estudiats tant en mostres aquoses com en mostres sòlides. Però, pel que fa als seus derivats, aquests no han estat gaire estudiats en mostres aquoses, probablement degut als baixos nivells de concentració en què es troben presents. A continuació, es descriuen algunes

de les tècniques més utilitzades en l'extracció dels PACs d'aquests tipus de mostres.

#### **1.2.2.2.1. Mostres aquoses**

Pel que fa a les mostres aquoses, s'han aplicat diferents tècniques, com per exemple la LLE, la SPME, l'extracció per sorció amb barres magnètiques agitadores (SBSE), l'extracció de fluids supercrítics (SFE) o l'extracció en punt de núvol (CPE), si bé la més utilitzada és la SPE.

La LLE és una de les tècniques utilitzades per a la determinació de PAHs, si bé cada vegada s'utilitza menys degut als seus desavantatges, esmentats anteriorment. Tot i això encara hi ha mètodes que utilitzen aquesta tècnica [23,116], inclòs el mètode 550 de l'EPA [117]. Els solvents més utilitzats són el n-hexà [23] i el diclorometà [102], però també s'han utilitzat altres solvents, com el benzè, toluè i ciclohexà [116]. Aquesta tècnica s'ha comparat, per exemple, amb la SPE amb C<sub>18</sub> [102] i, en aquest cas, es van obtenir millors recuperacions amb la SPE per als compostos de pes molecular més baix, mentre que per a la resta, es van obtenir millors resultats per a la LLE. No obstant això, la reproducibilitat del mètode va ser millor amb la SPE que amb la LLE, obtenint-se desviacions estàndard relatives (RSD) de 3-26% i 4-67%, respectivament.

En aquest últim estudi [102], també es va comparar la LLE i la SPE amb la SFE, que també s'ha utilitzat per a la determinació de PAHs. Els resultats obtinguts amb aquest últim tipus d'extracció van ser millors que amb la SPE per als PAHs d'alt pes molecular i millors que amb la LLE per als compostos de baix pes molecular, ja que es van obtenir recuperacions entre 40 i 61% per als compostos més volàtils, mentre que per a la resta de compostos van ser superiors al 66%. La reproducibilitat va ser millor que l'obtinguda amb la LLE, si bé lleugerament pitjor que l'obtinguda amb la SPE. Com a alternativa, també es va estudiar l'acoblament de la SPE amb la SFE i, tot i que



s'obtenen millors recuperacions per a alguns compostos que amb les altres tècniques, el mètode utilitzant aquest sistema no és tan repetitiu amb altres tècniques.

La SPME també s'ha utilitzat per a l'extracció d'aquests compostos [93,99,118,119]. R.-D. Doong *et al.* [118] van comparar cinc tipus de fibres diferents per a la determinació dels 16 PAHs regulats per l'EPA en aigües naturals, així com dos tipus de procediments per dur a terme l'extracció: la immersió directa de la fibra a la mostra i la SPME d'espai de cap (HS-SPME). Com a conclusió d'aquest estudi, els autors recomanen les fibres de polidimetilsiloxà (PDMS) de 100 µm i de poliacrilat (PA) de 85 µm. Aquesta última requeria temps més elevats per arribar a l'equilibri, però permetia obtenir recuperacions majors per als compostos de pes molecular més baix. Pel que fa als dos procediments de SPME, amb tots dos es van obtenir bons resultats.

La recentment desenvolupada SBSE també s'ha aplicat en la determinació d'aquests compostos. Per exemple, s'ha comparat aquesta tècnica amb la SPME convencional amb una fibra de PDMS de 100 µm utilitzant la desorció tèrmica en ambdós casos [120]. En aquest cas, els compostos estudiats eren els 16 PAHs regulats per l'EPA i es van obtenir recuperacions superiors per als compostos de pes molecular més baix utilitzant la nova tècnica, mentre que per a la resta, les recuperacions van ser similars. A més, amb la SBSE es va obtenir una reproduïbilitat millor que amb la SPME convencional.

Aquesta tècnica també es pot utilitzar realitzant la desorció amb un solvent orgànic. Popp *et al.* [121] van seleccionar aquesta tècnica juntament amb un sistema HPLC-FLD per tal de determinar els PAHs regulats per l'EPA, a excepció de l'acenaftilè. El solvent seleccionat va ser acetonitril i van utilitzar ultrasons per tal de millorar la desorció dels analits. En aquestes condicions, les recuperacions van ser entre 58 i 70% per a cinc dels quinze compostos estudiats, mentre que per a la resta van ser superiors al 70%.

A més d'aquestes tècniques d'extracció, n'hi ha d'altres que, si bé no són tan utilitzades, també s'han aplicat a la determinació de PAHs. Una d'aquestes tècniques és la CPE [122,123]. A l'hora d'aplicar aquesta tècnica, es poden utilitzar diferents tipus de surfactants. Els surfactants no iònics presenten una elevada absorció en la regió UV, de manera que el seu ús es limita a quan el detector emprat en el mètode analític no és un d'UV-visible, com per exemple un MS [109], a aquells casos en què s'utilitzen fases mòbils que contenen metanol i, per tant, que produeixen l'elució del surfactant abans que els analits, o quan s'afegeix una etapa de neteja que permet l'eliminació del surfactant prèviament a la injecció en el sistema cromatogràfic. També es pot diluir la fracció rica en surfactant amb una certa proporció de solvent orgànic. Una altra alternativa és l'ús de surfactants aniònics com el dodecilsulfat sòdic (SDS) o l'àcid dodecansulfònic (SDSA), que no interfereixen en el senyal dels analits, si bé els temps requerits per a la separació de les fases en l'etapa d'extracció són relativament llargs.

La tècnica d'extracció més utilitzada per a la determinació de PAHs en mostres aquoses és la SPE [61]. Ara bé, com s'ha esmentat anteriorment, un dels problemes que sorgeixen en la determinació d'aquests compostos és la seva tendència a quedar adsorbits als recipients que els contenen degut a la seva baixa solubilitat en aigua, la qual cosa dificulta la seva determinació, tant en el procés d'anàlisi com en l'etapa de mostreig i emmagatzemament de les mostres. Per tal d'evitar aquesta adsorció, se sol addicionar a la mostra un solvent orgànic, com per exemple acetonitril o 2-propanol, o alguns tensoactius, com el Brij-35. Però la quantitat addicionada d'aquestes substàncies influeix, no només en la solubilitat dels compostos, sinó també en el seu volum de ruptura [124].

Pel que fa als sorbents, els més utilitzats per a la preconcentració d'aquests compostos són els de sílice enllaçada amb grups  $C_{18}$  [79,80,104], tot i que també s'han utilitzat fases enllaçades amb grups ciano- i fenil- [102] i els sorbents polimèrics de PS-DVB, com per exemple el PLRPs [104] o les reïnes

XAD-2 [125]. El Harrak *et al.* [104] van comparar l'ús de discs de C<sub>18</sub> i PS-DVB per tal de determinar els 16 PAHs regulats per l'EPA. A més, en aquest treball també es va estudiar l'efecte de l'addició de diferents percentatges de 2-propanol o diferents concentracions d'un surfactant, el Brij-35, a les mostres abans de la seva preconcentració. En aquest cas, les millors recuperacions per a 1 l de mostra es van obtenir utilitzant els discs polimèrics i addicionant un 15% de 2-propanol abans de la seva extracció.

Els sorbents altament entrecreuat també s'han aplicat a la determinació d'aquests compostos [126,127]. Per exemple, Toribio *et al.* [127] van comparar la SPE acoblada en línia a la SFC utilitzant LiChrolut RP-18, LiChrolut EN, Isolute ENV+, PLRP-s i Envichrom P per a la determinació simultània de 35 compostos, incloent pesticides, fenols i els 8 PAHs de pes molecular més baix dels regulats per l'EPA. Per a un volum de mostra de 2 ml, les recuperacions obtingudes amb els diferents sorbents van ser similars per a la majoria dels PAHs, però en el cas del fluorè, s'obtenien recuperacions superiors al 96% amb l'Isolute ENV+ i el PLRP-s, mentre que per a la resta de sorbents, els resultats eren inferiors al 65%.

L'Oasis HLB, polímer altament entrecreuat de divinilbenzè-N-vinilpirrolidona, també s'ha utilitzat en l'extracció de PAHs, juntament amb altres compostos. S. Lacorte *et al.* [126] van desenvolupar un mètode basat en la GC i la MS (GC-MS) per a la determinació de 109 compostos inclosos en la llista de la directiva europea 76/464/CEE, incloent els sis PAHs regulats per l'EU, el naftalè i l'antracè. En aquest cas i mitjançant la preconcentració *off-line* d'un volum de mostra de 200 ml, les recuperacions obtingudes per als compostos de pes molecular més baix van ser d'aproximadament un 100%, mentre que per als compostos de pes molecular més alt les recuperacions van ser més baixes (48-75%). Tot i això, el seu ús pot ser molt útil en la determinació de PAHs juntament amb altres compostos, com es pot comprovar en aquest exemple.

Els immunosorbents també s'han aplicat a l'extracció d'aquests compostos. Per exemple, s'ha utilitzat un immunosorbent d'anti-fluorè immobilitzat en sílice en la SPE acoblada en línia a l'HPLC amb un FLD (HPLC-FLD) per a la determinació dels sis PAHs de pes molecular més baix dels compostos de l'EPA [128]. Per tal d'obtenir recuperacions adequades, es va provar l'ús de solvents orgànics i surfactants addicionats a la mostra abans de la seva preconcentració. Finalment, els millors resultats (recuperacions entre 15 i 65%) es van obtenir preconcentrant 20 ml de mostra que contenia Brij-35 en una concentració de  $3 \cdot 10^{-4}$  M. Els resultats es van comparar amb els obtinguts amb la preconcentració del mateix volum de mostra contenint un 10% d'acetonitril amb un sorbent polimèric (PRP-1). Tot i que les recuperacions obtingudes amb aquest sorbent polimèric (60-85%) van ser superiors que les obtingudes amb l'immunosorbent, la selectivitat d'aquest últim va permetre limitar l'efecte de la matriu en mostres relativament brutes com, per exemple, aigües residuals. Els autors també van proposar l'ús de barreges d'aquests immunosorbents per tal de millorar la recuperació dels compostos de pes molecular més alt.

#### **1.2.2.2. Mostres sòlides**

Pel que fa a l'anàlisi de mostres sòlides, s'han utilitzat diferents tècniques per a l'extracció de PAHs com, per exemple, l'extracció amb solvents, afavorint en alguns casos el procés amb l'ús d'ultrasons o microones, o mitjançant l'aportació de calor, com l'extracció Soxhlet. A més, també s'han utilitzat la SFE, l'extracció amb aigua subcrítica (SWE) i l'extracció accelerada amb solvent (ASE). Ara bé, degut a la complexitat d'aquest tipus de mostres, que solen contenir moltes altres substàncies que poden interferir en la determinació dels compostos d'interès, s'utilitza una etapa de neteja prèvia a la injecció cromatogràfica per tal d'eliminar aquests possibles interferents. La tècnica més utilitzada per realitzar aquesta neteja és la SPE amb un sorbent tipus  $C_{18}$  [89,129,130], tot i que també s'han aplicat els polimèrics com el PLRPs [103] o fins i tot alguns immunosorbents [131]. Si

els PAHs es determinen juntament amb altres compostos, com poden ser els PCBs, es realitza un procés de fraccionament i purificació mitjançant una separació amb cromatografia líquida, generalment utilitzant columnes reblertes d'alúmina [114] o sílica [132,133].

Prèviament al procés d'extracció, l'assecat de la mostra és important, ja que aquest afecta la concentració de PAHs. Berset *et al.* [133] van comparar tres tècniques per a realitzar aquest procés: l'assecat tèrmic, la liofilització i l'assecat químic. El primer és el més utilitzat, tot i que l'ús de temperatures superiors a 40 °C produeix la pèrdua d'alguns dels compostos més volàtils. L'ús de temperatures inferiors és una bona elecció, tot i que aquest procediment pot comportar problemes de contaminació de PAHs procedents de l'aire, especialment si la mostra conté els analits en concentracions molt baixes.

Pel que fa a la liofilització, és una tècnica més ràpida que l'assecat tèrmic i minimitza la contaminació de les mostres, tot i que també provoca la pèrdua parcial d'alguns dels compostos més volàtils, com per exemple el naftalè [133].

L'assecat químic consisteix en l'addició d'una substància higroscòpica a la mostra, generalment sulfat sòdic anhidre [133]. Tot i que el procés és molt ràpid, aquest procediment no s'utilitza molt, ja que dilueix la mostra.

Segons l'estudi de Berset *et al.* [133], els resultats obtinguts amb aquestes tres tècniques són similars per als compostos estudiats, si bé l'assecat químic dóna lloc a millors recuperacions per al naftalè.

Pel que fa a les tècniques d'extracció, una molt senzilla és posar en contacte un solvent orgànic amb la mostra sòlida, agitant la barreja per afavorir el contacte entre les dues fases. Aquesta tècnica s'ha aplicat a la determinació de PACs [103,134] i s'han obtingut bons resultats. Moltes vegades, però, s'utilitzen els ultrasons per tal d'afavorir l'extracció dels analits. Aquest

tipus d'extracció també s'ha utilitzat per a diferents mostres, com fangs residuals [114], sòls [89,94,133] i sediments [108]. Sun *et al.* [89] van comparar els resultats obtinguts amb l'extracció amb ultrasons utilitzant acetona com a solvent orgànic i els d'un procediment amb extracció Soxhlet i no només amb el procediment amb ultrasons es van obtenir millors recuperacions, sinó que el procés era molt més ràpid, a més d'utilitzar menys solvent orgànic.

Pel que fa als solvents, se n'han utilitzat diferents en aquest tipus d'extraccions. Per exemple, Sun *et al.* [89] van comparar l'ús de ciclohexà, 2-propanol, metanol, acetonitril, diclorometà i acetona per a l'extracció amb ultrasons de PAHs de sòls. Aquest últim va ser el que va donar lloc a millors resultats. També s'han utilitzat barreges de solvents com, per exemple, diclorometà:metanol 2:1 [135]. Pino *et al.* [136] han proposat també l'extracció amb ultrasons utilitzant un medi miscel·lar d'èter de polioxietilè 10 lauril com a alternativa a l'ús de solvents orgànics. Amb aquest mètode, s'obtenen recuperacions superiors al 86% per als compostos de pes molecular més elevat regulats per l'EPA, mentre que les recuperacions pel naftalè, acenaftè i acenaftilè són inferiors al 5%.

A més dels ultrasons, també s'ha fet servir l'extracció assistida amb microones (MAE) per afavorir el procés. Aquesta és una tècnica relativament recent, que ha permès obtenir bones recuperacions en l'extracció de PAHs de sòls [137] i sediments marins [138]. També s'ha utilitzat per a la determinació de PACs en sòls i partícules suspeses a l'aire urbà [129,139]. Els solvents que més s'utilitzen són diclorometà o acetona o barreges de solvents com, per exemple, metanol:acetona (1:1), hexà:acetona (1:1) o diclorometà:toluè (1:1) [140]. Pino *et al.* [141] van utilitzar el medi miscel·lar esmentat anteriorment i MAE, i van obtenir recuperacions més grans de 85% per als PAHs amb més de tres anells aromàtics. Com en el cas dels ultrasons, l'avantatge de la MAE respecte a altres tècniques, com l'extracció Soxhlet i la SFE, és la disminució del temps d'extracció [140].

Una tècnica molt utilitzada és l'extracció Soxhlet, que s'ha aplicat a la determinació de PAHs i altres PACs en diferents tipus de mostra, com partícules suspeses a l'aire [142], sòls [132,143] i sediments [23,144]. Però, com s'ha comentat anteriorment, un dels inconvenients d'aquesta tècnica és el temps necessari per realitzar aquest procés, que sol ser llarg. Per exemple, Leeming *et al.* [130] van utilitzar aquesta tècnica combinada amb una etapa de neteja posterior basada en una SPE amb C<sub>18</sub>. En aquest cas, l'extracció Soxhlet es va dur a terme amb 40 ml de diclorometà a 55°C durant 8 hores a 6 cicles per hora i les recuperacions obtingudes per als 10 compostos estudiats van ser superiors al 60%.

La CPE també s'ha utilitzat per a l'extracció de PAHs. Per exemple, Pino *et al.* [145] van aplicar aquesta tècnica a l'extracció d'aquests compostos de sediments marins utilitzant ultrasons i microones i en ambdós casos es van obtenir bones recuperacions per als PAHs amb més de tres anells aromàtics.

Una altra tècnica molt utilitzada en la determinació de PAHs és la SFE, majoritàriament amb diòxid de carboni [84,133,146]. En aquestes condicions, s'obtenen bones recuperacions per als PAHs de més baix pes molecular, mentre que per als de pes molecular més elevat s'obtenen recuperacions baixes degut a la solubilitat d'aquests compostos en el solvent supercrític. Per tal d'augmentar la recuperació d'aquests compostos, es poden addicionar alguns modificadors [133], com diclorometà o metanol, però en aquest cas, també augmenta la recuperació d'altres substàncies presents en la matriu de la mostra i que poden interferir en la determinació dels analits [146].

La SWE [147,148] i l'ASE [149,150], que permeten augmentar la solubilitat dels compostos augmentant la temperatura i la pressió però sense que el solvent arribi al punt de solvent supercrític, també s'han utilitzat per a l'extracció dels PAHs, obtenint-se bones recuperacions. Hawthorne *et al.* [146] van comparar aquestes dues tècniques amb la SFE amb diòxid de carboni pur i l'extracció Soxhlet amb una barreja de diclorometà-acetona 1:1.

Tot i que les diferències entre les recuperacions obtingudes amb les quatre tècniques van ser petites, els extractes obtinguts amb la SFE donaven lloc a cromatogrames amb menys substàncies interferents sense que es requerís cap etapa de neteja dels extractes abans de la seva injecció al sistema cromatogràfic.

### **1.2.3. Ftalats i adipats**

Els additius polimèrics són substàncies que s'afegeixen als polímers per tal de millorar les seves propietats i facilitar el seu processat. Depenent de la seva funció, se'n poden distingir diferents tipus, com per exemple els plastificants, que milloren la flexibilitat del polímer, els estabilitzants, que allarguen la vida útil del polímer, els lubricants, que disminueixen la viscositat del polímer durant el seu processat, o els colorants, que modifiquen la coloració del producte acabat [151].

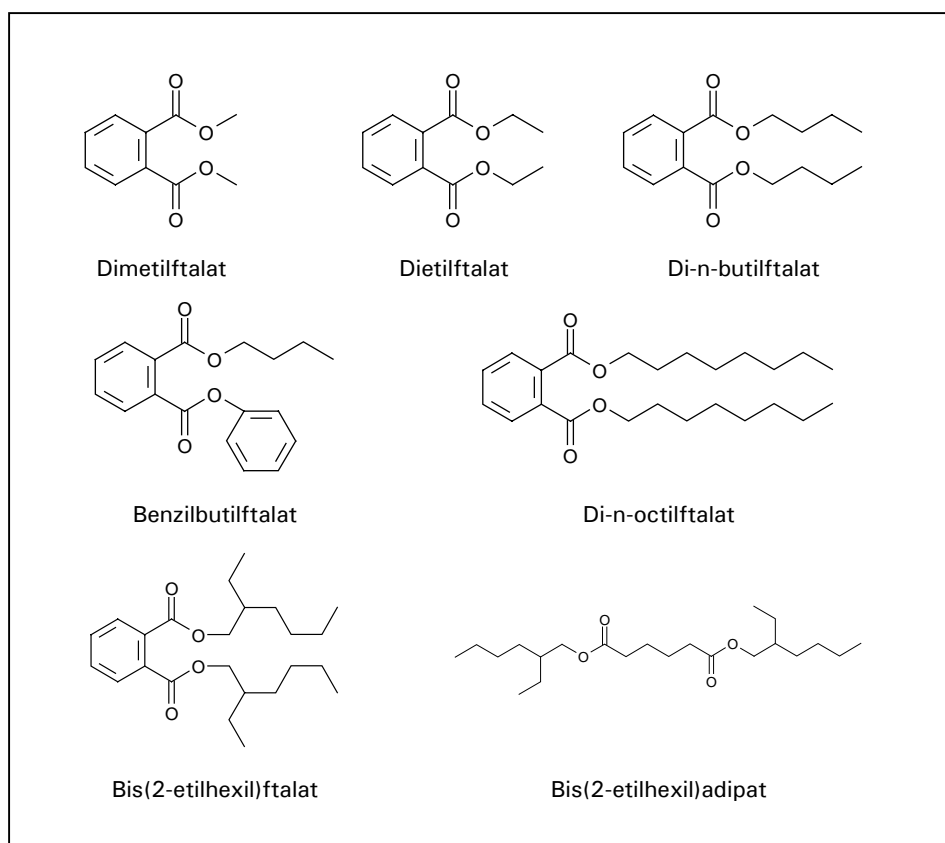
Entre els plastificants, els esters d'àcids ftàlics o ftalats són un dels grups de compostos més utilitzats [152]. El principal ús d'aquests compostos és donar flexibilitat als productes basats en el clorur de polivinil (PVC). De fet, més d'un 90% dels ftalats produïts a Europa s'utilitzen en la indústria del PVC [153]. Però aquests compostos també tenen altres aplicacions en la síntesi d'altres plàstics i polímers, per exemple, el di-n-butilftalat (DBPH) s'utilitza en la síntesi de reïnes epoxi, i el dimetilftalat (DMPH) i el dietilftalat (DEPH) s'utilitzen en els plàstics basats en esters de cel·lulosa [152]. A més de la indústria dels plàstics, aquests compostos tenen altres usos en la fabricació de cosmètics, pintures, alguns adhesius i lubricants per a automòbils. Per exemple, el DEPH s'utilitza com a solvent i vehicle per a ingredients cosmètics i fragàncies [154].

Tot i que els ftalats són molt utilitzats, també hi ha altres tipus de plastificants com, per exemple, els esters adípics o adipats [155]. Aquests compostos donen millors propietats a alguns polímers degut, entre d'altres,



a la seva baixa viscositat. És per això que moltes vegades s'utilitzen conjuntament amb els ftalats per obtenir un compromís en les propietats del polímer resultant. Per exemple, el bis(2-etilhexil)adipat (BEHA) també s'utilitza molt en les formulacions de pesticides, pintures i cosmètics [156].

Com a exemple, a la Figura 4 es mostren les estructures d'alguns dels plastificants més utilitzats a la indústria.



**Figura 4.** Estructura d'alguns dels plastificants més utilitzats.

Aquests compostos són, en general, poc solubles en aigua i bastant lipofílics. Degut a aquestes propietats i a la seva estesa utilització, aquests compostos s'han trobat en diferents tipus de mostres, alguns exemples de les quals es mostren a la Taula 7. No obstant, la seva presència en aigües costaneres no ha estat tan estudiada com en altres tipus de mostra. També es pot observar que hi ha una sèrie de compostos que són més estudiats que els altres, degut a la seva toxicitat o a la seva presència en una gran varietat de mostres.

Pel que fa a la seva toxicitat, diferents estudis han revelat que alguns d'aquests compostos són cancerígens. A més, compostos com el DBPH, el bis(2-etilhexil)ftalat (EHPH) i el benzilbutilftalat (BBPH) són alteradors endocrins segons l'última Comunicació de la Comissió de l'EU referent a aquest tipus de substàncies [12], si bé alguns altres, com el BEHA o el di-n-octilftalat (DOPH), entre d'altres, també estan essent estudiats i són sospitosos de tenir aquest tipus d'efectes. Degut a la seva toxicitat l'EPA ha establert una concentració màxima admissible en aigua potable de  $6 \mu\text{g l}^{-1}$  per al EHPH i  $0.4 \text{ mg l}^{-1}$  per al BEHA [165]. En el cas de l'EU, si bé encara no s'han establert uns nivells de concentració, l'EHPH ha estat inclòs a la llista de substàncies prioritàries en matèria de política d'aigües [166].

Un dels principals problemes en la determinació d'aquests compostos és el risc de contaminació durant les diferents etapes del mètode [167], ja que molt del material utilitzat per dur a terme l'anàlisi de mostres ambientals conté plàstic. En general, es recomana utilitzar mètodes tan simples i ràpids com sigui possible, evitant en la mesura del possible l'ús de material de plàstic i netejant i desactivant el material de vidre utilitzat. Tot i això, els mètodes estan basats en una etapa d'extracció degut a les baixes concentracions en què es troben en el medi ambient i una etapa de separació cromatogràfica. En aquests casos, es recomana injectar en el sistema cromatogràfic una única alíquota de cada extracte per tal de minimitzar la contaminació a causa dels septums. En aquells casos en que s'hagin de dur a terme més d'una injecció, es recomana la preparació de

diferents vials que continguin diferents alíquotes de l'extracte d'interès [167].

**Taula 7.** Exemples de determinació de ftalats i adipats en mostres ambientals. Abreviatures dels compostos no incloses al text: DiBPH, di-iso-butilftalat.

Mostra	Compostos quantificats	Concentracions	Referència
Aigua mineral	DBPH, EHPH	0.18-9.78 $\mu\text{g l}^{-1}$	157
	DBPH, EHPH	0.19-0.52 $\mu\text{g l}^{-1}$	158
Aigua de l'aixeta	DBPH, EHPH, BEHA	0.02-0.3 $\mu\text{g l}^{-1}$	25
	DMPH, DEPH, BBPH, DBPH, EHPH	0.002-0.66 $\mu\text{g l}^{-1}$	157
	DMPH, DEPH, DBPH, EHPH	0.02-9.26 $\mu\text{g l}^{-1}$	158
	DMPH, DEPH, DBPH, EHPH	0.03-75.6 $\mu\text{g l}^{-1}$	24
Aigua de riu	BBPH, DBPH	0.08 $\mu\text{g l}^{-1}$	25
	DEPH, DBPH, EHPH	0.4-1.1 $\mu\text{g l}^{-1}$	156
Aigua de llac	DEPH, DBPH, EHPH	0.02-0.4 $\mu\text{g l}^{-1}$	159
Aigua costanera	DMPH, DEPH, DBPH, EHPH	0.03-1028.1 $\mu\text{g l}^{-1}$	24
	BBPH, DBPH, EHPH	0.08-0.48 $\mu\text{g l}^{-1}$	25
	DMPH, DEPH, BBPH, DBPH, EHPH, DOPH, BEHA	0.5-3.2 $\mu\text{g l}^{-1}$	156
Efluents industrials	DEPH, DBPH	0.23-2.02 $\mu\text{g l}^{-1}$	160
	DMPH, DBPH, EHPH	0.66-3 $\mu\text{g l}^{-1}$	161
Sediments de llac	EHPH	6.5-29.7 $\text{mg kg}^{-1}$	162
Sediments de riu	DMPH, BBPH, DBPH, EHPH, DOPH	16-620 $\mu\text{g kg}^{-1}$	163
Sediments portuaris	DEPH, DBPH, DiBPH, EHPH	2-20 $\text{ng g}^{-1}$	88
Peix	DBPH, DOPH	1.3-1.8 $\text{mg kg}^{-1}$	164

### I.2.3.1. Tècniques de separació

La GC és la tècnica de separació més utilitzada per a la determinació de ftalats. Amb aquesta tècnica, el detector més habitual és la MS [168-170] degut a la seva selectivitat. També s'han utilitzat el detector de captura electrònica (ECD) [157,159] o el FID [158,171]. Per exemple, el mètode 8061A de l'EPA proposa la combinació de GC i ECD per a la determinació de ftalats en mostres aquoses i sòlides, incloent aigua superficial, lixiviats, sòl, aigües residuals i sediments [172].

En el cas de què es vulgui utilitzar aquesta tècnica per a la determinació simultània dels diesters, monoesters i l'àcid ftàlic, es requereix una derivatització prèvia, per exemple amb tetrametilsilà (TMS) [173].

No obstant, la GC té algunes limitacions [33]. Una d'elles és la necessitat d'utilitzar sistemes de neteja dels extractes obtinguts en les etapes d'extracció prèvies a la separació cromatogràfica, sobretot en el cas de mostres complexes com sediments o sòls, la qual cosa augmenta el risc de contaminació anteriorment esmentat. A més, en el cas dels ftalats, l'ús de la MS amb ionització per impacte electrònic dona lloc a espectres característics que contenen majoritàriament l'ió  $m/z = 149$ , corresponent a l'anhídrid ftàlic, la qual cosa pot ser una limitació a l'hora d'identificar i quantificar barreges d'aquests compostos que continguin diferents cadenes alquíliques i que coelueixin, degut a la falta de fragments que permetin la confirmació de la seva estructura.

És per això que l'HPLC s'utilitza cada vegada més en la determinació d'aquests additius polimèrics, sobretot quan es pretén determinar simultàniament compostos que pertanyen a diferents famílies, com és el cas de la determinació d'alteradors endocrins. Per exemple, aquesta tècnica s'ha utilitzat en la determinació de contaminants orgànics en aigües residuals provenint de la indústria [161,174]. Pel que fa a la detecció, s'ha utilitzat el detector d'UV-visible [175,176], però el detector més utilitzat és la MS. La

interfase més emprada per a l'acoblament d'aquesta tècnica de detecció amb l'HPLC és l'APCI [161,177], tot i que l'ES s'ha utilitzat en algunes aplicacions. Per exemple, Lin *et al.* [33] van emprar aquesta última tècnica, però, en aquest cas, el senyal obtingut de l'ió  $[M+H]^+$  era molt feble, mentre que s'obtenia un senyal abundant corresponent a l'aducte  $[M+Na]^+$ , de manera que els autors proposaven l'addició d'acetat sòdic a la fase mòbil del sistema cromatogràfic per tal de produir la supressió del primer ió i que l'aducte passés a ser el pic base. En aquestes condicions, els límits de detecció van ser comparables als obtinguts amb GC-MS.

K. Inoue *et al.* [178] també van emprar l'ES per a la determinació de DEPH i mono(2-etilhexil)ftalat (MEHPH) en mostres de plasma humà. En aquest cas, la fase mòbil contenia únicament acetonitril i aigua acidificada amb àcid fòrmic, i els ions monitoritzats van ser  $[M+H]^+$  i  $[M-H]^-$ , respectivament. En aquestes condicions i utilitzant una SPE acoblada en línia a la separació cromatogràfica, els límits de detecció obtinguts per al DEPH i MEHPH van ser de 10 i 1  $\mu\text{g l}^{-1}$  respectivament.

### 1.2.3.2. Tècniques d'extracció

Com s'ha esmentat anteriorment, un dels principals problemes en la determinació d'aquests compostos és el risc de contaminació durant les diferents etapes del mètode, sobretot en les etapes prèvies a la separació cromatogràfica [167]. És per això que en l'etapa d'extracció s'ha d'evitar qualsevol contacte amb material que contingui plàstic i netejar i desactivar el material de vidre utilitzat. A més, es recomana restringir l'ús d'etapes de neteja dels extractes obtinguts en l'etapa d'extracció únicament a aquells casos en què siguin estrictament necessàries. Generalment, aquesta neteja només es realitza en el cas de mostres sòlides, com sediments o sòls, degut a la seva complexitat.

### I.2.3.2.1. Mostres aquoses

Pel que fa a l'extracció dels ftalats i adipats de mostres aquoses, s'han utilitzat diferents tècniques. Per exemple, la LLE s'ha aplicat a l'extracció dels ftalats utilitzant diferents solvents. El més usual és el n-hexà [164,179], si bé hi ha alguns treballs que utilitzen una barreja de n-hexà i acetat d'etil en diferents proporcions [180,181]. Amb aquesta tècnica s'obtenen recuperacions superiors al 70% per als ftalats més estudiats. Però, com s'ha comentat anteriorment, l'ús d'elevats volums de solvents orgànics i l'elevat risc de contaminació que presenta aquesta tècnica ha fet que es busquin tècniques alternatives. Per intentar disminuir els volum de solvent orgànic utilitzat, Holadová *et al.* [179] han aplicat la microextracció líquid-líquid (LLME) utilitzant isooctà com a solvent, però amb aquesta tècnica les recuperacions obtingudes per als compostos més polars, com el DMPH i DEPH, són baixes (4 i 42%, respectivament).

També s'ha aplicat la SPE amb diferents tipus de sorbents a la determinació d'additius polimèrics en mostres aquoses. S'han utilitzat, per exemple, els sorbents de sílice enllaçada amb diferents grups. Ritsema *et al.* [159] van utilitzar-ne un amb C<sub>8</sub> i van obtenir recuperacions superiors al 83% per als sis ftalats estudiats en preconcentrar un volum de mostra de 500 ml. També s'han utilitzat sorbents de sílice enllaçada amb C<sub>18</sub> (ENVI C<sub>18</sub>) per a 2 l de mostra [24] i es van obtenir recuperacions similars a les obtingudes en el treball anterior. Holadová *et al.* [179] van comparar el sorbent C<sub>8</sub> amb el C<sub>18</sub> (Bakerbond) en l'extracció de sis ftalats i els resultats van ser similars per a un volum de mostra de 200 ml, excepte en el cas dels compostos menys polars (EHPH i DOPH), per als quals es van obtenir recuperacions inferiors al 30%.

A més dels sorbents de sílice enllaçada, també s'han utilitzat els sorbents polimèrics. Per exemple, Brossa *et al.* [25] van aplicar el PLRP-s per a l'extracció acoblada en línia a la GC d'una barreja d'alteradors endocrins, incloent alguns ftalats i el BEHA. En aquest cas, es van observar problemes

d'adsorció dels compostos en el sistema degut a la seva hidrofobicitat. Per tal d'evitar l'adsorció, els autors proposen l'addició d'un 50% de metanol a la mostra abans de la seva preconcentració, obtenint-se així recuperacions superiors als 42% per als plastificants en preconcentrar 15 ml de mostra.

Els sorbents polimèrics altament entrecreuat com, per exemple, el LiChrolut EN [161,177] i l'Isolute ENV+ [175], també s'han utilitzat en la determinació d'additius polimèrics en mostres aquoses, sobretot a l'hora de determinar aquests compostos juntament amb altres famílies de compostos, com és el cas dels alteradors endocrins. Per exemple, el LiChrolut EN s'ha aplicat a la determinació de contaminants orgànics en efluent industrial, incloent alguns ftalats [177]. En aquest cas, es van obtenir recuperacions per als ftalats estudiats (DMPH, DBPH i EHPH) d'entre 54 i 69% preconcentrant 300 ml de mostra. Jara *et al.* [175] van desenvolupar un mètode amb l'Isolute ENV+ per a l'anàlisi de mostres d'aigua d'aquari. En aquest cas i degut a la baixa solubilitat d'aquests compostos a l'aigua, els autors van proposar l'addició de solvents orgànics, com el metanol, a la mostra abans de la seva preconcentració.

Recentment, Casajuana *et al.* [182] han comparat l'Oasis amb el sorbent de sílice enllaçada amb C<sub>18</sub> convencional per a l'extracció de cinc ftalats, juntament amb el nonilfenol, el bisfenol A i el bisfenol A diglicilèter, d'aigua embotellada. Pel que fa als ftalats, les millors recuperacions, obtingudes amb el sorbent C<sub>18</sub>, van ser superiors al 68% per a tots els compostos estudiats, excepte per al EHPH, per al qual la recuperació va ser de 42% en preconcentrar 200 ml de mostra.

La SPME també s'ha utilitzat per a l'extracció d'additius polimèrics de mostres aquoses. Pel que fa a les fibres emprades, s'han realitzat diferents estudis de comparació. Per exemple, Peñalver *et al.* [156] van comparar les fibres de PDMS de 30 µm, de polidimetilsiloxà-divinilbenzè (PDMS-DVB) de 65 µm, de carbowax-divinilbenzè (CWX-DVB) de 65 µm, de carboxen-divinilbenzè (CX-DVB) de 75 µm i de PA de 85 µm per a l'extracció de sis ftalats i el BEHA.

D'aquestes fibres, es va seleccionar la segona degut als bons resultats obtinguts. Prokupková *et al.* [157] també va comparar les fibres de PDMS de 7 µm, 30 µm i 100 µm amb la de PA de 85 µm. En aquest cas, aquesta última va ser seleccionada, ja que amb ella s'obtenien els millors resultats per als compostos més polars i de polaritat moderada. Luks-Betlej *et al.* [170] van comparar les fibres de PDMS de 7 µm i de 100 µm, de PA de 85 µm, de PDMS-DVB de 65 µm, de divinilbenzè-Carboxen-polimetilsiloxà (DVB-CX-PDMS) de 30-50 µm i de CWX-DVB de 70 µm. Finalment, els autors recomanen les fibres que contenen la fase de divinilbenzè i, especialment, la fibra de CWX-DVB, ja que amb aquesta última la repetitivitat de les extraccions és major.

A més de la SPME convencional, també s'ha aplicat la SPME *in-tube*. Saito *et al.* [183] van comparar capil·lars d'extracció amb tres configuracions diferents d'aquesta tècnica: la configuració *in-tube* convencional i les anomenades *wire-in-tube* i *fiber-in-tube*. Els millors resultats es van obtenir amb aquesta última, que consisteix en disposar longitudinalment una sèrie de filaments polimèrics a l'interior d'un tub PEEK. Aquest sistema, acoblat en línia a HPLC-UV, es va aplicar a la determinació de DBPH i EPH en aigua de depuradora i els límits de quantificació obtinguts van ser de 0.1 i 0.5 ng ml<sup>-1</sup> respectivament.

#### 1.2.3.2.2. Mostres sòlides

Pel que fa a l'anàlisi de mostres sòlides, s'ha utilitzat l'extracció Soxhlet amb diclorometà [163] o ciclohexà:acetat d'etil 98.5+100 (v/v) [184] i la SFE amb diòxid de carboni [162]. Però el mètode més utilitzat per la seva simplicitat és l'extracció amb solvents orgànics sense aportació de calor [159,167], moltes vegades utilitzant els ultrasons per afavorir l'extracció [33,181]. Per a això, s'han utilitzat diferents solvents com l'acetat d'etil [167], i diferents barreges de solvents, com hexà:acetona 50:50 [181] o 2:1 [179], diclorometà:hexà 1:1 [33,185] o diclorometà:dietilèter 1:2 [186].



Degut a la complexitat d'aquest tipus de mostra, tot i que no és recomanable per evitar la possible contaminació, és bastant habitual incloure una etapa de neteja dels extractes abans de la seva injecció en el sistema cromatogràfic. Per dur a terme aquesta neteja, s'utilitzen els sistemes recomanats per l'EPA (mètodes 3610, 3620 i 3640) [187]. Aquests mètodes utilitzen columnes d'Alúmina i de Florisil. El mètode 3640 utilitza el fraccionament amb cromatografia de permeació en gel (GPC). Aquests mètodes s'han utilitzat, per exemple, per a la determinació de plastificants en sediments marins [33] o mostres vegetals [179].

Petrovic *et al.* [188] van utilitzar l'extracció amb una barreja de metanol:diclormetà 7:3 (v/v) i ultrasons seguida d'una etapa de neteja basada en la SPE amb cartutxos C<sub>18</sub> per a la determinació de DEPH, DBPH i EPHH, juntament amb altres compostos alteradors endocrins, en mostres de llots de plantes municipals de tractament de residus. Amb aquest sistema, les recuperacions obtingudes per als ftalats estudiats van ser superiors al 78%.

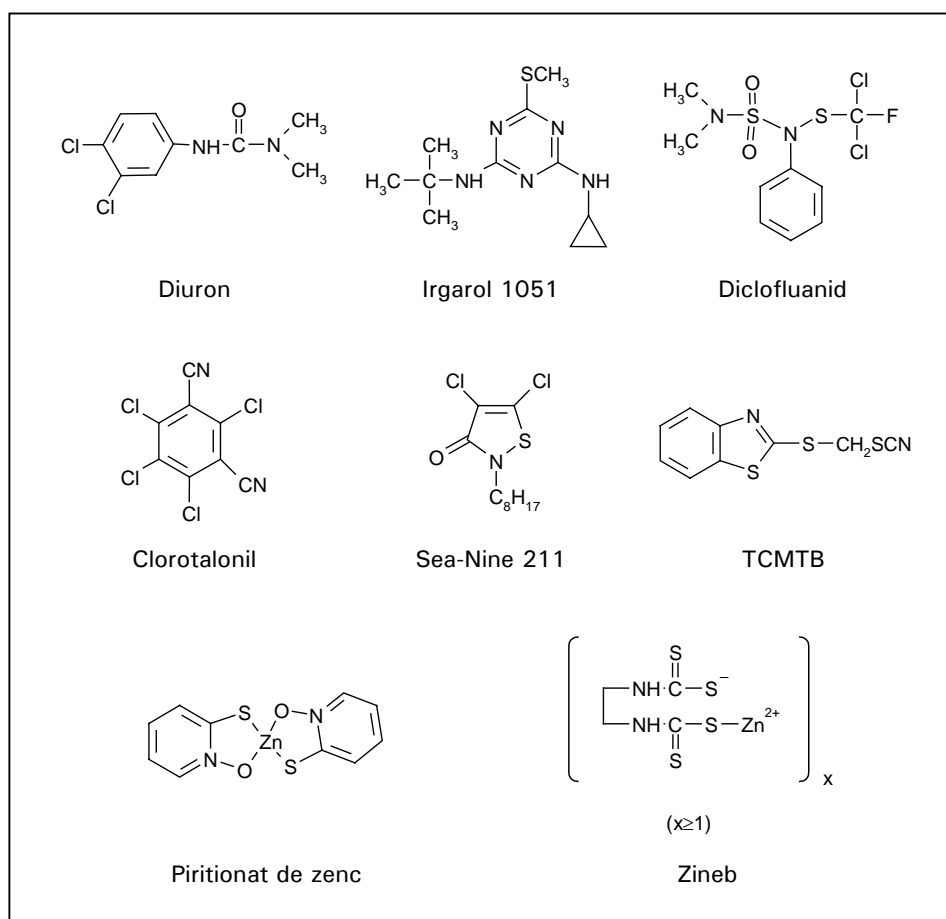
#### **1.2.4. Plaguicides antialgues**

Els plaguicides antialgues són una família de compostos que s'afegeixen a les pintures utilitzades per a cobrir les superfícies dels vaixells que es troben en contacte amb l'aigua per tal d'evitar el creixement d'algues i altres microorganismes. Aquest grup comprèn alguns fungicides, com el clorotalonil, el diclofluanid i el (2-tiocianometiltio)benzotiazol (TCMTB), i alguns herbicides, com els TBTs, l'Irgarol 1051, el diuron i el Sea-Nine 211 [189].

Com s'ha comentat a l'apartat 1.1, fins a finals dels anys 80, els antialgues més utilitzats eren els TBTs. Però degut a la seva toxicitat, l'EU va prohibir el seu ús en aquells vaixells que tenien una eslora menor de 25 m.

Recentment, ja ha entrat en vigor a l'EU una nova regulació que prohibeix totalment l'ús d'aquests plaguicides [11].

És per això que es van buscar altres compostos per tal de substituir als anteriors. Actualment, s'utilitzen uns divuit compostos com a additius per a les pintures amb aquesta finalitat [190]. Les estructures dels més utilitzats es mostren a la Figura 5.



**Figura 5.** Estructura dels antialgues més utilitzats com a additius en pintures per a vaixells.

Aquests compostos, com en el cas dels TBTs, també poden ser tòxics per al medi ambient si es troben a elevades concentracions. De fet, l'EU ha inclòs compostos com el diuron, el Ziram i el Tiram en la llista d'alteradors endocrins inclosa en l'última Comunicació de la Comissió de l'EU referent a aquest tipus de substàncies [12] degut als efectes produïts per aquests compostos en els organismes del medi ambient marí.

Pel que fa a la degradació, sembla que la majoria de compostos, com el clorotalonil, diclofluanid i el Sea-Nine 211, es degraden de forma ràpida, tot i que l'Irgarol 1051 i el diuron són més persistents [191,192]. No obstant, s'ha de tenir en compte que hi ha pocs estudis que avaluin la presència i toxicitat dels productes de degradació. En un d'aquests, Tixier *et al.* [193] van estudiar la toxicitat d'alguns dels productes de degradació del diuron mitjançant el test Microtox i van concloure que aquests últims eren més tòxics que el diuron. Fernández-Alba *et al.* [189] van realitzar un estudi similar per a l'Irgarol 1051 i el diuron utilitzant altres tests. Per al primer, els resultats obtinguts per al seu principal producte de degradació, el 2-metiltio-4-tert-butilamino-6-amino-s-atrazina, indiquen que aquest compost és tan bactericida com l'Irgarol 1051.

És per això que darrerament ha augmentat l'interès per avaluar la seva presència en mostres mediambientals, especialment en ports, ja que en aquestes zones es realitzen les operacions de pintura dels cascs dels vaixells, on hi romanen durant un cert temps, la qual cosa afavoreix l'alliberament d'aquestes substàncies al medi, a més de què l'aigua sol tenir poca circulació en aquestes zones, la qual cosa afavoreix l'acumulació de contaminants. A la Taula 8 es mostren alguns exemples d'estudis sobre la presència d'aquests compostos en mostres marines. Aquests estudis s'han realitzat bàsicament en mostres aquoses, degut a què són compostos bastant solubles en aigua, de manera que no tenen una elevada tendència a quedar adsorbits en els sediments. Per exemple, s'estima que només un 4.4% de l'Irgarol 1051 present en aigües de port és susceptible d'aparèixer

en els sediments [190]. Tot i això, també hi ha alguns estudis sobre la presència d'aquests contaminants en sediments.

**Taula 8.** Exemples de determinació d'antialgues en mostres ambientals.

Mostres aquoses	Compostos quantificats (concentració)	Referència
Ports en el mar Mediterrani (Espanya)	Diuron (2-2190 ng l <sup>-1</sup> ), Irgarol 1051 (2-665 ng l <sup>-1</sup> ), Sea-Nine 211 (2600-3700 ng l <sup>-1</sup> ), diclofluanid (230-760 ng l <sup>-1</sup> ) i productes de degradació del diuron (26-53 ng l <sup>-1</sup> ) i l'Irgarol 1051 (120-440 ng l <sup>-1</sup> )	16
Estuari del riu Crouch (Anglaterra)	Diuron (0.6-117 ng l <sup>-1</sup> ) i Irgarol 1051 (1.2-1426 ng l <sup>-1</sup> )	194
Estuari del riu Humber (Anglaterra)	Irgarol 1051 (1-39 ng l <sup>-1</sup> )	195
Llac Geneva (Suècia)	Irgarol 1051 (2.5-145 ng l <sup>-1</sup> )	196
Ports de Japó	Irgarol 1051 (19.5-264 ng l <sup>-1</sup> )	197
Ports del mar del Nord i mar Bàltic (Alemanya)	Irgarol 1051 (11-170 ng l <sup>-1</sup> )	198
Ports en el Mar Mediterrani (Côte d'Azur)	Irgarol 1051 (1.8-640 ng l <sup>-1</sup> )	199
Ports de la costa oest de Japó	Diuron (0.030-3.054 µg l <sup>-1</sup> ) i Irgarol 1051 (0.010-0.262 µg l <sup>-1</sup> )	200
<b>Sediments</b>		
Ports de UK	Irgarol 1051 (10-132 ng g <sup>-1</sup> )	190
Llac Geneva (Suècia)	Irgarol 1051 (2.5-8 ng g <sup>-1</sup> )	196
Ports del Mar del Nord i mar Bàltic (Alemanya)	Irgarol 1051 (3-220 ng g <sup>-1</sup> )	198

Com es pot veure en aquesta taula, un dels antialgues que es troben habitualment en el medi marí és l'Irgarol 1051, ja que aquest compost és un

dels més utilitzats. El diuron és un altre compost que apareix de forma freqüent a les mostres. Tot i que aquest compost no s'utilitza tant com l'Irgarol 1051, s'ha de tenir en compte que és un herbicida molt emprat en l'agricultura, de manera que la seva presència també és deguda a l'abocament d'aquest compost des dels rius.

En el cas de compostos que apareixen de forma continuada en les mostres ambientals, a més d'avaluar la seva presència de forma puntual, també és interessant determinar la variació de la concentració al llarg del temps, per tal d'evitar l'aparició d'aquests contaminants en concentracions que siguin tòxiques per als éssers del medi. En el cas dels plaguicides antialgues, en alguns estudis [198,201] s'ha observat un augment de la concentració d'aquests compostos al final de la primavera i a l'estiu, ja que en aquestes èpoques hi ha una major activitat en els ports degut a què molts vaixells són pintats. Per tant, és important realitzar estudis de monitorització de la concentració d'aquests compostos.

#### **1.2.4.1. Tècniques de separació**

En la determinació dels plaguicides antialgues, l'elecció de la tècnica de separació utilitzada, habitualment la GC o l'HPLC, depèn dels compostos estudiats, ja que alguns d'ells no es poden determinar mitjançant la GC.

La GC s'ha utilitzat en la determinació d'aquests compostos, habitualment amb MS com a sistema de detecció [202-204], tot i que també hi ha alguns estudis emprant tàndem MS [205,206], un detector de nitrogen-fòsfor (NPD) [199,207] o un FID [198]. Amb aquesta tècnica es poden determinar compostos com l'Irgarol 1051, el diclofluanid o el Sea-Nine 211, entre d'altres. Però hi ha compostos, com el diuron, que són difícils de determinar mitjançant la GC degut a que es descomposen ràpidament a causa de les elevades temperatures [208-210]. Per tal de determinar aquest compost amb aquesta tècnica, es pot utilitzar una derivatització prèvia mitjançant, per

exemple, una metilació [202]. No obstant, l'alternativa més usual és l'anàlisi per HPLC, ja que aquesta tècnica permet la separació i detecció de la majoria dels antialgues.

L'HPLC s'ha utilitzat per a la determinació de diferents compostos amb detectors UV-visible [211-214], però l'ús de la MS ha augmentat en els últims anys pels avantatges esmentats en els apartats anteriors. L'acoblament entre l'HPLC i la MS se sol dur a terme mitjançant l'APCI [201,211,215], tot i que Piedra *et al.* [209] van utilitzar l'ES per a la determinació de sis antialgues. També hi ha algunes aplicacions utilitzant tàndem MS [212,216].

#### **1.2.4.2. Tècniques d'extracció**

Com s'ha comentat anteriorment, la presència dels antialgues s'estudia habitualment en mostres aquoses, tot i que alguns autors també han estudiat la presència d'aquests compostos en sediments, com es mostra a la Taula 8. A continuació, es descriuen les tècniques més utilitzades en l'extracció d'aquests compostos de diferents tipus de mostres.

##### **1.2.4.2.1. Mostres aquoses**

Com per a la resta de compostos estudiats en la present tesi, s'han emprat diferents tècniques d'extracció per a la determinació dels plaguicides antialgues.

Per exemple, la LLE s'ha utilitzat en diferents estudis per a la determinació d'aquests compostos en mostres costaneres [202,207,217]. Per exemple, Tolosa *et al.* [207] van desenvolupar un mètode per a la determinació dels TBTs i l'Irgarol 1051 realitzant simultàniament la derivatització dels TBTs i l'extracció amb diclormetà, obtenint una recuperació del 88% per a l'Irgarol

1051. Amb aquest solvent, Voulvoulis *et al.* [202] també van extreure el diuron, l'Irgarol 1051, el diclofluanid i el clorotalonil de mostres d'aigua de mar, obtenint recuperacions superiors al 90%.

La SPME també s'ha utilitzat per a la determinació d'antialgues en mostres aquoses. Peñalver *et al.* [218] van utilitzar una fibra de PA de 85 µm per a extreure l'Irgarol 1051, el diclofluanid i el 4-cloro-3-metilfenol. Lambropoulou *et al.* [219] van comparar diferents fibres per a la determinació de l'Irgarol 1051 i el Sea-Nine 211 utilitzant la HS-SPME. Les fibres estudiades van ser les de PDMS de 100 µm, de PDMS-DVB de 65 µm, de CWX-DVB de 65 µm i de PA de 85 µm. En aquest cas, els autors proposen la fibra de PDMS-DVB, amb la qual obtenien recuperacions superiors al 82%. En aquestes condicions, la repetitivitat del mètode va ser bona, obtenint RSD inferiors al 15% per a tres replicats.

Tot i que s'han utilitzat les tècniques esmentades anteriorment, la més emprada per a l'extracció d'aquests compostos és la SPE, utilitzant diferents tipus de sorbents. Un dels sorbents més utilitzats són els de sílice enllaçada amb grups C<sub>18</sub>, tant en cartutxos [196,198,215] com en discs [199,214]. Per exemple, Thomas [215] va utilitzar aquest sorbent en cartutxos per a la determinació de diuron, Kathon 5287, TCMTB i 2,3,5,6-tetracloro-4-metilsulfonyl de piridina (TCMS piridina) i es van obtenir recuperacions superiors al 91% preconcentrant 2.7 l d'aigua de mar.

També s'han utilitzat sorbents polimèrics de PS-DVB [203,205,211]. Pocurull *et al.* [203] van utilitzar el PLRP-s en la SPE acoblada en línia a la GC per a la determinació de diclofluanid, Irgarol 1051 i 4-cloro-3-metilfenol de mostres d'aigua de mar. En aquest cas, es va observar l'adsorció dels analits en el sistema i es va optar per addicionar un 10% de metanol a les mostres abans de la seva preconcentració, a més d'un 1% d'àcid acètic per tal de tenir els compostos de forma neutra. En aquestes condicions, es van obtenir recuperacions superiors al 67% per a un volum de 10 ml d'aigua de mar.

Els sorbents de PS-DVB també s'han utilitzat en format de disc. Per exemple, Steen *et al.* [205] van utilitzar discs d'aquest sorbent per a l'extracció de l'Irgarol 1051 de 200 ml d'aigua de riu i es va obtenir una recuperació del 101%.

Ferrer *et al.* [211] van comparar el sorbent de sílice enllaçada amb grups C<sub>18</sub> amb el PLRP-s per a la SPE en línia a HPLC de 5 antialgues (clorotalonil, diclofluanid, diuron, Irgarol 1051 i TCMTB). Per a un volum de 100 ml d'aigua de mar, les recuperacions obtingudes amb els dos sorbents van ser superiors al 63%, excepte per al diclofluanid, per al qual es van obtenir recuperacions inferiors al 10%. Finalment, els autors van triar el sorbent polimèric, ja que la recuperació obtinguda per al clorotalonil era superior que en el cas d'utilitzar l'altre sorbent.

Darrerament, també s'han aplicat els sorbents polimèrics altament entrecruats a la determinació dels antialgues en mostres aquoses. Per exemple, en diferents estudis, s'han utilitzat el LiChrolut EN [201,216], l'Isolute ENV+ [201,209,217] i l'Oasis HLB [204,206]. Martínez *et al.* [201] han comparat el LiChrolut EN i l'Isolute ENV+ per a l'extracció de diferents antialgues i alguns dels seus productes de degradació en mostres d'aigua de mar. En aquest cas, els resultats per a 500 ml de mostra van ser millors utilitzant l'Isolute ENV+, ja que s'obtenien recuperacions superiors al 92% per a sis dels nou compostos estudiats, mentre que per al clorotalonil i el TCMTB van ser inferiors al 20%. Els autors suposen que una de les raons que expliquen aquestes baixes recuperacions és la pèrdua d'aquests compostos en el procés d'evaporació de solvent que es realitzava posteriorment a l'etapa de preconcentració. Pel que fa al diclofluanid, amb aquest sorbent va ser recuperat en un 52%, mentre que amb el LiChrolut EN, la recuperació va ser del 20%.

En general, amb els sorbents altament entrecruats s'obtenen millors recuperacions que els altres sorbents. Piedra *et al.* [209] van comparar el C<sub>18</sub>, l'Isolute ENV+ i l'Oasis HLB per a l'extracció de sis antialgues i es van



obtenir millors resultats amb aquest últim, ja que, preconcentrant 600 ml d'aigua de mar, s'obtenen recuperacions superiors al 82%, excepte en el cas del Sea-Nine 211 i el diclofluanid (recuperacions del 46 i 40%, respectivament).

L'EnviCarb, un sorbent de carbó negre grafititzat, també s'ha comparat amb els polímers altament entrecreuats abans esmentats [201,209]. Martínez *et al.* [201] van obtenir resultats considerablement millors amb aquest tipus de sorbent que amb d'altres (recuperacions superiors al 76%, inclòs el diclofluanid), però, contràriament, Piedra *et al.* [209] van obtenir recuperacions inferiors al 76% per a tots els compostos estudiats, sense aconseguir retenir el diclofluanid.

A més d'aquests sorbents, també s'han aplicat els immunosorbents per a l'extracció d'antialgues i herbicides [220,221]. Per exemple, Ferrer *et al.* [221] van aplicar la SPE acoblada en línia a la HPLC emprant cartutxos amb 80 mg de sílice i 2 mg d'anticossos d'anti-atrazina i d'anti-clortoluron per a l'extracció d'una barreja de plaguicides de mostres d'aigua de mar i d'estuari i van obtenir recuperacions de 91 i 86% per al diuron i l'Irgarol 1051, respectivament.

#### **1.2.4.2.2. Mostres sòlides**

Per a l'extracció d'antialgues de mostres sòlides s'ha utilitzat l'extracció Soxhlet amb metanol [221] o acetona [198], si bé es prefereix posar directament en contacte un solvent orgànic amb la mostra sense aportar calor degut a què el procés és més senzill i ràpid. En aquest últim cas, s'han utilitzat barreges d'hexà:acetona 85:15 [196] o amb acetona:diclorometà 6:5, seguit per èter de petroli com a etapa de neteja [202], obtenint bons resultats en ambdós casos.

Lambropoulou *et al.* [32] van utilitzar l'extracció amb solvents i ultrasons combinada amb una SPME emprant fibres de PDMS de 100 µm. Com a solvent, els autors proposen l'acetona, però abans d'aplicar la SPME, l'extracte és concentrat mitjançant un corrent de nitrogen i seguidament es dilueix amb aigua destil·lada (pH 4) per tal d'obtenir un contingut d'acetona final d'un 5%. Aquest mètode es va aplicar a la determinació de clorotalonil, diclofluanid, Sea-Nine 211 i Irgarol 1051 en sediments marins i es van obtenir recuperacions superiors al 75% en tots els casos.

Com s'ha comentat en els apartats anteriors, degut a la complexitat de la mostra, en molts casos es requereix un sistema de neteja dels extractes previ a la injecció en el sistema cromatogràfic. Els sistemes més habituals per dur a terme aquest procés són les columnes de Florisil [196] i d'Alúmina [198]. Com a alternativa, Ferrer *et al.* [221] van utilitzar la SPE amb immunosorbents com a etapa de neteja per a la determinació d'una barreja de plaguicides, incloent l'Irgarol 1051 i el diuron, en sediment d'estuaris, i les recuperacions obtingudes per a aquests dos antialgues van ser de 86 i 91%, respectivament.

Carrasco *et al.* [222] van desenvolupar un mètode per a la determinació d'Irgarol 1051 en sediments marins utilitzant la SFE com a tècnica d'extracció i la cromatografia d'immunoafinitat com a sistema de neteja previ a la injecció cromatogràfica. En aquest estudi es va comparar la SFE amb l'extracció amb solvents orgànics i ultrasons convencional. Tot i que amb aquesta última les recuperacions obtingudes van ser lleugerament superiors, els autors van triar la SFE degut a què, a diferència de l'extracció convencional, el solvent utilitzat en la SFE és compatible amb l'etapa de neteja, de manera que no es requereix un canvi de solvent, a més de què el volum de solvent utilitzat és menor.

### **I.2.5. Determinació de contaminants orgànics en aigua de mar**

Com s'ha comentat a la secció I.1, la determinació de contaminants orgànics en aigua de mar és d'especial interès degut a la gran varietat de fonts de contaminació. Però per a aquesta determinació es requereix l'ús de mètodes molt sensibles degut a les baixes concentracions en què es troben aquest compostos.

Hi ha un gran nombre de compostos que s'han trobat en el medi marí mitjançant l'ús de mètodes basats en l'acoblament de diferents tècniques. A continuació es presenta un estudi bibliogràfic que pretén recollir alguns exemples rellevants de la determinació de contaminants orgànics mitjançant aquests mètodes, entre ells, els compostos esmentats en els apartats anteriors i que són objecte d'estudi en la present Tesi Doctoral, en aigua de mar a l'EU. Així, en una primera part es realitza un recull de les principals fonts de contaminació del medi marí i es resumeixen aquelles accions de caràcter legislatiu que, de forma directa o indirecta, estan relacionades amb la protecció del medi marí a l'EU.

Seguidament, es descriuen algunes de les tècniques analítiques més emprades en el desenvolupament de mètodes per a l'anàlisi de mostres d'aigua de mar. La majoria d'aquests mètodes utilitzen una tècnica cromatogràfica amb tècniques de preconcentració prèvies per tal d'assolir els baixos nivells de concentració en què es troben els diferents contaminants en aquestes mostres.

Finalment, es descriuen alguns dels estudis de la presència dels compostos que s'han trobat més freqüentment en el medi aquós marí.

Aquest estudi ha estat enviat a la revista Trends in Analytical Chemistry per a la seva publicació. A continuació, se n'adjunta una còpia.

Per tal de facilitar la identificació de les referències utilitzades en aquest treball, incloses a la pàgina 87 s'ha modificat el format en què estan expressades les mateixes respecte a la resta de referències utilitzades al text de la present Tesi Doctoral.

## **DETERMINATION OF ORGANIC CONTAMINANTS IN SEAWATER**

### **ABSTRACT**

In this paper we discuss the determination of organic contaminants in seawater samples. These compounds are determined with methods based on a chromatographic separation. In order to achieve the low concentration levels found in real samples, a preconcentration technique before chromatographic analysis is required, so especial attention is given to these enrichment techniques.

The development of these methods and the low concentration levels that can be achieved with them allow the presence of contaminants in real seawater samples to be determined, so we also discuss their occurrence in seawater.

**Keywords:** Organic contaminants; Seawater

## INTRODUCTION

As most industrial residual waters are discharged into the river flow after treatment, and river water is sometimes used for drinking purposes, contamination in river water has been widely studied. There has been less research into sea pollution, however, because of a self-regulation system that dilutes the contaminants when they enter the sea. This system is not too effective in areas such as the coast or ports, where the pollutants are discharged directly or the water is stagnant. In these areas, compounds can be found at high concentrations. Also, some hydrophobic compounds, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), can deposit and occur in sediments. Their resuspension can increase the concentration of these kinds of pollutants<sup>1</sup>. Such compounds can therefore become toxic to certain organisms. Some studies have revealed, for example, that some compounds present in coastal waters have an endocrine-disrupting activity, thus affecting the reproductive function of species such as fish and molluscs<sup>2</sup>. This is one of the reasons for the increasing interest in sea pollution, particularly in coastal waters.

Seawater pollution is caused by several factors. The most important of these are human activities, such as the dumping of urban and industrial waste, but it can also be caused by natural activities. As far as anthropogenic contamination is concerned, pollutants can enter the environment in several ways<sup>3</sup>. One of these is the exchange between water and atmosphere at the seawater interface. This is the case, for example, of the incomplete combustion of organic material from industrial processes, traffic, etc, which generates a variety of hydrocarbons that are discharged directly into the atmosphere. These pollutants are diluted and transported in the air. Although they are diluted, they can be adsorbed onto solid particles in the atmosphere. These will later sediment or be carried off by the rain to occur in surface water.

Direct discharge into surface water is the most important way in which contaminants find their way into the marine environment<sup>3</sup>. Urban and

industrial wastewater is dumped into the sea after its treatment, and agricultural pesticides can filter through the soil to re-appear in underground water or flow to the sea. To minimise dumping, there are several regulations governing the discharge of contaminants <sup>4</sup>. Treatment plants have been built to remove contaminants from water before it is discharged into the river flow or into the sea. Sometimes, however, these processes do not remove certain compounds completely. This is the case, for example, of some phthalates <sup>5</sup>, which are included in the preliminary list of endocrine-disrupting compounds that also includes compounds such as pesticides and PAHs <sup>2</sup>.

Contamination can also be caused by the transportation of certain substances, not only due to accidental dumping such as crude oil spills into the sea, which can pollute large areas with several kinds of compounds such as hydrocarbons, but also due to ballast operations, even though these are banned by the European Union (EU).

This is how substances such as polychlorinated biphenyls (PCBs), phenols, surfactants, hydrocarbons, pesticides, etc., which may be toxic to animal or plant species, find their way into the marine environment. As well as toxicity, another important parameter with these compounds is degradability. Some compounds can be considered non-toxic because of their fast degradation in water, but the degradation products can sometimes be more toxic than the initial compound. Also, if the compounds are not biodegraded, they accumulate in the environment and make the problem worse. It is important, therefore, to control the presence of these substances in the environment.

In the last few years, several initiatives, such as those arising from conventions held in Barcelona, Bucharest, Helsinki (HELCOM), and Oslo and Paris (OSPAR), have been taken to protect the marine environment <sup>6</sup>. Today, all the seas belonging to the members of the EU are covered by regional agreements. However, there is no specific legislation in the EU on pollution in the marine environment, though there is increasing interest in it <sup>7</sup>. Other directives do indirectly contribute to the protection of the marine environment,

however. Table 1 summarises some of the most important of these initiatives<sup>6,8</sup>. Most attention has concentrated on the presence of metals and inorganic species, like anions such as nitrates, which can lead to the growth of algae that in some cases can be dangerous. In the last few years, interest in organic compounds has grown because they are widely used in industry. Such studies mainly focus on compounds found in tap water or surface river water that are known to be toxic.

In this paper, we have selected some of the most important methods for determining the most common organic contaminants in seawater samples to present an overview of the trends in seawater analysis. We also discuss the occurrence of these compounds on the coasts of the EU.

## **METHODS FOR DETERMINING ORGANIC POLLUTANTS IN SEAWATER**

Interest in developing analytical methods for detecting and monitoring contaminants in the marine environment is increasing. Because of the complexity of the samples, most of these methods are based on a chromatographic technique. A system of pretreatment is required before separation either because the levels of concentration are low or because substances may be present that can interfere the determination of the analytes of interest or make it more difficult. Table 2 shows some important methods for determining contaminants in seawater samples. Generally, the most often used separation techniques are high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV-visible (UV) or diode-array detector (DAD), fluorescence (FLD) or mass-spectrometry (MS) and gas chromatography (GC) with MS or flame ionization detection (FID). Other techniques have also been reported. For example, capillary electrophoresis (CE) separation with UV detection has been used to determine linear alkylbenzene sulfonates (LAS) in seawater<sup>34</sup>, though sensitivity and selectivity were lower than with an HPLC-MS system using an electrospray (ES) interface.



**Table 1.** Summary of the most important initiatives of the European Union related to the marine environment.

Initiative	Description
Directive 76/160/EEC (amended by directives 90/656/EEC and 91/692/EEC)	It establishes parameters to achieve and maintain a good quality of bathing water. It also indicates their mandatory limit and indicative values.
Directive 76/464/EEC (amended by directives 90/656/EEC and 91/692/EEC)	The aim is harmonizing the legislation about discharging certain dangerous substances into the aquatic environment.
Directive 76/769/EEC (amended by directives 1999/51/EC and 2002/62/EC)	The aim is the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations in the EU. One of these substances are organotin compounds.
Directive 79/923/EEC (amended by directive 91/692/EEC)	It establishes parameters to control and monitor the water quality for shellfish. It also indicates their mandatory limit and indicative values.
Decision 2850/2000/EEC	The aim is establishing a Community framework for cooperation in the field of accidental or deliberate marine pollution.
Directive 2000/60/CE (amended by 2455/2001/EC)	The aim is establishing a Community framework for the protection of inland surface waters, transitional waters, coastal water and groundwater.
Barcelona Convention	Convention for reduction of the contamination in the Mediterranean Sea. The Parties must reduce and prevent contamination in this area, specially pollution caused by dumping from ships and aircraft, pollution from ships, pollution resulting from exploration and exploitation of the continental shelf and the seabed and its subsoil and pollution from land-based sources.
Helsinki Convention	Convention for reduction of the contamination in the Baltic Sea. The Parties must ban the discharging of some contaminants, such as dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and its derivatives (DDE and DDD), polychlorinated biphenyls (PCBs) and polychlorinated terphenyls (PCTs) and control and minimize pollution from land-based sources.
Paris Convention	Convention for the protection of the marine environment of the north-east Atlantic. The Parties must prevent and eliminate pollution coming from land-based sources, due to dumping or incineration of wastes or other matter or coming from offshore.

**Table 2.** Selection of methods developed for the analysis of some organic contaminants in seawater samples. Abbreviations which are not included in the text: PCDDs, polychlorinated dibenzo-p-dioxines; PCDFs, polychlorinated dibenzofurans; ECD, electron capture detection; PDMS, polydimethylsiloxane; PTV, programmable temperature vaporiser; EI, electro-impact ionization; NPD, nitrogen-phosphorus detection; LVI, large-volume injection; NCI, negative chemical ionization; SFC, supercritical fluid chromatography; PDMS-DVB, polydimethylsiloxane-divinylbenzene.

Analyte	Sample	Pretreatment	Analysis	LOD	Reference
PCDDs and PCDFs	Coastal seawater	XAD-2 and HPLC cleaning	GC/MS	--	9
PCDFs	Spiked seawater	Cloud point extraction	HPLC/FLD	0.5-27.5 mg l <sup>-1</sup>	10
PCDDs and PCDFs	Coastal seawater	SPE (C <sub>18</sub> ) and purification	GC/MS	4 pg l <sup>-1</sup>	11
Non-ortho PCBs	Coastal seawater	SPE (XAD-2) and HPLC cleaning	GC/ECD	--	12
PCBs	Seawater	LLE (n-hexane)	GC/MS	--	13
Phenol, alkyl- and chlorophenols	Spiked seawater	SPE (C <sub>18</sub> ) with loading of cetyl trimethyl ammonium bromide	GC/FID	30-140 ng l <sup>-1</sup> (deionized water)	14
Phenol, nitro-, alkyl- and chlorophenols	Seawater	SPE (high crosslinked PS-DVB with hydrophilic acetyl- group)	HPLC/EC	9-45 ng l <sup>-1</sup>	15

(continued)

Analyte	Sample	Pretreatment	Analysis	LOD	Reference
Phenol, nitro-, alkyl-, bromo- and chlorophenols	Spiked seawater	SPE (two PS-DVB membrane disks)	HPLC/ES-MS and HPLC/APCI-MS	0.1-3 mg l <sup>-1</sup> (for ES) and 0.004-5 mg l <sup>-1</sup> (for APCI)	16
Phenol and chlorophenols	Seawater	SPE (C <sub>18</sub> cartridges, C <sub>18</sub> and PS-DVB disks)	HPLC/EC	0.25-1.90 mg l <sup>-1</sup> (for C <sub>18</sub> cartridge) and 0.01-0.1 mg l <sup>-1</sup> (for PS-DVB disks)	17
Triazine and phenylurea herbicides	Seawater	SPE (immunosorbent)	HPLC/APCI-MS	1-5 ng l <sup>-1</sup> (groundwater)	18
α- and γ-hexachlorocyclohexanes	Ocean water	Clean-up SPE (Isolute ENV +)	GC/MS	0.05 ng l <sup>-1</sup>	19
Desethylatrazine, simazine, atrazine, alachlor and metolachlor	Marine water	SPE (PS-DVB disks)	PTV-GC/MS-MS	0.2-5 ng l <sup>-1</sup>	20
Dicloran, chlorothalonil, vinclozolin, dichlofluanid, captan, folpet and captatafol	Seawater	SPME (100-µm PDMS fiber)	GC/ECD and GC/EI-MS	1-15 ng l <sup>-1</sup> (GC/ECD) and 10-40 ng l <sup>-1</sup> (GC/MS)	21
Diazinon, methylparathion, fenthion, fenitrothion, parathion, methyl-trithion, ethion and triazophos	Seawater	SPME (polyacrylate)	GC/NPD	6-136 ng l <sup>-1</sup> (deionized water)	22

(continued)

Analyte	Sample	Pretreatment	Analysis	LOD	Reference
Irgarol 1051, dichlofluanid and 4-chloro-3-methyl-phenol	Seawater	SPE (PLRP-s)	GC/MS	10-20 ng l <sup>-1</sup>	23
Organotin and triazine antifoulings	Marina water	LLE (derivatization) and SPE	GC/MS, GC/FPD, GC/NPD	0.5-2.2 ng l <sup>-1</sup>	24
Chlorothalonil, dichlofluanid, Sea-nine 211, Irgarol 1051 and TCMTB	Marine and coastal water	SPE (Oasis)	LVI-GC/MS (EI and NCI)	1.2-3 ng l <sup>-1</sup> (EI) and 0.5-20000 ng l <sup>-1</sup> (NCI)	25
Antifoulings and degradation products	Seawater	SPE (Envicarb)	HPLC/APCI-MS	1-20 ng l <sup>-1</sup>	26
Chlorothalonil, diuron, Irgarol 1051 and TCMTB	Marina water	SPE (C <sub>18</sub> )	HPLC/DAD or HPLC/APCI-MS	2-10 ng l <sup>-1</sup>	27
Diuron, Irgarol 1051, folpet and dichlofluanid	Coastal water	SPE (LiChrolut EN)	HPLC/APCI-MS	5-200 ng l <sup>-1</sup>	28
VOCs, catechols, guaiacols and chlorophenols	Seawater	LLE (acetylated derivatives of phenols) with hexane	GC/ECD	--	29
266 compounds	Seawater	LLE (dichloromethane with different pH in the sample)	GC/MS	9-1100 ng l <sup>-1</sup>	30

(continued)

Analyte	Sample	Pretreatment	Analysis	LOD	Reference
Hydrocarbons and PCBs	Seawater	SPE (XAD-2 or C <sub>18</sub> ) and fractionation	GC/MS or GC/FID	--	31
PAHs, PCBs, organochlorine pesticides	Spiked seawater	SFC cleanup-cryo-trap	GC/MS	--	32
LAS and degradation products (SPC)	Marine water	SPE (C <sub>18</sub> -SAX)	HPLC/FLD or HPLC/ISP-MS	--	33
LAS	Coastal water	SPE (C <sub>18</sub> -SAX)	CE/UV and CE/MS	1 mg l <sup>-1</sup> (for CE/UV)	34
LAS and degradation products (SPC)	Seawater	SPE (C <sub>18</sub> )	HPLC/UV	--	35
LAS and degradation products (SPC)	Coastal water	SPE (C <sub>18</sub> )	HPLC/MS	3-400 ng l <sup>-1</sup> (deionized water)	36
Naphthalene monosulfonates	Seawater	SPE (PLRP-s)	HPLC/ES-MS	3-300 ng l <sup>-1</sup> (river water)	37
Naphthalene- and benzenesulfonates	Coastal water	SPE (LiChrolut EN)	HPLC/UV	20-1000 ng l <sup>-1</sup>	38
Nonionic surfactants (AEO, NPEO, CDEA) and LAS	Coastal water	SPE (C <sub>18</sub> )	HPLC/APCI-MS and HPLC/ES-MS	20-200 ng l <sup>-1</sup>	39

(continued)

Analyte	Sample	Pretreatment	Analysis	LOD	Reference
16 PAHs (EPA)	Seawater	SPE (C <sub>18</sub> )	HPLC/FLD	0.07-1.98 ng l <sup>-1</sup>	40
17 PAHs	Seawater	LLE (C <sub>18</sub> )	HPLC (micellar)/FLD	--	41
14 PAHs (included in EPA's list)	Seawater	Cloud point extraction	HPLC/FLD	0.015-96 ng l <sup>-1</sup>	42
17 volatile halogenated compounds	Seawater	Purge and trap system	GC/ECD and GC/MS	6-2500 fmol l <sup>-1</sup>	43
27 volatile organic compounds	Scheidt estuary	Purge and trap system	GC/MS	0.15-41.07 ng l <sup>-1</sup>	44
DMP, DEP, DnBP, BBP, DEHA, DEHP, BnOP	Coastal water	SPME (65-µm PDMS-DVB fiber)	GC/MS	2-27 ng l <sup>-1</sup>	45

The most common preconcentration technique is solid-phase extraction (SPE) because it has several well-known advantages. Sometimes, however, the main problem with this technique is the different breakthrough volumes of the compounds studied, which limit the sample volume to be preconcentrated. For instance, phenols, which are regulated by the EU in bathing waters, comprise a variety of compounds with different polarities and, therefore, different breakthrough volumes. For phenols, various sorbents are used. The most common ones in the analysis of seawater are C<sub>18</sub> and poly(styrene-divinylbenzene) (PS-DVB). For example, two disks of PS-DVB were used in an off-line preconcentration of 250 ml of sample containing a mixture of phenol and six alkyl- and chlorophenols<sup>17</sup>. In this case, recoveries were between 70 and 108%. When C<sub>18</sub> cartridges were used, recoveries were between 36 and 106% for the same sample volume.

Polymeric sorbents have also been used in the preconcentration of other kinds of compounds. An Amberlite XAD-2 column has been compared with a C<sub>18</sub> disk for a mixture of n-alkanes, PCBs and PAHs<sup>31</sup>. For spiked Milli-Q water, recoveries were higher when the XAD-2 resins (65-96% for a sample volume of 50 l) were used than when the C<sub>18</sub> disk was used (43-76% for a sample volume of 10 l). However, for real seawater samples, the 3-4 aromatic ring PAHs were recovered better when the C<sub>18</sub> disk was used. This was attributed to the binding of humic and fulvic substances on the uncapped silanol groups of the adsorbent.

Highly crosslinked polymers have recently been used with SPE. These sorbents have been applied, for instance, to the determination of antifouling agents in seawater. For these compounds, LiChrolut EN was used in an on-line extraction<sup>28</sup> and recoveries for a sample volume of 200 ml were higher than 85% for all the compounds studied (diuron, Irgarol 1051, folpet and dichlofluanid).

A comparative study used Isolute ENV+, LiChrolut EN and Envicarb for the off-line preconcentration of dichlofluanid, diuron and its byproduct

(demethyldiuron and 1-[3,4-dichlorophenyl] urea), chlorothalonil, Sea-nine 211, 2-thiocyanomethylthiobenzothiazole (TCMTB), Irgarol 1051 and one of its byproducts (2-methylthio-4-tert-butylamino-s-triazine) <sup>26</sup>. For a sample volume of 500 ml, the best results were with Envicarb, for which recoveries were above 76% for all compounds. Oasis HLB has also been used in an off-line extraction to determine antifoulings in seawater <sup>25</sup>, but recoveries were less than 60% for dichlofluanid and Sea-nine 211 when 200 ml of sample was preconcentrated.

In other cases, compounds are ionic in solution, and good recoveries are difficult to obtain with the common sorbents. Examples of these kinds of compounds are aromatic sulfonates, which are ionized even at very low pH values. In this case, the usual solution is to add an ion-pairing reagent to the sample before preconcentration. The presence of salt in the seawater sample matrix is expected to affect the formation of the ion-pair, because this depends on the ionic strength of the sample. Recoveries were acceptable when highly crosslinked polymers such as LiChrolut EN were used in an on-line SPE process <sup>38</sup>, although low recoveries were obtained for the most polar compounds.

Immunosorbents have also been used to determine organic contaminants in seawater. For example, antiatrazine and anti-chlorotoluron immunosorbents were used to determine a mixture of triazine and phenylurea pesticides in an on-line SPE <sup>18</sup>. Recoveries were good (above 86%) for the atrazine pesticides with the antiatrazine sorbent when 20 ml of sample was preconcentrated. This was not true for deisopropylatrazine, which was not recovered at all. With the anti-chlorotoluron sorbent and for the same sample volume, phenylurea pesticides were extracted with recoveries above 80%. This was not true for diflubenzuron, whose recovery was only 42%.

Another problem is that compounds such as PAHs can get adsorbed onto the walls of the sampling bottles or onto the system, thus polluting the system. To solve this, an organic solvent is added to the sample, but in an



SPE the breakthrough volume strongly depends on this variable <sup>40</sup>. Also, because of the high salt content, some problems have also been reported in the analysis of seawater samples with a high percentage of solvent <sup>46</sup>. These are solved by adding a filtration step before preconcentrating the sample to remove the precipitated salt.

Liquid-liquid extraction (LLE) is still used, despite its disadvantages. For example, LLE has been used to determine PAHs <sup>41</sup>. In this case, 5 l of sample was extracted with 3x100 ml of n-hexane, and the extracts were concentrated to 1-2 ml. In these conditions, recoveries were good (71-91%). This extraction technique is usually used when a mixture of compounds with different properties are determined simultaneously. It sometimes includes a prior derivatization step to improve the extraction of some of the compounds. For example, a mixture of organotin compounds was extracted from 750 ml of sample by derivatization with sodium tetraethylborate and simultaneously extracted with dichloromethane, together with Irgarol 1051 <sup>24</sup>, and recoveries were between 88 and 100%.

There are other techniques for extracting organic compounds from seawater samples. Solid-phase microextraction (SPME), for example, is interesting, mainly when coupled to GC separation. SPME has been used to determine compounds such as pesticides <sup>21,22</sup> or phthalates <sup>45</sup>. For example, a method for determining eight organophosphorus compounds in different kinds of water, using a polyacrylate fiber, has been developed <sup>22</sup>. This method determined the analytes in spiked seawater samples. Recoveries increased in some cases due to the presence of salts, which enhanced the adsorption of the analytes by the fiber.

Cloud point preconcentration has also been used to determine PCBs <sup>47</sup>. After optimisation, 2% (w/v) Genapol X-080 was selected as the surfactant, and recoveries were above 86%.

Volatile organic compounds (VOCs) have also been determined in seawater samples. These can enter the marine environment via exchange with the atmosphere. The usual technique is the purge and trap system coupled to GC. For this, several sorbents have been checked to maximise the adsorption of the analytes. Porapak N, Carboxen-1000+Porapak N and Carboxen-1000 were compared for determining a mixture of 18 halogenated organic compounds <sup>43</sup>. Porapak N showed the best adsorption properties for almost all the compounds studied. With a combination of Carboxen 1000 and Carboxen 1001, recoveries were above 68% for a mixture of 27 non-halogenated compounds <sup>44</sup>, except for toluene and 1,4-dichlorobenzene, which gave recoveries of 54 and 64% respectively.

## **OCCURRENCE OF POLLUTANTS IN SEAWATER SAMPLES**

The low concentration levels achieved using the above mentioned methods have allowed the study of the presence of a variety of compounds in samples of seawater.

One of the most studied compounds are a group of pesticides, the antifouling agents. These are added to paints for boats to prevent algae and other organisms from growing on the hull. This means that they are directly discharged into the aquatic coastal environment in areas such as ports. Here, because the waters are stagnated, such contaminants can concentrate.

Of the antifouling agents, organotin compounds have been widely used in the last few decades, though recently the EU only allowed them to be used with small vessels of less than 25 metres. A new directive has recently banned them totally (directive 2002/62/EC; Table 1), but because of their toxicity it is still interesting to control their presence in the marine environment. The most common organotin compounds to be used were

tributyltin (TBT), which has been studied in some coastal water samples, and dibutyltin (DBT) and monobutyltin (MBT), which are its main degradation products.

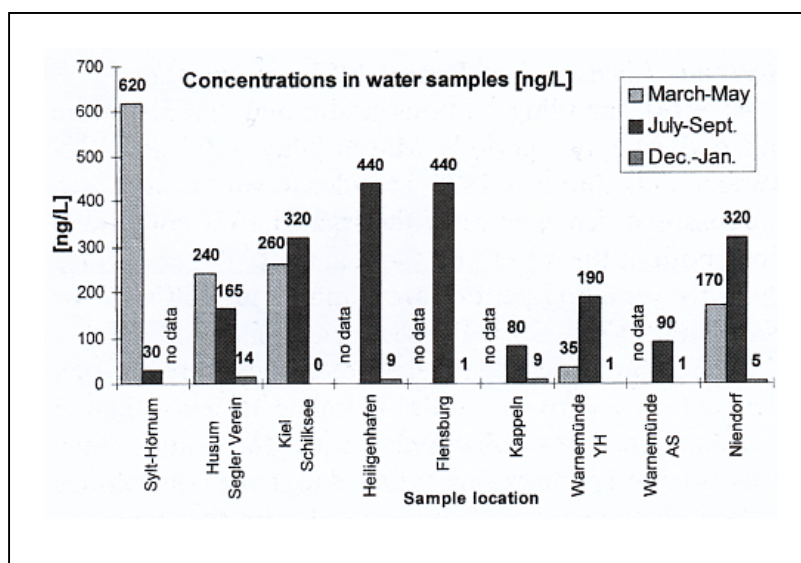
Samples taken at two-monthly intervals from the port of Genoa, Italy, between 1997 and 1998 were analysed by LLE-HPLC with hydride generation and induced coupled plasma with atomic emission spectroscopy (ICP/AES) <sup>48</sup>, and all these compounds were found. Concentrations were between 161 and 1041 ng l<sup>-1</sup> for TBT, between 40 and 872 ng l<sup>-1</sup> for DBT and between 48 and 213 ng l<sup>-1</sup> for MBT.

In other studies, the levels of concentration were generally lower for the same seasons. For example, samples taken at various sites in Corsica in the Mediterranean were analysed by simultaneous derivatization-LLE followed by GC with flame photometric detection (FPD) <sup>49</sup>. Levels of concentration were between 2 and 200 ng l<sup>-1</sup> for TBT, between 0.3 and 107 ng l<sup>-1</sup> for DBT and between 1 and 39 ng l<sup>-1</sup> for MBT.

A similar method was used to determine these compounds in samples taken on the Côte d'Azur along the coastlines of France and Monaco <sup>50</sup>. TBT, DBT and MBT were found at concentrations of less than 459, 221 and 30 ng l<sup>-1</sup>, respectively.

Since the butyltin compounds have also been banned in vessels of less than 25 m, other antifouling biocides have been used. One of the most common of these, Irgarol 1051, has been determined in several sites. For example, a method based on SPE and GC with FID was used to determine Irgarol 1051 in samples taken from various German marinas and harbours in the North and Baltic Seas <sup>51</sup>, and it was found in all samples at concentrations between 11 and 170 ng l<sup>-1</sup>. As expected, concentrations were highest in marinas with the highest boating activity. It is also interesting that concentrations in the Baltic Sea marinas and harbours were higher than those in the North Sea. This was because the stronger tidal cycles lead to

higher water exchange rates. How the concentration levels depended on the seasons was investigated. As we can see in Figure 1, levels were maximum between March and May 1997 and between July and September 1997, and minimum in winter (December 1997-January 1998).



**Figure 1.** Variation in the concentration of Irgarol 1051 found in water samples taken from the North and Baltic Sea marinas <sup>51</sup>.

Some of these compounds have also been found in samples taken from the Spanish Mediterranean coast. For example, samples taken in 1999 from three marinas in Almeria, in the south-east of Spain, were analysed by SPE with GC-MS and LC-MS <sup>52</sup>. In most of these samples, diuron and Irgarol 1051 were present at concentrations of between 40 and 800 ng l<sup>-1</sup> and between 50 and 1000 ng l<sup>-1</sup>, respectively. Concentrations were highest in the summer, probably due to higher shipping activity. Other biocides, such as chlorothalonil and TCMTB, were also found, but at concentrations of below 10 ng l<sup>-1</sup>.

To determine these compounds, an on-line SPE-HPLC-MS method using atmospheric pressure chemical ionization (APCI) was applied to samples taken from the coast of Catalonia (in the north-east of Spain) <sup>28</sup>, and diuron and Irgarol 1051 were found at concentrations of between 27 and 420 ng l<sup>-1</sup> and between 15 and 511 ng l<sup>-1</sup>, respectively. Dichlofluanid, demethyldiuron, Sea-nine 211 and an Irgarol by-product (2-methylthio-4-tert-butylamino-s-triazine) were also determined in samples taken from the coast of Catalonia using several methods <sup>53</sup>. In this study, the highest concentrations were for dichlofluanid (760 ng l<sup>-1</sup>) and Sea-nine 211 (3700 ng l<sup>-1</sup>). Sea-nine 211 is a relatively new biocide, so these high concentrations are surprising.

A similar study was carried out during the yachting season (April to October 1998) in the United Kingdom (UK) using simultaneous derivatization-LLE followed by GC-MS for TBT and SPE with HPLC-MS for the other organic antifouling agents <sup>54</sup>. In this study, only TBT, Irgarol 1051 and diuron were detected. In general, TBT and Irgarol 1051 were found at concentrations between 1 and 80 ng l<sup>-1</sup>, except at one sampling site, where the concentration of Irgarol 1051 was 1421 ng l<sup>-1</sup>, probably because the study was carried out at a locked marina. Diuron was found at concentrations of between 0.6 and 117 ng l<sup>-1</sup>.

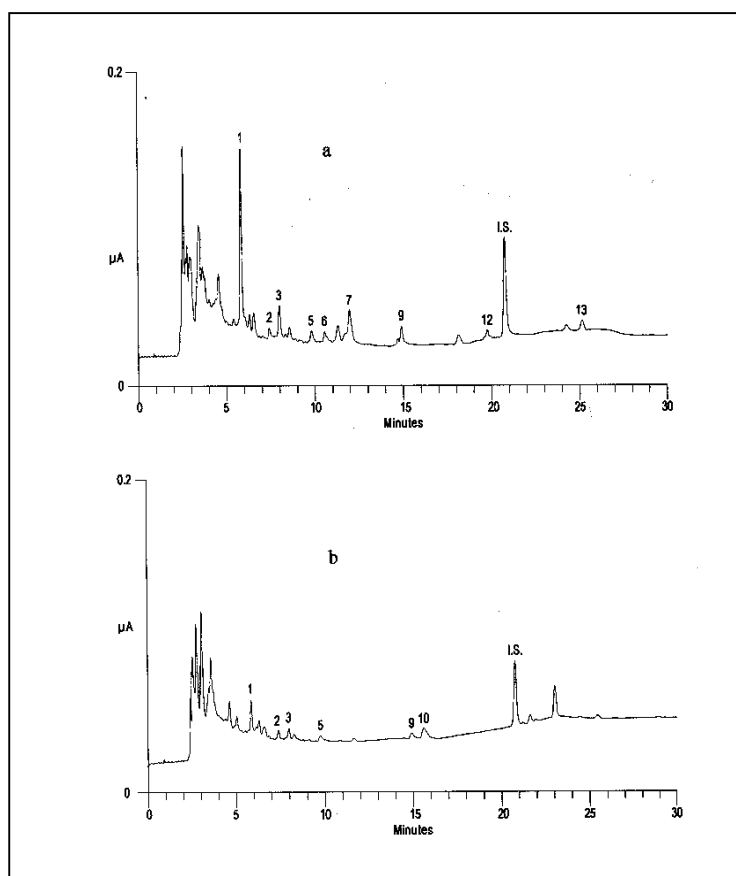
PAHs are another group of compounds found in various samples. For example, they have been detected in seawater taken from sampling sites in the western Mediterranean, which includes the coastline of Catalonia, the straits of Gibraltar and Sicily, and the Gulf of Lyons and the Rhône estuary<sup>55</sup>. These samples were analysed by SPE with GC-MS, and the concentration levels were between 400 and 2170 pg l<sup>-1</sup>. The distribution of the compounds was lower than expected if we take into account the concentration levels in the input sources. This was attributed to the fact that, because of their low solubility in water, these compounds tend to get adsorbed onto the sediments. This is in agreement with other studies on the vertical distribution of these compounds in the marine environment. For example, one study analysed the behaviour of the concentration of PAHs

along the water column in the North-western Black Sea <sup>1</sup>. In this case, a near-bottom enrichment of PAH concentration was found and attributed both to sediment resuspension from the continental shelf and to transport phenomena.

Sometimes, for example with PCBs and PAHs, the concentration of the compounds in the water samples depends on the presence of suspended solids. Yang *et al.* <sup>56</sup> applied SPME with GC-ECD to determine a mixture of PCBs in a spiked ocean water sample (content of suspended solids around 3% w/w, including salt) before and after storing the sample for 24 hours. Losses of between 5 and 50% were observed. Results of other studies <sup>57</sup>, in which concentration levels of these compounds were higher for sediment samples than for seawater samples, were similar.

Phenols have been determined by SPE with HPLC and electrochemical (EC) detection in various samples, for example, from the coastal area of Taranto, Italy <sup>15</sup>. Some of the chlorophenols included in the Priority List of the Environmental Protection Agency (EPA) were detected, as well as other nitro- and methyl phenols, at concentrations between 0.03 and 0.32  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Figure 2 shows the chromatograms for two seawater samples contaminated by phenols.

LAS are the surfactants that are most often studied in seawater samples because they are difficult to remove in treatment plant processes. These compounds have been determined in samples taken from different sites. In marine water samples taken up to 100 km from the coast of the German Bight of the North Sea using SPE and HPLC-(APCI)-MS/MS, Bester *et al.* <sup>58</sup> found LAS at concentrations of up to 30  $\text{ng l}^{-1}$ . These compounds have also been monitored in an industrial area of the Mediterranean coast of Catalonia, where the outflows of wastewater treatment plants are discharged <sup>39</sup>. Here, a method based on SPE with HPLC-ESI-MS found concentrations of between 3 and 70  $\mu\text{g l}^{-1}$ , which are typical of sea areas where densely populated cities discharge their wastewater directly into the sea.



**Figure 2.** Chromatograms obtained for two seawater samples taken from Taranto coast (Italy), contaminated by (a) oil refinery wastes and (b) iron and steel factory wastes. Peaks: (1) phenol; (2) 4-nitrophenol; (3) 4-methylphenol; (5) 2-nitrophenol; (6) 4-chlorophenol; (7) 2,4-dinitrophenol; (9) 2-methyl-4,6-dinitrophenol; (10) 2,4-dichlorophenol; (I.S.) thymol; (12) 2,4,6-trichlorophenol; (13) 2,3,4,5-tetrachlorophenol <sup>15</sup>.

It is also interesting to identify and quantify some of the degradation products of these compounds, such as sulfophenylcarboxylic acids (SPC), because these are very abundant in areas where LAS are discharged. Some studies have determined the persistence of these compounds in seawater

samples and the variability of their concentration as a function of the distance to the focus of emission. For example, Riu *et al.*<sup>36</sup> analysed marine samples taken from six sites in the bay of Cadiz, in the south-west of Spain, using SPE with HPLC-MS with an ionspray (ISP) interface, and identified several SPC. In these samples, LAS concentration levels ranged from 2 to 347  $\mu\text{g l}^{-1}$ , while the concentrations of some of the SPC detected ranged from 0.53 to 64  $\mu\text{g l}^{-1}$ .

Another study of the same area<sup>33</sup> determined these compounds using SPE with HPLC and FLD or ISP-MS and studied their degradability in the aqueous phase of the marine environment. The LAS concentration levels were studied as a function of the distance between the sampling site and the industrial discharge point. An exponential decrease was observed, but the decrease was greater than expected. The authors attributed this rapid decline to the tendency of the compounds to get adsorbed by matter in suspension and by the sediments, and the biodegradation, since the degradation products were also found at medium-to-high concentrations.

Other kinds of surfactants have also been determined in seawater samples. For example, non-ionic surfactants such as nonylphenol-ethoxylates (NPEO) and nonylphenols (NP), their main degradation products, have been found in the German Bight of the North Sea using SPE and HPLC-(APCI)-MS/MS<sup>58</sup>. Here, the concentration of NP decreased considerably the further from the coast the samples were taken, ranging from 33  $\text{ng l}^{-1}$  in the estuary to less than 1  $\text{ng l}^{-1}$  in the middle of the North Sea. NPEO were not found within the concentration limits of the method.

These compounds were found in samples taken along the coast of Spain using a method based on SPE and HPLC-(ES)-MS<sup>39</sup>. The highest concentrations were 15  $\mu\text{g l}^{-1}$  for alcohol ethoxylates (AEO), 11  $\mu\text{g l}^{-1}$  for NPEO and 3.8  $\mu\text{g l}^{-1}$  for NP. This study used an HPLC-(APCI)-MS system to monitor coconut diethanol amides (CDEA), which are surfactants containing amide groups, and found them in some samples at concentrations of less

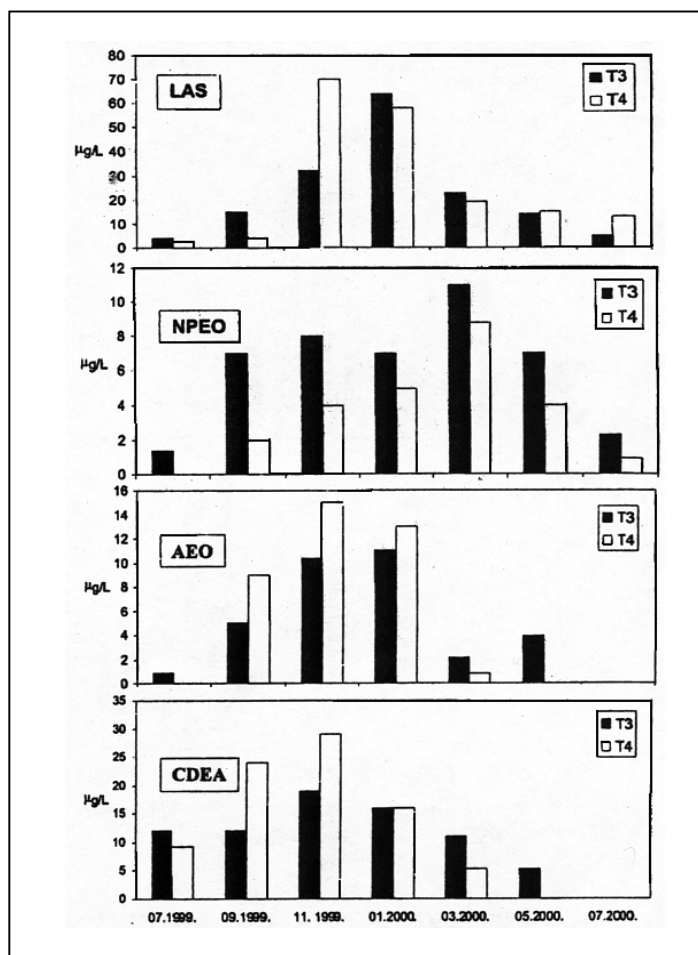


than  $24 \mu\text{g l}^{-1}$ . The seasonal variation in the concentration of the analytes (LAS, AEO, NPEO and CDEA) was also evaluated. Concentration was lowest in the warmer periods, probably because biodegradation was more efficient. As an example, Figure 3 shows the seasonal variation in the concentration of these compounds in seawater taken from two sites in Tarragona, on the coast of Spain.

Another kind of surfactant that has been studied are benzene- and naphthalenesulfonates. On the coast of Catalonia <sup>37</sup>, 1-naphthalenesulfonate and 2-naphthalenesulfonate were found at  $0.8$  and  $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ , respectively, using on-line SPE-HPLC-(ES)-MS.

Other kinds of contaminants, such as polymer additives, have been studied in coastal water. For example, dimethylphthalate (DMP), diethylphthalate (DEP), di-n-butylphthalate (DnBP), butylbenzylphthalate (BBP), bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), bis-n-octylphthalate (BnOP) and bis(2-ethylhexyl)adipate (BEHA), studied along the coast of Catalonia using SPME-GC-MS <sup>45</sup> and on-line SPE-PTV-GC-MS <sup>59</sup>, were found at concentrations of between  $0.5$  and  $3.2 \mu\text{g l}^{-1}$ .

VOCs have also been determined in seawater. For example, cyclohexane, tetrachloroethene, toluene and chlorobenzene were determined along the Scheldt estuary in Belgium by purge and trap with GC-MS and found at concentrations between  $0.33$  and  $461 \text{ ng l}^{-1}$  <sup>44</sup>. The results of this study suggest that other removal mechanisms besides dilution in the sea were responsible for the drop in tetrachloroethene concentration. The mechanism proposed was volatilization because, if we take into account the low octanol-water partition coefficient logarithm ( $\log K_{ow}$ ), sorption onto the sediment is unlikely. The concentration profiles of the other compounds were more difficult to explain.



**Figure 3.** Variation of the concentration of NPEO, AEO, CDEA and LAS in seawater taken from Tarragona (Catalonia, Spain) <sup>39</sup>.

Recently, pharmacological drugs have been found in seawater. North Sea water samples were analysed using SPE and GC-MS to determine some herbicides <sup>60</sup>. The presence was observed of a pharmacological drug, clofibric acid, which is mainly used as a lipid regulator in human medicine in the form of the ethyl ester (clofibrate). This compound was quantified at

concentrations of between 0.5 and 7.8 ng l<sup>-1</sup>. Another study<sup>61</sup> used a filtration-extraction system with GC separation and MS detection to determine various compounds in samples taken from the German Bight and the North Sea. Propyphenazone, carbamazepine and caffeine were identified and quantified at concentrations of between 0.6 and 2 ng l<sup>-1</sup>.

## CONCLUSIONS

There is a wide variety of conditions and contamination sources in European seas. Though the determination of metals is very important, attention is increasingly being paid to organic industrial contaminants. The development of methods allow the determination of very low concentration levels. Their use has allowed the investigation of the presence of many kinds of compounds, such as antifouling agents or surfactants, and many of them have been found in numerous samples taken along the coastlines of Europe.

However, the development of new methods is still required in order to achieve lower limits of detection to control and quantify these contaminants and their main degradation products and to identify new contaminants in the sea environment. Moreover, methods for determining mixtures of families of contaminants with several properties, are also needed in order to evaluate overall pollution in several areas.

## REFERENCES

- <sup>1</sup> C. Maldonado, J. M. Bayona, L. Bodineau, Environ. Sci. Technol. 33 (1999) 2693.

- 
- <sup>2</sup> Communication from the Commission to the Council and the European Parliament, Implementation of the Community Strategy for Endocrine Disruptors: a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife (COM (1999) 706), Brussels, 14-06-2001, COM (2001) 262 final.
  - <sup>3</sup> D. Stanners, P. Bourdeau, Europe's environment. The Dobris Assessment. European Union Agency, Office for Official Publications of the European Communities, Copenhagen, 1995.
  - <sup>4</sup> Council Directive 91/271/EC of 21 May 1991 concerning urban wastewater treatment, DO L 135, 30-5-9, 40.
  - <sup>5</sup> M. Castillo, A. Oubiña, D. Barceló, Environ. Sci. Technol. 32 (1998) 2180.
  - <sup>6</sup> Environment in the European Union at the turn of the century, European Union Agency, Copenhagen, 1999.
  - <sup>7</sup> Communication from the Commission to the Council and the European Parliament, Towards a strategy to protect and conserve the marine environment, Brussels, 2-10-2002, COM (2002) 539 final.
  - <sup>8</sup> [http://europa.eu.int/eur-lex/es/lif/reg/es\\_register\\_15102020.html](http://europa.eu.int/eur-lex/es/lif/reg/es_register_15102020.html); European Union, Legislation in force: Water protection and management, 23/4/2003.
  - <sup>9</sup> S. Hashimoto, M. Matsuda, T. Wakimoto, R. Tatsukawa, Chemosphere 30 (1995) 1979.
  - <sup>10</sup> A. E. Fernández, Z. S. Ferrera, J. J. S. Rodríguez, Analyst 124 (1999) 487.
  - <sup>11</sup> E. Pujadas, J. Diaz Ferrero, R. Martí, F. Broto Puig, L. Comellas, M. C. Rodríguez Larena, Chemosphere 43 (2001) 449.
  - <sup>12</sup> N. Kannan, G. Petrick, R. Bruhn, D. E. Schulz-Bull, Chemosphere 37 (1998) 2385.
  - <sup>13</sup> R. Fuoco, M. Perla Colombini, A. Ceccarini, C. Abete, Microchemical Journal 54 (1996) 384.
  - <sup>14</sup> F. Abu-Shammala, Analytical Letters 32 (1999) 3083.
  - <sup>15</sup> N. Cardellicchio, S. Cavalli, V. Piangerelli, S. Giandomenico, P. Ragone, Fresenius J. Anal. Chem. 358 (1997) 749.

- 
- <sup>16</sup> O. Jáuregui, E. Moyano, M. T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 787 (1997) 79.
- <sup>17</sup> M. T. Galceran, O. Jáuregui, *Anal. Chim. Acta* 304 (1995) 75.
- <sup>18</sup> I. Ferrer, M.-C. Hennion, D. Barceló, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4508.
- <sup>19</sup> T. Harner, H. Kylin, T. F. Bidleman, W. M. Strachan, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 1157.
- <sup>20</sup> R. J. C. A. Steen, I. L. Freriks, W. P. Cofino, U. A. Th. Brinkman, *Anal. Chim. Acta* 353 (1997) 153.
- <sup>21</sup> D. A. Lambropoulou, I. K. Konstantinou, T. A. Albanis, *J. Chromatogr. A* 893 (2000) 143.
- <sup>22</sup> I. Valor, J. C. Moltó, D. Apraiz, G. Font, *J. Chromatogr. A* 767 (1997) 195.
- <sup>23</sup> E. Pocurull, L. Brossa, F. Borrull, R. M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 361.
- <sup>24</sup> I. Tolosa, J. W. Readman, *Anal. Chim. Acta* 335 (1996) 267.
- <sup>25</sup> A. Agüera, L. Piedra, M. D. Hernando, A. Rodríguez Fernández-Alba, *J. Chromatogr. A* 889 (2000) 261.
- <sup>26</sup> K. Martínez, I. Ferrer, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 879 (2000) 27.
- <sup>27</sup> I. Ferrer, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 854 (1999) 197.
- <sup>28</sup> R. A. Gimeno, C. Aguilar, R. M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A* 915 (2001) 139.
- <sup>29</sup> K. Abrahamsson, A. Ekdahl, *J. Sea Res.* 35 (1996) 73.
- <sup>30</sup> K. Kadokami, K. Sato, Y. Hanada, R. Shinohara, *Anal. Sci.* 11 (1995) 375.
- <sup>31</sup> J. Dachs, J. M. Bayona, *Chemosphere* 35 (1997) 1669.
- <sup>32</sup> R. Fuoco, A. Ceccarini, M. Onor, L. Marrara, *J. Chromatogr. A* 846 (1999) 387.
- <sup>33</sup> E. González-Mazo, M. Honing, D. Barceló, A. Gómez-Parra, *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997) 504.
- <sup>34</sup> J. Riu, P. Eichhorn, J. A. Guerrero, Th. P. Knepper, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 889 (2000) 221.
- <sup>35</sup> L. Sarrazin, W. Wafo, P. Rebouillon, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 22 (1999) 2511.

- <sup>36</sup> J. Riu, E. González-Mazo, A. Gómez-Parra, D. Barceló, *Chromatographia* 50 (1999) 275.
- <sup>37</sup> E. Pocurull, C. Aguilar, M. C. Alonso, D. Barceló, F. Borrull, R. M. Marcé, *J. of Chromatogr. A* 854 (1999) 187.
- <sup>38</sup> R. A. Gimeno, R. M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia* 53 (2001) 22.
- <sup>39</sup> M. Petrovic, A. Rodríguez Fernández-Alba, F. Borrull, R. M. Marcé, E. González Mazo, D. Barceló, *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (2002) 37.
- <sup>40</sup> R. Ferrer, J. Guiteras, J. L. Beltrán, *Analytical Letters* 29 (1996) 2201.
- <sup>41</sup> M. A. Rodríguez Delgado, M<sup>a</sup> J. Sánchez, V. González, F. García Montelongo, *J. High Resol. Chromatogr.* 19 (1996) 111.
- <sup>42</sup> V. Pino, J. H. Ayala, A. M. Afonso, V. González, *J. Chromatogr. A* 949 (2002) 291.
- <sup>43</sup> A. Ekdahl, K. Abrahamsson, *Anal. Chim. Acta* 357 (1997) 197.
- <sup>44</sup> T. Huybrechts, J. Dewulf, O. Moerman, H. Van Langenhove, *J. Chromatogr. A* 893 (2000) 367.
- <sup>45</sup> A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R. M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 922 (2001) 377.
- <sup>46</sup> L. Brossa, R. M. Marcé, F. Borrull, E. Pocurull, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 287.
- <sup>47</sup> A. Eiguren Fernández, Z. Sosa Ferrera, J. J. Santana Rodríguez, *Química Analítica* 16 [Suppl 2] (1997) S283.
- <sup>48</sup> P. Rivaro, G. Pensiero, R. Frache, *Appl. Organometal. Chem.* 13 (1999) 727.
- <sup>49</sup> P. Michel, B. Averty, B. Andral, J.-F. Chiffolleau, F. Galgani, *Marine Pollution Bulletin* 42 (2001) 1128.
- <sup>50</sup> I. Tolosa, J. W. Readman, A. Blaevoet, S. Ghilini, J. Bartocci, M. Horvat, *Marine Pollution Bulletin* 32 (1996) 335.
- <sup>51</sup> S. Biselli, K. Bester, H. Hühnerfuss, K. Fent, *Marine Pollution Bulletin* 40 (2000) 233.
- <sup>52</sup> L. Piedra, A. Tejedor, M. D. Hernando, A. Aguera, D. Barceló, A. Fernández-Alba, *Chromatographia* 52 (2000) 631.
- <sup>53</sup> K. Martínez, I. Ferrer, M. D. Hernando, A. Rodríguez Fernández-Alba, R. M. Marcé, F. Borrull, D. Barceló, *Environ. Technol.* 22 (2001) 543.

- 
- <sup>54</sup> K. V. Thomas, T. W. Fileman, J. W. Readman, M. J. Waldock, *Marine Pollution Bulletin* 42 (2001) 677.
- <sup>55</sup> J. Dachs, J. M. Bayona, C. Raoux, J. Albaigés, *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997) 682.
- <sup>56</sup> Y. Yang, D. J. Miller, S. B. Hawthorne, *J. Chromatogr. A* 800 (1998) 257.
- <sup>57</sup> I. Tolosa, J. W. Readman, S. W. Fowler, J. P. Villeneuve, J. Dachs, J. M. Bayona, J. Albaiges, *Deep-Sea Research II* 44 (1997) 907.
- <sup>58</sup> K. Bester, N. Theobald, H. Fr. Schröder, *Chemosphere* 45 (2001) 817.
- <sup>59</sup> L. Brossa, R. M. Marcé, F. Borrull, E. Pocurull, *J. Chromatogr. A* (in press).
- <sup>60</sup> H. R. Buser, M. D. Müller, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 188.
- <sup>61</sup> S. Wiegel, K. Bester, H. Hühnerfuss, *J. Chromatogr. A* 912 (2001) 151.





### **I.3. DESCRIPCIÓ DE LES TÈCNIQUES DE CALIBRACIÓ DE SEGON ORDRE EMPRADES EN LA DETERMINACIÓ DE CONTAMINANTS**

La majoria de mètodes analítics que s'utilitzen en l'anàlisi mediambiental determinen la concentració dels analits d'interès de forma indirecta, és a dir, mitjançant la construcció d'un model matemàtic que relaciona el senyal obtingut en l'anàlisi de la mostra amb la concentració de l'analit d'interès. Els models més utilitzats són els mètodes de calibració univariant degut a que són models matemàtics fàcils de construir. A més, moltes vegades el seu ús està justificat per alguna llei experimental de l'instrument utilitzat, com per exemple la llei de Beer, que relaciona l'absorbància obtinguda amb un detector d'UV-visible amb la concentració de l'analit.

Un requisit a l'hora d'aplicar aquest tipus de calibració és que el senyal obtingut per a dur a terme la quantificació només ha de ser degut a l'analit d'interès [223]. Per tant, i tenint en compte que no és habitual que es disposi d'un sistema de detecció totalment selectiu per a un analit d'interès, es requereix la separació dels analits d'altres substàncies presents en la mostra analitzada.

En l'anàlisi de mostres ambientals, aquesta separació es duu a terme mitjançant l'ús de tècniques cromatogràfiques i, moltes vegades, amb detectors d'elevada selectivitat, com el FLD. Però per a les mostres més complexes, com per exemple els sòls, aquesta separació no sempre es pot aconseguir i, en aquells casos en què es pot obtenir, dona lloc a temps d'anàlisi molt llargs.

El desenvolupament de noves tecnologies en el camp de la detecció ha fet que apareguin detectors que permeten l'adquisició d'informació addicional a la necessària per a dur a terme una calibració univariant. Per exemple, el DAD permet enregistrar l'espectre de l'eluent d'un sistema cromatogràfic de manera que no només s'obté l'absorbància a una longitud d'ona, sinó per a tot un interval de longituds d'ona. Aquesta informació addicional ha permès

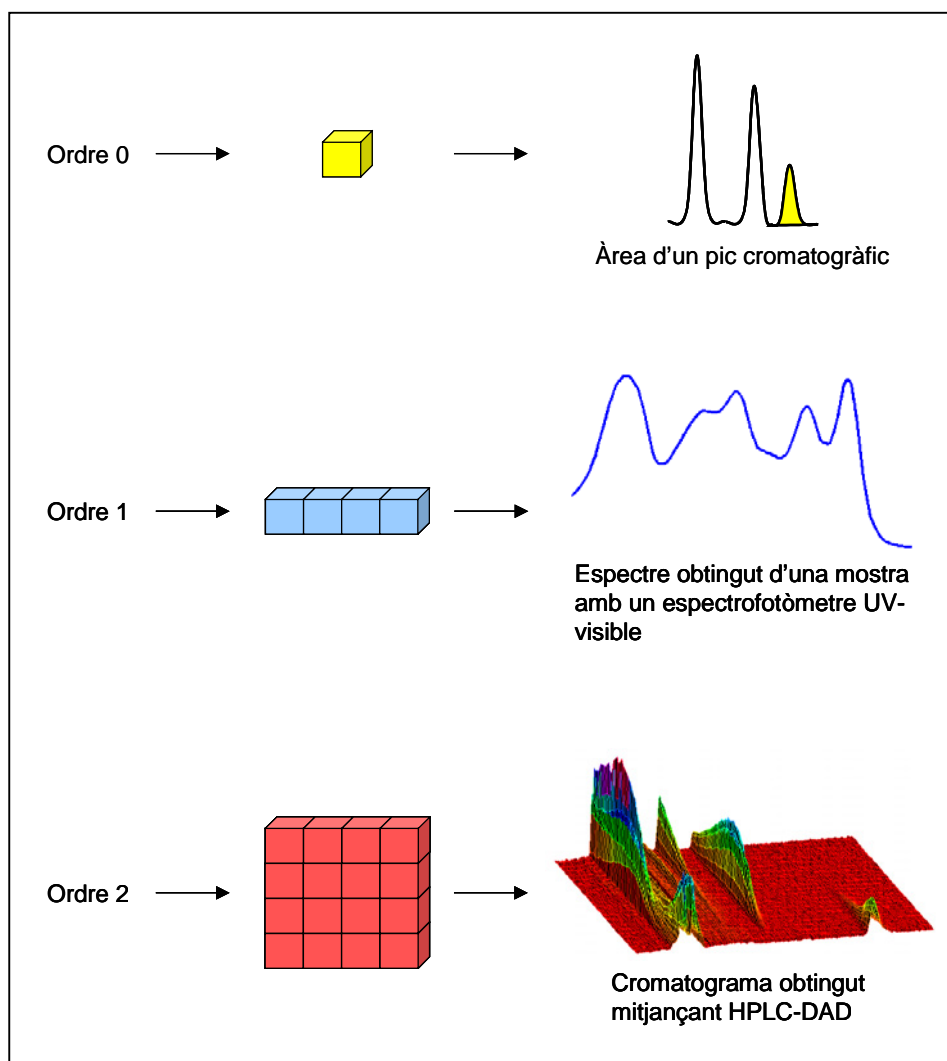
el desenvolupament de nous mètodes de calibració que utilitzen aquesta informació per a quantificar els analits d'interès en presència d'altres substàncies presents en la mostra. D'aquesta manera, s'aconsegueix quantificar els analits en mostres complexes en aquells casos en què la separació de les substàncies interferents és difícil o no es pot aconseguir, a més de disminuir el temps d'anàlisi, ja que la separació completa no és necessària.

### **I.3.1. Tipus de dades i calibració**

En funció de l'instrument utilitzat per a l'anàlisi d'una mostra, es poden obtenir diferents tipus de dades [224], com es pot veure a la Figura 6. Així, si l'instrument dóna com a resposta un valor com, per exemple, la lectura d'un pHmetre o l'àrea d'un pic cromatogràfic, es diu que s'obtenen dades d'ordre zero. Si el que s'obté és un vector de dades, com és el cas de l'espectre d'una mostra obtingut en un espectrofotòmetre, les dades són de primer ordre. Si la resposta obtinguda de l'instrument és una matriu de dades, es diu que les dades són de segon ordre. Aquest últim resultat és el que s'obté, per exemple, amb els espectrofluorímetres que enregistren simultàniament l'espectre d'excitació i emissió, o amb un sistema HPLC-DAD, que enregistra l'espectre de l'eluent dels sistema cromatogràfic.

De la mateixa manera, els mètodes de calibració es classifiquen en funció del tipus de dades utilitzades per a cada una de les mostres. Segons això, la calibració pot ser d'ordre zero, de primer ordre o de segon ordre [224,225].

A la Taula 9 es fa un resum d'algunes de les característiques més importants dels diferents tipus de calibració. Com es pot veure, l'ús d'un tipus de calibració determinat permet superar les limitacions d'un tipus de calibració d'ordre inferior.



**Figura 6.** Exemples dels tipus de dades que es poden obtenir en l'anàlisi d'una mostra.

S'ha de tenir en compte que també es poden utilitzar dades d'un ordre determinat per a un tipus de calibració d'ordre inferior mitjançant un tractament previ de les dades. Per exemple, les dades contingudes en una matriu es poden transformar en un vector i aplicar-hi una calibració de

primer ordre en comptes d'una de segon ordre. No obstant, aquesta no és l'aproximació més utilitzada degut a què en aquests processos es pot perdre informació que pot ser important a l'hora de construir el model de calibració.

**Taula 9.** Principals característiques dels diferents tipus de calibració.

Calibració	Característiques
Ordre zero o univariant	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilitza dades d'ordre zero</li> <li>• Per a una correcta quantificació, l'analit d'interès ha d'estar totalment separat d'altres substàncies</li> <li>• No es poden detectar punts discrepants</li> </ul>
Primer ordre o multivariant	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilitza dades de primer ordre</li> <li>• Permet la quantificació en presència de substàncies interferents, però aquestes substàncies han d'estar incloses en el model de calibració</li> <li>• Es poden detectar punts discrepants</li> </ul>
Segon ordre	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilitza dades de segon ordre</li> <li>• Permet la quantificació en presència de substàncies interferents no incloses en el model de calibració</li> <li>• Es poden detectar punts discrepants</li> </ul>

### 1.3.2. Mètodes de quantificació a partir de dades de segon ordre

L'adquisició de dades de segon ordre per a cada mostra i l'aplicació dels algorismes per a aquest tipus de dades presenta diferents avantatges. Un d'ells és que aquests algorismes permeten la determinació dels analits d'interès en presència de substàncies interferents, la qual cosa no és possible utilitzant els mètodes de calibració univariant. Amb els algorismes multivariants o de primer ordre, la quantificació en aquestes condicions és possible però només es pot realitzar en aquells casos en què els interferents han estat inclosos en el model de calibració i són constants per a les diferents mostres analitzades. Pel que fa als mètodes de segon ordre, els analits poden ser quantificats en presència d'interferents, fins i tot quan

aquestes substàncies no es troben presents en les mostres de calibració. Aquest és l'anomenat "avantatge de segon ordre" [226-228].

Hi ha diferents tipus d'algorismes matemàtics que extreuen informació de les dades de segon ordre. Es poden agrupar en dos blocs: els mètodes de resolució de corbes i els mètodes de calibració.

Els mètodes de resolució de corbes descomposen el senyal obtingut per a una mostra problema com a suma dels senyals corresponents a les diferents substàncies contingudes en la mateixa. Per exemple, en el cas de dades obtingudes amb un sistema HPLC-DAD, l'aplicació d'aquest tipus de mètodes permet obtenir els perfils i espectres per a la mostra. Amb aquests mètodes, doncs, es poden identificar els analits d'interès comparant els espectres obtinguts amb els corresponents a l'anàlisi de solucions patró. Donat que permeten l'obtenció dels espectres, aquests mètodes s'apliquen més freqüentment amb una finalitat qualitativa. Alguns exemples d'aquests mètodes són l'*Iterative Target Transformation Factor Analysis* (ITTFA) [229,230], el *Multivariate Curve Resolution by Alternating Least Squares* (MCR-ALS) [231,232] i l'*Evolving Factor Analysis* (EFA) [233].

Els mètodes de calibració tenen com a objectiu la quantificació dels analits presents en les mostres analitzades. Per a dur a terme aquesta determinació, es necessita, a més de la mostra problema, un conjunt de mostres de concentració coneguda per a la calibració. Alguns exemples d'aquest tipus de mètodes són el *Parallel Factor Analysis* (PARAFAC) [234], el *Generalized Rank Annihilation Method* (GRAM) [235], el Tucker3 [236] i el *Three-way Partial Least Squares* (3-PLS) [237].

Aquests algorismes s'han utilitzat per a la resolució de problemes en la determinació de contaminants en diferents tipus de mostres. A la Taula 10 se'n mostren alguns exemples.

**Taula 10.** Exemples d'aplicacions d'algorismes de segon ordre per a la determinació de contaminants.

Compostos determinats	Mètode de calibració	Referència
PAHs en aigua de l'aixeta	PARAFAC i 3-PLS	238
Dioxines en oli de peix	PARAFAC i 3-PLS	239
PAHs en aigua d'oceà	PARAFAC	240
NS en aigua de depuradora	GRAM	241
Pesticides en aigua	GRAM	242
Monitorització dels perfils de degradació d'herbicides	MCR-ALS	227
Compostos de trifenilestany en aigua de mar	MCR-ALS	243
Pesticides organofosforats en aigües naturals	PARAFAC, MCR-ALS, TUCKER3	244

A continuació es descriuen els mètodes de calibració de segon ordre que s'han utilitzat en alguns dels estudis inclosos en la present tesi. Seguint les recomanacions de Kiers [245], els cubs de dades s'expressen amb lletres majúscules, negreta i subratllat (per exemple,  $\underline{\mathbf{X}}$ ). En el cas de les matrius, s'utilitzen lletres majúscules i negreta (per exemple,  $\mathbf{X}$ ). Els diferents elements d'una matriu s'indiquen amb lletres minúscules i cursiva (per exemple,  $x_{ij}$ , on  $i$  i  $j$  indiquen la fila i columna). Els vectors es representen mitjançant lletres minúscules i negreta (per exemple,  $\mathbf{x}$ ). Finalment, els escalars s'expressen utilitzant lletres minúscules (per exemple,  $x$ ).

### 1.3.2.1. Regressió amb mínims quadrats parcials de tres vies (3-PLS)

El mètode 3-PLS [237] és una generalització per a dades de segon ordre del mètode de regressió amb mínims quadrats parcials (*Partial Least Squares*, PLS) aplicat a dades de primer ordre [236].

El PLS és un mètode bilinear que es basa en la reducció del nombre de variables que expliquen les dades, de manera que s'elimina el soroll, mantenint-se la informació més rellevant. Per exemple, si es vol estimar la concentració dels analits i si se suposa que la major variació produïda en les dades és deguda a la variació d'aquesta concentració, la reducció de variables permet eliminar l'efecte d'altres variables, com per exemple el soroll instrumental. D'aquesta forma, no només s'aconsegueix disminuir el nombre de variables a modelar, sinó que també es pot triar només aquella part de la informació que és necessària per a la calibració.

El PLS, com en el cas de la regressió en components principals (*Principal Component Regression*, PCR), busca les direccions que expressen la màxima variació en la informació de què es disposa. Així, es defineixen uns nous eixos anomenats components o factors, de manera que el primer eix explica la màxima variació, el segon eix és perpendicular al primer i explica la màxima variació una vegada restada la del primer component, i així successivament.

De forma general, els models de calibració com el PCR i el PLS es poden expressar segons:

$$\mathbf{R} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (1)$$

$$\mathbf{C} = \mathbf{TQ}^T + \mathbf{F} \quad (2)$$

on  $\mathbf{R}$  és la matriu que conté les respostes instrumentals,  $\mathbf{C}$  és la matriu que conté les concentracions dels analits,  $\mathbf{T}$  és la matriu que conté les projeccions de les respostes obtingudes per a les diferents mostres de calibració en l'espai definit pels nous eixos (*scores*),  $\mathbf{P}$  i  $\mathbf{Q}$  són les matrius que contenen els angles formats entre els nous eixos i els inicials (*loadings*) i  $\mathbf{E}$  i  $\mathbf{F}$  són les matrius que contenen tota la informació no inclosa en els models. Utilitzant aquestes expressions, en l'etapa de calibració es busquen

**T**, **P** i **Q**, de manera que una vegada coneguts, la concentració d'un analit en la mostra desconeguda pot ser estimat a partir de l'equació (2).

A diferència del PCR, amb el PLS no es descomposa primer la matriu de dades en els *loadings* i els *scores* per després utilitzar-los per dur a terme la regressió front a les concentracions, sinó que les concentracions també es tenen en compte en l'etapa de descomposició de la matriu. Per a això, l'expressió que s'utilitza per a descriure el model de PLS és la següent:

$$r_{ij} = t_i w_j \quad (3)$$

on  $r_{ij}$  és cada una de les respostes,  $t_i$  és la projecció de la resposta  $i$  en el nou espai (*score*) i  $w_j$  és un pes estadístic (*loading weight*).

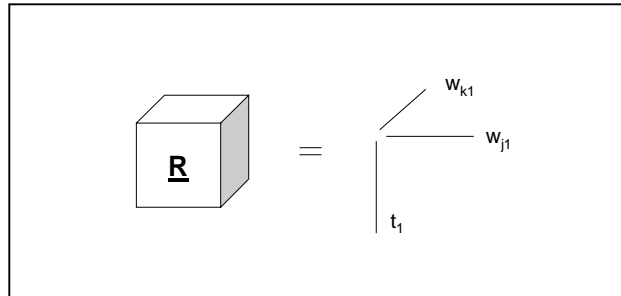
En el cas del 3-PLS, l'objectiu és la descomposició del cub de dades **R** que conté les matrius obtingudes per a les diferents mostres de calibració en un conjunt de tríades, segons l'expressió (4). Aquestes tríades consisteixen en un vector de *scores* **t** i dos vectors pes (**w<sup>J</sup>** i **w<sup>K</sup>**). A la Figura 7, es mostra una representació gràfica d'aquesta representació.

$$r_{ijk} = t_i w_j^J w_k^K \quad (4)$$

El procés de calibració consisteix en el càlcul de **t**, **w<sup>J</sup>**, **w<sup>K</sup>** i **q** per a cada un dels factors, de manera que els valors obtinguts per a un factor  $i$  s'utilitzen per modificar les dades inicials i calcular de nou aquests paràmetres per al factor  $i+1$ . Aquest procés es repeteix fins que les dades inicials es troben descrites de forma adequada pel model de calibració.

A mode de resum, a la Figura 8 es mostra el procés de calibració a seguir utilitzant 3-PLS.





**Figura 7.** Representació gràfica de la descomposició del cub de respostes  $\mathbf{R}$  en la calibració amb 3-PLS.

De forma anàloga al procés de calibració multivariant amb PLS, inicialment es calculen els pesos  $\mathbf{w}^J$  i  $\mathbf{w}^K$  utilitzant el mètode de mínims quadrats per al primer factor, de manera que s'obtingui la màxima covariança amb la part no explicada de la variable depenent (concentracions) [237], segons l'expressió:

$$\max_{\mathbf{w}^J \mathbf{w}^K} \left[ \text{cov}(\mathbf{t}, \mathbf{c}) \mid \min \left( \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K (r_{ijk} - t_i w_j^J w_k^K)^2 \right) \right] \quad (5)$$

Utilitzant l'equació (4), l'expressió anterior dóna lloc a:

$$\max_{\mathbf{w}^J \mathbf{w}^K} \left( \text{cov}(\mathbf{t}, \mathbf{c}) \mid t_i = \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K r_{ijk} w_j^J w_k^K \right) \quad (6)$$

Això implica:

$$\max_{\mathbf{w}^J \mathbf{w}^K} \left( \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K z_{jk} w_j^J w_k^K \right) \quad (7)$$

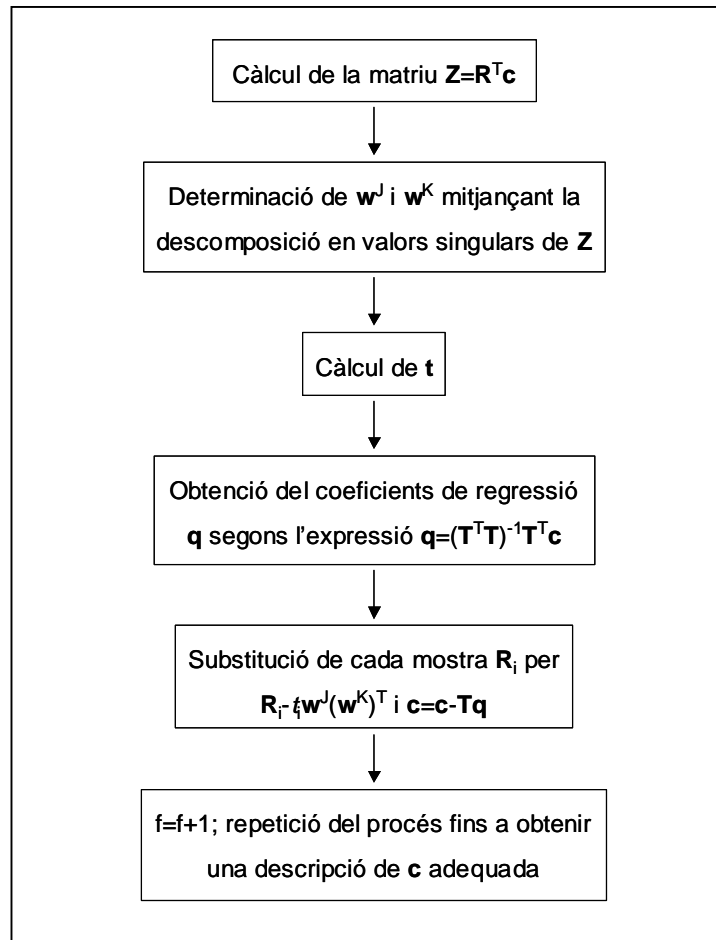


Figura 8. Procés de calibració utilitzant 3-PLS.

on  $z_{ij}$  són els elements d'una matriu  $Z$  que està definida com:

$$Z = R^T c \quad (8)$$

Per tal de maximitzar l'expressió (7), es formula aquesta en forma de matrius, de manera que es poden obtenir  $w^j$  i  $w^k$  a partir de la matriu  $Z$

mitjançant la seva descomposició en valors singulars (SVD) com es mostra a l'equació (9):

$$\max_{\mathbf{w}^J, \mathbf{w}^K} [(\mathbf{w}^J)^T \mathbf{Z} \mathbf{w}^K] \Rightarrow (\mathbf{w}^J, \mathbf{w}^K) = \text{SVD}(\mathbf{Z}) \quad (9)$$

Una vegada es coneixen  $\mathbf{w}^J$  i  $\mathbf{w}^K$ , es calcula  $\mathbf{t}$  segons l'equació (4) mitjançant el model de mínims quadrats. A continuació, es determinen els coeficients de regressió  $\mathbf{q}$  que relacionen  $\mathbf{t}$  amb la concentració segons l'expressió (2).

Finalment, es modifiquen  $\mathbf{R}_i$  i  $\mathbf{c}$  segons les expressions:

$$\mathbf{R}_i = \mathbf{R}_i - \mathbf{t}_i \mathbf{w}^J (\mathbf{w}^K)^T \quad (10)$$

$$\mathbf{c} = \mathbf{c} - \mathbf{T} \mathbf{q} \quad (11)$$

Aquest procés es repeteix per a tots els diferents factors  $f$ .

Aquest mètode s'ha utilitzat en diferents treballs, com la determinació de PAHs en aigua [238], la quantificació de barreges dels isòmers 2-, 3- i 4-etilpiridina utilitzant la injecció directa en un sistema tàndem MS/MS [246] o la determinació d'àcid oxolínic i flumequina en múscul de pollastre, porc i salmó [247].

Com a mètode de calibració de segon ordre, presenta l'avantatge de què pot quantificar els analits d'interès en presència de substàncies interferents, però també l'inconvenient de què no permet la identificació dels analits presents en la mostra [238].

### 1.3.2.2. Mètode generalitzat d'anihilació de rang (GRAM)

El GRAM és un mètode de calibració de segon ordre que es basa en l'anàlisi de components principals (*Principal Component Analysis*, PCA), en el qual es

descomposa la matriu de les dades en dues matrius **P** i **T**, segons l'expressió (1).

Una de les característiques per les quals aquest mètode és interessant és que permet la quantificació dels analits d'interès amb només una mostra de concentració coneguda. Per tant, només utilitza dues matrius: una de calibració (**R**<sub>0</sub>) i una de predicció (**R**<sub>u</sub>). Aquestes dues matrius es poden escriure de la següent forma [248]:

$$\mathbf{R}_0 = \mathbf{X}\mathbf{C}_0\mathbf{Y}^T + \mathbf{E}_0 \quad (12)$$

$$\mathbf{R}_u = \mathbf{X}\mathbf{C}_u\mathbf{Y}^T + \mathbf{E}_u \quad (13)$$

on **X**(J<sub>1</sub>×K) i **Y**(J<sub>2</sub>×K) contenen els espectres i perfils normalitzats respectivament, **C**<sub>0</sub> i **C**<sub>u</sub> són matrius diagonals (K×K) que contenen les concentracions relatives dels diferents factors i **E**<sub>0</sub> i **E**<sub>u</sub> (J<sub>1</sub>×J<sub>2</sub>) contenen els termes d'error. En aquestes matrius, J<sub>1</sub> indica el nombre de longituds d'ona enregistrades durant l'adquisició de cada espectre, J<sub>2</sub> és el nombre d'espectres obtinguts al llarg del cromatograma i K és el nombre total de constituents en les dues matrius.

Així, suposant que els errors **E**<sub>0</sub> i **E**<sub>u</sub> són negligibles, la diferència que hi ha entre les matrius de dades és deguda a la diferència en les concentracions dels analits, ja que els espectres (**X**) i els perfils (**Y**) són els mateixos. Per tant, el mètode pot estimar la diferència entre les concentracions de dues mostres a partir de la diferència entre les matrius de dades corresponents.

Aquest mètode, a més de permetre la quantificació dels analits, també permet la seva identificació, com en el cas dels mètodes de resolució de corbes, ja que, a diferència d'altres mètodes com el 3-PLS, és capaç d'extreure els perfils i espectres a partir de les dades inicials.

La Figura 9 mostra el procés de calibració i quantificació dels analits en una mostra desconeguda.

Per fer la descomposició de les dades inicials segons les expressions (12) i (13), Sánchez *et al.* [235] van definir una matriu  $\mathbf{L}$  com la suma de les dues matrius  $\mathbf{R}_0$  i  $\mathbf{R}_u$  i van proposar la seva descomposició en valors propis segons l'equació:

$$\mathbf{L} = \mathbf{R}_0 + \mathbf{R}_u = \mathbf{U}\mathbf{S}\mathbf{V}^T + \mathbf{E}_Q \quad (14)$$

on  $\mathbf{U}$  ( $J_1 \times F$ ) i  $\mathbf{V}$  ( $J_2 \times F$ ) contenen els vectors singulars i  $\mathbf{S}$  ( $F \times F$ ) és una matriu diagonal que conté els valors singulars. Per a trobar aquesta descomposició, cal resoldre l'equació (15), que és un problema de valors i vectors singulars:

$$(\mathbf{S}^{-1}\mathbf{U}^T\mathbf{R}_u\mathbf{V})^T\mathbf{M} = \mathbf{M}\mathbf{\Pi} \quad (15)$$

on la matriu  $\mathbf{\Pi}$  és una matriu diagonal que conté els valors propis  $\pi_k$ .

Aquesta descomposició és un bon procediment per dur a terme un PCA, ja que els *scores* ( $\mathbf{T}$ ) i *loadings* ( $\mathbf{P}$ ) (veure equació (1)) es poden expressar com a  $\mathbf{T} = \mathbf{U}\mathbf{S}$  i  $\mathbf{P} = \mathbf{V}^T$ .

Una vegada coneguts la matriu de valors propis  $\mathbf{\Pi}$  i la resta de matrius de l'equació anterior, es calculen les matrius  $\mathbf{X}$  i  $\mathbf{Y}$  segons les expressions:

$$\mathbf{X} = \mathbf{U}\mathbf{\Pi}\mathbf{M} \quad (16)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{V}(\mathbf{M}^{-1})^T \quad (17)$$

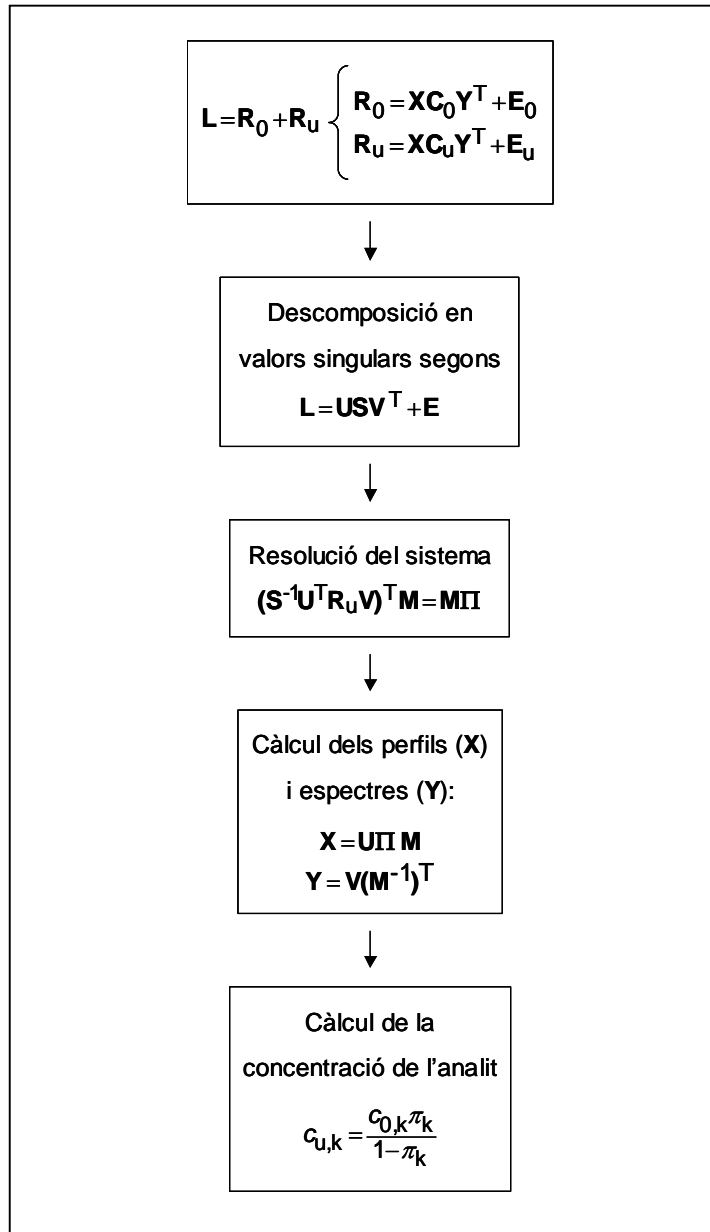


Figura 9. Procés de calibració i quantificació utilitzant GRAM.

Finalment, una vegada coneguts  $\mathbf{X}$  i  $\mathbf{Y}$ , es pot calcular la concentració de l'analit d'interès en la mostra de predicció segons l'expressió:

$$c_{u,k} = \frac{c_{0,k}\pi_k}{1 - \pi_k} \quad (18)$$

Aquest mètode s'ha utilitzat en diferents treballs, com per exemple la determinació de compostos aromàtics en gasolina d'avió mitjançant un sistema d'acoblament bidimensional GCxGC [249] o per determinar cinètiques de reacció [250].

Tot i això, aquest algorisme no ha estat molt utilitzat per a la quantificació de compostos en mostres ambientals emprant dades obtingudes mitjançant sistemes com l'HPLC-DAD amb tècniques d'extracció prèvies a la separació, degut a les petites variacions que es poden produir en els temps de retenció als quals elueixen els analits en diferents anàlisis. En el cas d'altres mètodes de calibració de segon ordre, com és el 3-PLS, en el qual s'utilitzen diferents mostres per a la construcció del model de calibració, aquestes variacions estan incloses al model, de manera que la quantificació no es veu afectada. Però en el cas del GRAM, en el qual la quantificació es duu a terme utilitzant una única mostra de calibració, els efectes són més notables, ja que pot fer que no es compleixi el model de descomposició assumit inicialment, expressat en les equacions 12 i 13, degut a què la matriu  $\mathbf{X}$  d'aquestes expressions, és a dir, els perfils cromatogràfics, no són totalment iguals, la qual cosa pot impedir la correcta quantificació.

Recentment han aparegut alguns estudis que proposen la utilització de mètodes de resolució de corbes com l'ITTFA [251] o la *Trilinear Decomposition* (TLD) [242] per a alinear els pics cromatogràfics, evitant així l'efecte de la irreproducibilitat de l'elució dels analits en la quantificació dels mateixos.

#### I.4. BIBLIOGRAFIA

- [1] M. Seoáñez Calvo, Manual de contaminación marina y restauración del litoral. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, 2000.
- [2] C. Park, Environment. Principles and applications. Routledge, New York, 2001.
- [3] J. L. Suárez de Vivero, Los océanos. Medio ambiente, recursos y políticas marinas. Ediciones del Serbal. Barcelona, 2001.
- [4] L. A. Kimball, International ocean governance. Using international law and organizations to manage marine resources sustainably. IUCN. 2001, Gland, Switzerland and Cambridge.
- [5] Council Directive 91/271/EC of 21 May 1991 concerning urban wastewater treatment , DO L 135, 30-5-9, 40.
- [6] Eutrophication in Europe's coastal waters, European Union Agency, Copenhagen, 2001.
- [7] Environment in the European Union at the turn of the century, European Union Agency, Copenhagen, 1999.
- [8] F. Hernández, J. Medina, J. Ansuátegui, Contaminación por metales pesados en el Mediterráneo, Servei de publicacions de la Diputació de Castelló. Castelló, 1990.
- [9] R. Johnston, Marine pollution. Academic Press. London, 1976.
- [10] Communication from the Commission to the Council and the European Parliament, Towards a strategy to protect and conserve the marine environment, Brussels, 2-10-2002, COM (2002) 539 final.
- [11] Directiva 2002/62/CE de la Comissió, de 9 de juliol de 2002, per la qual s'adapta al progrés tècnic per novena vegada l'annex I de la Directiva 76/769/CEE del Consell relativa a l'aproximació de les disposicions legals, reglamentàries i administratives dels Estats membres que limiten la comercialització i l'ús de determinades substàncies i preparats perillosos (compostos organoestànics). Diari Oficial de la Unió Europea, L 183, 58.



- [12] Communication from the Commission to the Council and the European Parliament, Implementation of the Community Strategy for Endocrine disruptors: a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife (COM (1999) 706), Brussels, 14-06-2001, COM (2001) 262 final.
- [13] A. Gianguzza, E. Pelizzetti, S. Sammartano, Chemistry of marine water and sediments. Editorial Springer. Berlin, 2002.
- [14] T. Harner, H. Kylin, T. F. Bidleman, W. M. Strachan, Environ. Sci. Technol. 33 (1999) 1157.
- [15] N. Voulvoulis, M. D. Scrimshaw, J. N. Lester, Mar. Pollut. Bull. 40 (2000) 938.
- [16] K. Martínez, I. Ferrer, M. D. Hernando, A. Rodríguez Fernández-Alba, R. M. Marcé, F. Borrull, D. Barceló, Environ. Technol. 22 (2001) 543.
- [17] M. T. Galceran, O. Jáuregui, Anal. Chim. Acta 304 (1995) 75.
- [18] K. Bester, N. Theobald, H. Fr. Schröder, Chemosphere 45 (2001) 817.
- [19] M. Petrovic, A. Rodríguez Fernández-Alba, F. Borrull, R. M. Marcé, E. González Mazo, D. Barceló, Environ. Toxicol. Chem. 21 (2002) 37.
- [20] E. Pujadas, J. Diaz Ferrero, R. Martí, F. Broto Puig, L. Comellas, M. C. Rodríguez Larena, Chemosphere 43 (2001) 449.
- [21] R. Siegener, R. F. Chen, Mar. Pollut. Bull. 44 (2002) 383.
- [22] S. Weigel, J. Kuhlmann, H. Hühnerfuss, Sci. Total Environ. 295 (2002) 131.
- [23] M. A. Rodríguez Delgado, M<sup>a</sup> J. Sánchez, V. González, F. García Montelongo, J. High Resol. Chromatogr. 19 (1996) 111.
- [24] O. S. Fatoki, A. Noma, Water, Air and Soil Pollut. 140 (2002) 85.
- [25] L. Brossa, R. M. Marcé, F. Borrull, E. Pocurull, J. Chromatogr. A 963 (2002) 287.
- [26] G.-P. Yang, X.-L. Liu, J.-Wu Zhang, Environ. Pollut. 101 (1998) 405.
- [27] J. V. Macías-Mora, E. Mendoza-Vega, J. A. Villaescusa-Celaya, Chemosphere 46 (2002) 459.
- [28] M. Tsapakis, E. G. Stephanou, I. Karakassis, Marine Chem. 80 (2003) 283.

- 
- [29] E. Eljarrat, J. Caixach, J. River, M. de Torres, A. Ginebreda, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 3589.
- [30] C. Piérard, H. Budzinski, P. Garrigues, *Environ. Sci. Technol.* 30 (1999) 2776.
- [31] A. V. Tkalin, *Environ. Pollut.* 91 (1996) 183.
- [32] D. A. Lambropoulou, V. A. Sakkas, T. A. Albanis, *J. Chromatogr. A* 1010 (2003) 1.
- [33] Z.-P. Lin, M. G. Ikonou, H. Jing, C. Mackintosh, F. A. P. C. Gobas, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 2100.
- [34] M. C. Alonso, D. Barceló, *Anal. Chim. Acta* 400 (1999) 211.
- [35] H. Greim, J. Ahlers, R. Bias, B. Broecker, H. Hollander, H.-P. Gelbke, H. J. Klimisch, I. Mangelsdorf, A. Paetz, N. Schöne, G. Stropp, R. Vogel, C. Weber, K. Ziegler-Skylakakis, E. Bayer, *Chemosphere* 28 (1994) 2203.
- [36] T. P. Knepper, F. Sacher, F. T. Lange, H. J. Brauch, F. Karrenbrock, O. Roerden, K. Lindner, *Waste Res.* 19 (1999) 77.
- [37] P. Literáthy, F. László, *Wat. Sci. Technol.* 40 (1999) 17.
- [38] M. C. Alonso, M. Castillo, D. Barceló, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2586.
- [39] R. Loos, J. Riu, M. C. Alonso, D. Barceló, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 1197.
- [40] S. Riediker, M. J.-F. Suter, W. Giger, *Water Res.* 34 (2000) 2069.
- [41] E. Pocurull, C. Aguilar, M. C. Alonso, D. Barceló, F. Borrull, R. M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 854 (1999) 187.
- [42] M.C. Alonso, E. Pocurull, R. M. Marcé, F. Borrull, D. Barceló, *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (2002) 2059.
- [43] H. Kataoka, T. Okazaki, M. Makita, *J. Chromatogr.* 473 (1989) 276.
- [44] C.-H. Liu, W.-H. Ding, *J. Chromatogr. A* 926 (2001) 341.
- [45] P. Jandera, J. Fischer, V. Stanek, M. Kucerová, P. Zvoníček, *J. Chromatogr. A* 738 (1996) 201.
- [46] M. J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Chromatographia* 46 (1997) 204.
- [47] R. Loos, R. Niessner, *J. Chromatogr. A* 822 (1998) 291.
- [48] S. Angelino, A. B. Prevot, M. C. Gennaro, E. Pramauro, *J. Chromatogr. A* 845 (1999) 257.

- 
- [49] M. J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Analyst* 125 (2000) 2236.
- [50] J. B. Kim, J. P. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 916 (2001) 123.
- [51] T. W. Garner, E. S. Yeung, *J. Chromatogr.* 640 (1993) 397.
- [52] E. Minnoor, Y. Liu, D. J. Pietrzyk, *J. Chromatogr. A* 884 (2000) 297.
- [53] R. Loos, M. C. Alonso, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 890 (2000) 225.
- [54] W. D. Pfeffer, E. S. Yeung, *J. Chromatogr.* 557 (1991) 125.
- [55] S. J. Kok, E. M. Kristenson, C. Gooijer, N. H. Velthorst, U. A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 771 (1997) 331.
- [56] S. J. Kok, G. Ph. Hoornweg, T. De Ridder, O. A. Th. Brinkman, N. H. Velthorst, C. Gooije, *J. Chromatogr. A* 806 (1998) 355.
- [57] M. J. Cugat, C. Aguilar, R. M. Marcé, F. Borrull, M. Calull, *Electrophoresis* 23 (2002) 2279.
- [58] M. J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Analyst* 126 (2001) 1312.
- [59] P. Gerbauer, P. Bocek, *Electrophoresis* 21 (2000) 3898.
- [60] S. Chen, S. W. Graves, M. L. Lee, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 341.
- [61] R. M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 273.
- [62] S. Schullerer, F. H. Frimmel, *Anal. Chim. Acta* 283 (1993) 251.
- [63] I. S. Kim, F. I. Sasinos, D. K. Rishi, R. D. Stephens, M. A. Brown, *J. Chromatogr.* 559 (1991) 177.
- [64] G. R. Bear, C. W. Lawley, R. M. Riddle, *J. Chromatogr.* 302 (1984) 65.
- [65] O. Zerbinati, G. Ostacoli, *J. Chromatogr. A* 640 (1993) 231.
- [66] R. El Harrak, M. Calull, R. M. Marcé, F. Borrull, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 69 (1998) 295.
- [67] B. Alterbach, W. Giger, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2325.
- [68] O. Zerbinati, G. Ostacoli, *J. Chromatogr. A* 671 (1994) 217.
- [69] R. El Harrak, M. Calull, R. M. Marcé, F. Borrull, *Quím. Anal.* 16 (Suppl. 2) (1997) S251.
- [70] F. Th. Lange, M. Wenz, H.-J. Brauch, *J. High Resol. Chromatogr.* 18 (1995) 243.
- [71] T. Storm, T. Reemtsma, M. Jekel, *J. Chromatogr. A* 854 (1999) 175.

- 
- [72] G. Socher, R. Nussbaum, K. Rissler, E. Lankmayr, *Chromatographia* 54 (2001) 65.
- [73] S. Fichtner, F. Th. Lange, W. Schmidt, H.-J. Brauch, *Fresenius J. Anal. Chem.* 353 (1995) 57.
- [74] O. Zerbinati, G. Ostacoli, *J. Chromatogr. A* 671 (1994) 217.
- [75] B. Bastian, T. Knepper, P. Hoffmann, H. M. Ortner, *Fresenius J. Anal. Chem.* 348 (1994) 674.
- [76] K. Peltonen, T. Kuljukka, *J. Chromatogr. A* 710 (1995) 93.
- [77] K. M. Arzayus, R. M. Dickhut, E. A. Canuel, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 2178.
- [78] A. Jiries, H. Hussain, J. Lintelmann, *Water Air and Soil Pollut.* 121 (2000) 217.
- [79] R. Ferrer, J. Guiteras, J. L. Beltrán, *Analytical Letters* 29 (1996) 2201.
- [80] H.-P. Nirmaier, E. Fischer, A. Meyer, G. Henze, *J. Chromatogr. A* 730 (1996) 169.
- [81] M. Biziuk, J. Namiesnik, J. Czerwinski, D. Gorlo, B. Makuch, W. Janicki, Z. Polkowska, L. Wolska, *J. Chromatogr. A* 733 (1996) 171.
- [82] G. Kiss, Z. Varga-Puchony, A. Gelencsér, Z. Krivácsy, Á. Molnár, J. Hlavay, *Chromatographia* 48 (1998) 149.
- [83] C. Maldonado, J. M. Bayona, L. Bodineau, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 2693.
- [84] O. P. Heemken, B. Stachel, N. Theobald, B. W. Wenclawiak, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38 (2000) 11.
- [85] J. Dachs, J. M. Bayona, C. Raoux, J. Albaigés, *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997) 682.
- [86] G. Kiss, Z. Varga-Puchony, J. Hlavay, *J. Chromatogr. A* 725 (1996) 261.
- [87] D. Barceló, A. Ouriña, J.S. Salau, S. Perez, *Anal. Chim. Acta* 376 (1998) 49.
- [88] P. Desideri, L. Lepri, L. Checchini, D. Santianni, *Annali di Chimica* 86 (1996) 215.
- [89] F. Sun, D. Littlejohn, M. D. Gibson, *Anal. Chim. Acta* 364 (1998) 1.

- 
- [90] R. J. Law, C. Kelly, K. Baker, J. Jones, A. D. McIntosh, C. F. Moffat, *J. Environ. Monitor.* 4 (2002) 383.
- [91] E. W. Taylor, *Toxicology of aquatic pollution. Physiologica, cellular and molecular approaches*, Cambridge University Press, 1996.
- [92] Proposal for a Council Directive, Commission of the European Communities, Brussels, 1994.
- [93] E. Lesellier, *Analisis*, 27 (1999) 363.
- [94] E. Lesellier, *Analisis*, 27 (1999) 241.
- [95] J. L. Bernal, M. J. Nozal, L. Toribio, M. L. Serna, F. Borrull, R. M. Marcé, E. Pocurull, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 321.
- [96] D. Martínez, M. J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 65.
- [97] G. Kavran, F. B. Erim, *J. Chromatogr. A* 949 (2002) 301.
- [98] M.-M. Hsieh, Y.-C. Kuo, P.-L. Tsai, H.-T. Chang, *J. Chromatogr. A* 924 (2001) 397.
- [99] J. T. Koch, B. Beam, K. Scott Phillips, J. F. Wheeler, *J. Chromatogr. A* 914 (2001) 223.
- [100] M. G. Garguilo, D. H. Thomas, D. S. Anex, D. J. Rakestraw, *J. Chromatogr. A* 883 (2000) 231.
- [101] US EPA, EPA 40 CFR, Part 136, Method 610- Polynuclear aromatic Hydrocarbons, Fed. Regist. 49, Washington, DC, 1984.
- [102] S. R. Sargenti, H. M. McNair, *J. Microcolumn Sep.* 10 (1998) 125.
- [103] J. Slobodník, S. Ramalho, B. L. M. Van Baar, A. J. H. Louter, U. A. Th. Brinkman, *Chemosphere* 41 (2000) 1469.
- [104] R. El Harrak, M. Calull, R. M. Marcé, F. Borrull, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 64 (1996) 47.
- [105] S. Moret, V. Cericco, L. S. Conte, *J. Microcolumn Sep.* 13 (2001) 13.
- [106] C. H. Marvin, R. W. Smith, D. W. Bryant, B. E. McCarry, *J. Chromatogr. A* 863 (1999) 13.
- [107] M. R. Hadjmohammadi, M. H. Fatemi, *J. High Resol. Chromatogr.* 18 (1995) 2569.
- [108] S. Pérez, I. Ferrer, M. C. Hennion, D. Barceló, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4996.

- [109] V. Pino, J. H. Ayala, A. M. Afonso, V. González, J. Chromatogr. A 949 (2002) 291.
- [110] J. F. Anacleto, L. Ramaley, F. M. Benoit, R. K. Boyd, M. A. Quillian, Anal. Chem. 67 (1995) 4145.
- [111] H. Moriwaki, A. Imaeda, R. Arakawa, Anal. Commun. 36 (1999) 53.
- [112] M. Taniko, S. Daishima, K. Yamaguchi, T. Nakahara, J. Chromatogr. A 928 (2001) 53.
- [113] D. Thomas, S. M. Crain, P. G. Sim, F. M. Benoit, J. Mass Spectrom. 30 (1995) 1034.
- [114] S. Pérez, D. Barceló, Chromatographia 53 (2001) 475.
- [115] R. B. Robb, T. R. Covey, A. P. Bruins, Anal. Chem. 72 (2000) 3653.
- [116] E. Manoli, C. Samara, Trends Anal. Chem. 18 (1999) 417.
- [117] "Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Drinking Water by Liquid-Liquid Extraction and HPLC with Coupled Ultraviolet and Fluorescence Detection", Mètode 550 de la EPA, [http://reports.er.usgs.gov/dev60cgi/rwcgi60?report=nemi\\_method\\_details.rdf+userid=nemi\\_pub/nemi\\_pub@wiport+desformat=html+destype=cache+paramform=no+p\\_method\\_id=4782](http://reports.er.usgs.gov/dev60cgi/rwcgi60?report=nemi_method_details.rdf+userid=nemi_pub/nemi_pub@wiport+desformat=html+destype=cache+paramform=no+p_method_id=4782); NEMI (National Environmental Method Index), 27-08-2003.
- [118] R. Doong, S. Chang, Y. Sun, J. Chromatogr. A 879 (2000) 177.
- [119] R. Doong, S. Chang, Y. Sun, J. Chromatogr. Sci. 38 (2000) 528.
- [120] A. C. Heiden, B. Kolahgar, A. Hoffmann, Gerstel Application note 8/2001.
- [121] P. Popp, C. Bauer, L. Wennrich, Anal. Chim. Acta 436 (2001) 1.
- [122] J. A. Jönsson, L. Mathiasson, J. Chromatogr. A 902 (2000) 251.
- [123] R. Ferrer, J. L. Beltrán, J. Guiteras, Anal. Chim. Acta 330 (1996) 199.
- [124] R. El Harrak, M. Calull, R. M. Marcé, F. Borrull, J. High Resol. Chromatogr. 21 (1998) 667.
- [125] J. Dachs, J. M. Bayona, Chemosphere 35 (1997) 1669.
- [126] S. Lacorte, I. Guiffard, D. Fraise, D. Barceló, Anal. Chem. 72 (2000) 1430.
- [127] L. Toribio, M. J. del Nozal, J. L. Bernal, J. J. Jiménez, M. L. Serna, J. Chromatogr. A 823 (1998) 163.

- 
- [128] M. Bouzige, V. Pichon, M. C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 197.
- [129] S. L. Cresswell, S. J. Haswell, *Analyst* 124 (1999) 1361.
- [130] R. Leeming, W. Maher, *Org. Geochem.* 15 (1990) 469.
- [131] S. Pérez, D. Barceló, *Analyst* 125 (2000) 1273.
- [132] S. Meyer, S. Cartellieri, H. Steinhart, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4023.
- [133] J. D. Berset, M. Ejem, R. Holzer, P. Lischer, *Anal. Chim. Acta* 383 (1999) 263.
- [134] D. Knopp, M. Seifert, V. Väänänen, R. Niessner, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 2035.
- [135] R. M. Vilanova, P. Fernández, C. Martínez, J. O. Grimalt, *Water Res.* 35 (2001) 3916.
- [136] V. Pino, J. H. Ayala, A. M. Afonso, V. González, *Talanta* 54 (2001) 15.
- [137] M. Letellier, H. Budzinski, J. Bellocq, J. Connan, *Org. Geochem.* 30 (1999) 1353.
- [138] S. Thompson, H. Budzinski, K. LeMenach, M. Letellier, P. Garrigues, *Anal. Bioanal. Chem.* 372 (2002) 196.
- [139] M. Niederer, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 5 (1998) 209.
- [140] V. López-Ávila, *Critical Rev. Anal. Chem.* 29 (1999) 195.
- [141] V. Pino, J. H. Ayala, A. M. Afonso, V. González, *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 515.
- [142] S. Nicol, J. Dugay, M.-C. Hennion, *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 451.
- [143] P. Popp, P. Keil, M. Möder, A. Paschke, U. Thuss, *J. Chromatogr. A* 774 (1997) 203.
- [144] Y. F. Song, X. Jing, S. Fleischmann, B.-M. Wilke, *Chemosphere* 48 (2002) 993.
- [145] S. Lundstedt, B. Van Bavel, P. Haglund, M. Tysklind, L. Öberg, *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001) 526.
- [146] S. B. Hawthorne, C. B. Grabanski, E. Martin, D. J. Miller, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 421.
- [147] R. M. Smith, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 31.

- 
- [148] T. Hyötyläinen, T. Andersson, K. Hartonen, K. Kuosmanen, M.-L. Riekkola, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3070.
- [149] L. Ramos, E. M. Kristenson, U. A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 3.
- [150] S. Lundstedt, B. Van Bavel, P. Haglund, M. Tysklind, L. Öberg, *J. Chromatogr. A* 883 (2000) 151.
- [151] J. I. Kroschwitz, H. F. Mark, N. M. Bikales, C. G. Overberger, G. Menges, *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, 2nd edition. John Wiley & Sons, Inc., USA, 1985.
- [152] M. Thomsen, A. G. Rasmussen, L. Carlsen, *Chemosphere* 38 (1999) 2613.
- [153] [www.phthalates.com](http://www.phthalates.com); Phthalates Information Centre, 30-06-2003.
- [154] A. M. Api, *Food and Chemical Toxicology* 39 (2001) 97.
- [155] [www.plasticizers.org](http://www.plasticizers.org); Plasticizers Information Centre, 30-06-2003.
- [156] A. Peñalver, E. Pucurull, F. Borrull, R. M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 922 (2001) 377.
- [157] G. Prokupková, K. Holadová, J. Poustka, J. Hajslová, *Anal. Chim. Acta* 457 (2002) 211.
- [158] K. Hashizume, J. Nanya, C. Toda, T. Yasui, H. Nagano, N. Kojima, *Biol. Pharm. Bull.* 25 (2002) 209.
- [159] R. Ritsema, W. P. Cofino, P. C. M., Frintrop, U. A. T. Brinkman, *Chemosphere* 18 (1989) 2161.
- [160] M. Castillo, M. C. Alonso, J. Riu, D. Barceló, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 1300.
- [161] M. Castillo, M. F. Alpendurada, D. Barceló, *J. Mass Spectrom.* 32 (1997) 1100.
- [162] D. C. McDowell, C. D. Metcalfe, *J. Great Lakes Res.* 27 (2001) 3.
- [163] T. J. Lopes, E. T. Furlong, J. W. Pritt, *Environmental Toxicology and risk assessment: American Testing and Materials, ASTM STP 1333, v.7* (1998) 105.
- [164] M.-C. Yin, K.-H. Su, *J. of Food and Drug Analysis* 4 (1996) 313.



- [165] National Primary Drinking Regulations, Federal register; Part 12, 40 CFR Part 141, US Environmental Protection Agency, Washington, DC, July 1st 1991, p. 395.
- [166] Decisió n°2455/2001/EC del Parlament Europeu i del Consell Europeu del 20 de novembre de 2001 que estableix la llista de substàncies prioritàries en el camp de política d'aigües i que modifica la directiva 2000/60/EC, Diari Oficial de les Comunitats Europees, L331/1, 15-12-2001.
- [167] J.-D. Berset, R. Etter-Holzer, J. AOAC Int. 84 (2001) 383.
- [168] A. Peñalver, E. Pucurull, F. Borrull, R. M. Marcé, J. Chromatogr. A 872 (2000) 191.
- [169] J. Bartulewicz, E. Bartulewicz, J. Gawłowski, J. Niedzielski, Chem. Anal. (Warsaw) 41 (1996) 753.
- [170] K. Luks-Betlej, P. Popp, B. Janoszka, H. Paschke, J. Chromatogr. A 938 (2001) 93.
- [171] T. Hyötyläinen, K. Grob, M. Biedermann, M.-L. Riekkola, J. High Resol. Chromatogr. 20 (1997) 410.
- [172] <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/8061a.pdf>; Mètode 8061A de la EPA per a la determinació de ftalats mitjançant GC i ECD, US Environmental Protection Agency, 26-08-2003.
- [173] S. Jonsson, J. Ejlertsson, B. H. Svensson, Adv. Environ. Res. 7 (2003) 429.
- [174] T. Suzuki, K. Yaguchi, S. Suzuki, Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 3757.
- [175] S. Jara, C. Lysebo, T. Greibrokk, E. Lundanes, Anal. Chim. Acta 407 (2000) 165.
- [176] M. T. Kelly, M. Larroque, J. Chromatogr. A 841 (1999) 177.
- [177] M. Castillo, A. Oubiña, D. Barceló, Environ. Sci. Technol. 32 (1998) 2180.
- [178] K. Inoue, M. Kawaguchi, F. Okada, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, Anal. Bioanal. Chem. 375 (2003) 527.
- [179] K. Holadová, J. Hajslová, Intern. J. Environ. Anal. Chem. 59 (1995) 43.

- [180] E. M. J. Verbruggen, H. J. C. Klamer, L. Villerius, U. A. Th. Brinkman, J. L. M. Hermens, *J. Chromatogr. A* 835 (1999) 19.
- [181] M. J. Bauer, R. Herrmann, *Waste Manage. Res.* 16 (1998) 446.
- [182] N. Casajuana, S. Lacorte, *Chromatographia* 57 (2003) 649.
- [183] Y. Saito, Y. Nakao, M. Imaizumi, Y. Morishima, Y. Kiso, K. Jinno, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 81.
- [184] H. Fromme, T. Kuchler, T. Otto, K. Pilz, J. Müller, A. Wenzel, *Water Res.* 36 (2002) 1429.
- [185] A. Cincinelli, A. M. Stortini, M. Perugini, L. Checchini, L. Lepri, *Marine Chem.* 76 (2001) 77.
- [186] R. Lega, G. Ladwig, O. Meresz, R. E. Clement, G. Crawford, R. Salemi, Y. Jones, *Chemosphere* 34 (1997) 1705.
- [187] <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/main.htm>; Test methods, Environmental Protection Agency, 30-06-2003.
- [188] M. Petrovic, D. Barceló, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4560.
- [189] A. R. Fernández-Alba, M. D. Hernando, L. Piedra, Y. Christi, *Anal. Chim. Acta* 456 (2002) 303.
- [190] K. V. Thomas, *Biofouling* 17 (2001) 73.
- [191] P. T. C. Harrison, P. Holmes, C. D. N. Humfrey, *Sci. Total Environ.* 205 (1997) 97.
- [192] K. V. Thomas, M. McHugh, M. Waldock, *Sci. Total Environ.* 293 (2002) 117.
- [193] C. Tixier, M. Sancelme, F. Bonnemoy, A. Cuer, H. Veschambre, *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (2001) 1381.
- [194] K. V. Thomas, T. W. Fileman, J. W. Readman, M. J. Waldock, *Mar. Pollut. Bull.* 42 (2001) 677.
- [195] J. L. Zhou, T. W. Fileman, S. Evans, P. Donkin, R. Fauzi, C. Mantoura, S. J. Rowland, *Mar. Pollut. Bull.* 32 (1996) 599.
- [196] S. Tóth, K. Becker-van Slooten, L. Spack, L. F. De Alencastro, J. Tarradellas, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57 (1996) 426.
- [197] D. Liu, G. J. Pacepavicius, R. J. Maguire, Y. L. Lau, H. Okamura, I. Aoyama, *Water Res.* 33 (1999) 2833.

- 
- [198] S. Biselli, K. Bester, H. Hühnerfuss, K. Fent, *Mar. Pollut. Bull.* 40 (2000) 233.
- [199] I. Tolosa, J. W. Readman, A. Blaevoet, S. Ghilini, J. Bartocci, M. Horvat, *Mar. Pollut. Bull.* 32 (1996) 335.
- [200] H. Okamura, I. Aoyama, Y. Ono, T. Nishida, *Mar. Pollut. Bull.* 47 (2003) 59.
- [201] K. Martínez, I. Ferrer, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 879 (2000) 27.
- [202] V. Voulvoulis, M. D. Scrimshaw, J. N. Lester, *Chromatographia* 50 (1999) 353.
- [203] E. Pocurull, L. Brossa, F. Borrull, R. M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 361.
- [204] A. Agüera, L. Piedra, M. D. Hernando, A. Rodríguez Fernández-Alba, *J. Chromatogr. A* 889 (2000) 261.
- [205] R. J. C. A. Steen, P. E. G. Leonards, U. A. Th. Brinkman, W. P. Cofino, *J. Chromatogr. A* 766 (1997) 153.
- [206] M. D. Hernando, L. Piedra, A. Belmonte, A. Agüera, A. R. Fernández-Alba, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 103.
- [207] I. Tolosa, J. W. Readman, *Anal. Chim. Acta* 335 (1996) 267.
- [208] I. Liška, J. Slobodník, *J. Chromatogr. A* 733 (1996) 235.
- [209] L. Piedra, A. Tejedor, M. D. Hernando, A. Agüera, D. Barceló, A. Fernández-Alba, *Chromatographia* 52 (2000) 631.
- [210] Y. Akiyama, N. Yoshioka, M. Tsuji, *J. Food Hyg. Soc. Japan* 39 (1998) 303.
- [211] I. Ferrer, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 854 (1999) 197.
- [212] A. C. Hogenboom, M. P. Hofman, D. A. Jolly, W. M. A. Niessen, U. A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 377.
- [213] R. Carabias, E. Rodriguez, M. E. Fernández, F. J. Sánchez, *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 471.
- [214] C. E. Green, M. H. Abraham, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 41.
- [215] K. V. Thomas, *J. Chromatogr. A* 825 (1998) 29.
- [216] M. H. Lamoree, C. P. Swart, A. van der Horst, B. van Hattum, *J. Chromatogr. A* 970 (2000) 183.

- [217] A. R. Fernández-Alba, A. Agüera, M. Contreras, G. Peñuela, I. Ferrer, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 35.
- [218] A. Peñalver, E. Pucurull, F. Borrull, R. M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 839 (1999) 253.
- [219] D. A. Lambropoulou, V. A. Sakkas, T. A. Albanis, *Anal. Chim. Acta* 468 (2002) 171.
- [220] B. Ballesteros, D. Barceló, F. Sánchez-Baeza, F. Camps, M. P. Marco, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4004.
- [221] I. Ferrer, M.-C. Hennion, D. Barceló, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4508.
- [222] P. Bou Carrasco, S. Díez, J. Jiménez, M. P. Marco, J. M. Bayona, *Water Res.* 37 (2003) 3658.
- [223] H. Martens, *Multivariate calibration*. Wiley. Chichester, 1989.
- [224] E. Sánchez, B. R. Kowalski, *J. Chemom.* 2 (1988) 247.
- [225] E. Sánchez, B. R. Kowalski, *J. Chemom.* 2 (1988) 265.
- [226] K. S. Booksh, B. R. Kowalski, *Anal. Chem.* 66 (1994) A782.
- [227] C.-N. Ho, G. D. Christian, E. R. Davidson, *Anal. Chem.* 50 (1978) 1108.
- [228] M. Linder, R. Sundberg, *J. Chemom.* 16 (2002) 12.
- [229] P. K. Hopke, *Chemom. Intell. Lab. Sys.* 6 (1989) 7.
- [230] B. G. M. Vandeginste, F. Leyten, M. Gerritsen, J. W. Noor, G. Kateman *J. Chemom.* 1 (1987) 51.
- [231] R. Tauler, *Chemom. Intell. Lab. Sys.* 30 (1995) 133.
- [232] R. Tauler, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.* 12 (1993) 319.
- [233] B. G. M. Vandeginste, D. L. Massart, L. M. C. Buydens, S. De Jong, P. J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of chemometrics and qualimetrics, Part B*. Elsevier. Amsterdam, 1998.
- [234] R. Bro, *Chemom. Intell. Lab. Sys.* 38 (1997) 149.
- [235] E. Sánchez, B. R. Kowalski, *Anal. Chem.* 58 (1986) 496.
- [236] R. Bro, *Multi-way analysis in the food industry. Models, algorithms and applications*. Tesi doctoral. Universitat d'Amsterdam, 1998.
- [237] R. Bro, *J. Chemom.* 10 (1996) 47.
- [238] J. L. Beltrán, J. Guiteras, R. Ferrer, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1949.

- 
- [239] D. K. Pedersen, L. Munck, S. B. Engelsen, *J. Chemom.* 16 (2002) 451.
- [240] K. S. Booksh, A. R. Muroski, M. L. Myrick, *Anal. Chem.* 68 (1996) 3539.
- [241] E. Comas, R. A. Gimeno, J. Ferré, R. M. Marcé, F. Borrull, F. X. Rius, *J. Chromatogr. A* 988 (2003) 277.
- [242] A. G. Frenich, D. P. Zamora, M. M. Galera, J. L. M. Vidal, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 974.
- [243] J. Saurina, R. Tauler, *Analyst* 125 (2000) 2038.
- [244] A. de Juan, R. Tauler, *J. Chemom.* 15 (2001) 749.
- [245] H. A. L. Kiers, *J. Chemom.* 14 (2000) 105.
- [246] C. G. Zampronio, S. P. Gurden, L. A. B. Moraes, M. N. Eberlin, A. K. Smilde, R. J. Poppi, *Analyst* 127 (2002) 1054.
- [247] J. A. Hernández-Arteseros, J. L. Beltrán, R. Compañó, M. D. Prat, *J. Chromatogr. A* 942 (2002) 275.
- [248] N. K. M. Faber, R. Boqué, J. Ferré, *Chemom. Intell. Lab. Sys.* 55 (2001) 67.
- [249] C. G. Fraga, B. J. Prazen, R. E. Synovec, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4154.
- [250] Y. L. Xie, J. J. Baeza-Baeza, G. Ramis-Ramos, *Chemom. Intell. Lab. Sys.* 32 (1996) 215.
- [251] E. Comas, R. A. Gimeno, J. Ferré, R. M. Marcé, F. Borrull, F. X. Rius, *Anal. Chim. Acta* 470 (2002) 163.



## **CAPÍTOL II**

---

### **PART EXPERIMENTAL I RESULTATS**





Tenint en compte que, com s'ha comentat al capítol anterior, la contaminació al medi marí deguda a substàncies orgàniques no ha estat gaire estudiada, en la present Tesi Doctoral s'han desenvolupat diferents mètodes per a la determinació d'aquest tipus de contaminants en aquest medi. Els estudis es van centrar en els ports de Tarragona, tot i que també es va avaluar la presència d'alguns contaminants en diferents ports de la costa de la província de Tarragona. Les famílies de compostos seleccionades pel seu interès mediambiental van ser els benzensulfonats i naftalensulfonats, els compostos aromàtics policíclics, els ftalats i adipats i els plaguicides antialgues.

En aquest capítol s'inclou la part experimental i els resultats obtinguts en els estudis realitzats durant la present Tesi Doctoral. Aquests resultats han estat publicats en diferent revistes científiques, de manera que es presenten en forma d'articles. Prèviament a cada un d'aquests articles s'inclou una introducció en la qual s'indiquen els objectius, així com la innovació de cada treball respecte a la investigació en el moment de la seva realització.

Els mètodes desenvolupats en aquests treballs s'han basat en l'acoblament de diferents tècniques d'extracció i detecció a la cromatografia líquida.

La tècnica d'extracció emprada per a la determinació de contaminants en mostres aquoses ha estat la SPE, que s'ha acoblat a la cromatografia líquida tant de forma *on-line* com *off-line*. En funció de les propietats dels compostos, s'han utilitzat diferents sorbents polimèrics. Així, en dos dels treballs presentats a continuació s'ha utilitzat el PLRP-s en la SPE acoblada en línia. Degut al desenvolupament i comercialització dels sorbents polimèrics altament entrecruats i tenint en compte els bons resultats obtinguts en l'extracció d'altres contaminants orgànics en altres tipus de mostres aquoses, aquests han estat els sorbents emprats en alguns dels estudis. D'entre els diferents sorbents de què es disposava, es van triar dos polímers de poliestirè-divinilbenzè, el LiChrolut EN i l'Isolute ENV+.

Per a l'anàlisi de sediments marins, la tècnica que s'ha utilitzat és l'extracció amb solvents orgànics degut a la seva senzillesa. Concretament, aquesta tècnica s'ha aplicat a l'extracció de diferents compostos utilitzant diclormetà i acetonitril com a solvents. Per afavorir l'extracció d'alguns compostos, en un dels treballs s'han utilitzat ultrasons.

Com a detectors, s'han desenvolupat mètodes emprant el detectors UV-visible i DAD, ja que aquests detectors s'utilitzen de forma habitual. No obstant això, i degut als baixos nivells de concentració que s'han d'assolir en l'anàlisi de mostres ambientals, és preferible utilitzar detectors més sensibles, com el detector de fluorescència. És per això que es va triar aquest detector per a la determinació de compostos aromàtics policíclics. En un dels treballs que es presenten a continuació, si bé també es va utilitzar aquest tipus de detecció, es va optar per l'espectrometria de fluorescència d'escanejat ràpid, ja que permet l'adquisició de dades de segon ordre per a cada mostra. A més d'aquests detectors, una tècnica cada vegada més utilitzada és la MS, ja que permet la confirmació dels analits estudiats en la mostra, així com la identificació d'altres substàncies presents en la mateixa. Degut a la disponibilitat d'un nou equip, aquesta és, doncs, la tècnica que es va utilitzar en els últims treballs. Pel que fa a l'acoblament d'aquesta tècnica i la cromatografia líquida, es va triar la interfase APCI degut a les característiques d'ionització dels compostos estudiats.

Com s'ha esmentat a l'apartat 1.3, els mètodes de calibració de segon ordre poden ser una bona eina matemàtica per resoldre alguns dels problemes sorgits en la determinació de contaminants. D'entre aquests mètodes, en la present Tesi s'han emprat el 3-PLS i el GRAM. El 3-PLS s'ha utilitzat per tal de quantificar els compostos a partir de pics parcialment solapats, la qual cosa permet la disminució del temps d'anàlisi, que és considerablement llarg en la determinació dels compostos aromàtics sulfonats degut a l'etapa de separació cromatogràfica. El GRAM, a més de permetre la quantificació a partir de pics parcialment solapats, permet quantificar els analits en mostres complexes mitjançant únicament una mostra de calibració, la qual cosa

permet la quantificació sense realitzar de nou la calibració per a cada nova mostra. És per això que aquest algorisme es va utilitzar en la determinació d'una barreja de compostos policíclics aromàtics en sediments marins.

En tots els treballs que es presenten a continuació, els mètodes desenvolupats s'han aplicat a l'anàlisi de mostres reals. Aquestes mostres han estat preses a diferents ports de la costa de Tarragona, tot i que també s'han analitzat algunes mostres d'aigua residual urbana de la depuradora d'aigua d'aquesta ciutat per tal d'avaluar la seva incidència sobre la contaminació del medi marí. A més, també s'han analitzat algunes mostres d'aigua del riu Ebre. També cal destacar d'entre aquests mètodes el desenvolupat per a la determinació de plaguicides antialgues i que ha permès la monitorització durant un període de cinc mesos en mostres de diferents ports.



---

**II.1. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS AROMÀTICS SULFONATS  
EN AIGUA COSTANERA MITJANÇANT L'ACOBLEMENT EN  
LÍNIA DE L'EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA DE PARELL IÒNIC I  
LA CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA DE PARELL IÒNIC AMB  
DETECCIÓ UV**



Com s'ha comentat a la introducció, els compostos aromàtics sulfonats són molt utilitzats en la indústria com a productes intermedis en la síntesi de colorants, pesticides, fàrmacs, etc. [1]. Entre aquests compostos es poden destacar els BZS i NS, sobretot els que contenen grups amino-, hidroxi- o sulfònic addicionals, que, a més de ser poc biodegradables, tenen una elevada polaritat, la qual cosa fa que siguin difícils d'eliminar en els processos de tractament d'aigües, com s'ha vist en alguns estudis sobre la seva presència en aigües de depuradora [2].

Aquests compostos són normalment analitzats utilitzant la SPE de parell iònic com a tècnica d'extracció i la IPLC amb detector d'UV-visible, FLD o MS com a tècnica de separació i determinació [3,4].

Pel que fa al procés d'extracció, els sorbents més emprats fins a la data de realització d'aquest estudi eren els sorbents C<sub>18</sub> i polimèrics de PS-DVB [6]. En el nostre grup s'havien fet estudis en els quals s'havien obtingut bons resultats utilitzant aquests sorbents per a l'anàlisi d'aigua de l'aixeta o de riu, però en el cas d'aigües amb una elevada força iònica, com és l'aigua de mar, els volums de ruptura disminuïen considerablement degut a l'efecte de les substàncies inorgàniques presents en aquest tipus de mostra en la formació del parell iònic [6].

L'aparició dels sorbents altament entrecreuat, que permeten una major retenció dels analits degut a la seva major àrea superficial, va fer que es proposés la utilització d'un d'aquests sorbents, el LiChrolut EN, per a la determinació d'una barreja de divuit BZS i NS, que contenien grups hidroxi-, amino- i sulfònics addicionals, en mostres d'aigua de mar. Fins a la data de realització d'aquest treball, aquest sorbent no s'havia utilitzat per a la SPE acoblada en línia a l'IPLC, si bé s'havia utilitzat per a l'extracció *off-line* d'aquests compostos sense la formació de parells iònics [7].

Per tant, l'objectiu d'aquest treball va ser l'aplicació del LiChrolut EN a la SPE de parell iònic per a la determinació d'aquests compostos en aigua de la

costa de Tarragona. Per a això, es va desenvolupar un mètode basat en l'acoblament en línia d'aquesta tècnica amb l'IPLC i un detector UV-visible.

En la primera part del treball es va optimitzar la separació dels compostos estudiats partint de les condicions obtingudes en un estudi previ realitzat al nostre grup [5]. Per a això, i tenint en compte que en les proves prèvies realitzades en aquestes condicions es va posar de manifest que la força elutròpica de la fase mòbil utilitzada per a la separació cromatogràfica no era suficient per eluir els compostos retinguts al sorbent de la SPE, es va utilitzar un sistema cromatogràfic que permetia l'elució dels analits utilitzant únicament la fracció orgànica de la fase mòbil i que s'havia emprat anteriorment en altres treballs realitzats al nostre grup per a altres compostos [8].

En l'etapa d'extracció, les recuperacions obtingudes en les condicions òptimes van ser millors que les obtingudes utilitzant C<sub>18</sub> o els sorbents polimèrics convencionals [5]. En mostres d'aigua de mar s'observa l'efecte de la força iònica de la mostra abans esmentat, però la disminució de les recuperacions no va ser tan significativa com en el cas dels sorbents convencionals [5].

El mètode desenvolupat es va aplicar a la quantificació dels compostos en mostres del port comercial de Tarragona, on hi ha alguns dels emissaris d'algunes empreses de la indústria petroquímica. En les mostres, van ser trobats dos dels compostos estudiats. Tot i que els compostos no es van poder identificar de forma inequívoca degut al tipus de detector utilitzat en aquest estudi, un d'ells havia estat identificat anteriorment en mostres similars analitzades pel nostre grup utilitzant la MS com a detector [4].

Posteriorment a aquest treball, s'han fet altres estudis utilitzant sorbents polimèrics altament entrecreuats per a l'extracció *off-line* d'aquest tipus de compostos, com per exemple l'Isolute ENV+ [9]. En aquest cas, però, el reactiu de formació del parell iònic s'utilitzava en l'etapa d'elució dels



analits, obtenint-se també bones recuperacions. Aquest sistema es va utilitzar per avaluar la presència d'alguns dels compostos inclosos en el present treball en mostres d'aigua d'alguns ports de la costa de Barcelona i Tarragona i es van detectar el 1-naftalensulfonat i el 2-naftalensulfonat.

El treball que s'adjunta a continuació i que ha estat publicat en la revista *Chromatographia*, 53 (2001) 22-26, inclou els resultats obtinguts en aquest estudi.

### **Bibliografia**

- [1] B. Alterbach, W. Giger, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2325
- [2] M. Farré, G. Klöter, M. Petrovic, M. C. Alonso, M. J. L. López de Alda, D. Barceló, *Anal. Chim. Acta* 456 (2002) 19.
- [3] S. Fichtner, F. Th. Lange, W. Schmidt, H.-J. Brauch, *Fresenius J. Anal. Chem.* 353 (1995) 57
- [4] E. Pocurull, C. Aguilar, M. C. Alonso, D. Barceló, F. Borrull, R. M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 854 (1999) 187
- [5] R. El Harrak, M. Calull, R. M. Marcé, F. Borrull, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 69 (1998) 295.
- [6] R. El Harrak, M. Calull, R. M. Marcé, F. Borrull, *Quím. Anal.* 16 (Suppl. 2) (1997) S251.
- [7] R. Loos, R. Niessner, *J. Chromatogr. A* 822 (1998) 291.
- [8] E. Pocurull, R. M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia* 41 (1995) 521.
- [9] M. C. Alonso, E. Pocurull, R. M. Marcé, F. Borrull, D. Barceló, *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (2002) 2059.



**DETERMINATION OF AROMATIC SULFONATES IN COASTAL WATER BY ON-LINE ION-PAIR SOLID-PHASE EXTRACTION/ION-PAIR LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH UV DETECTION**

**ABSTRACT**

A method for determining aromatic sulfonates in seawater is presented. Ion-pair solid-phase extraction is coupled on-line to ion-pair liquid chromatography with UV detection. In the enrichment step, the recoveries from 100 ml of seawater were higher than 65% for most analytes. Linearity was good and detection limits were between 0.02 and 1  $\mu\text{g l}^{-1}$ . The repeatability of the method, expressed as % of relative standard deviation ( $n=3$ ) was between 1 and 15%. The method was checked in coastal water near the commercial port of Tarragona, where effluents from the petrochemical industry are discharged. All the samples taken were found to contain 2-naphthalenesulfonate.

**Keywords:** Column liquid chromatography; Ion-pair chromatography; Ion-pair solid-phase extraction; Aromatic sulfonates; Coastal waters

## INTRODUCTION

Aromatic sulfonates such as benzene- and naphthalenesulfonates are widely used as intermediates in the chemical industry, particularly in the production of pharmaceuticals, dyes, tanning agents, pesticides, cement, concrete and so on. For instance, 4-amino-1-naphthalenesulfonate and 4-amino-1-benzenesulfonate are commonly used as precursors of mono- and diazochromophores in dye synthesis [1]. These compounds are highly soluble in water. For this reason, it is difficult to remove them totally from wastewater in treatment plants and they are discharged into the aquatic environment [1]. Little is known about their toxicology and ecotoxicology, but their biodegradability is low [2] which makes them potentially hazardous. These compounds have recently been found in river waters and for this reason, increasing attention is being paid to control their presence in coastal water.

Various analytical techniques have been proposed for determining these compounds in water [3]. A gas chromatography (GC) analysis needs a previous step to convert them into volatile derivatives [3,4]. However, this process is difficult when there are amino- and hydroxy- groups in the molecule because they can react with the derivatising reagents in different and competing ways [3]. When capillary electrophoresis is used, results have been good particularly using laser-induced fluorescence detection [5-9]. The preferred technique, however, is still ion-pair liquid chromatography with UV [8-15], fluorescence [13-17] or mass-spectrometry [17-21] detectors.

The detection and quantification limits obtained for these compounds with these techniques are not low enough for them to be determined in real water samples. For this reason, an enrichment step is necessary. Ion-pair solid-phase extraction (ion-pair SPE) using C<sub>18</sub> [10,14] or polymeric [10,12,17-19] sorbents is the most commonly used preconcentration technique. With these sorbents, the recovery values of many aromatic sulfonates have been quite good when tap or river waters are analysed. However, when these compounds are determined in seawater, the breakthrough volumes decrease considerably

[19] due to inorganic species such as chloride and sulphate, which increases the ionic strength of samples and can compete in the formation of the ion-pair, thus interfering with the solid-phase extraction process [22].

LiChrolut EN is a highly crosslinked polymeric sorbent used in SPE. It is a styrene-divinylbenzene copolymer and due to the high degree of crosslinking, its specific surface area ( $1200 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) is larger than other conventional sorbents, like PLRP-s ( $500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) or  $\text{C}_{18}$  ( $500\text{-}600 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ). This allows greater  $\pi\text{-}\pi$  interactions between analytes and sorbent [23-25] and there is, therefore, a greater retention of polar analytes [23,24]. Recently, it has been used in off-line SPE of these aromatic sulfonates. Loos *et al.* [5] enriched the sample without the formation of an ion-pair, but the recoveries for benzenesulfonates and naphthalenedisulfonates were low. Alonso *et al.* [17] added an ion-pairing reagent to the elution solvent for preconcentrating these compounds and used another highly crosslinked polymeric sorbent, Isolute ENV+, and results were better, although only 150 ml was preconcentrated in the off-line mode.

LiChrolut EN had never previously been used in the on-line SPE of these compounds. Initial experiments revealed that the elutropic strength of the mobile phase used in the separation step was not high enough to elute retained analytes because it did not contain enough methanol and the peaks obtained were wide. For this reason, the elution must be done with only the organic solvent of the mobile phase [26].

The aim of this paper is to develop a method for determining a mixture of benzene-, naphthalene- and naphthalenedisulfonates, some of which have amino- and hydroxy- groups, in seawater. The method is based on ion-pair liquid chromatography with UV detection, coupled on-line to solid-phase extraction. The set-up of the analytical system means that the retained compounds are only eluted by means of the organic component of the mobile phase of the separation step. To our knowledge, this sorbent has not

previously been used coupled directly to LC to determine these compounds, and the presence of these compounds in seawater has scarcely been studied.

## EXPERIMENTAL

### Reagents and standards

The compounds studied were the following: (1) 4-aminobenzenesulfonate, (2) 3-aminobenzenesulfonate, (3) 4-hydroxybenzenesulfonate, (4) 5-amino-1-naphthalenesulfonate, (5) 6-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonate, (6) 2-aminobenzenesulfonate, (7) 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonate, (8) 1-benzenesulfonate, (9) 5-amino-2-naphthalenesulfonate, (10) naphthalene-2,6-disulfonate, (11) naphthalene-1,5-disulfonate, (12) 3-nitrobenzenesulfonate, (13) naphthalene-2,7-disulfonate, (14) 4-hydroxy-1-naphthalenesulfonate, (15) 8-amino-2-naphthalenesulfonate, (16) 2-amino-1-naphthalenesulfonate, (17) 1-naphthalenesulfonate and (18) 2-naphthalenesulfonate.

These compounds were all obtained as free acids or sodium salts from Fluka (Buchs, Switzerland), Aldrich Chemie (Beerse, Belgium) or Across (Geel, Belgium). Standard solutions of each compound in a concentration of 1000 mg l<sup>-1</sup> were prepared in Milli-Q quality water. Several drops of 0.1 M sodium hydroxide were added to increase solubility, except for 2-naphthalenesulfonate, which was solubilized in Milli-Q water/methanol (Merck, Germany) 85:15 (v/v). All the mixtures of compounds used in this work were prepared from these solutions.

Disodium hydrogen phosphate (Panreac, Barcelona, Spain), sodium dihydrogen phosphate (Probus, Badalona, Spain), phosphoric acid 85% (Probus), tetrabutylammonium bromide (Fluka) and methanol (Merck) were used to prepare the mobile phase and samples.

## Apparatus

The chromatographic system consisted of two LC-10ADB<sub>VPB</sub> pumps, an on-line degasser DGU-14A and a CTO-6AS column oven (all from Shimadzu (Kyoto, Japan)), an injection valve (Rheodyne, California, USA) with a 20- $\mu$ l loop and a HP1100 UV detector (Hewlett Packard, Waldbronn, Germany). The chromatographic column was 25.0 cm x 0.46 cm 5- $\mu$ m Kromasil 100 C<sub>18</sub> (Teknokroma, Barcelona, Spain).

The solid-phase extraction system consisted of an LC-10AS pump (Shimadzu), which was used to preconcentrate samples through a stainless-steel precolumn (10 x 3 mm I.D.) (Free University, Amsterdam, The Netherlands) laboratory-packed with 40-120  $\mu$ m LiChrolut EN (Merck).

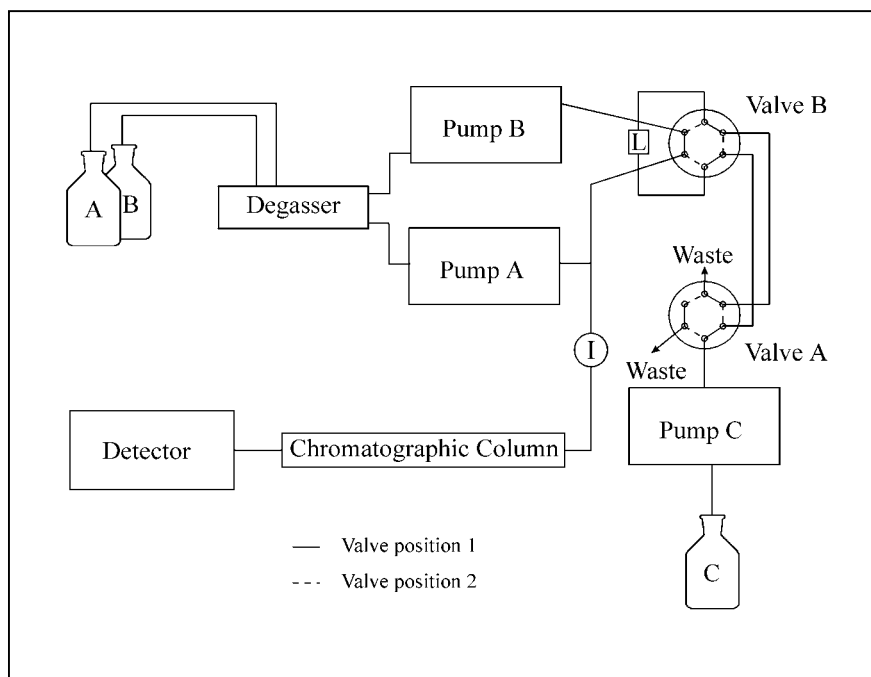
Chromatographic and extraction systems were coupled on-line by means of two LabPRO 6-port valves (Rheodyne).

Figure 1 shows the scheme of the chromatographic system. Because of this set-up, the retained compounds were eluted only by means of the organic solvent.

## Experimental conditions

The aqueous component of the mobile phase was prepared in Milli-Q water and contained 8 mM of disodium hydrogen phosphate, 8 mM of sodium dihydrogen phosphate and 7 mM of tetrabutylammonium bromide. The pH was adjusted to 6.5 with phosphoric acid and the resulting solution was filtered through a 0.45- $\mu$ m membrane filter. Analysis was performed with the following gradient: first, 10% of methanol was used and it was linearly changed to 30% in 40 min, and then to 50% in 20 min. After 5 min at 50%, the mobile phase was returned to initial conditions in 5 min. The column was reequilibrated in 10 min. The temperature of the

chromatographic column was 40°C and the mobile phase flow rate was 1 ml min<sup>-1</sup>. The wavelengths for detection were 230 nm up to 38 minutes and 260 nm from 38 min to 43 minutes.



**Figure 1.** Set-up of the analytical system. (A) Aqueous phase, (B) methanol, (C) sample delivery system, (I) injector, (L) LiChrolut EN precolumn. For more details, see text and Table 1.

For the preconcentration step, tetrabutylammonium bromide was used as the ion-pairing reagent. It was added to samples at a concentration of 3 mM. To ensure the ion-pair formation, the pH of samples was adjusted to 7 by adding a disodium hydrogen phosphate/sodium dihydrogen phosphate buffer. These conditions were optimised in a previous study [10]. Samples were collected in



2.5 l precleaned amber glass bottles, filtered through a 0.45- $\mu\text{m}$  membrane filter and kept at 4°C until analysis.

The process of on-line solid-phase extraction can be seen in Table 1, which shows the program for preconcentrating 100 ml of sample. When the position of valve B was changed to 2, retained analytes were injected into the chromatographic system and therefore both the separation and detection programs started. Throughout the preconcentration process, the flow rate of pump C was 4 ml min<sup>-1</sup>. As can be seen in Figure 1, before the organic phase was mixed with the aqueous phase, it eluted the retained analytes in backflush mode. These analytes were then directly injected into the chromatographic column.

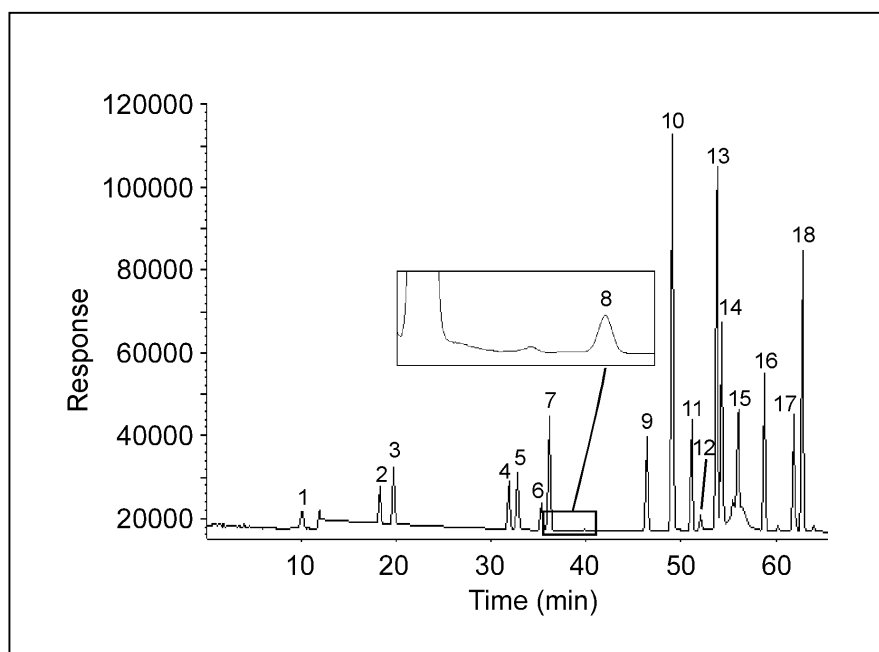
**Table 1.** Preconcentration process (for more details on valve position, see Figure 1).

Time (min)	Valve A position	Valve B position	Solvent Delivered
0	2	1	methanol
3	1	1	methanol
4	2	1	water
7	1	1	water
8	2	1	sample
12	1	1	sample
37	2	2	injection

## RESULTS AND DISCUSSION

In the first step, the chromatographic separation was optimised by checking different gradients of concentration of methanol in the mobile phase. The

concentrations of disodium hydrogen phosphate, sodium dihydrogen phosphate and tetrabutylammonium bromide that are indicated in Experimental Conditions section were taken from previous studies by our group [10] and some additional experiments. The gradient was optimised for the compounds studied in the present work and the separation was good. As an example, Figure 2 shows a chromatogram obtained with these conditions.



**Figure 2.** Chromatogram of a standard solution of  $10 \text{ mg l}^{-1}$  under optimum conditions. For peak identification, see Reagents and Standards section.

As mentioned in the introduction, a solid-phase extraction was coupled on-line to the chromatographic system to improve detection and quantification limits and LiChrolut EN was chosen as the sorbent because good recoveries have been reported for very polar analytes [23,24]. When LiChrolut EN was

used in the off-line preconcentration of 200 ml of sample without the addition of an ion-pairing reagent, naphthalenedisulfonates could not be extracted and the sample pH had to be adjusted to 1 to obtain a recovery of around 40% for some compounds [5]. Some experiments were carried out without the addition of the ion-pairing reagent to see whether the same effect was observed with an on-line SPE process. In this case, the sample pH was adjusted to 2.5 with hydrochloric acid and results were similar. To enhance the retention of benzene- and naphthalenedisulfonates, we added an ion-pairing reagent to the sample as given in the Experimental Conditions section.

Recoveries and breakthrough volumes in the SPE process were determined by percolating different volumes (10, 20, 50, 100 and 200 ml) of standard solutions with different concentrations of analytes, so that the amount of each analyte in the sample was constant (200 ng injected). For 10 ml, recoveries were good for most compounds but the higher the volume was, the lower the recovery of most benzenesulfonates. For the remaining compounds, however, the recoveries were acceptable even at 200 ml sample volume. Table 2 shows the recoveries obtained. When 100 ml of sample was preconcentrated, these values were higher than 80%, except for most of the benzenesulfonate compounds (compounds 1-3 and 8), the recoveries of which were lower than 60%. For naphthalenesulfonates, these recoveries were better for most compounds than when a C<sub>18</sub> or a PLRP-s was used [10]. In particular they were better for the most polar compounds, like 6-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonate, 7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonate and 5-amino-2-naphthalenesulfonate [10]. For naphthalenedisulfonates, recoveries were also better than with other sorbents.

From the previous results, 100 ml of sample was selected because of the decrease in the recovery values obtained for the most polar compounds when a higher sample volume was preconcentrated.

**Table 2.** Comparison of recoveries (% R) when different volumes of spiked Milli-Q water were preconcentrated (n = 3).

Compound	10 ml		20 ml		50 ml		100 ml		200 ml	
	% R	% RSD	% R	% RSD	% R	% RSD	% R	% RSD	% R	% RSD
1	79	6	78	17	33	16	27	17	16	15
2	88	2	79	4	72	3	55	5	36	9
3	89	2	80	2	70	4	49	6	30	9
4	92	1	92	3	92	3	91	2	95	2
5	110	2	100	5	91	4	90	2	75	9
6	89	3	88	3	88	5	82	1	84	4
7	89	4	89	1	83	4	81	5	66	12
8	71	8	85	9	55	6	58	11	49	6
9	95	1	94	2	94	3	94	2	96	3
10	91	2	93	2	94	3	91	2	94	2
11	96	1	98	2	96	2	94	2	98	3
12	104	5	93	11	102	1	108	3	104	1
13	92	2	91	4	91	3	91	1	94	2
14	93	2	87	6	89	3	88	2	85	2
15	80	1	76	5	93	4	93	4	99	7
16	95	1	94	3	94	2	96	2	99	2
17	90	3	90	5	92	6	91	1	90	4
18	99	1	107	3	106	3	104	2	109	3

Recoveries were then calculated by preconcentrating seawater samples spiked at a concentration of  $2 \mu\text{g l}^{-1}$ . The results are shown in Table 3. Compounds 1 and 8 could not be quantified due to the low signal. For naphthalenesulfonates, recoveries were higher than 70% for most of the compounds. The recovery of naphthalenedisulfonates (compounds 10, 11 and 13) was lower, which suggested that they were affected by the ionic concentration. This is in agreement with previous observations [22].

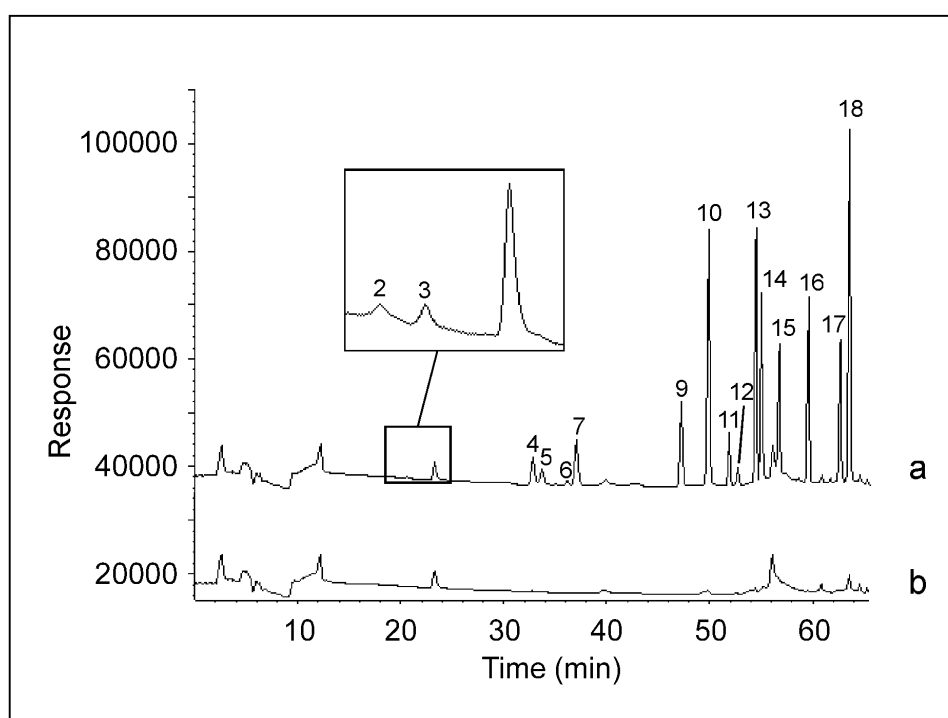
**Table 3.** Recoveries, linear range and detection limits when 100 ml of spiked seawater is preconcentrated (n=3).

Compound	Recovery (%)	% RSD	Linear range ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Detection limit ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )
1	n.d.	-	-	-
2	10	15	3-40	1
3	6	11	3-60	1
4	66	3	1.5-6	0.5
5	68	11	1.5-6	0.5
6	17	8	1-25	0.5
7	68	7	0.3-8	0.1
8	n.d.	-	-	-
9	82	2	0.1-5	0.05
10	54	6	0.06-8	0.02
11	39	10	0.5-10	0.2
12	103	7	0.5-4	0.2
13	49	8	0.2-8	0.04
14	69	1	0.2-6	0.02
15	85	2	0.2-5	0.05
16	87	1	0.1-5	0.04
17	87	1	0.1-5	0.04
18	104	2	0.06-4	0.02

n.d.: not detected

Calibration was carried out by preconcentrating seawater samples spiked at different concentrations. A seawater sample which did not contain any aromatic sulfonates was used as a blank.

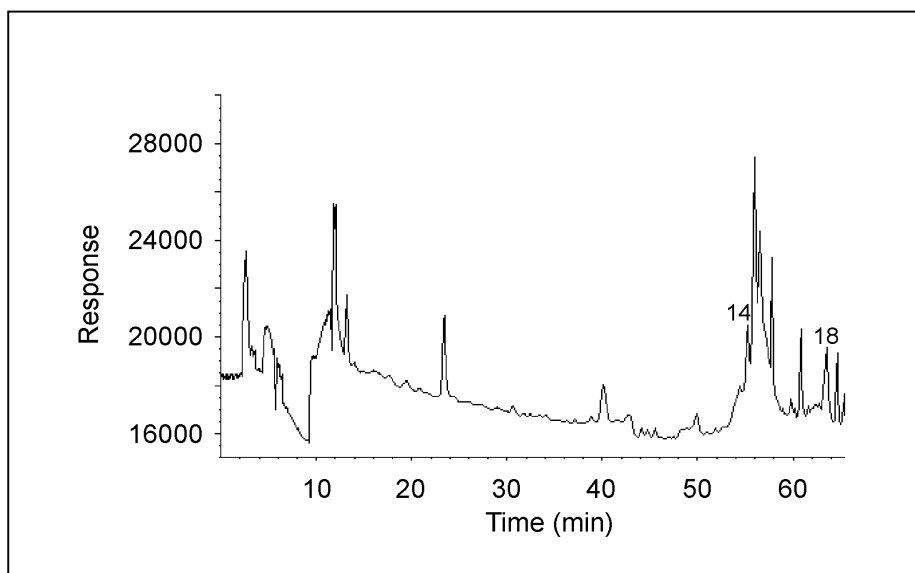
Figure 3 shows the chromatogram of a seawater sample and the chromatogram of the same sample spiked at  $2 \mu\text{g l}^{-1}$  of each analyte.



**Figure 3.** Chromatograms obtained when 100 ml of seawater sample was preconcentrated: (a) sample spiked at  $2 \mu\text{g l}^{-1}$ ; (b) sample without the addition of the analytes. For peak identification, see Reagents and Standards section.

The correlation coefficients were higher than 0.998 for most of compounds. The linear ranges and detection limits are also shown in Table 3. It should be mentioned that the linear coefficients were good even for those compounds whose recoveries were low (naphthalenedisulfonates). Low concentrations (only a few  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) can be quantified and, in some cases, concentrations as low as  $60 \text{ ng l}^{-1}$  can be quantified. The detection limits of the analytes were between 20 and  $1000 \text{ ng l}^{-1}$ . These analyses were carried out using an UV detector, which is the most commonly used detector for monitoring tasks. However, if more sensitive detection, such as fluorescence or mass spectrometry, were to be used, these levels could be decreased considerably.

The method was applied to analyse seawater from the Tarragona coast, near the commercial port, where the effluents from petrochemical industry are discharged. The samples were taken near these effluent outlets. 2-naphthalenesulfonate was tentatively identified in all the samples and 4-hydroxy-1-naphthalenesulfonate was in one of them. Figure 4 shows the chromatogram of a coastal water sample in which 2-naphthalenesulfonate was quantified at  $0.14 \mu\text{g l}^{-1}$  (% RSD = 8%,  $n = 3$ ) and the peak at the same retention time as 4-hydroxy-1-naphthalenesulfonate could not be quantified because its concentration was between the detection limit and the quantification limit. The presence of these two compounds could not be confirmed and an additional technique (for example mass spectrometry) would have to be used for such confirmation. However, the method developed involves simple instrumentation and is very useful for control analysis. 2-naphthalenesulfonate has already been found in samples of the same origin using MS with electrospray interface as the detection technique [19].



**Figure 4.** Chromatogram of 100 ml of coastal water. Peak identification: (14) 4-hydroxy-1-naphthalenesulfonate and (18) 2-naphthalenesulfonate.

## CONCLUSIONS

On-line ion-pair solid-phase extraction coupled to ion-pair liquid chromatography with UV detection was developed to determine aromatic sulfonates in seawater. By using LiChrolut EN as the sorbent in the enrichment step and adding an ion-pairing reagent to the sample, analytes were retained to a greater extent. These conditions enabled 100 ml of sample to be preconcentrated. Under these conditions, analytes could be quantified at concentrations of only a few  $\mu\text{g l}^{-1}$  and concentrations between 20 and 1000  $\text{ng l}^{-1}$  could be detected.

The method was applied to the analysis of coastal water taken from different places near the chemical industry outfalls and 4-hydroxy-1-naphthalenesulfonate and 2-naphthalenesulfonate were detected.



## ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by CICYT (Project AMB98-0913-C03-02).

## REFERENCES

- [1] B. Alterbach, W. Giger, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2325.
- [2] H. Greim, J. Ahlers, R. Bias, B. Broecker, H. Hollander, H.-P. Gelbke, H. J. Klimisch, I. Mangelsdorf, A. Paetz, N. Schöne, G. Stropp, R. Vogel, C. Weber, K. Ziegler-Skylakakis, E. Bayer, *Chemosphere* 28 (1994) 2203.
- [3] T. Reemtsma, *J. Chromatogr. A* 733 (1996) 473.
- [4] O. Zerbinati, I. Diana, C. Baiocchio, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 74 (1999) 43.
- [5] R. Loos, R. Niessner, *J. Chromatogr. A* 822 (1998) 291.
- [6] M. J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Chromatographia* 50 (1999) 229.
- [7] S. J. Kok, I. C. Kristina Isberg, C. Gooijer, U. A. Th. Brinkman, N. H. Velthorst, *Anal. Chim. Acta* 360 (1998) 109.
- [8] P. Jandera, J. Fischer, V. Stanek, M. Kucerová, P. Zvoníček, *J. Chromatogr. A* 738 (1996) 201.
- [9] S. Angelino, A. B. Prevot, M. C. Gennaro, E. Pramauro, *J. Chromatogr. A* 845 (1999) 257.
- [10] R. El Harrak, M. Calull, R. M. Marcé, F. Borrull, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 69 (1998) 295.
- [11] C. Sarzanini, M. C. Bruzzoniti, G. Sacchero, E. Mentasti, *J. Chromatogr. A* 739 (1996) 63.
- [12] E. R. Brouwer, J. Slobodnik, H. Lingeman, U. A. Th. Brinkman, *Analisis* 20 (1992) 121.
- [13] O. Zerbinati, G. Ostacoli, *J. Chromatogr. A* 671 (1994) 217.
- [14] F. Th. Lange, M. Wenz, H.-J. Brauch, *J. High Resol. Chromatogr.* 18 (1995) 243.

- 
- [15] C. Redín, F. T. Lange, H.-J. Brauch, S. H. Eberle, *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 27 (1999) 136.
- [16] O. Zerbinati, G. Ostacoli, D. Gastaldi, V. Zelano, *J. Chromatogr. A* 640 (1993) 231.
- [17] M. C. Alonso, D. Barceló, *Anal. Chim. Acta* 400 (1999) 211.
- [18] M. C. Alonso, M. Castillo, D. Barceló, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2586.
- [19] E. Pocurull, C. Aguilar, M. C. Alonso, D. Barceló, F. Borrull, R. M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 854 (1999) 187.
- [20] T. Storm, T. Reemtsma, M. Jekel, *J. Chromatogr. A* 854 (1999) 175.
- [21] M. Holcapek, P. Jandera, J. Prikryl, *Dyes Pigment.* 43 (1999) 127.
- [22] R. El Harrak, M. Calull, R. M. Marcé, F. Borrull, *Quím. Anal.* 16 (Suppl. 2) (1997) S251.
- [23] N. Masqué, R. M. Marcé, F. Borrull, *Trends Anal. Chem.* 17 (1998) 384.
- [24] I. Ferrer, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 180.
- [25] M. C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 3.
- [26] E. Pocurull, R.M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia* 41 (1995) 521.

---

**II.2. DETERMINACIÓ DE NAFTALENSULFONATS EN AIGUA  
MITJANÇANT L'ACOBLEMENT EN LÍNIA DE L'EXTRACCIÓ EN  
FASE SÒLIDA DE PARELL IÒNIC I LA CROMATOGRÀFIA  
LÍQUIDA DE PARELL IÒNIC AMB DETECCIÓ DE  
FLUORESCÈNCIA D'ESCANEJAT RÀPID**



Com s'ha explicat al capítol anterior, la determinació de compostos aromàtics sulfonats, com els NS, es realitza habitualment utilitzant l'IPLC amb detectors UV-visible [1,2], encara que el FLD és també interessant degut a l'elevada sensibilitat i selectivitat que presenta i la menor complexitat respecte a altres sistemes, com la MS [3,4].

Tot i que els mètodes basats en l'IPLC permeten la separació d'un nombre significatiu d'aquests compostos, el temps requerit per a aquesta separació sol ser bastant llarg, com s'ha pogut observar en l'estudi presentat a l'apartat anterior. Però la disminució d'aquest temps mitjançant la modificació dels diferents paràmetres cromatogràfics que afecten la separació, com la composició de la fase mòbil o la temperatura, és difícil degut a les característiques similars dels compostos.

Com s'ha comentat a l'apartat 1.3 de la present Tesi Doctoral, una alternativa a l'optimització de paràmetres cromatogràfics és l'aplicació de mètodes de calibració de segon ordre. Aquests mètodes permeten la quantificació de compostos a partir de pics cromatogràfics que no estan totalment resolts, de forma que no es requereix una separació cromatogràfica completa. Per tant, aquests mètodes poden ser útils a l'hora de disminuir el temps d'anàlisi en el cas dels compostos aromàtics sulfonats.

Per dur a terme aquest tipus de calibració, és necessari disposar de dades de segon ordre per a cada mostra com, per exemple, les que s'obtenen amb un sistema HPLC acoblat a un DAD, que enregistra l'espectre de l'efluent del sistema cromatogràfic al llarg de la separació. Pel que fa als detectors de fluorescència, tot i que existeixen equips que permeten l'adquisició d'aquest tipus de dades, s'han desenvolupat mètodes per tal d'emprar els equips convencionals i obtenir resultats similars. Per exemple, Ferrer *et al.* [5] van utilitzar l'espectrometria de fluorescència d'escanejat ràpid (*fast-scanning fluorescence spectrometry*, FSFS) en la determinació de PAHs emprant l'HPLC com a tècnica de separació cromatogràfica. Aquest detector permet l'adquisició de l'espectre de fluorescència de l'efluent del sistema

cromatogràfic mitjançant l'escanejat ràpid de longituds d'ona d'emissió. Així, aquest sistema permet l'adquisició de matrius de dades de segon ordre que contenen l'espectre d'emissió de l'efluent del sistema cromatogràfic a una longitud d'ona d'excitació determinada.

En el present treball es va proposar l'ús d'aquest detector i d'un mètode de calibració de segon ordre, el 3-PLS [6], per tal de disminuir el temps de l'etapa de separació en la quantificació dels compostos aromàtics sulfonats. Per a això es va seleccionar una barreja de dotze naftalensulfonats i naftalendisulfonats i es va desenvolupar un mètode per a la seva determinació en aigua de l'aixeta i aigua de riu basat en l'acoblament en línia de la SPE de parell iònic amb l'IPLC utilitzant la detecció amb FSFS. Pel que fa a l'etapa d'extracció, es va utilitzar un sorbent polimèric, el PLRP-s, per tal de retenir els compostos estudiats. Tot i les bones recuperacions obtingudes en el treball anterior, no es va utilitzar un polímer altament entrecruat, ja que el sistema cromatogràfic de què es disposava no permetia l'elució dels compostos retinguts únicament amb la fracció orgànica de la fase mòbil. Així, si s'hagués utilitzat el polímer altament entrecruat s'haurien obtingut pics cromatogràfics molt amples, que haurien dificultat la quantificació de baixos nivells de concentració dels analits a partir dels mateixos.

Es va optimitzar una separació parcial dels compostos de manera que per a cada analit s'adquirissin un mínim de deu espectres. Per a això, es va optar per un sistema isocràtic, ja que així es facilita el processament de les matrius de dades obtingudes. En aquestes condicions, es va poder utilitzar per a la quantificació una separació de només 25 minuts.

Finalment, es va avaluar la capacitat de predicció del mètode en mostres fortificades. Els resultats obtinguts van ser acceptables tenint en compte els baixos nivells de concentració que s'estaven determinant. Per tant, el mètode desenvolupat és útil en el control ràpid de la presència d'aquests compostos en aquest tipus de mostres.

A continuació, s'adjunta una còpia del treball publicat en la revista *Journal of Chromatography A*, 890 (2000) 289-294, que resumeix els resultats obtinguts.

### **Bibliografia**

- [1] R. El Harrak, M. Calull, R. M. Marcé, F. Borrull, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 69 (1998) 295.
- [2] E. R. Brouwer, J. Slobodnik, H. Lingeman, U. A. Th. Brinkman, *Analisis* 20 (1992) 121.
- [3] F. Th. Lange, H.-J. Brauch, M. Wenz, *J. High Resol. Chromatogr.* 18 (1995) 243.
- [4] O. Zerbinati, G. Ostacoli, D. Gastaldi, V. Zelano, *J. Chromatogr. A* 640 (1993) 231.
- [5] R. Ferrer, J. Guiteras, J. L. Beltrán, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 123.
- [6] R. Bro, *J. Chemom.* 10 (1996) 47.





**DETERMINATION OF NAPHTHALENESULFONATES IN WATER BY ON-LINE ION-PAIR SOLID-PHASE EXTRACTION AND ION-PAIR LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH FAST-SCANNING FLUORESCENCE DETECTION****ABSTRACT**

A fast analytical method for quantifying a mixture of 12 naphthalenesulfonates and naphthalenedisulfonates has been developed. This method consists of on-line ion-pair solid-phase extraction with PLRP-s sorbent and ion-pair liquid-chromatography using fast-scanning fluorescence spectrometer as a detection system and multivariate calibration. As complete separation is unnecessary, the compounds were analysed in isocratic conditions and the chromatographic analysis took only 25 minutes. Three-way partial least-squares (PLS) was used to carry out multivariate calibration for spiked tap water. In these conditions, quantification limits were between 0.01 and 3  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Repeatability was also evaluated and relative standard deviations ( $n=3$ ) were between 0.5 and 4%, depending on the compound. Finally, spiked tap and Ebro river waters were analysed to evaluate prediction capability of the method.

**Keywords:** Water analysis; Solid-phase extraction; Partial least square calibration; Fast-scanning fluorescence detection; Detection; LC; Naphthalenesulfonates

## INTRODUCTION

Naphthalenesulfonates and their amino- and hydroxy- derivatives are widely used in the pharmaceutical and textile industries [1]. But these compounds are not easily eliminated from water by conventional methods and can occur in water that may be used as drinking water [2,3]. Their low biodegradability [4,5] makes them potentially hazardous and an efficient analytical system is therefore required to control their presence in water.

Gas chromatography analysis with a process of derivatization to increase the volatility of analytes may be used [1,4], but liquid chromatography [2-4] or capillary electrophoresis [6-10] are preferred. The limitation of capillary electrophoresis is the low sensitivity [9,10] although for naphthalenesulfonates good results have been obtained using an ultraviolet laser-induced fluorescence detection [7,8]. But, at present, liquid chromatography is still the preferred technique. Due to the high polarity of naphthalenesulfonates with amino- and hydroxy- functional groups, the most frequently used technique is ion-pair liquid chromatography [2-4,11-13], although analysis with ion-exchange liquid chromatography is also described [1,14].

UV or DAD is used as the detection system [12,13], although recently mass-spectrometry detection has also been applied with interesting results [15,16]. However, the fluorescence detector is still preferred for aromatic sulfonates because of the higher sensitivity than UV detection and simpler instrumentation than mass-spectrometry [2-4,11]. Recently, the fast-scanning fluorescence spectrometer (FSFS) has been developed, which records spectra of the effluent from the chromatographic system at a fixed excitation wavelength by scanning emission wavelengths at a high rate [17,18]. In this case, coeluted analytes can be quantified by different emission wavelengths, deconvolution methods or multivariate calibration. Complete separation of chromatographic peaks is therefore not necessary and analysis time considerably decreases.

Since low concentrations of naphthalenesulfonates had to be detected and quantified, a preliminary enrichment step is required. The most frequently used preconcentration technique for determining aromatic sulfonates in water is ion-pair solid-phase extraction (SPE) using C<sub>18</sub> or polymeric sorbents [11-13,15,16].

The aim of this paper is to develop a fast method for determining 12 naphthalenesulfonates and naphthalenedisulfonates with amino- and hydroxy- functional groups in tap and river waters. For this purpose, an on-line ion-pair solid-phase extraction and ion-pair liquid chromatography were used and, in order to quantify overlapped peaks and decrease the analysis time, a fast-scanning fluorescence spectrometer was used and a three-way PLS was chosen for calibration.

## **EXPERIMENTAL**

### **Reagents and standards**

All the compounds studied were obtained as free acids or sodium salts from Fluka (Buchs, Switzerland), Aldrich Chemie (Beerse, Belgium) or Across (Geel, Belgium). Standard solutions of each compound in a concentration of 1000 mg l<sup>-1</sup> were prepared in Milli-Q quality water. To increase solubility of some compounds, several drops of sodium hydroxide 0.1 N were added, except for 2-naphthalenesulfonate, which was solubilized in Milli-Q water-methanol (Merck, Germany; 85:15, v/v). From these solutions, mixtures of compounds in different concentrations were prepared to perform the calibration.

Disodium hydrogen phosphate (Panreac, Barcelona, Spain), sodium dihydrogen phosphate (Probus, Badalona, Spain), phosphoric acid 85% (Probus), tetrabutylammonium bromide (Fluka) and methanol (Merck) were used to prepare mobile phase and samples.

## **Apparatus**

The chromatographic system consisted of a System 525 pump (Bio-Tek Kontron Instruments) and a 25- $\mu$ l injection loop. The chromatographic column was a 15.0x0.4 cm Kromasil 100 C<sub>18</sub> with a 5- $\mu$ m particle size (Teknokroma, Barcelona, Spain).

The detection system was an Aminco Bowman Series 2 spectrofluorimeter (SLM-Aminco, Rochester, NY, USA), equipped with a 25- $\mu$ l flow cell (Hellma 176.752, Baden, Germany).

Extraction was carried out with a 10x3 mm precolumn packed with 20  $\mu$ m PLRP-s (Polymer Laboratories, Shropshire, UK). This precolumn was on-line coupled to the chromatographic system by a Rheodyne 7010 valve.

An Applied Biosystems (Ramsey, USA) pump was used to preconcentrate samples through the extraction precolumn.

## **Experimental conditions**

### *Chromatographic separation*

Chromatographic separation was performed in isocratic conditions. The mobile phase was 35% methanol and 65% aqueous phase, which contained 6.9 mM of a disodium hydrogen phosphate-sodium dihydrogen phosphate buffer and 4.6 mM of tetrabutylammonium bromide. The pH of the aqueous phase was adjusted to 6.5 with phosphoric acid and filtered through a 0.45- $\mu$ m membrane filter. The mobile phase was degassed with a stream of helium. Analysis was performed at room temperature. The mobile phase flow-rate was 1 ml min<sup>-1</sup>.

***Detection***

With fast-scanning fluorescence detection, two different excitation wavelengths were used: 293 nm for compounds 1-8 and 308 nm for compounds 9-12. The emission wavelengths were scanned from 350 nm to 450 nm at 50 nm s<sup>-1</sup> and readings were taken every 1 nm. In this way, one spectrum was recorded every 2.7 s (the time required by the monochromator to return to the initial position is included).

Data were obtained in a flow cell, so every spectral point corresponds to a different composition of chromatographic eluent. Moreover, a fluorescent blank (due to the mobile phase and the flow cell) and a background noise caused by the low integration time in the fast-scanning system are added to the fluorescence of the analytes. Our data therefore had to be corrected [17]. The rectification process was as follows: blank was first subtracted from the initial chromatogram; the fluorescent intensities were then corrected by spline interpolation to obtain the spectra at a fixed time; finally, the resulting spectra were smoothed out to minimise background noise [17]. This process was carried out using a computer program written in MATLAB language (Mathworks, Natick, MA, USA).

***Solid-phase extraction***

Tetrabutylammonium bromide was added to samples at a concentration of 3 mM as the ion-pairing reagent. Disodium hydrogen phosphate-sodium dihydrogen phosphate buffer was also added at a concentration of 2.5 mM to ensure that the pH of the samples were appropriate for ion-pair formation [12].

The process of on-line solid-phase extraction was as follows: the precolumn was washed with 8 ml of methanol at 4 ml min<sup>-1</sup>; the position of the valve was then changed and the precolumn was conditioned by mobile phase; the position of valve was then changed again and 20 ml of sample was

preconcentrated at 4 ml min<sup>-1</sup>; finally, the retained analytes were eluted in backflush mode and injected into the chromatographic column by mobile phase.

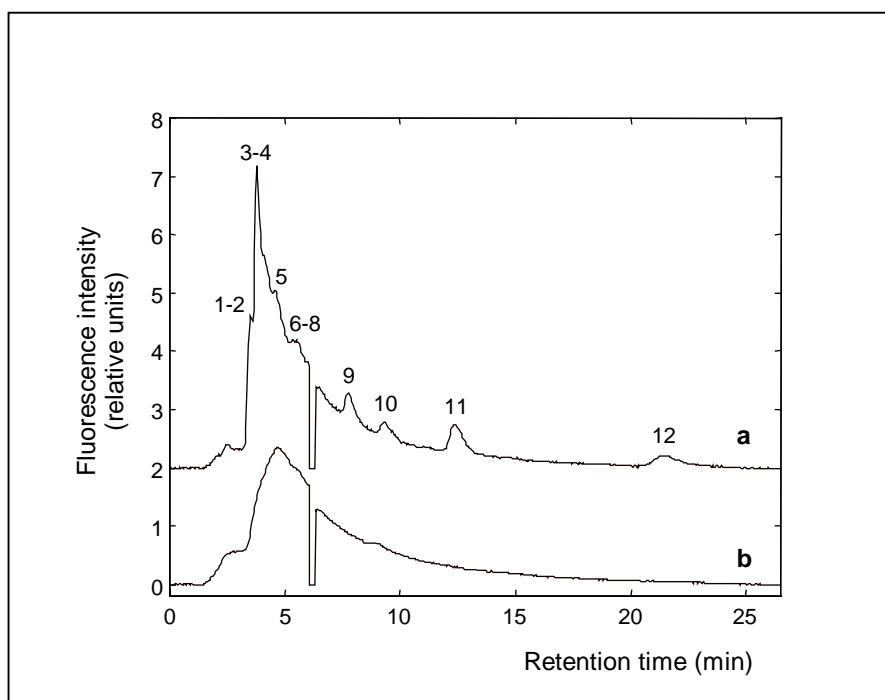
## RESULTS AND DISCUSSION

Because the characteristics of the compounds are very similar, the gradient for acceptable separation of the naphthalenesulfonates has to have a gentle slope and the analysis usually took 1 hour [12]. A fast-scanning fluorescence spectrometer was used as a detection system because this can measure coeluted analytes and complete separation is therefore not necessary. An isocratic analysis was selected because of the simpler instrumentation and blank subtraction. For this purpose, a partial separation of the compounds was optimised, taking into account that at least 10 spectra had to be acquired for every chromatographic peak [17], and 35 % methanol was selected. In this way, the analysis took less than 25 min, although the 10 first eluted peaks were eluted in only 10 min (see Figure 1).

Different mixtures of the compounds were injected to determine linear range. The lower limit of this range was obtained from quantification limit, calculated as 10 times the standard deviation of the noise of a blank chromatogram, and the upper limit was taken from the maximum quantity of analyte that can be read before the detector is saturated.

For the SPE process, the preconcentration volume was checked for tap and river water using PLRP-s as a sorbent. From previous work [12] and additional experiments, 20 ml of sample was preconcentrated. Results are shown in Table 1. Recoveries for the first eluted compounds are lower because of the polarity, but they are slightly greater than with other sorbents like C<sub>18</sub> for most compounds [2,11]. This table also shows the linear ranges obtained for each compound, which were determined by

preconcentrating different samples containing non-overlapped peaks. We can see that the quantification limits were low and a few  $\text{ng l}^{-1}$  in some cases could be quantified. These limits are lower than those obtained by UV detection [12] and quite similar to those obtained by mass spectrometry [15] at the same extraction conditions.



**Figure 1.** (a) Profile plot of spiked Ebro river water obtained with fast-scanning fluorescence spectrometer. Concentration ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ): 0.1 (compounds 3, 4, 7, 9), 0.3 (compounds 1, 5, 6, 10), 0.8 (compound 8), 3 (compounds 2, 11) and 6 (compound 12). For peak identification, see Table 1. (b) Profile plot of unspiked Ebro river water.

**Table 1.** Recoveries (%) and %RSD when 20 ml of tap and Ebro river waters is preconcentrated (n = 3) and linear ranges in tap water.

No.	Compound	Tap water				River water	
		Linear range ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	
1	6-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonate	0.07 - 1.50	54	7	62	6	
2	5-amino-1-naphthalenesulfonate	0.3 - 15.0	56	1	54	3	
3	7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonate	0.01 - 0.30	54	3	66	7	
4	4-amino-1-naphthalenesulfonate	0.01 - 0.50	58	1	66	2	
5	naphthalene-2,6-disulfonate	0.2 - 0.5	84	1	74	16	
6	5-amino-2-naphthalenesulfonate	0.07 - 1.50	76	2	50	4	
7	naphthalene-1,5-disulfonate	0.07 - 0.50	85	1	69	6	
8	naphthalene-2,7-disulfonate	0.3 - 4.0	88	2	87	4	
9	4-hydroxy-1-naphthalenesulfonate	0.07 - 0.10	86	1	82	14	
10	8-amino-2-naphthalenesulfonate	0.07 - 1.50	92	7	76	4	
11	2-amino-1-naphthalenesulfonate	0.3 - 15.0	90	3	83	3	
12	2-naphthalenesulfonate	3-15	88	1	102	17	



For calibration, eight tap water samples spiked at different concentrations of compounds were analysed. These concentrations were chosen in such a manner that all the linear range for each compound was included and different ratios of concentration were used. The three-way PLS was chosen as the calibration method [19]. The optimum model was built with the minimum number of factors that give an error of prediction which is not significantly different from the minimum. This error was calculated by a leave-one-out cross-validation procedure. The number of factors for every compound and the relative error in each case are shown in Table 2. For most compounds, this error is small enough, if we take into account that the concentrations are low.

**Table 2.** Parameters of three-way PLS calibration.

No.	Compound	No. of factors	Relative error of calibration (%)
1	6-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonate	3	9
2	5-amino-1-naphthalenesulfonate	6	10
3	7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonate	3	55
4	4-amino-1-naphthalenesulfonate	5	27
5	naphthalene-2,6-disulfonate	4	15
6	5-amino-2-naphthalenesulfonate	5	15
7	naphthalene-1,5-disulfonate	6	32
8	naphthalene-2,7-disulfonate	3	10
9	4-hydroxy-1-naphthalenesulfonate	3	3
10	8-amino-2-naphthalenesulfonate	2	9
11	2-amino-1-naphthalenesulfonate	2	10
12	2-naphthalenesulfonate	2	19

Three tap water samples were analysed to evaluate repeatability and the results, expressed in %RSD, were between 0.5 and 4, depending on the compound.

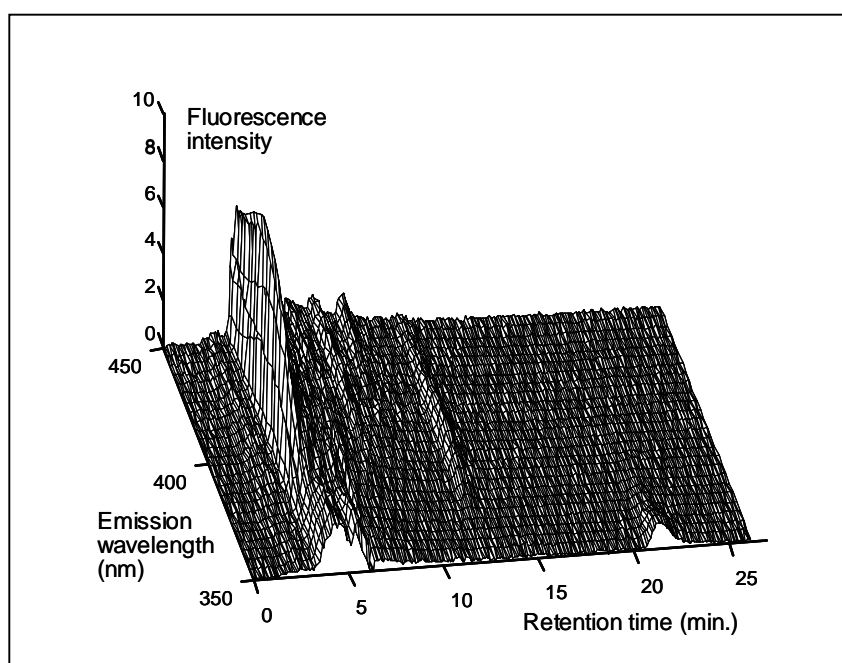
For checking the prediction capability of the method, three tap water samples spiked with naphthalenesulfonates were analysed. The comparison of real and predicted concentrations is included in Table 3. The values are very similar and errors are acceptable taking into account the low levels of concentration. So, the method enabled low levels of naphthalenesulfonates to be quantified in a short time and with an isocratic elution.

**Table 3.** Real and predicted concentrations in tap and Ebro river waters for n=3.

No.	Compound	Real concentration ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Predicted concentration ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	
			Tap water	Ebro river water
1	6-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonate	0.3	$0.24 \pm 0.04$	$0.36 \pm 0.05$
2	5-amino-1-naphthalenesulfonate	3	$2.9 \pm 0.1$	$4.5 \pm 0.5$
3	7-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonate	0.1	$0.14 \pm 0.04$	$0.21 \pm 0.06$
4	4-amino-1-naphthalenesulfonate	0.1	$0.08 \pm 0.01$	$0.17 \pm 0.02$
5	naphthalene-2,6-disulfonate	0.3	$0.23 \pm 0.01$	$0.09 \pm 0.02$
6	5-amino-2-naphthalenesulfonate	0.3	$0.23 \pm 0.04$	$0.45 \pm 0.03$
7	naphthalene-1,5-disulfonate	0.1	$0.16 \pm 0.11$	$0.13 \pm 0.01$
8	naphthalene-2,7-disulfonate	0.75	$0.70 \pm 0.04$	$1.32 \pm 0.05$
9	4-hydroxy-1-naphthalenesulfonate	0.1	$0.08 \pm 0.01$	$0.16 \pm 0.01$
10	8-amino-2-naphthalenesulfonate	0.3	$0.31 \pm 0.07$	$0.58 \pm 0.01$
11	2-amino-1-naphthalenesulfonate	3	$1.5 \pm 0.5$	$2.3 \pm 0.1$
12	2-naphthalenesulfonate	6	$5.2 \pm 1.6$	$7.7 \pm 0.1$

The calibration model was also tested for river water sample in order to check if it can be applied to this kind of samples. Three spiked river water samples were analysed at the same levels than in tap water and results are shown in Table 3. Results are not so good as for tap water which may be

due to the differences in sample matrix and the possible interference of humic and fulvic acids, which may be significant when river water is analysed. However, for a fast control of the presence of these compounds the method may also be suitable. As an example of spiked Ebro river water analysis, a profile plot including the blank signal is shown in Figure 1, where the partial separation of the compounds can be seen and a three-dimensional chromatogram obtained using the fast-scanning fluorescence spectrometer for a spiked Ebro river water is shown in Figure 2.



**Figure 2.** Chromatogram of spiked Ebro river water obtained with fast-scanning fluorescence spectrometer. For concentration of compounds, see Figure 1.

## CONCLUSIONS

An analytical method consisting of on-line ion-pair solid-phase extraction with PLRP-s sorbent and ion-pair liquid chromatography with a fast-scanning fluorescence spectrometer has been developed for quantifying a mixture of 12 naphthalenesulfonates and naphthalenedisulfonates using a three-way PLS to perform calibration. The method is simple because an isocratic elution is used and fast since a reduction in analysis time from 1 hour to about 25 min has been achieved, since complete separation of analytes is not needed. In these conditions, a concentration of 0.01-3  $\mu\text{g l}^{-1}$ , depending on the compound, can be quantified in tap water with good repeatability.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Spanish Interministerial Commission for Science and Technology (CICYT) (AMB98-0913-C03-02).

## REFERENCES

- [1] T. Reemtsma, *J. Chromatogr. A* 733 (1996) 473.
- [2] S. Fichtner, F. Th. Lange, W. Schmidt, H.-J. Brauch, *Fresenius J. Anal. Chem.* 353 (1995) 57.
- [3] R. El Harrak, M. Calull, R. M. Marcé, F. Borrull, *Quím. Anal.* 16 (Suppl. 2) (1997) S251.
- [4] O. Zerbinati, G. Ostacoli, D. Gastaldi, V. Zelano, *J. Chromatogr. A* 640 (1993) 231.
- [5] H. Greim, J. Ahlers, R. Bias, B. Broecker, H. Hollander, H.-P. Gelbke, H. J. Klimisch, I. Mangelsdorf, A. Paetz, N. Schöne, G. Stropp, R.

- Vogel, C. Weber, K. Ziegler-Skylakakis, E. Bayer, *Chemosphere* 28 (1994) 2203.
- [6] M. J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Chromatographia* 46 (1997) 204.
- [7] S. J. Kok, E. M. Kristenson, C. Gooijer, N. H. Velthorst, U. A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 771 (1997) 331.
- [8] S. J. Kok, I. C. Kristina Isberg, C. Gooijer, U. A. Th. Brinkman, N. H. Velthorst, *Anal. Chim. Acta* 360 (1998) 109.
- [9] P. Jandera, J. Fischer, V. Stanek, M. Kucerová, P. Zvoníček, *J. Chromatogr. A* 738 (1996) 201.
- [10] S. Angelino, A. B. Prevot, M. C. Gennaro, E. Pramauro, *J. Chromatogr. A* 845 (1999) 257.
- [11] F. Th. Lange, H.-J. Brauch, M. Wenz, *J. High Resol. Chromatogr.* 18 (1995) 243.
- [12] R. El Harrak, M. Calull, R. M. Marcé, F. Borrull, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 69 (1998) 295.
- [13] E. R. Brouwer, J. Slobodnik, H. Lingeman, U. A. Th. Brinkman, *Analisis* 20 (1992) 121.
- [14] G. R. Bear, C. W. Lawley, R. M. Riddle, *J. Chromatogr. A* 302 (1984) 65.
- [15] E. Pocurull, C. Aguilar, M. C. Alonso, D. Barceló, F. Borrull, R. M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 854 (1999) 187.
- [16] M. C. Alonso, M. Castillo, D. Barceló, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2586.
- [17] R. Ferrer, J. Guiteras, J. L. Beltrán, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 123.
- [18] J. L. Beltrán, J. Guiteras, R. Ferrer, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1949.
- [19] R. Bro, *J. Chemom.* 10 (1996) 47.



---

**II.3. DETERMINACIÓ D'HIDROCARBURS AROMÀTICS POLICÍCLICS I COMPOSTOS AROMÀTICS HETEROCÍCLICS DERIVATS DE SOFRE MITJANÇANT LA CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ AMB FLUORESCÈNCIA I ESPECTROMETRIA DE MASSES AMB IONITZACIÓ QUÍMICA A PRESSIÓ ATMOSFÈRICA EN MOSTRES D'AIGUA DE MAR I SEDIMENTS**





La MS és una tècnica que, acoblada a l'HPLC, s'utilitza cada vegada més per a la determinació de contaminants en mostres ambientals ja que, a més de permetre la seva quantificació, també permet la confirmació dels compostos detectats en les mateixes.

Tot i això, hi ha compostos per als quals aquest sistema encara no ha estat molt utilitzat. Un exemple d'aquests compostos són els hidrocarburs aromàtics policíclics (PAHs). Fins al moment de realització d'aquest treball, aquests compostos es determinaven generalment utilitzant sistemes acoblats HPLC-UV-visible o HPLC-FLD [1]. Pel que fa a l'ús de l'acoblament HPLC-MS, tot i que se n'havien realitzat algunes aplicacions, aquest sistema no estava molt estès degut a la dificultat d'ionització d'aquests compostos [2]. D'entre les interfases que permeten l'acoblament de l'HPLC i la MS, hi havia algun mètode que emprava l'ES addicionant substàncies  $\pi$ -acceptores com el catió tropili per tal de millorar-ne la ionització [3], o la recentment desenvolupada APPI, que facilita la ionització dels analits mitjançant l'aplicació de radiació UV [4]. No obstant, l'APCI era la interfase més emprada en els treballs que s'havien realitzat fins al moment de realització d'aquest treball [3].

A més dels PAHs, hi ha altres compostos com els compostos aromàtics heterocíclics derivats de sofre (PASHs) que, tot i no estar regulats per l'EU com els primers [5], també són potencialment cancerígens i tenen una elevada bioacumulació [6]. No obstant, aquests compostos no han estat gaire estudiats, sobretot en el medi marí.

Per tant, es va proposar el desenvolupament d'un mètode per avaluar la presència dels PAHs i PASHs en el medi costaner, no només en aigua procedent de ports, sinó també en els sediments marins degut a la tendència d'aquests compostos a sedimentar. Aquest mètode es va basar en la MS acoblada a HPLC mitjançant la interfase d'APCI. Donat que el mètode habitual per obtenir bona sensibilitat utilitza la FLD [7], es va pensar també

en el desenvolupament d'un mètode utilitzant aquest tipus de detector per poder comparar així els resultats obtinguts amb ambdós detectors.

Per tant, l'objectiu d'aquest treball va ser el desenvolupament de dos mètodes per a la determinació d'una barreja de deu PAHs i PASHs en aigua de mar i en sediments marins, ambdós basats en HPLC, utilitzant dos tipus de detecció diferents: un detector de fluorescència i la MS amb APCI (APCI-MS).

En l'optimització del mètode basat en l'acoblament HPLC-MS, la millor ionització dels compostos es va obtenir quan s'utilitzava una barreja d'aigua:metanol 40:60 com a fase mòbil, tot i que altres autors havien observat una disminució en la sensibilitat degut a la presència d'aigua en la fase mòbil. Donat que en aquestes condicions la separació era molt llarga, es va optar per una separació cromatogràfica emprant metanol a flux 0.75 ml min<sup>-1</sup> i una addició *post-column* d'aigua a flux 0.5 ml min<sup>-1</sup>. En aquestes condicions, tres dels compostos estudiats no van poder ser determinats mitjançant aquest tipus de detecció. Per a la resta de compostos, cal remarcar la falta de fragments obtinguts a l'espectre, fins i tot aplicant voltatges de fragmentació elevats, així com l'obtenció de l'ió [M]<sup>+</sup> com a pic base, mentre que l'ió [M + H]<sup>+</sup> apareixia de forma minoritària.

Pel que fa al pretractament de les mostres aquoses, es va optar per la SPE acoblada en línia al sistema cromatogràfic. Com a sorbent, es va seleccionar un sorbent polimèric de PS-DVB, el PLRP-s, que ja havia donat bons resultats en treballs anteriors realitzats al nostre grup per a l'extracció de PAHs de mostres aquoses [7]. Com s'ha comentat en la introducció, un dels problemes que es presenten a l'hora de determinar aquests compostos és la tendència que tenen de quedar adsorbits en el sistema degut al seu caràcter hidrofòbic. Una forma d'evitar aquest problema és afegint un percentatge de solvent orgànic, habitualment acetonitril o 2-propanol, a la mostra abans de la seva extracció [7]. Per tant, en l'optimització d'aquesta etapa, es va estudiar el volum de ruptura dels compostos quan s'addicionen diferents

percentatges d'aquests solvents a la mostra abans de la seva preconcentració.

D'entre les tècniques d'extracció per a sediments, es va triar l'extracció amb solvents orgànics degut a la seva simplicitat [8]. Pel que fa al solvent, es va triar el diclorometà tenint en compte les bones recuperacions obtingudes en altres treballs [8].

Una vegada optimitzats els dos mètodes, es van aplicar a l'anàlisi de mostres dels ports esportiu i pesquer de Tarragona. Tot i que en l'aigua de mar no es van detectar els compostos estudiats, en les mostres de sediments es van poder quantificar cinc dels compostos: el benzo[b]fluorantè, el benzo[k]fluorantè, el benzo[a]pirè, el benzo[g,h,i]perilè i l'indeno[1,2,3-cd]pirè.

Comparativament, els dos mètodes són complementaris per a la determinació dels compostos estudiats en mostres ambientals. El mètode amb detecció mitjançant MS, si bé no permet la determinació de tres dels compostos estudiats, permet assolir nivells de concentració similars als que s'obtenen utilitzant un FLD per a la majoria de compost restants.

Seguidament, s'inclou una còpia del treball publicat en la revista *Journal of Chromatography A*, 958 (2002) 141-148, que resumeix els resultats obtinguts en aquest estudi.

### **Bibliografia**

- [1] E. Manoli, C. Samara, *Trends in Anal. Chem.* 18 (1999) 417.
- [2] J. F. Anacleto, L. Ramaley, F. M. Benoit, R. K. Boyd, M. A. Quillian, *Anal. Chem.* 67 (1995) 4145.
- [3] S. Pérez, D. Barceló, *Chromatographia* 53 (2001) 475.
- [4] D. B. Robb, T. R. Covey, A. P. Bruins, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3653.

- [5] Commission of the European Communities, proposal for a Council Directive. Brussels, 1994.
- [6] S. G. Mössner, S. A. Wise, *Anal. Chem.* 71 (1999) 58.
- [7] R. El Harrak, M. Calull, R. M. Marcé, F. Borrull, J. *High Resol. Chromatogr.* 21 (1998) 667.
- [8] A. Jiries, H. Hussain, J. Lintelmann, *Water Air Soil Pollut.* 121 (2000) 217.

**DETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS AND POLYCYCLIC AROMATIC SULFUR HETEROCYCLES BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH FLUORESCENCE AND ATMOSPHERIC PRESSURE CHEMICAL IONIZATION MASS SPECTROMETRY DETECTION IN SEAWATER AND SEDIMENT SAMPLES**

**ABSTRACT**

Two methods for determining ten polycyclic aromatic compounds were developed. Both methods were based on high-performance liquid chromatography (HPLC), but one method used fluorescence detection, while the other used atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (APCI-MS) detection. For water analysis, a solid-phase extraction (SPE) was on-line coupled to the separation system. Using a styrene-divinylbenzene copolymer (PLRP-s) as sorbent in the SPE and adding 20% of acetonitrile to the water sample before its preconcentration, recoveries were above 70% for most of the compounds. For the fluorescence method, all compounds were detected and six of them could be quantified at concentrations higher than  $0.02 \mu\text{g l}^{-1}$ . For the MS detection method, only seven of the compounds were detected and six were quantified at a concentrations higher than  $0.06 \mu\text{g l}^{-1}$ . To analyse sediment samples, an extraction with dichloromethane was used and, due to the complexity of the matrix, a standard addition calibration was carried out. Seawater and sediment samples taken from the Tarragona fishing port and marina on the coast of Catalonia (Spain) were analysed, and five compounds (benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene, benzo[ghi]perylene and indeno[1,2,3-cd]pyrene) were quantified in the sediment samples.

**Keywords:** Water analysis; Sediment; Polynuclear aromatic hydrocarbons; Polynuclear aromatic sulfur heterocycles

## INTRODUCTION

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are reported to have mutagenic and/or carcinogenic effects. The European Union (EU) has therefore developed a directive for controlling six PAHs in drinking water [1].

Some analogues of these compounds, such as polycyclic aromatic sulfur heterocycles (PASHs), are also potentially mutagenic and carcinogenic [2]. But, although they have a high bioaccumulation [3] and have been found in some water and sediment samples [4], they have not been studied as extensively as PAHs.

These compounds occur in the environment as a result of natural or manmade incomplete combustion of organic materials, discharge from industrial processes, oil spill accidents, ballast operations, petroleum transport, traffic, etc [5]. This is why it is very important to develop analytical methods for monitoring their presence in the environment.

The most common techniques used to separate PAHs are gas-chromatography (GC) [6-10] and high-performance liquid chromatography (HPLC) [9-13]. With HPLC, the most common detection systems are UV-visible or diode-array (DAD) detectors [10-12] and fluorescence [9-11,13]. MS has not been as extensively used because these compounds are difficult to ionize. Some studies have been reported [14-18] using interfaces such as electrospray (ES), atmospheric pressure chemical ionization (APCI) or atmospheric pressure photoionization (APPI). The last one is a new interface that makes it possible to analyse compounds which are difficult to ionize due to their low polarity [18]. For ES, the addition of the tropylium cation to form the PAH-tropylium ( $\pi$  donor- $\pi$  acceptor) complexes is proposed [17] in order to improve the ionization. APCI can also be used to determine PAHs, although for some compounds some authors found a decrease in sensitivity due to the presence of water in the mobile phase [14,15].

Because of the low concentration levels to be quantified in water samples, an enrichment step is needed before chromatographic analysis. This step has not been studied as much for PASH compounds. For PAHs, several preconcentration techniques have been used, but the most common preconcentration technique is solid-phase extraction (SPE) [19,20]. The sorbents that are most often used with SPE are C<sub>18</sub> and styrene divinylbenzene copolymers [5,11,19,20] like PLRP-s, although immunosorbents have also been used [10,21].

The main problem with these compounds is that they tend to become adsorbed onto the walls and surfaces they come into contact with. To avoid this, an organic solvent such as acetonitrile or 2-propanol or a surfactant must be added to the sample [11,19,22].

As mentioned above, the solubility of these compounds in water is very low and they tend to deposit in sediment samples. For this, it is also important to determine them in such samples. One of the most common techniques for the extraction of the analytes from solid samples is using an organic solvent that is kept in contact with the sample [23,24].

The aim of this paper is to develop and compare two methods for determining polycyclic aromatic compounds, including the six PAHs regulated by the EU, and four PASHs, selected from bibliography. One method involves HPLC separation with fluorescence detection and the other involves APCI-MS detection, as an alternative to the previous method. To analyse seawater, an on-line SPE step with a polymeric sorbent (PLRP-s) is used. For sediment sample analysis, the compounds are determined after extraction with an organic solvent. Finally, these methods are applied to determine these compounds in seawater and sediment samples from the marina and fishing port of Tarragona in Catalonia (Spain).

## EXPERIMENTAL

### Reagents and standards

Figure 1 shows the structures of the studied compounds. All were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland), Aldrich Chemie (Beere, Belgium), Sigma (Alcobendas, Madrid, Spain), Across (Geel, Belgium) or Supelco (Bellefonte, PA, USA), and all had a purity of more than 97%. Standard solutions of each compound at a concentration of 500 mg l<sup>-1</sup> were prepared in acetonitrile (SDS, Peypen, France) and stored at 4°C. All the working solutions were prepared by diluting these solutions.

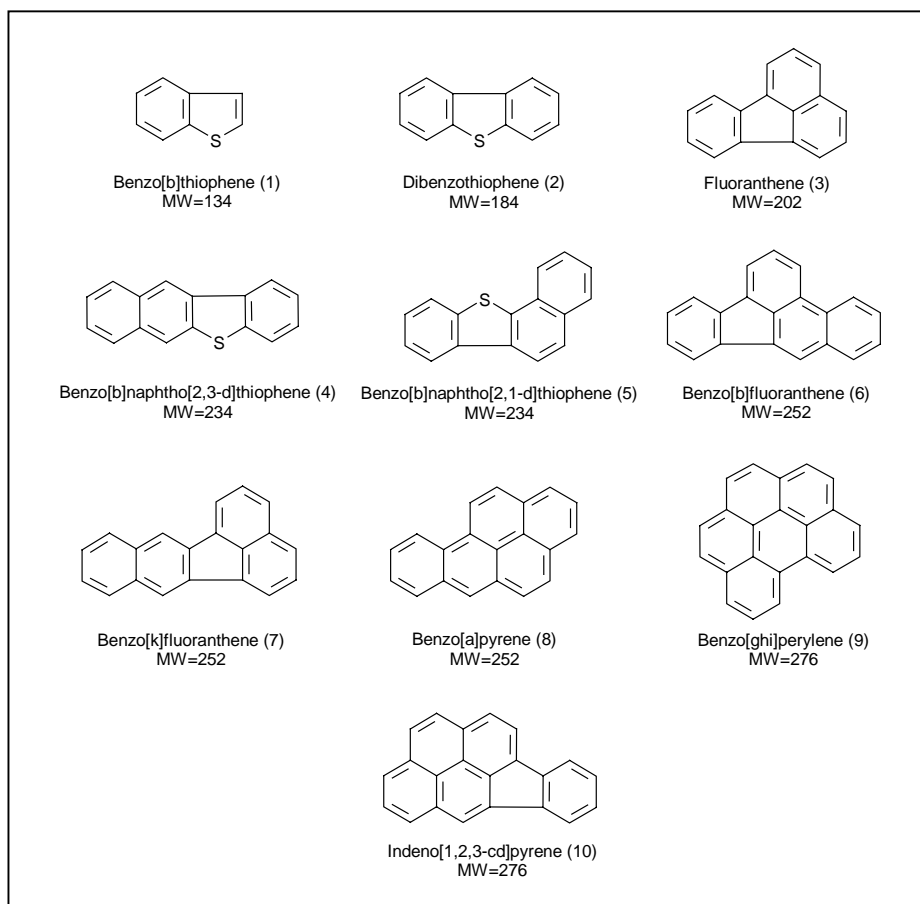
For the mobile phase, HPLC gradient-grade acetonitrile and methanol (SDS) were used. To optimize the preconcentration step, HPLC gradient-grade 2-propanol (Merck, Germany) was also used. Ultra pure water was prepared by ultra filtration with a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

### Apparatus

An HP1100 system (Agilent Technologies, Barcelona, Spain) was used for HPLC separation. For detection, an HP1046A programmable fluorescence detector (Hewlet Packard, Barcelona, Spain) and an HP1100 mass-selective detection system with an APCI interface (Agilent Technologies) were used. The chromatographic column was a 15x0.46 cm Pinnacle PAH with a 5 µm particle size (Restek, Bellefonte, USA). For direct injection experiments, 20 µl of sample volume was injected using an autosampler.

An HP1100 isocratic pump was used to add water into the mobile phase and improve the MS detection.





**Figure 1.** Structures of the studied compounds. The identification numbers used in the figures and text are in brackets. The molecular weight (MW) of the compounds are also indicated.

For the SPE step, a 10x3 mm stainless steel precolumn (Free University, Amsterdam, The Netherlands) laboratory-packed with 20  $\mu\text{m}$  PLRP-s sorbent (Polymer Labs, Shropshire, UK) was used. The precolumn was on-line coupled to the chromatographic system with a Rheodyne 7000 valve, and an Applied Biosystems pump (Ramsey, NJ, USA) was used to preconcentrate the samples.

**HPLC-fluorescence conditions**

For HPLC separation with fluorescence detection, the mobile phase contained Milli-Q water and acetonitrile. The analysis started with 40% of acetonitrile, which was increased linearly up to 100% in 30 min. This percentage was maintained for 10 min to return to the initial conditions in 3 min. The column was equilibrated for 5 min. The column temperature was 30°C and the mobile phase flow-rate was 1 ml min<sup>-1</sup>.

For fluorescence detection, the following program of wavelengths was used: at 0 min,  $\lambda_{\text{ex}} = 233$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 312$  nm; at 15 min,  $\lambda_{\text{ex}} = 233$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 341$  nm; at 18 min,  $\lambda_{\text{ex}} = 233$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 420$  nm; at 23 min,  $\lambda_{\text{ex}} = 267$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 387$  nm; at 26 min,  $\lambda_{\text{ex}} = 271$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 363$  nm; at 27.5 min,  $\lambda_{\text{ex}} = 255$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 420$  nm; at 33 min,  $\lambda_{\text{ex}} = 230$  nm and  $\lambda_{\text{em}} = 450$  nm.

**HPLC-APCI-MS conditions**

For the MS detection, an isocratic separation with methanol as the mobile phase was used. The flow-rate was 0.75 ml min<sup>-1</sup> and the column temperature was 45°C. Water at a flow rate of 0.5 ml min<sup>-1</sup> was added between the separation and the MS systems to increase the response.

The positive ionization mode was selected and, after optimization, the vaporizer temperature was 500 °C, the nebulizer gas pressure was 60 p.s.i., the APCI drying gas was nitrogen at a 6 l min<sup>-1</sup> at a temperature of 350 °C, capillary voltage was 4000 V and the corona current was 6  $\mu$ A (1 p.s.i. = 6894.76 Pa). The fragmentor voltage was set to 175 V and the gain was 16.

Chromatograms were recorded under selected-ion monitoring (SIM) acquisition. The molecular ion  $[M]^+$  was selected for each compound. Under

these conditions, only compounds 4-10 could be quantified because no signal was obtained for the rest.

### **Extraction methods**

In the SPE process, the precolumn was first washed with 20 ml of acetonitrile and then with 20 ml of Milli-Q water at 4 ml min<sup>-1</sup>. The tubes were then purged with the sample and finally 25 ml of this sample was preconcentrated at 2 ml min<sup>-1</sup>. To inject the compounds into the chromatographic system, the retained analytes were eluted in backflush mode by mobile phase.

To analyse sediment sample, the enrichment step involved adding 2x30 ml of dichloromethane to 1 g of sample [25]. The mixture was shaken vigorously and kept for 30 min at each step. The supernatant was evaporated to dryness in a rotary evaporator. Finally, the residues were dissolved in 0.5 ml of acetonitrile. This solution was filtered through a 0.2- $\mu$ m nylon syringe filter (Teknokroma, Barcelona, Spain) before being directly injected into the chromatographic system.

### **Sampling**

Seawater samples were taken from the fishing port and marina in Tarragona, Catalonia (Spain). Seawater was also taken from the open sea as a blank sample. The samples were collected in 2.5-l precleaned amber glass bottles. 20% of acetonitrile was added to prevent the compounds from being adsorbed onto the wall of the bottles. The samples were then filtered through a 0.45- $\mu$ m membrane filter (Whatman, Maidstone, UK) and kept at 4 °C until analysis.

Sediment samples were collected from the port of Tarragona and dried at room temperature.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Optimization of HPLC with fluorescence detection

The chromatographic column specified in Apparatus section was selected because it separates PAHs with high resolution. Moreover, mobile phase and wavelength program were optimized and the conditions are specified in HPLC-fluorescence Conditions section. Under these conditions, all ten compounds were separated in 35 min.

Calibration models were constructed and the highest concentration of the linear range was between 1 and 20 mg l<sup>-1</sup> and the quantification limits ranged from 0.0005 to 0.075 mg l<sup>-1</sup>. Linearity was good for all the compounds and correlation coefficients (R<sup>2</sup>) were above 0.9997.

### Optimization of HPLC-APCI-MS

The operational parameters of the APCI interface and MS detection were optimized for positive ionization mode because for the negative mode there was no response for most of the compounds. These parameters and their studied ranges were: drying gas flow (1-13 l min<sup>-1</sup>) and temperature (150-400 °C), corona current (1-10 µA), nebulizer pressure (10-60 p.s.i.), capillary voltage (1000-6000 V), vaporizer temperature (200-500 °C), fragmentor voltage (25-350 V) and gain (4-16). The optimization was carried out by flow injection analysis (FIA) of several solutions containing the individual compounds at a concentration of 5 mg l<sup>-1</sup>. An increase in the signal of most of compounds was observed when water was added to the carrier stream, although some authors [15,16] observed the opposite effect. So several percentages of water were checked. Acetonitrile and methanol were also checked as organic solvent in the carrier stream. Results were best with a water-methanol 40:60 solution, although compounds 1-3 were

not detected, so this mobile phase was chosen for separating the compounds.

However, since at this mobile phase composition the analysis time was too long, the separation was established using methanol at a flow-rate of 0.75 ml min<sup>-1</sup> as mobile phase and a post-column addition of water at a flow-rate of 0.5 ml min<sup>-1</sup> before MS detection. Under these conditions, separation took only 20 min.

The optimum conditions outlined in HPLC-APCI-MS Conditions section were chosen for the MS detection taking into account the results for the individual compounds. For all compounds, the molecular ion [M]<sup>+</sup> was obtained as base peak, and with a relative abundance (RA) between 8 and 15%, the ion corresponding to the addition of a proton [M + H]<sup>+</sup>.

Calibration models were constructed for the MS detection. The highest concentration of the linear range was 20 mg l<sup>-1</sup> and the quantification limits were between 0.007 and 0.06 mg l<sup>-1</sup>. Linearity was good for all compounds and correlation coefficients (R<sup>2</sup>) were above 0.997.

### **Optimization of SPE process**

The studied compounds tend to be adsorbed onto the walls and surfaces of the system and an organic solvent has to be added to the samples. This parameter has been studied for PAHs [19], but it had to be optimized for PASHs. For PAHs, the most common solvents are 2-propanol and acetonitrile [19], so both of these at different percentages were checked. In both cases some interferences from solvent coeluted with the first eluted compounds. Comparing optimum percentages of them, similar results were obtained, but less interferences were obtained for acetonitrile, so this solvent was chosen. In Table 1, some results are shown as an example. At low concentration of organic solvent, some of the last compounds were lost

because they were adsorbed onto the system. Also, the more organic solvent added to samples, the lower the recoveries for the first eluted compounds. Finally, 20% of acetonitrile was chosen.

**Table 1.** Recoveries obtained when 25 ml of Milli-Q water spiked at  $0.8 \mu\text{g l}^{-1}$  containing different percentages of acetonitrile was preconcentrated ( $n = 3$ ).

Number	Compound	Acetonitrile		
		20%	25%	30%
1	Benzo[b]thiophene	108	42	17
2	Dibenzothiophene	104	102	104
3	Fluoranthene	100	95	96
4	Benzo[b]naphtho[2,3-d]thiophene	86	86	88
5	Benzo[b]naphtho[2,1-d]thiophene	86	86	89
6	Benzo[b]fluoranthene	88	89	91
7	Benzo[k]fluoranthene	78	79	83
8	Benzo[a]pyrene	71	69	72
9	Benzo[ghi]perylene	64	72	78
10	Indeno[1,2,3-cd]pyrene	40	51	58

The RSD was under 15% in all cases.

Recoveries were checked when a spiked seawater sample was preconcentrated and were similar to those obtained when Milli-Q water samples were preconcentrated.

## Calibration

### *Seawater samples*

Linearity for all the compounds was studied under optimum conditions for both methods by preconcentrating 25 ml of seawater sample spiked at different concentrations. Table 2 shows the linear ranges and limits of detection for a signal-to-noise ratio of 3. For both detectors, good linearity was obtained and correlation coefficients ( $R^2$ ) were higher than 0.9996 for fluorescence and higher than 0.9967 for MS. For compounds 4, 8 and 9, the quantification and detection limits are similar when comparing both detection systems. For compounds 5-7, the results are lower with fluorescence detection but for the last compound, the quantification limit is lower with MS detection.

Repeatability was also evaluated by preconcentrating three seawater samples spiked at different concentrations of all the compounds. For fluorescence detection, the concentration was  $0.3 \mu\text{g l}^{-1}$  for compounds 1, 2, 4, 5, 9 and 10, and  $0.02 \mu\text{g l}^{-1}$  for compounds 3 and 6-8. The results, expressed as relative standard deviation (RSD), were between 2 and 15 %, although most of the results were lower than 10 %.

For MS detection, the concentration was  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  for compounds 5 and 6,  $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$  for compounds 4, 7, 9 and 10, and  $0.01 \mu\text{g l}^{-1}$  for compound 8. In this case, the results were between 3 and 8 %.

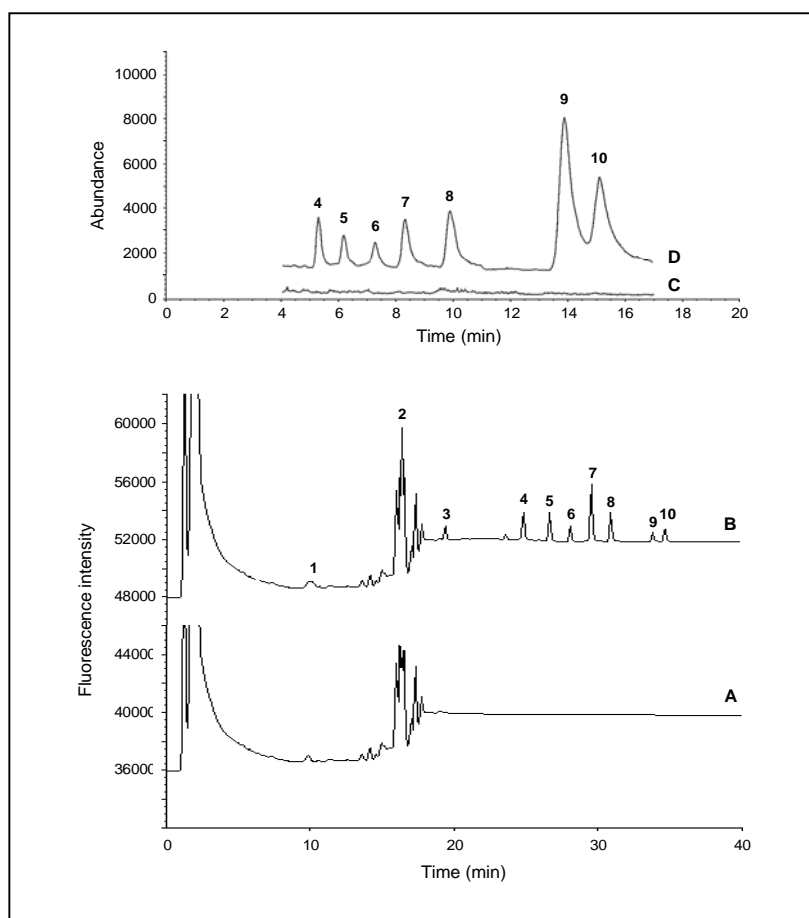
Figure 2 shows the chromatograms obtained at these conditions for both detection systems.

Reproducibility between days ( $n=3$ ) was also evaluated for both methods at the same concentrations as for the repeatability analysis. Results were between 2 and 20 % for fluorescence detection, being lower than 15 % for most compounds, and between 6 and 13 % for MS detection.

**Table 2.** Comparison of the linear ranges and limits of detection (LOD) when fluorescence or MS detection are used in the preconcentration of 25 ml of spiked seawater sample.

Number	Compound	Fluorescence		MS	
		Linear range ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Linear range ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )
1	Benzo[b]thiophene	0.06-10	0.03	-	-
2	Dibenzo[thiophene	0.009-10	0.003	-	-
3	Fluoranthene	0.008-10	0.004	-	-
4	Benzo[b]naphthol[2,3-d]thiophene	0.08-10	0.03	0.06-3	0.02
5	Benzo[b]naphthol[2,1-d]thiophene	0.07-10	0.02	0.7-100	0.3
6	Benzo[b]fluoranthene	0.02-5	0.008	0.6-100	0.2
7	Benzo[k]fluoranthene	0.007-5	0.003	0.07-10	0.03
8	Benzo[a]pyrene	0.004-1	0.001	0.006-0.3	0.003
9	Benzo[ghi]perylene	0.1-10	0.06	0.08-1.5	0.04
10	Indeno[1,2,3-cd]pyrene	0.3-10	0.1	0.08-3	0.04





**Figure 2.** Chromatograms obtained at the optimum conditions for SPE-HPLC-fluorescence and SPE-HPLC-APCI-MS when 25 ml of seawater sample was pre-concentrated. Signal identification: (A) and (B), blank and spiked sample for fluorescence detection; (C) and (D), blank and spiked sample for MS detection. The concentration levels for the spiked samples are specified in the text. For peak identification, see Figure 1.

### *Sediment samples*

From the different techniques available to analyse sediment samples, an extraction with an organic solvent was chosen because of the simplicity of

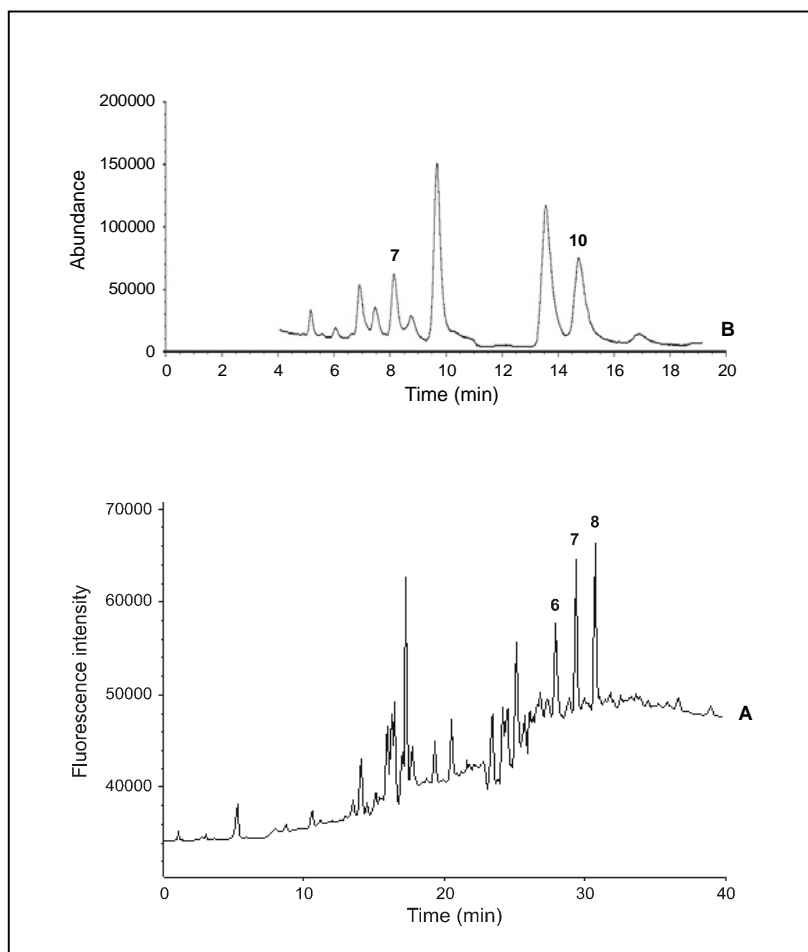
this technique. As explained in Extraction Methods section, dichloromethane as organic solvent was selected from literature [25], and because of the complexity of the sample, a standard addition calibration was carried out.

### **Application to real samples**

The developed methods were applied to analyse seawater and sediment samples from Tarragona fishing port and marina in Catalonia (Spain).

In seawater samples no compound was detected within the limits established in the methods, but when sediment samples were analysed, some of the studied compounds were detected. To quantify them, standard addition calibration was carried out. Sediment samples spiked at concentrations of between 75 and 600  $\mu\text{g kg}^{-1}$  were treated as explained in Extraction Methods section and analysed by both fluorescence and MS detection. Three unspiked sediment samples were also analysed for quantification. Figure 3 shows the chromatogram for each method.

Because of the different quantification limits of the methods, not all the compounds could be quantified with the two methods. With fluorescence detection, compounds 6-8 could be identified and quantified at concentrations of 230, 86 and 174  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . With the APCI-MS system, compounds 7-10 were identified and quantified. The results were 526, 218, 281 and 123  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively. For both detection systems, the RSDs were less than 15% in most cases. As can be seen, there are some difference between the concentration of compound 7 when calculating it using the different detection systems. These could be explained by the presence of interfering peak because in the MS chromatogram under SIM acquisition mode there are some other peaks that appear at similar retention time to the studied PAHs. These interferences could not be identified under full-scan acquisition mode because of the low concentration levels.



**Figure 3.** Chromatograms obtained for a sediment sample with fluorescence (A) and MS (B) detection.

Therefore, to detect whether there is any interference, we suggest on-line coupling between fluorescence and MS detection, since each detector provides complementary information.

## CONCLUSIONS

Two methods have been optimized for determining a mixture of polycyclic aromatic compounds in seawater and sediment samples. Methods consist on fluorescence or APCI-MS detection after HPLC separation. APCI-MS detection was found to be not an alternative technique to the mostly used fluorescence but a good complementary technique for the detection of these compounds. To analyse seawater samples, 25 ml of sample was preconcentrated by on-line SPE with PLRP-s as sorbent and 20% of acetonitrile was added to the sample prior to preconcentration. For the fluorescence detection method, quantification limits ranged from 0.004 to 0.3  $\mu\text{g l}^{-1}$  depending on the compound. Using the APCI-MS detection, only seven of the studied compounds could be detected and the quantification limits for these compounds ranged from 0.006 to 0.7  $\mu\text{g l}^{-1}$ . To analyse sediment samples, an extraction with dichloromethane was used and a standard addition calibration was carried out. These methods were used to quantify these compounds in seawater and sediment samples from Tarragona fishing port and marina on the coast of Catalonia (Spain). Although no compound was detected in the seawater samples, five compounds were quantified in the sediment samples using both detection systems.

## REFERENCES

- [1] Proposal for a Council Directive, Commission of the European Communities, Brussels, 1994.
- [2] S. G. Mössner, S. A. Wise, *Anal. Chem.* 71 (1999) 58.
- [3] J. Hellou, D. Mackay, B. Fowler, *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 2555.
- [4] R. M. Vilanova, P. Fernández, C. Martínez, J. O. Grimalt, *Water Res.* 35 (2001) 3916.

- 
- [5] E. Manoli, C. Samara, *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 417.
- [6] S. Lacorte, I. Guiffard, D. Fraise, D. Barceló, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1430.
- [7] L. Wolska, K. Galer, T. Górecki, J. Namiesnik, *Talanta* 50 (1999) 985.
- [8] R. Doong, S. Chang, Y. Sun, *J. Chromatogr. A* 879 (2000) 177.
- [9] J. D. Berset, M. Ejem, R. Holzer, P. Lischer, *Anal. Chim. Acta* 383 (1999) 263.
- [10] C. Miège, M. Bouzige, S. Nicol, J. Dugay, V. Pichon, M. C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 859 (1999) 29.
- [11] R. El Harrak, M. Calull, R. M. Marcé, F. Borrull, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 64 (1996) 47.
- [12] F. Sun, D. Littlejohn, M. D. Gibson, *Anal. Chim. Acta* 364 (1998) 1.
- [13] I. Urbe, J. Ruana, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 337.
- [14] C. H. Marvin, R. W. Smith, D. W. Bryant, B. E. McCarry, *J. Chromatogr. A* 863 (1999) 13.
- [15] S. Pérez, D. Barceló, *Chromatographia* 53 (2001) 475.
- [16] J. F. Anacleto, L. Ramaley, F. M. Benoit, R. K. Boyd, M. A. Quillian, *Anal. Chem.* 67 (1995) 4145.
- [17] H. Moriwaki, A. Imaeda, R. Arakawa, *Anal. Commun.* 36 (1999) 53.
- [18] D. B. Robb, T. R. Covey, A. P. Bruins, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3653.
- [19] R. El Harrak, M. Calull, R. M. Marcé, F. Borrull, *J. High Resol. Chromatogr.* 21 (1998) 667.
- [20] R. M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 273.
- [21] E. R. Brouwer, A. N. J. Hermans, H. Lingeman, U. A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 669 (1994) 45.
- [22] M. Bouzige, V. Pichon, M. C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 197.
- [23] J. Slobodník, S. Ramalho, B. L. M. Van Baar, A. J. H. Louter, U. A. Th. Brinkman, *Chemosphere* 41 (2000) 1469.
- [24] D. Thomas, S. M. Crain, P. G. Sim, F. M. Benoit, *J. Mass Spectrom.* 30 (1995) 1034.

- [25] A. Jiries, H. Hussain, J. Lintelmann, *Water Air Soil Pollut.* 121 (2000) 217.

---

**II.4. CALIBRACIÓ BILINEAL DE SEGON ORDRE PER A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS AROMÀTICS POLICÍCLICS EN SEDIMENTS MARINS MITJANÇANT L'EXTRACCIÓ AMB SOLVENT I LA CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA AMB DETECCIÓ AMB DIODES EN FILA**





La determinació de contaminants en mostres complexes, com els sediments marins, és important, ja que molts compostos hidrofòbics, com per exemple els PAHs, tendeixen a aparèixer en aquest tipus de mostra. Però, com s'ha vist en el treball anterior, aquesta determinació és una tasca difícil degut a la complexitat de la mostra, ja que és possible que quan s'apliqui el mètode optimitzat amb patrons a l'anàlisi de mostres reals, apareguin pics que corresponen a substàncies contingudes a la mostra i que coelueixin amb els compostos estudiats, de manera que la quantificació pot ser errònia. Per solventar aquest problema, s'ha d'optimitzar una nova separació que permeti la resolució dels pics cromatogràfics per tal de poder quantificar l'analit d'interès. Tot i així, si la mostra és molt complexa i el detector és poc selectiu, pot succeir que la separació completa sigui molt difícil d'aconseguir.

Com s'ha explicat en la introducció de la present tesi, una alternativa a la utilització de la separació cromatogràfica per a la quantificació de substàncies aplicant la calibració univariant és l'aplicació de la calibració de segon ordre [1]. Aquest tipus de calibració, que requereix dades de segon ordre per a cada mostra, permet la quantificació de compostos a partir de pics cromatogràfics que no estan totalment separats.

Hi ha diferents algorismes que permeten realitzar aquest tipus de calibració, com per exemple el 3-PLS, que s'ha utilitzat en el treball presentat a l'apartat II.2. Un altre d'aquests algorismes és el GRAM [2], que és especialment interessant degut a què permet la quantificació de l'analit d'interès utilitzant únicament una mostra de calibració. Aquest mètode ja havia donat bons resultats en un treball anterior en el qual es quantificaven naftalensulfonats en aigua de depuradora utilitzant una mostra d'aigua ultrapura fortificada com a mostra de calibració [3].

Però en el cas de mostres com els sediments marins, la complexitat de la mostra fa que moltes vegades aquesta presenti efecte matriu, de manera que la quantificació dels analits es duu a terme habitualment mitjançant

mostres fortificades com a mostres de calibració i una calibració univariant per addicions estàndard. Quan aquesta metodologia s'aplica a l'anàlisi de mostres reals, el procés de quantificació és llarg, ja que per a cada nova mostra s'ha de realitzar una nova calibració. En aquests casos, l'aplicació del GRAM podria ser útil, ja que si s'utilitza només una mostra per a la calibració, el temps requerit en aquesta etapa es veuria considerablement reduït.

Per tant, l'objectiu d'aquest treball va ser la quantificació de contaminants orgànics en mostres complexes mitjançant l'aplicació del GRAM. Els compostos que es van triar van ser els compostos aromàtics policíclics que s'havien estudiat en el treball presentat a l'apartat anterior de la present tesi, en el qual ja s'havia vist que aquests compostos podien estar presents en sediments marins i que aquest tipus de mostra complexa produïa efecte matriu en la resposta dels compostos. A més, també s'havia observat la presència de substàncies interferents degut a la complexitat de la mostra, tot i l'ús de detectors amb una elevada selectivitat. El mètode desenvolupat es va basar, doncs, en el mètode cromatogràfic desenvolupat al treball anterior, si bé es va utilitzar un DAD per tal d'obtenir dades de segon ordre per a les mostres analitzades.

Els compostos estudiats no van ser detectats en la mostra analitzada, tot i que en el treball presentat en l'apartat anterior aquests compostos van ser trobats i quantificats a concentracions entre 86 i 526  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en mostres similars, de manera que el present estudi es va realitzar utilitzant mostres fortificades com a mostres desconegudes. La quantificació es va dur a terme utilitzant una mostra de sediments fortificada per tal de tenir en compte l'efecte matriu que produïa la mostra en el senyal dels compostos estudiats.

Per tal de validar el mètode, es va desenvolupar un segon mètode per a dur a terme la calibració univariant habitualment utilitzada per a la quantificació de compostos en mostres reals. Aquest mètode requeria un temps d'anàlisi considerablement més llarg i només permetia la separació total de les

substàncies interferents per a dos dels compostos estudiats. Per a aquests dos compostos, els resultats obtinguts amb els dos mètodes de calibració van ser estadísticament molt similars.

Pel que fa a la resta de compostos, les dades obtingudes utilitzant el GRAM es van comparar amb la concentració teòrica i els resultats van ser bastant similars estadísticament, amb errors relatius menors del 20% per a la majoria de compostos, que són acceptables tenint en compte els baixos nivells de concentració quantificats.

Segons els resultats obtinguts, aquest tipus de calibració pot ser molt útil en l'anàlisi de mostres complexes, ja que a més de permetre la quantificació de compostos a partir de pics que no estan totalment resolts, fa que aquesta sigui més ràpida degut a l'ús d'una única mostra fortificada per a la calibració, que evita el procés de calibració univariant per addicions estàndard convencional que pot ser llarg, sobretot en aquells casos en què l'anàlisi de les mostres requereix molt de temps. A més, en el cas de mostres complexes que presenten efecte matriu, com els sediments marins, no es necessita realitzar l'anàlisi de mostres fortificades per a dur a terme una nova recta de calibratge per a cada nova mostra, sinó que l'anàlisi d'una única mostra fortificada és suficient per dur a terme la quantificació, la qual cosa fa que el procés de quantificació en aquest tipus de mostres sigui considerablement més ràpid.

Els resultats obtinguts en aquest treball han estat acceptats per la revista *Analytica Chimica Acta* per a la seva publicació. A continuació, se n'adjunta una còpia.

### **Bibliografia**

- [1] K. S. Booksh, B. R. Kowalski, *Anal. Chem.* 66 (1994) A782.
- [2] E. Sanchez, B. R. Kowalski, *Anal. Chem.* 58 (1986) 496.

- [3] E. Comas, R. A. Gimeno, J. Ferré, R. M. Marcé, F. Borrull, F. X. Rius, J. Chromatogr. A 988 (2003) 277.

**SECOND-ORDER BILINEAR CALIBRATION FOR DETERMINING POLYCYCLIC AROMATIC COMPOUNDS IN MARINE SEDIMENTS BY SOLVENT EXTRACTION AND LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH DIODE ARRAY DETECTION**

**ABSTRACT**

A method based on solvent extraction followed by chromatographic separation with diode-array detection has been applied to determine polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediment samples. Because interfering substances coeluted with the compounds studied, second-order calibration using the Generalized Rank Annihilation Method (GRAM) was used for quantification. For calibration, a spiked sample was used instead of a standard solution because the complexity of the samples made us suspect the presence of matrix effect. With this method, the compounds do not need to be completely separated from the interferences and quantification can be carried out with only one spiked sample for calibration. Hence the quantification process is shorter than the one based on univariate calibration.

The ability of the method to quantify the studied compounds was evaluated by comparing the results with those of a univariate standard addition calibration, which involved the previous isolation of the analytes.

**Keywords:** Polycyclic aromatic hydrocarbons; Polycyclic aromatic sulfur heterocycles; Marine sediment; Second-order calibration; GRAM; Standard additions; HPLC-DAD

## INTRODUCTION

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are well-known mutagenic and carcinogenic compounds, which are produced by the incomplete combustion of organic materials [1]. These compounds are suspected of having endocrine disrupting effects [2]. Some homologues of these compounds, such as polycyclic aromatic sulfur heterocycles (PASHs), are also suspected of having potentially mutagenic and carcinogenic effects [3]. For these reasons they need to be determined in real environmental samples and particularly in coastal waters because of the variety of possible sources of contamination. For these compounds and specially for PAHs, marine sediment is a particularly interesting sample because the compounds are hydrophobic, which makes them to sediment and occur in this kind of samples [4].

The most common technique for separating these compounds is high-performance liquid chromatography (HPLC) [1], although gas chromatography (GC) [1] and supercritical fluid chromatography (SFC) [5] have also been applied. For HPLC, the most common detectors are UV-visible or diode-array detectors (DAD) [6,7], and fluorescence detector (FLD) [8,9], although interest in mass-spectrometry detection (MSD) is increasing because of its selectivity and sensitivity [4,10].

A step before chromatographic separation is required in order to extract the analytes from the sample. For solid samples, such as sediments, analytes are extracted by mixing the sample with an organic solvent [4], although other techniques have also been reported; for example, microwave-assisted extraction [11], Soxhlet extraction [12], supercritical fluid extraction (SFE) [12] or accelerated solvent extraction (ASE) [9].

These extraction processes are usually not selective enough, so a number of interfering substances are extracted. If the compounds studied are to be quantified by univariate calibration, these interferences have to be separated

from the analytes. However, in most occasions, complete separation cannot be achieved or the separation time is too long.

In these cases, second-order calibration algorithms, which do not require complete separation of the analytes, can be used for quantification [13]. These algorithms use data matrices for each sample. These matrices can be obtained, for example, by an HPLC-DAD system, which can record the spectra of the chromatographic system's effluent. In this way, a data matrix (elution time x wavelength) is obtained for each sample.

Several algorithms that use second-order data are described in the literature [14-16]. Of these, the Generalized Rank Annihilation Method (GRAM) [17-19] has interesting properties since it only requires two data matrices for quantification: one from the calibration sample and the other from the unknown sample. Recently, it has been proved that GRAM predicts similarly to the Parallel Factor Analysis (PARAFAC) when only two samples are used [16], so both methods can be useful as calibration methods for second-order data. But, unlike PARAFAC, GRAM is a non-iterative method and several figures of merit like the limits of detection, the sensibility and the variance of the predicted concentrations can be easily calculated [20]. Then, we focused our attention to the application of GRAM.

As a calibration sample, a pure standard is commonly used, but it can lead to erroneous quantification for very complex samples in which matrix effect is present. In these cases, a standard addition method is recommended. In univariate calibration, this method is very time-consuming, because calibration has to be carried out for every new sample. GRAM, however, makes this process shorter, because only one spiked sample is needed for quantification.

The aim of this paper is the application of GRAM to quantify a mixture of ten PAHs and PASHs in marine sediment samples. Calibration is carried out using a spiked sample, since matrix effect is suspected in these very

complex samples. The results will be validated by comparison with those obtained with univariate standard addition calibration.

## **EXPERIMENTAL**

### **Reagents and standards**

The compounds studied were: (1) benzo[b]thiophene (Aldrich Chemie, Beere, Belgium), (2) dibenzothiophene (Aldrich Chemie), (3) fluoranthene (Sigma, Alcobendas, Madrid, Spain), (4) benzo[b]naphtho[2,3-d]thiophene (Across, Geel, Belgium), (5) benzo[b]naphtho[2,1-d]thiophene (Aldrich Chemie), (6) benzo[b]fluoranthene (Aldrich Chemie), (7) benzo[k]fluoranthene (Fluka, Buchs, Switzerland), (8) benzo[a]pyrene (Sigma), (9) benzo[ghi]perylene (Aldrich Chemie), (10) indeno[1,2,3-cd]pyrene (Supelco, Bellefonte, PA, USA). They were all more than 97% pure. Standard solutions of each compound were prepared in acetonitrile at a concentration of 500 mg l<sup>-1</sup> (SDS, Peypen, France) and stored at 4°C. All the working solutions were prepared by diluting these standard solutions.

HPLC gradient grade acetonitrile (SDS) was used for the mobile phase in the chromatographic separation and the extraction process. Ultra pure water was prepared with a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

### **Instrumentation**

The chromatographic system was an HP1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), which consisted of a degasser, a binary pump, a manual injector provided with a 20 µl-loop, a column oven and a DAD. The



chromatographic column was a 25 x 0.46 cm Kromasil 100 C<sub>18</sub> with a particle size of 5 µm (Teknokroma, Barcelona, Spain).

In the extraction process, the extraction solvent was evaporated using a R-114 rotary vacuum evaporator (Büchi, Flawil, Switzerland) equipped with a B-480 water bath (Büchi).

### **Chromatographic conditions**

Two chromatographic separation conditions were used in this study. In both cases, the temperature of the column was 30 °C and the mobile phase, which consisted of ultra pure water and acetonitrile, was pumped at 1 ml min<sup>-1</sup>.

#### *Conditions 1*

For quantification with univariate standard additions calibration, the gradient started with 20% acetonitrile, which was increased linearly to 100% in 80 min. This percentage was maintained for 20 min and returned to initial conditions in 5 min. The column was also equilibrated for 5 min. Under these conditions, analysis lasted 105 minutes.

Analytes were detected at 290 nm.

#### *Conditions 2*

For quantification with GRAM, the gradient started with 40% acetonitrile and it was linearly increased to 100% in 30 min. This percentage was maintained for 10 min and returned to initial conditions in 3 min. The

column was equilibrated for 5 min. Under these conditions, analysis lasted 43 minutes.

The spectra of the effluent were recorded every 0.4 s between 220 and 300 nm every 0.4 nm.

### **Extraction process**

The extraction process consisted of adding 2 x 30 ml of dichloromethane to 1 g of dry sample. For spiked samples, a suitable volume of standard solution was added to the sample, which was then left to dry before dichloromethane was added. The mixture was shaken and kept for 30 min at each step. The supernatants were separated from the sediment and evaporated to dryness in a rotary evaporator. The residue was redissolved in 0.5 ml of acetonitrile and the resulting solution was filtered through a 0.2- $\mu\text{m}$  nylon syringe filter (Teknokroma) before it was injected into the chromatographic system.

### **Sampling**

Sediment samples were collected from the fishing port of Tarragona, Catalonia (Spain) and dried at room temperature.

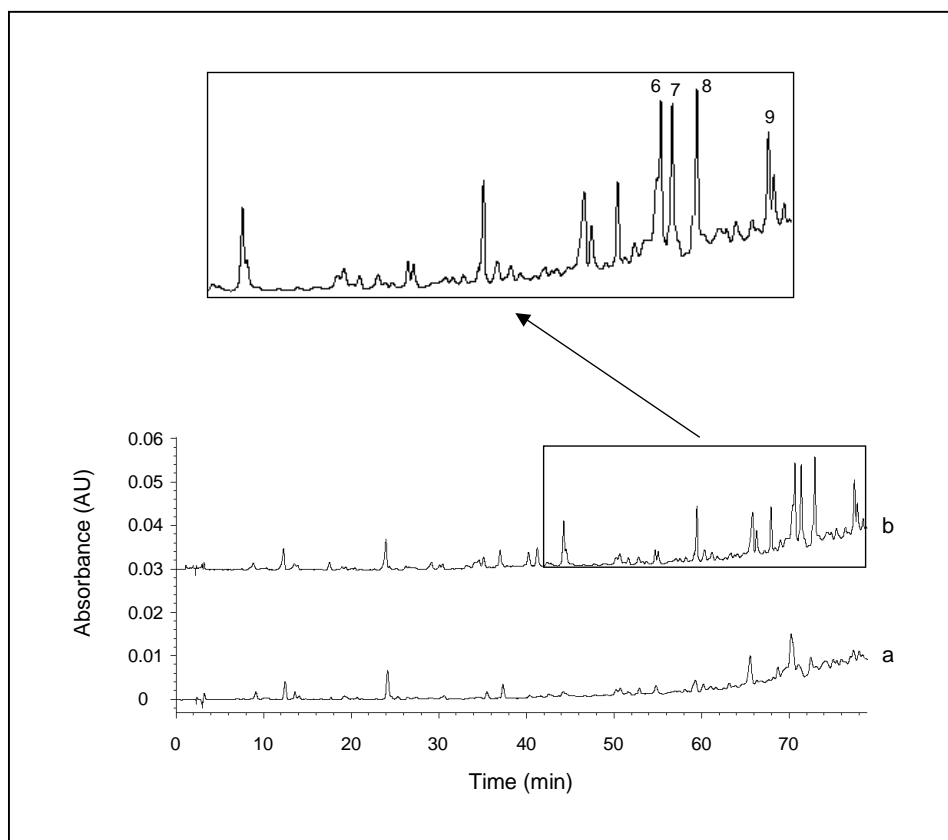
## **RESULTS AND DISCUSSION**

A method based on a previous study [4] was used to determine a mixture of PAHs and PASHs in marine sediment samples using a DAD. In univariate calibration, analytes must be completely separated if they are to be correctly quantified. However, because of the complexity of the sample and the low

selectivity of the detector, the sediment sample produced a chromatogram with several peaks, most of which coeluted with the compounds studied. In these conditions, and taking into account the low concentration levels to be quantified, the separation had to be optimized to separate the analytes from the interferences. Several conditions were tested, and the temperature, composition and flow rate of the mobile phase, and the wavelength were all varied. Finally, only compounds 4 and 5 did not coelute with interferences (peak purities higher than 985 in both cases) using the conditions specified in Conditions 1 section (see Figure 1). Note that, under these conditions, separation lasted 80 minutes, which is too long. Moreover, the wavelength selected to avoid interferences is not the one that provides a maximal absorbance for the studied analytes, and, consequently, the sensitivity of the method decreases.

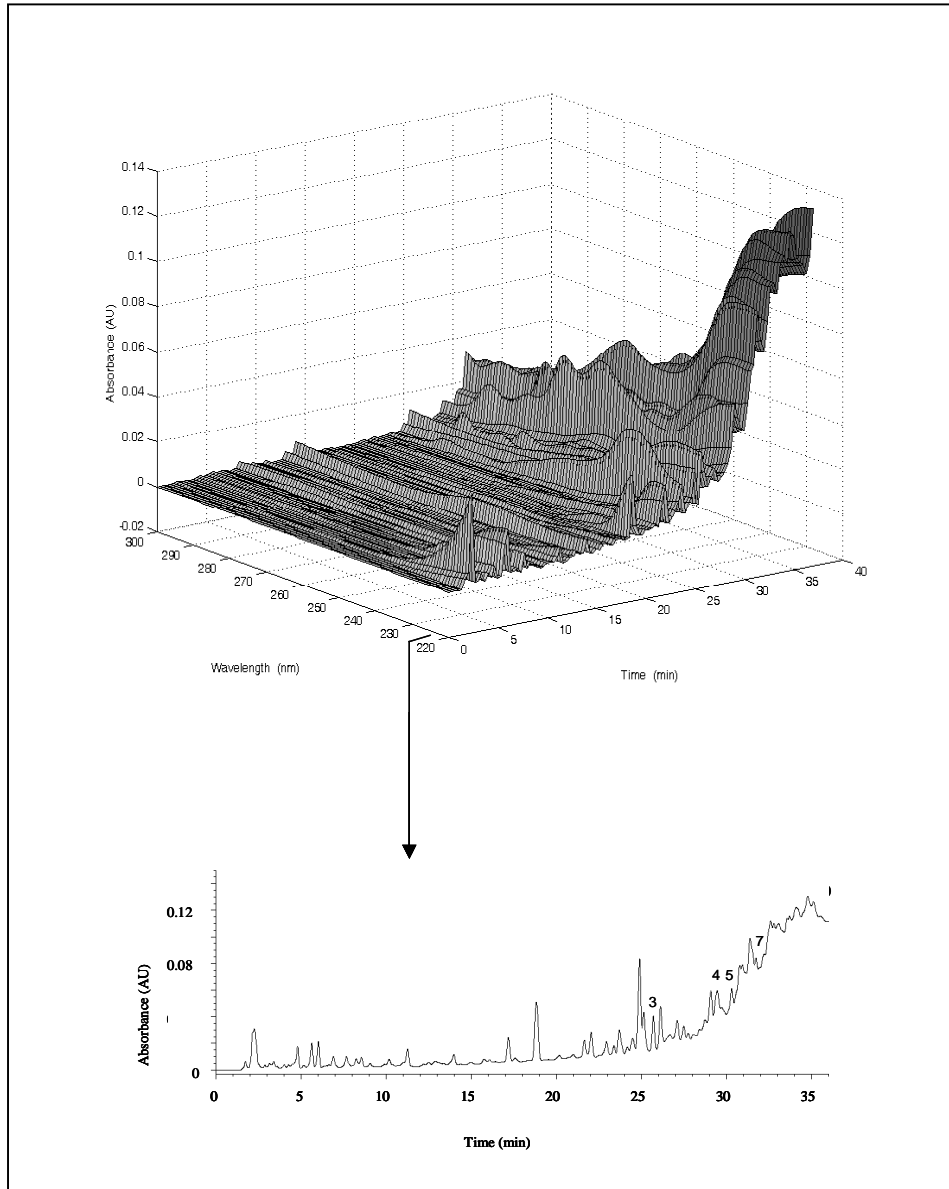
Taking into account that the optimized method led to long analysis times and that not all the analytes studied could be quantified, second-order calibration, which does not require the analytes to be completely separated, was chosen. Of the algorithms available, GRAM was selected because of its simplicity and speed (it only requires one calibration sample). This algorithm has already been applied to determine contaminants in spiked treatment plant wastewater samples, using standard solutions for quantification [19]. The results were statistically very similar to those obtained using the more time-consuming univariate calibration.

For complex samples, such as soil or sediment, in which matrix effect may be present, calibration with pure standards can lead to errors in the quantification because the signal of the analyte depends on the sample. So analytes have to be quantified using standard additions. This calibration is often long and tedious, since it has to be carried out for every new sample. For this reason, GRAM was chosen to quantify the analytes in marine sediment samples. In order to take into account a possible matrix effect in the sample, a spiked sediment sample was used as the calibration sample instead of a standard solution.



**Figure 1.** Chromatograms obtained under conditions 1 for: a) marine sediment sample; b) marine sediment sample spiked at a concentration of 1 mg kg<sup>-1</sup>. For more details and identification of the peaks, see text.

In this way, four replicates of a marine sediment sample were spiked at a concentration of 2 mg kg<sup>-1</sup>. These samples were treated as explained in Extraction Process section. Two repetitions of each sample were injected into the chromatographic system and analysed under conditions 2 (see Conditions 2 section). As an example, the chromatogram at 224 nm for one of these samples is shown in Figure 2. All the compounds eluted in 36 min.



**Figure 2.** Chromatogram of a calibration sample in conditions 2 and extracted chromatogram at 224 nm. For more details and identification of the peaks, see text.

The analytes were not detected in the studied sample within the limits of the method, although these compounds have been found in similar samples [4]. To check how well GRAM performed in quantifying the analytes, four replicates were spiked at  $0.5 \text{ mg kg}^{-1}$  and considered as unknown samples. Each sample was analysed under conditions 2. Like other second-order calibration methods, GRAM assumes that the data follow a mathematical structure [14]. For chromatographic data, this means that the analyte of interest must elute at the same retention time in different samples and also that its peaks must be proportional among them. But due to general indeterminations, time-shift between repetitions is not unusual. For this reason, a time-shift correction algorithm was applied before GRAM [21]. First, it is selected the part of the data to be used in the model, what is called a time window. This time window corresponds where the peak elutes. This window is not the same in both matrices but the one where the analyte of interest is aligned (elute at the same time sensor). To detect that, and as we are working with overlapped peaks, a curve resolution method is applied to determine which is the retention time of the analyte of interest in both matrices. Then the analyte of interest is selected and a time window for the test sample is considered.

To build a GRAM model, it is also necessary to specify the number of factors, which corresponds to the number of analytes present in both samples. Estimating the number of factors in a GRAM model is much easier than estimating the pseudorank of a simple data matrix. Hence, it was determined by looking at the singular values calculated in a step of GRAM [19].

To validate the GRAM results, univariate calibration was carried out. This study focused on compounds 4 and 5, which were the only analytes that could be separated from the interferences under conditions 1. Because of the complexity of the sample, a matrix effect was investigated by carrying out calibration by direct injection of standard solutions containing the studied compounds at different concentration levels. Another calibration

was done by injecting the solutions obtained from the extraction of sediment samples spiked at concentrations between 0.5 and 10 mg kg<sup>-1</sup>. A t-test was used to compare the slopes of the calibration models [22] for both compounds, and they were found to be significantly different for a confidence interval of 95%. Since there was matrix effect for the studied compounds, a standard addition procedure was used for calibration.

The results obtained for compounds 4 and 5 using the GRAM and univariate calibration procedures are shown in Table 1. The results of the calibration approaches were compared with a t-test for both compounds. They were not significantly different for a confidence interval of 95%.

**Table 1.** Concentrations (mg kg<sup>-1</sup>) of the compounds studied in the spiked marine sediment samples using GRAM and a standard addition univariate calibration.

Replicate	Analyte 4		Analyte 5	
	GRAM calibration	Univariate calibration	GRAM calibration	Univariate calibration
A	0.54	0.50	0.66	0.68
B	0.58	0.50	0.70	0.66
C	0.57	0.54	0.67	0.64
D	0.55	0.48	0.69	0.65

The rest of the compounds were also quantified in the unknown sample. The results are shown in Table 2, where they are compared to the real concentration added into the samples. In most cases, the results are similar to the spiked concentration, and relative errors are lower than 20%, which is acceptable taking into account the low concentration levels being determined. The relative error is higher than 30% only for compound 10.

The similarity of these results shows that the GRAM method can be very advantageous in situations in which the analytes cannot be completely separated or the analysis is too long. In our case, we have the added advantage that we are quantifying analytes in samples in which matrix effect is present. This means that it is not necessary to determine whether this effect is present or not, often a tedious and time-consuming process, or to calibrate for every new sample. Moreover, calibration is also shorter because only one calibration sample is needed for quantification.

**Table 2.** Comparison between the concentration added to the samples ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) and the concentrations obtained when GRAM was used to study the compounds in spiked marine sediment samples.

Compound	GRAM concentration	Spiked concentration
1	0.43	0.51
2	0.49	0.53
3	0.69	0.52
4	0.57	0.51
5	0.68	0.53
6	0.53	0.50
7	0.64	0.54
8	0.59	0.50
9	0.51	0.51
10	0.88	0.53



## CONCLUSIONS

The Generalized Rank Annihilation Method (GRAM) proved to be very useful for quantifying contaminants in complex samples. In this study, it was applied to determine PAHs and PASHs in marine sediment samples. It requires only one spiked sample for quantification, which makes it easier. The use of a spiked sample for calibration allowed the analytes to be quantified in samples in which matrix effect is present. Moreover, this procedure does not require the new separation conditions to be optimised when the sample contains interferences that coelute with the analytes studied. This optimisation process is also time-consuming, particularly when the analysis is long.

## REFERENCES

- [1] E. Manoli, C. Samara, *Trends in Anal. Chem.* 18 (1999) 417.
- [2] Communication from the Commission to the Council and the European Parliament, Implementation of the Community Strategy for Endocrine disruptors: a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife (COM (1999) 706), Brussels, 14-06-2001, COM (2001) 262 final.
- [3] S. G. Mössner, S. A. Wise, *Anal. Chem.* 71 (1999) 58.
- [4] R. A. Gimeno, A. F. M. Altelaar, R. M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A* 958 (2002) 141.
- [5] E. Lesellier, *Analisis*, 27 (1999) 241.
- [6] C. Miège, M. Bouzige, S. Nicol, J. Dugay, V. Pichon, M. C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 859 (1999) 29.
- [7] F. Sun, D. Littlejohn, M. D. Gibson, *Anal. Chim. Acta* 364 (1998) 1.
- [8] I. Urbe, J. Ruana, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 337.
- [9] J. D. Berset, M. Ejem, R. Holzer, P. Lischer, *Anal. Chim. Acta* 383 (1999) 263.

- 
- [10] J. F. Anacleto, L. Ramaley, F. M. Benoit, R. K. Boyd, M. A. Quillian, *Anal. Chem.* 67 (1995) 4145.
- [11] S. L. Cresswell, S. J. Haswell, *Analyst* 124 (1999) 1361.
- [12] R. Doong, S. Chang, Y. Sun, *J. Chromatogr. A*, 879 (2000) 177.
- [13] K. S. Booksh, B. R. Kowalski, *Anal. Chem.* 66 (1994) A782.
- [14] A. De Juan, R. Tauler, *J. Chemom.* 15 (2001) 749.
- [15] N. M. Faber, R. Bro, P. K. Hopke, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 65 (2003) 119.
- [16] N. M. Faber, *Anal. Bioanal. Chem.* 372 (2002) 683.
- [17] E. Sanchez, B. R. Kowalski, *Anal. Chem.* 58 (1986) 496.
- [18] N. M. Faber, L. M. C. Buydens, G. Kateman, *J. Chemom.* 8 (1994) 181.
- [19] E. Comas, R. A. Gimeno, J. Ferré, R. M. Marcé, F. Borrull, F. X. Rius, *J. Chromatogr. A* 988 (2003) 277.
- [20] N.M. Faber, J. Ferré, R. Boqué, *Chem. Intell. Lab. Syst.* 55 (2001) 67.
- [21] E. Comas, R. A. Gimeno, J. Ferré, R. M. Marcé, F. Borrull, F. X. Rius, *Anal. Chim. Acta* 470 (2002) 163.
- [22] D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. S. Buydens, S. De Jong, P. J. Kewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Elsevier, Amsterdam, 1997.

---

**II.5. DETERMINACIÓ DE PLASTIFICANTS MITJANÇANT CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ I ESPECTROMETRIA DE MASSES AMB IONITZACIÓ QUÍMICA A PRESSIÓ ATMOSFÈRICA EN MOSTRES D'AIGUA I SEDIMENTS**



Uns contaminants d'especial interès a la costa, tot i que no han estat gaire estudiats en aquesta zona, són els ftalats i adipats, ja que s'han trobat en algunes mostres d'efluents industrials [1], d'aigua [2] o sediments portuaris [3] i alguns d'ells han estat recentment classificats com a alteradors endocrins per l'EU [4]. Donat que aquests compostos són utilitzats en la fabricació de polímers, és interessant la seva determinació en la costa del tarragonès, ja que en aquesta zona hi ha nombroses empreses dedicades a aquesta activitat.

Tot i que l'HPLC acoblat a la MS no ha estat gaire utilitzat per a la determinació dels compostos, la seva aplicació és interessant degut a què l'ús de l'HPLC permet la determinació conjunta d'aquests compostos amb d'altres, com per exemple altres alteradors endocrins, que no es poden determinar mitjançant la GC, i als avantatges d'utilització d'aquesta tècnica de detecció en mostres reals. D'entre les interfases emprades per a aquest acoblament, la més utilitzada és l'APCI [5], ja que la sensibilitat amb altres, com l'ES, és baixa, tot i que també s'ha proposat l'ús de l'electrosprai (ES) adquirint el senyal corresponent a l'aducte  $[M + Na]^+$  [6].

Per tant, es va pensar en el desenvolupament d'un mètode basat en l'HPLC-APCI-MS per a la determinació d'una barreja de sis ftalats i el bis(2-etilhexil)adipat per tal d'avaluar la seva presència en el medi ambient costaner de Tarragona, no només en l'aigua del port, sinó també en mostres de sediments. A més, també es va proposar la determinació de la presència d'aquests compostos en l'aigua de la depuradora de la mateixa ciutat per tal d'avaluar-ne la seva aportació com a font de contaminació.

En aquest cas, la ionització dels compostos no va ser difícil com en el cas dels PAHs, de manera que a un voltatge de fragmentació baix (25 V) l'ió  $[M + H]^+$  era present per a tots els compostos i l'aplicació de voltatges superiors permetia l'obtenció d'altres fragments per tal de confirmar la presència en mostres reals.

Per extreure els compostos de les mostres aquoses es va triar la SPE. Per a aquest procés, s'havien utilitzat sorbents altament entrecreuat com el LiChrolut EN, que s'havia emprat per a la determinació de diferents alteradors endocrins, incloent alguns ftalats, en mostres d'efluents industrials, obtenint recuperacions d'entre 54 i 69% [1]. En el present estudi, però, es van utilitzar cartutxos d'extracció d'un altre sorbent altament entrecreuat, l'Isolute ENV+. Aquest sorbent s'havia utilitzat anteriorment per a l'extracció de quatre ftalats d'aigua d'aquari i de llac [7]. En aquest últim treball, els autors proposen la utilització de metanol per augmentar la solubilitat dels compostos en la mostres i evitar la seva adsorció en les parets del sistema. Aquesta adsorció ja s'havia observat anteriorment en altres compostos hidrofòbics com els hidrocarburs policíclics aromàtics, de manera que es va optar per l'addició d'un solvent orgànic a la mostra aquosa abans de la seva preconcentració, com es fa en el cas d'aquests altres compostos.

Pel que fa als sediments marins, la tècnica d'extracció triada d'entre les utilitzades per a la determinació d'aquests compostos en aquest tipus de mostra va ser l'extracció amb un solvent orgànic i ultrasons degut a la seva senzillesa. Utilitzant acetonitril com a solvent orgànic, les recuperacions van ser acceptables.

El mètode desenvolupat es va aplicar a la determinació de les mostres de la depuradora i dels ports de Tarragona i, si bé els compostos estudiats no es van detectar a les mostres d'aigua dels ports, alguns d'ells van poder ser quantificats en les mostres de la depuradora i dels sediments marins

A continuació es presenten els resultats obtinguts en aquest estudi i que han estat publicats en la revista *Chromatographia*, 58 (2003) 37-41.

## **Bibliografia**

- [1] M. Castillo, M. C. Alonso, J. Riu, D. Barceló, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 1300.
- [2] O. S. Fatoki, A. Noma, *Water Air Soil Pollut.* 140 (2002) 85.
- [3] P. Desideri, L. Lepri, L. Checchini, D. Santianni, *Annali di Chimica* 86 (1996) 215.
- [4] Communication from the Commission to the Council and the European Parliament, Implementation of the Community Strategy for Endocrine disruptors: a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife (COM (1999) 706), Brussels, 14-06-2001, COM (2001) 262 final.
- [5] M. Castillo, A. Oubiña, D. Barceló, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 2180.
- [6] Z.-P. Lin, M. G. Ikononou, H. Jing, C. Mackintosh, F. A. P. C. Gobas, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 2100.
- [7] S. Jara, C. Lysebo, T. Greibrokk, E. Lundanes, *Anal. Chim. Acta* 407 (2000) 165.





---

**DETERMINATION OF PLASTICIZERS BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND ATMOSPHERIC PRESSURE CHEMICAL IONIZATION MASS SPECTROMETRY IN WATER AND SEDIMENT SAMPLES****ABSTRACT**

Two methods based on high-performance liquid chromatography and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry have been developed for determining phthalates and bis(2-ethylhexyl)adipate in water and marine sediment samples. A solid-phase extraction method using Isolute ENV+ as sorbent has been optimised for water samples and an ultrasonic extraction with acetonitrile was used to extract the compounds from sediment samples. In the solid-phase extraction method, 100 ml of sample containing a 20% of acetonitrile was preconcentrated. Under these conditions, recoveries were between 32 and 95% and the quantification limits ranged from 0.03 to 4  $\mu\text{g l}^{-1}$ . To analyse sediment, 1 g of sample was extracted and recoveries were up to 70% for all the compounds, and standard addition calibration was carried out.

When these methods were applied to real samples, no compound was detected in the coastal water samples. In treatment plant wastewater, five compounds were quantified at concentration levels between 0.2 and 3.8  $\mu\text{g l}^{-1}$ , while in sediment samples, five compounds were quantified at concentrations between 0.13 and 9.4  $\text{mg kg}^{-1}$ .

**Keywords:** Phthalate esters; Bis(2-ethylhexyl)adipate; Atmospheric pressure chemical ionisation-mass spectrometry; Column Liquid chromatography; Coastal water; Marine sediment

## INTRODUCTION

Plasticizers, such as some phthalate esters and bis(2-ethylhexyl)adipate, are widely used because they are added to polymers to increase their flexibility. However, some of these compounds have been classified by the European Union (EU) as endocrine disruptors [1]. So it is important to develop analytical methods to determine the occurrence of these compounds in environmental samples. These compounds have been determined in different water samples, but they have been scarcely determined in coastal waters.

Several separation techniques have been used to determine these compounds. The most common technique is gas chromatography (GC) with mass spectrometry (MS) [2,3] or flame ionization detector (FID) [4]. High-performance liquid chromatography (HPLC) has also been applied using a UV detector [5] or atmospheric pressure chemical ionisation/mass spectrometry (APCI-MS) [6,7], specially when these compounds are determined with other endocrine disruptors which are not amenable by GC.

As the concentration levels in real environmental samples are low, an enrichment step is needed before performing the chromatographic analysis. For water samples, this is usually done using liquid-liquid (LLE) [4] or solid-phase (SPE) [5-7] extraction, though solid-phase microextraction (SPME) has also been used [2,3,8,9]. For the SPE, C<sub>8</sub> or C<sub>18</sub> have been used as sorbents [3], but low recoveries for some compounds were obtained. This is why highly crosslinked polymeric sorbents such as LiChrolut EN [6,7] or Isolute ENV+ [5] have been used to preconcentrate these compounds. Slightly better results have been obtained in both cases, but only some of the phthalate esters were studied.

For solid samples like sediments, there are several techniques to extract the analytes, for example, supercritical fluid extraction (SFE) [10], but one of the most common ones, because of its simplicity, is to extract them with an

organic solvent that is kept in contact with the sample in an ultrasonic bath [4].

The aim of this paper is developing two methods for determining six phthalates and bis(2-ethylhexyl)adipate in water and marine sediment samples. These methods involve HPLC separation and APCI-MS detection. For water samples, an SPE using Isolute ENV+ will be optimised. For sediment samples, the analytes will be extracted by ultrasonic extraction with an organic solvent. These methods will be applied to evaluate the occurrence of these compounds in the coastal environment.

## **EXPERIMENTAL**

### **Reagents and standards**

Dimethylphthalate (DMPH), diethylphthalate (DEPH), benzylbutylphthalate (BBPH), di-n-butylphthalate (DBPH), bis(2-ethylhexyl)phthalate (EHPH) and di-n-octylphthalate (DOPH) were obtained from Riedel-de H en (Seelze-Hannover, Germany), bis(2-ethylhexyl)adipate (BEHA) from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Their purity was over 97%. Standard solutions of each compound at a concentration of 1000 mg l<sup>-1</sup> were prepared in acetonitrile (SDS, Peypen, France) and stored at 4°C. All the working solutions were prepared by diluting these solutions.

HPLC gradient grade acetonitrile (SDS) was used in the mobile phase and extraction steps. HPLC gradient grade 2-propanol (Merck, Germany) was also used in the SPE. Reagent water was prepared with a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

To prevent contamination problems, plastic materials were avoided when handling reagents, and materials were cleaned carefully by rinsing them with acetonitrile after the usual cleaning procedure.

### **Apparatus**

An HP1100 series LC-MSD system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a degasser, a quaternary pump, an autosampler, an oven and an APCI interface was used. The chromatographic column was a 25x0.46 cm Kromasil 100 C<sub>18</sub> with a particle size of 5 µm (Teknokroma, Barcelona, Spain).

For the water samples, a solid-phase extraction manifold (Teknokroma) connected to a vacuum pump (Gast Manufacturing Company, Buckinghamshire, United Kingdom) and 200-mg Isolute ENV+ cartridges (International Sorbent Technology, Mid. Glamorgan, UK) were used.

For the sediment samples, an ultrasonic bath (Selecta, Madrid, Spain) was used to enhance the extraction of analytes and a Centromix S-549 centrifuge (Selecta) to separate the sediments and the extraction solvent.

The extraction solvent was eliminated using a R-114 rotary vacuum evaporator (Büchi, Flawil, Switzerland) equipped with a B-480 waterbath (Büchi) set at 50 °C.

### **Experimental conditions**

#### *Chromatographic and mass spectrometry conditions*

The mobile phase consisted of acetonitrile and water. The elution gradient started with 50% of acetonitrile, which was increased linearly to 60% over

5 min. Then, over 5 min, this was changed to 100%, and this percentage was maintained for 13 min before returning to the initial conditions in 5 min. The column was equilibrated for 10 min. Column temperature was 30°C and the mobile phase flow rate was 1 ml min<sup>-1</sup>. The injection volume was 20 µl.

APCI-MS detection was performed in positive ionization mode. After optimization, the operational parameters were set as follows: the vaporizer temperature was 350°C; the nebulizer gas pressure was 60 p.s.i.; the drying gas was nitrogen at 8 l h<sup>-1</sup> at 350°C; the capillary voltage was 4000 V; the corona current was 5 µA; the fragmentor voltage was programmed as shown in Table 1.

**Table 1.** Program of fragmentor voltage and ion monitoring under SIM acquisition mode.

Time (min)	Fragmentor (V)	Fragment ion under SIM acquisition	Compound
0	75	163	DMPH
8	50	177	DEPH
12	25	313	BBPH
13	25	279, 205	DBPH
15	50	391, 371	EHPH, BEHA, DOPH

Chromatograms were recorded under full-scan ( $m/z = 100-400$ ) and selected-ion monitoring (SIM) acquisition modes. Table 1 shows the program of the ions selected for each compound for the SIM acquisition.

For identification, higher fragmentor voltages were used in the full-scan acquisition mode in order to obtain more fragment ions in the spectra.

### *Extraction*

Water samples were collected in 2.5-l pre-cleaned amber glass bottles. Seawater was also taken from the open sea as a blank sample. 20% of acetonitrile was added to samples to prevent the compounds from being adsorbed onto the walls of the bottle. All these samples were then filtered through a 0.45- $\mu\text{m}$  membrane filter (Whatman, Maidstone, UK) and kept at 4°C until analysis.

In the enrichment step, an off-line SPE was used. All solvents were percolated through the cartridge at a flow rate of 5 ml min<sup>-1</sup>. The cartridge was first washed with 10 ml of acetonitrile and 10 ml of reagent water before preconcentrating 100 ml of sample. Elution of the retained compounds was performed with 10 ml of acetonitrile. The enriched solution was evaporated to dryness in a rotary vacuum evaporator and the residues were re-dissolved in 0.5 ml of acetonitrile. For seawater samples, a clean-up step using 5 ml of reagent water was performed before elution of the retained analytes to eliminate the salts contained in the sample.

Marine sediment samples were dried at room temperature. For the sediment sample, 2x5 ml of acetonitrile were added to 1 g of dry sample. For spiked samples, the suitable volume of stock solution was added to the sample and it was left to dry before the addition of acetonitrile. The mixture was shaken vigorously and kept in an ultrasonic bath for 10 min at each step. To improve the separation between the solid sample and the supernatant, the mixture was centrifuged at 2500 r.p.m. for 5 min. Both enriched extracts were combined and evaporated to dryness in a rotary vacuum evaporator. Finally, the residues were dissolved in 0.5 ml of acetonitrile. This solution was filtered through a 0.2- $\mu\text{m}$  nylon syringe filter (Teknokroma) before injecting it into the chromatographic system.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Chromatographic separation and mass spectrometry optimization

The separation of the compounds was optimized by injecting a standard solution of 20 mg l<sup>-1</sup> of each compound. Methanol and acetonitrile were checked as solvents for the mobile phase, but acetonitrile was chosen because the analysis time was shorter and resolution was similar. The gradient specified in Experimental Conditions section was selected. Under these conditions, separation lasted 23 min.

In HPLC-APCI-MS, the positive ionization mode was selected because the response of most of the compounds for the negative mode was low. The ranges optimized of the operational parameters of the APCI interface and MS were: drying gas flow (1-11 l min<sup>-1</sup>) and temperature (300-400°C), corona current (1-10 µA), nebulizer pressure (10-60 p.s.i.), capillary voltage (1000-6000 V), vaporizer temperature (350-450°C) and fragmentor voltage (25-250 V). This optimization was done by flow injection analysis (FIA) of several solutions containing the individual compounds at 20 mg l<sup>-1</sup>. The optimum conditions specified in Experimental Conditions section were chosen by taking into account the results for the individual compounds.

One of the most important parameters of the APCI-MS is the fragmentor voltage, which is related to the molecule fragmentation. Table 2 shows, as an example, the most important fragment ions for each compound for two fragmentor voltages (25 and 75 V). At 25 V, [M+H]<sup>+</sup> ion appear for all compounds and, in most of them, as the base peak, although at 75 V the relative abundance of this ion decreased and, for some compounds, it did not appear.

To obtain higher sensitivity, the program of fragmentor voltages specified in Table 1 was used. But for confirmation in real samples, higher fragmentor voltages were also used in order to obtain additional structural information.

**Table 2.** Summary of the most important ions for each compound for different values of fragmentor voltages. R.A.: relative abundance.

Compound	25 V		75 V	
	m/z	% R. A.	m/z	% R. A.
DMPH	195 [MH] <sup>+</sup>	10	163 [MH-CH <sub>3</sub> OH] <sup>+</sup>	100
	163 [MH-CH <sub>3</sub> OH] <sup>+</sup>	100		
DEPH	223 [MH] <sup>+</sup>	100	177 [MH-C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O] <sup>+</sup>	38
	177 [MH-C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O] <sup>+</sup>	52	149 [C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	100
BBPH	313 [MH] <sup>+</sup>	100	205 [MH-C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O] <sup>+</sup>	23
	205 [MH-C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O] <sup>+</sup>	12	149 [C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	100
DBPH	279 [MH] <sup>+</sup>	100	279 [MH] <sup>+</sup>	26
	205 [MH-C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O] <sup>+</sup>	19	205 [MH-C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O] <sup>+</sup>	81
			149 [C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	100
EHPH	391 [MH] <sup>+</sup>	100	391 [MH] <sup>+</sup>	53
			279 [MH-C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> ] <sup>+</sup>	49
			167 [C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (COOH) <sub>2</sub> + H] <sup>+</sup>	23
			149 [C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	100
			113 [C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> ] <sup>+</sup>	46
BEHA	371 [MH] <sup>+</sup>	100	371 [MH] <sup>+</sup>	80
			259 [MH-C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> ] <sup>+</sup>	65
			241 [MH-C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O] <sup>+</sup>	43
			147 [MH-2C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> ] <sup>+</sup>	45
			129 [C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> O] <sup>+</sup>	100
DOPH	391 [MH] <sup>+</sup>	100	391 [MH] <sup>+</sup>	40
			149 [C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	100



## Extraction optimization

### *Water samples*

An off-line SPE was used to extract the compounds from the water samples. A highly crosslinked polymer (Isolute ENV+) was chosen because it has a higher retention for other contaminants [11].

In the optimization process, adsorption problems were suspected. They have also been reported for other compounds with low solubility in water, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) [12]. Since acetonitrile and 2-propanol had given good results for PAHs [12], these solvents were checked for the studied compounds. For this purpose, 25 ml of reagent water spiked at a concentration of  $40 \mu\text{g l}^{-1}$  of the compounds and containing different percentages of organic solvent was preconcentrated. The results for both solvents were similar and, as example, recoveries obtained with acetonitrile are shown in Table 3. The recoveries for the last eluting compounds are low because they are adsorbed onto the system for low concentrations of organic solvent. On the other hand, when more organic solvent is added to samples, the recoveries for the most polar compounds are lower. Finally, 20% of acetonitrile was chosen. To determine the sample volume to be preconcentrated, different volumes of spiked reagent water samples containing a 20% of acetonitrile were preconcentrated. These samples were spiked at different concentrations of the analytes so that the concentration of each compound in the resulting enriched solution was  $1 \text{ mg l}^{-1}$ . The results are shown in Table 4. From these results, the sample volume chosen was 100 ml because for higher volumes, recoveries decreased considerably.

Recoveries were checked when spiked coastal water or wastewater samples were preconcentrated. For coastal water, salt from the sample appeared when the solvent was evaporated. To prevent this, a clean-up step with 5 ml of reagent water was added before the elution of the retained

compounds in the SPE process. In these conditions, recoveries were similar to those when reagent water samples were preconcentrated.

**Table 3.** Recoveries obtained when 25 ml of reagent water spiked at  $40 \mu\text{g l}^{-1}$  containing different percentages of acetonitrile was preconcentrated ( $n=3$ ). In all cases, the relative standard deviation (RSD) was lower than 21%.

Compound	15%	20%	25%
DMPH	65	60	11
DEPH	72	80	27
BBPH	82	94	72
DBPH	70	92	67
EHPH	54	58	62
BEHA	32	48	54
DOPH	33	43	47

### *Sediment samples*

From the different techniques available to extract the analytes from the solid sample, an extraction with an organic solvent in an ultrasonic bath was chosen because of the simplicity of this technique. Acetonitrile was initially chosen as the organic solvent because of the good results obtained as the elution solvent in the SPE. Recoveries were checked by extracting a sample spiked at a concentration of  $1 \text{ mg kg}^{-1}$ . Using a spiked sample has the limitation that some analytes strongly retained on the particles may not be extracted. However, since no certified material was available, this method was used. Results were between 70 and 102% with relative standard deviations (RSD) ( $n=3$ ) between 3 and 8%. Since these recoveries were

acceptable for the studied compounds, this solvent was used in the following experiments.

**Table 4.** Recoveries for SPE of different volumes of standard solutions. In all cases, RSD was lower than 18% (n=3).

Compound	25 ml	50 ml	100 ml	200 ml
DMPH	60	54	38	26
DEPH	80	85	82	75
BBPH	94	99	95	91
DBPH	92	96	92	90
EHPH	58	49	58	41
BEHA	48	44	45	35
DOPH	43	35	32	28

### Performance of the methods

Calibration was performed by injecting ten standard solutions of different concentrations. The highest concentration injected was 20 mg l<sup>-1</sup>. In SIM acquisition mode, quantification limits (signal-to-noise ratio of ten) were between 0.004 and 0.2 mg l<sup>-1</sup>. In full-scan acquisition mode, quantification was performed using the base peak for each compound and quantification limits were between 0.05 and 2 mg l<sup>-1</sup>. Linearity was good for all compounds in both acquisition modes and correlation coefficients (R<sup>2</sup>) were above 0.992.

### *Water samples*

Linearity of the method was studied under optimum conditions. To do this, 100 ml of coastal water spiked at different concentrations was extracted. A blank was carried out by preconcentrating 100 ml of open seawater with 20% of acetonitrile. One small peak, which coeluted with EPHH, appeared. When 10 ml of acetonitrile were evaporated in the rotary vacuum evaporator the peak also appeared, which confirmed this peak corresponded to the system. The same experiment was carried out using a higher fragmentor voltage (100 V) in the detection in order to determine if the peak corresponded to EPHH and both spectra in full-scan acquisition coincided. This peak was taken into account in the calibration. Table 5 shows the linear ranges and limits of detection (L.O.D.) for a signal-to-noise ratio of 3. Good linearity was obtained and correlation coefficients ( $R^2$ ) were above 0.992. Data were recorded simultaneously in both full-scan and SIM modes because SIM provides higher sensitivity and full-scan provides more structural information and allows identification.

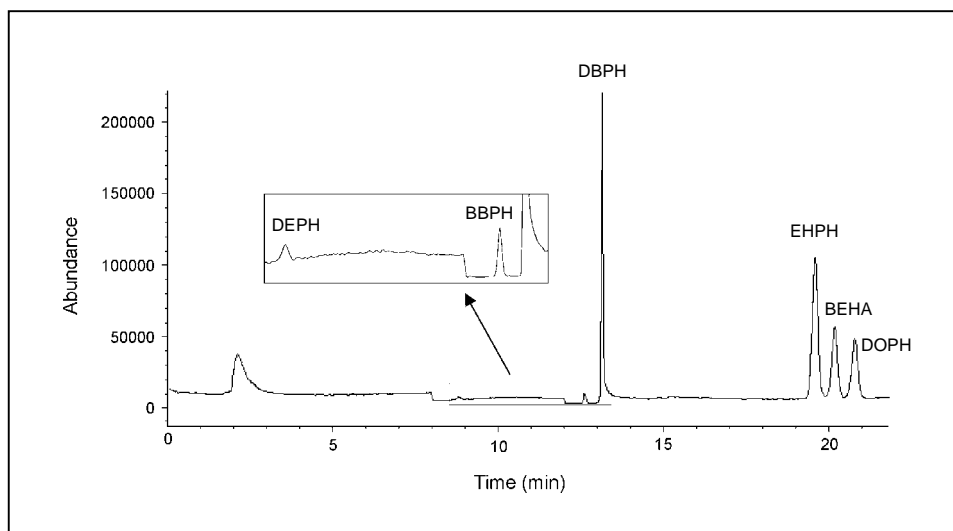
With this method the detection limits of the most common technique (GC-MS) [3] can be achieved for most of the compounds. So the HPLC with APCI-MS can be a good alternative, for example for determining a group of compounds with different characteristics, such as endocrine disruptors, some of which can not be determined by GC.

Repeatability and reproducibility were also evaluated. For this purpose, a coastal water sample spiked at  $10 \mu\text{g l}^{-1}$  of all the compounds were preconcentrated in triplicate in each case. The results, expressed as RSD, were between 12 and 21% and between 15 and 25%, respectively.

**Table 5.** Calibration results for spiked seawater samples in full-scan (quantified using the base peak) and SIM acquisition modes after preconcentrating 100 ml of sample.

Compound	Full-scan		SIM	
	Linear range ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	L.O.D. ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Linear range ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	L.O.D. ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )
DMPH	45-100	15	4-100	1
DEPH	3-100	1	0.7-100	0.5
BBPH	1-100	0.5	0.04-100	0.02
DBPH	0.3-100	0.2	0.03-100	0.01
EHPH	1-100	0.4	0.2-100	0.1
BEHA	1-100	0.6	0.1-100	0.05
DOPH	2-100	1.5	0.1-100	0.05

The developed method was applied to the determination of the studied compounds in real water samples. Outflow water from the wastewater treatment plant was analysed since it can be a source of phthalates in coastal environment and in one sample some peaks appeared at the same retention time as DEPH, BBPH, DBPH, EHPH, BEHA and DOPH under SIM acquisition. In these samples, DEPH was detected but it could not be quantified within the limits established in the method. The other compounds could be quantified at concentrations of 0.2, 2.2, 3.8, 3.3 and 3.4  $\mu\text{g l}^{-1}$  respectively. RSD ranged from 8 to 14% ( $n=3$ ). Figure 1 shows the chromatogram obtained for this sample. Confirmation of the compounds was carried out analysing the same sample using a higher fragmentor voltage in the full-scan acquisition mode in order to obtain more structural information. Under these conditions, only DEPH and BBPH could not be confirmed because of the low concentration levels.



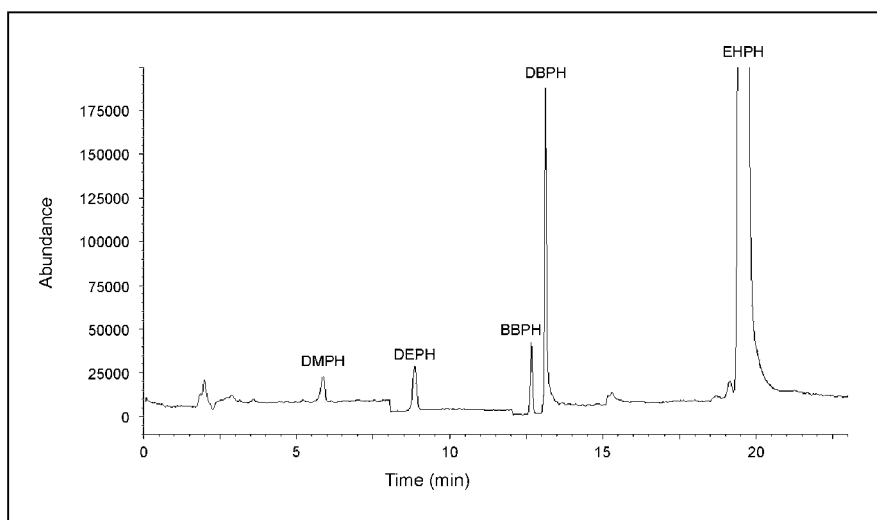
**Figure 1.** Chromatogram at the optimum conditions for a wastewater sample taken from the outflow of the water treatment plant of Tarragona.

Coastal water samples taken from the industrial and fishing ports were also analysed, but no compound was detected within the limits established in the method. This can be explained because of the dilution effect of the sea and the low solubility of these compounds in seawater, that makes them to tend to be adsorbed into sediment and appear in water at very low concentration levels.

#### *Sediment samples*

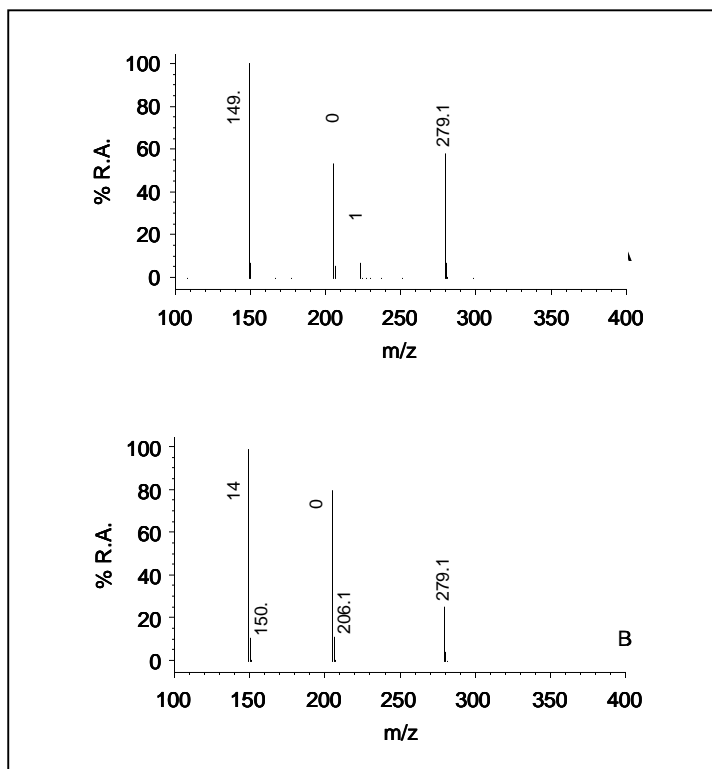
For this kind of sample and due to its complexity, a standard addition calibration between 0.1 and 20 mg kg<sup>-1</sup> was carried out, since matrix effect was observed. Using this calibration, a sediment sample taken from the fishing port was analysed. Figure 2 shows the obtained chromatogram, where some peaks appeared at the same retention time as DMPH, DEPH,

BBPH, DBPH and EHPH. These compounds were quantified in SIM mode at the following concentrations: DMPH,  $0.35 \text{ mg kg}^{-1}$ ; DEPH,  $0.41 \text{ mg kg}^{-1}$ ; BBPH,  $0.13 \text{ mg kg}^{-1}$ ; DBPH,  $0.42 \text{ mg kg}^{-1}$ ; and EHPH,  $9.4 \text{ mg kg}^{-1}$ . RSDs ( $n=3$ ) were between 5 and 8%. Confirmation was carried out in the same way as for the wastewater treatment plant samples. In this case, only the last two compounds were confirmed. As an example, Figure 3 shows the spectra obtained at a fragmentor voltage of 75 V for the peak corresponding to DBPH and the one obtained for a stock solution of  $20 \text{ mg l}^{-1}$  at the same fragmentor voltage. As can be seen, spectra are similar, so the peak which appeared in the sample was confirmed as DBPH.



**Figure 2.** Chromatogram at the optimum conditions for marine sediments taken from the fishing port of Tarragona.

Repeatability and reproducibility of the method were also evaluated. For this purpose, a sample spiked at  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  of all the compounds were extracted in triplicate for each case. The results, expressed as RSD, were between 7 and 10 % and between 10 and 19%, respectively.



**Figure 3.** Spectra obtained for DBPH at fragmentor voltage of 75 V: (A) spectrum obtained in marine sediment samples; (B) spectrum obtained for a 20 mg l<sup>-1</sup> stock solution.

## CONCLUSIONS

High-performance liquid chromatography and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry has demonstrated to be a good alternative to the commonly used gas chromatography-mass spectrometry for determining phthalates and bis(2-ethylhexyl)adipate. Two methods based on this technique have been developed to analyse water and marine sediment samples. The off-line solid-phase extraction of 100 ml of water sample



containing a 20% of acetonitrile using Isolute ENV+ cartridges allowed good recoveries to be obtained for most of the compounds. The ultrasonic extraction of 1 g of sediment sample with acetonitrile as organic solvent also involved good recoveries of the compounds. These methods enabled the compounds to be quantified in real samples at concentrations between 0.2 and 3.8  $\mu\text{g l}^{-1}$  in the effluent water from the wastewater treatment plant and between 0.13 and 9.4  $\text{mg kg}^{-1}$  in marine sediment samples. The use of different fragmentor voltages in the high-performance liquid chromatography and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry enabled these compounds to be confirmed in real samples.

#### **ACKNOWLEDGEMENT**

The authors gratefully acknowledge financial support by CICYT (Project AMB99-0875).

#### **REFERENCES**

- [1] Communication from the Commission to the Council and the European Parliament, Implementation of the Community Strategy for Endocrine disruptors: a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife (COM (1999) 706), Brussels, 14-06-2001, COM (2001) 262 final.
- [2] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R. M. Marcé, J. Chromatogr. A 872 (2000) 191.
- [3] K. Holadová, J. Hajslová, Int. J. Environ. Anal. Chem. 59 (1995) 43.
- [4] P. Desideri, L. Lepri, L. Checchini, D. Santianni, Annali di Chimica 86 (1996) 215.

- [5] S. Jara, C. Lysebo, T. Greibrokk, E. Lundanes, *Anal. Chim. Acta* 407 (2000) 165.
- [6] M. Castillo, M. F. Alpendurada, D. Barceló, *J. Mass Spectrom.* 32 (1997) 1100.
- [7] M. Castillo, A. Oubiña, D. Barceló, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 2180.
- [8] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R. M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 922 (2001) 377.
- [9] K. Luks-Bejtlej, P. Popp, B. Janovszka, H. Paschke, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 93.
- [10] M. L. Marín, A. Jiménez, V. Berenguer, J. López, *J. Supercritical Fluids* 12 (1998) 271.
- [11] V. Pichon, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 195.
- [12] R. El Harrak, M. Calull, R. M. Marcé, F. Borrull, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 64 (1996) 47.

---

**II.6. MONITORITZACIÓ DE PLAGUICIDES ANTIALGUES EN AIGUA MITJANÇANT L'ACOBLAMENT EN LÍNIA DE L'EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA I LA CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA AMB ESPECTROMETRIA DE MASSES AMB IONITZACIÓ QUÍMICA A PRESSIÓ ATMOSFÈRICA**



En l'anàlisi de mostres mediambientals és important el desenvolupament de mètodes que permetin l'automatització, ja que permeten evitar la contaminació que es pot produir en la manipulació de les mostres. Aquests mètodes poden ser molt útils a l'hora d'analitzar un gran nombre de mostres, com per exemple en els estudis de monitorització de la presència de contaminants al medi ambient. Per això, és important el desenvolupament de mètodes que permetin l'acoblament en línia de les tècniques d'extracció a les tècniques de separació i detecció.

En el medi marí, una família de compostos d'especial interès són els plaguicides antialgues. Com s'ha comentat en l'apartat 1.2.4, actualment, s'utilitzen compostos que substitueixen els compostos organometàl·lics d'estany (TBTs), l'ús dels quals no estava permès a l'EU per a vaixells de menys de 25 m d'eslora fins al present any, en què ha entrat en vigor la seva prohibició total [1]. Entre aquests nous plaguicides, uns dels més utilitzats són l'Irgarol 1051 i el diuron, tot i que també se'n fan servir d'altres, com poden ser el folpet, diclofluanid, clorotalonil o Sea-Nine 211 [2]. Per tant, també és interessant controlar la seva presència, ja que, per exemple, el diuron ha estat inclòs en la llista de compostos alteradors endocrins i l'Irgarol 1051 està inclòs a la llista de substàncies l'efecte alterador de les quals està essent estudiat [3]. Per això, es va considerar interessant el desenvolupament d'un mètode analític per a la monitorització de la presència d'alguns d'aquests compostos en aigües costaneres. Els compostos que es van triar per a aquest estudi van ser el diuron, l'Irgarol 1051, el folpet i el diclofluanid.

La tècnica de separació triada va ser l'HPLC, ja que, tot i que la GC s'havia emprat per a la determinació de plaguicides antialgues, les elevades temperatures emprades provoquen la degradació del diuron, i impedeixen la seva determinació mitjançant aquesta tècnica.

Per a l'HPLC s'han utilitzat diferents sistemes de detecció, com els d'UV-visible [4], si bé la MS [5] és cada vegada més emprada degut als

avantatges que presenta aquest sistema de detecció, esmentades en les seccions anteriors. En el cas d'aquests compostos, la interfase més emprada per a l'acoblament d'aquesta tècnica amb el sistema cromatogràfic és l'APCI [5], de manera que es va triar aquesta interfase.

Com a sistema de preconcentració, es va utilitzar la SPE acoblada en línia al sistema cromatogràfic. Per a això, es va utilitzar un sorbent polimèric altament entrecreuat, el LiChrolut EN, ja que aquest tipus de sorbents tenen un elevat poder de retenció [6]. La utilització d'aquest sistema va permetre obtenir bones recuperacions per a tots els compostos estudiats, fins i tot per a un volum de mostra de 200 ml, si bé en aquest treball es va triar preconcentrar només 100 ml, ja que això permetia arribar als nivells de concentració trobats habitualment en les mostres i disminuïa considerablement el temps d'anàlisi.

El mètode desenvolupat es va utilitzar per controlar la presència dels compostos estudiats en aigües de diferents ports de la costa de Tarragona durant un període de cinc mesos. El diuron i l'irgarol 1051 van aparèixer en totes les mostres a nivells de concentració similars als trobats en altres estudis realitzats en altres ports de l'EU com, per exemple, en ports del Regne Unit [7] o la costa holandesa [8].

L'ús de la MS pot ser molt útil en el control de contaminants al medi marí, no només perquè permet la identificació dels compostos estudiats, sinó perquè també permet la identificació d'altres substàncies presents a la mostra. En aquest treball, tot i que el diclofluanid no va ser detectat en cap de les mostres analitzades, la utilització d'aquesta tècnica de detecció en el mètode desenvolupat va permetre la identificació d'un dels productes de degradació d'aquest compost, així com d'un ftalat, el DEPH.

Els resultats obtinguts en el present estudi s'han publicat en la revista *Journal of Chromatography A*, 915 (2001) 139-147. A continuació, s'adjunta una còpia d'aquest treball.

**Bibliografia**

- [1] Directiva 2002/62/CE de la Comissió, de 9 de juliol de 2002, per la qual s'adapta al progrés tècnic per novena vegada l'annex I de la Directiva 76/769/CEE del Consell relativa a l'aproximació de les disposicions legals, reglamentàries i administratives dels Estats membres que limiten la comercialització i l'ús de determinades substàncies i preparats perillosos (compostos organoestànics). Diari Oficial de la Unió Europea, L 183, 58.
- [2] M. D. Hernando, L. Piedra, A. Belmonte, A. Agüera, A. R. Fernández-Alba, J. Chromatogr. A 938 (2001) 103.
- [3] Communication from the Commission to the Council and the European Parliament, Implementation of the Community Strategy for Endocrine disruptors: a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife (COM (1999) 706), Brussels, 14-06-2001, COM (2001) 262 final.
- [4] A. C. Hogenboom, M. P. Hofman, D. A. Jolly, W. M. A. Niessen, U. A. Th. Brinkman, J. Chromatogr. A 885 (2000) 377.
- [5] I. Ferrer, M.-C. Hennion, D. Barceló, Anal. Chem. 69 (1997) 4508.
- [6] N. Masqué, R. M. Marcé, F. Borrull, Trends Anal. Chem. 17 (1998) 384.
- [7] K. V. Thomas, T. W. Fileman, J. W. Readman, M. J. Waldock, Mar. Pollut. Bull. 42 (2001) 677.
- [8] M. H. Lamoree, C. P. Swart, A. van der Horst, B. van Hattum, J. Chromatogr. A 970 (2002) 183.





**MONITORING OF ANTIFOULING AGENTS IN WATER SAMPLES BY ON-LINE SOLID-PHASE EXTRACTION-LIQUID CHROMATOGRAPHY-ATMOSPHERIC PRESSURE CHEMICAL IONIZATION MASS SPECTROMETRY****ABSTRACT**

An automatic method for determining diuron, Irgarol 1051, folpet and dichlofluanid in seawater samples have been developed. This method is based on the on-line coupling of solid-phase extraction (SPE) with a highly crosslinked polymeric sorbent, LiChrolut EN, to liquid chromatography followed by atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and mass spectrometry. The operational parameters affecting the APCI interface have been studied in both positive and negative ionization modes. The use of LiChrolut EN in the SPE produced recoveries of over 85% for all the compounds when 100 ml of seawater sample was preconcentrated. Calibration was carried out in both ionization modes and in full-scan and selected-ion monitoring (SIM). The method allowed all the analytes to be detected at 5 ng l<sup>-1</sup> in SIM acquisition mode except folpet, which, because of its low response, could only be detected at 250 ng l<sup>-1</sup>. The method was used to analyse water samples taken from five different marina and fishing ports along the coast of Tarragona, Catalonia (Spain), over a 5-month period. Diuron and Irgarol 1051 were detected and quantified in most samples at concentration levels ranging from 27 to 420 ng l<sup>-1</sup> for diuron and from 15 to 511 ng l<sup>-1</sup> for Irgarol 1051.

**Keywords:** Water analysis; Pesticides; Diuron; Irgarol 1051; Folpet; Dichlofluanid

## INTRODUCTION

Antifouling compounds are used as additives in boat paints to prevent algae and other organisms from growing on the surface of the hull. Tributyltin (TBT) had been extensively used from the mid-1960s, but this compound and other organotin-copper-based antifouling agents were banned by the European Union (EU) in 1989 from being used on boats under 25 m because of their effects on aquatic organisms [1]. As an alternative, new biocides like diuron and Irgarol 1051 were introduced, but these are also toxic for marine algae, even at low concentrations [1-4]. Since some of them, such as Irgarol 1051, have been found in seawater samples [1,5-7], there is a considerable interest in developing new analytical methods to determine simultaneously groups of antifouling agents and control their presence in seawater samples.

Gas chromatography (GC) using nitrogen-phosphorus detection (NPD) [8] or mass spectrometry detection (MS) [8-11] has been used to determine antifouling compounds in water samples. However, some compounds, like diuron, cannot be determined under these conditions because it degrades at high temperatures. For this reason, liquid chromatography (LC) has also been applied to the analysis of these types of pollutants, mainly with diode-array detection (DAD) system [11], although in the last few years MS has been increasingly used because it can identify the analytes unambiguously [11-13]. Atmospheric pressure ionization techniques have become the most widely used interface for on-line coupling LC and MS because it is highly sensitive and it is possible to obtain additional structural information by fragmenting the quasimolecular ion by applying sufficient voltage. This mode of operation is called preanalyser collision-induced deionization (CID).

Because these compounds are present in real samples at low concentration levels, a preconcentration step is necessary before chromatographic analysis. Liquid-liquid extraction (LLE) [8,10,11] and, recently, solid-phase microextraction (SPME) [14] have been used, but the most common

enrichment technique is solid-phase extraction (SPE) because of its numerous advantages. Different kinds of sorbents, such as C<sub>18</sub> [5-8], graphitized carbon black, like Envi-carb [12], immunosorbents [15-17], or polymeric sorbents, like PLRP-s [5,9], have been used in the analysis of antifouling agents. Recoveries were generally good for all compounds, except the most polar ones, like dichlofluanid [9].

New highly crosslinked polymeric sorbents, such as LiChrolut EN and Isolute ENV+, have recently been developed. These sorbents have a higher degree of crosslinking than conventional polymeric sorbents and, therefore, a larger specific surface area which allows a greater retention for polar analytes [18,19].

The aim of this study was to develop an automatic method for determining four antifouling compounds in seawater samples: diuron, Irgarol 1051, folpet and dichlofluanid. The method was based on the on-line coupling of SPE-LC-APCI-MS and the use of a highly crosslinked polymer, LiChrolut EN, as SPE sorbent. Finally, the method was used to monitor the presence of these compounds in seawater samples from five different ports along the coast of Tarragona, Catalonia, over a 5-month period.

## **EXPERIMENTAL**

### **Reagents and standards**

Figure 1 shows the structure of the four antifouling agents used in this study. Three of these (diuron, folpet and dichlofluanid) were obtained from Riedel-de H en (Seelze-Hannover, Germany) and had purities of over 98%, and one (Irgarol 1051) was supplied by Ciba-Geigy (Barcelona, Spain), and had a purity of 100%. Stock standard solutions of each compound at a concentration of 2000 mg l<sup>-1</sup> were prepared in methanol HPLC grade (SDS,

Peypen, France) and stored at 4°C. Working standard solutions of all the compounds were prepared by diluting the stock solutions in methanol and these were stored in the same way.

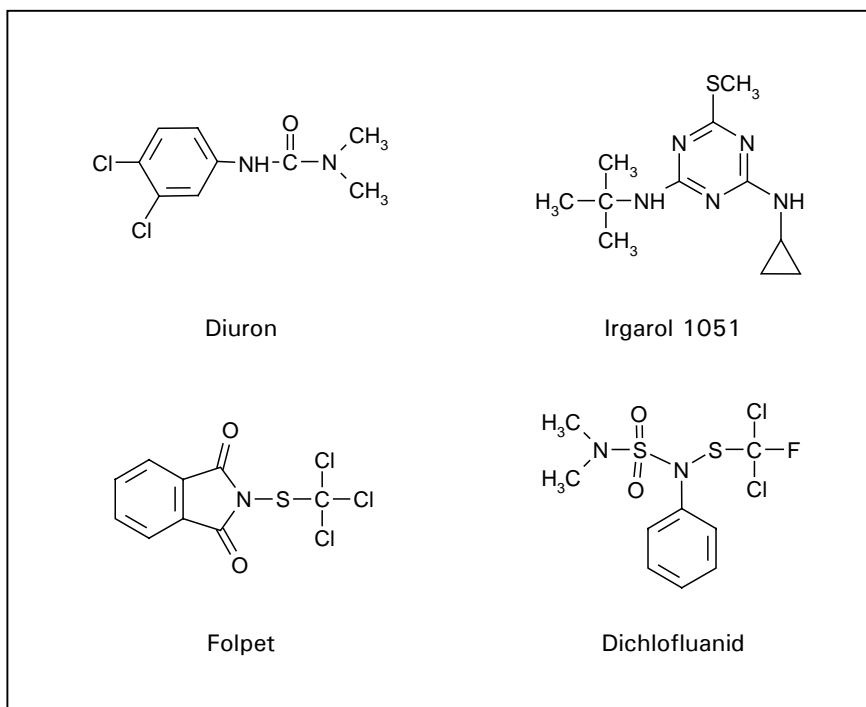


Figure 1. Structures of the compounds.

Acetonitrile HPLC grade (SDS, Peypen, France) was used as the organic component of the mobile phase. Acetic acid (Probus, Barcelona, Spain) was used to adjust mobile phase and sample pH. Ultra-pure water was prepared by ultrafiltration with a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

## **Apparatus**

An HP1100 series LC-MSD system (Agilent Technologies, Barcelona, Spain) with an APCI interface was used for the analysis. This system allowed full-scan and SIM acquisition modes to be used simultaneously. The chromatographic system was equipped with an automatic injector, a degasser, a quaternary pump and a column oven. The chromatographic column was a 25.0 cm x 0.46 cm Kromasil 100 C<sub>18</sub> with a 5- $\mu$ m particle size (Teknokroma, Barcelona, Spain).

SPE was carried out with a 10 x 3 mm stainless-steel precolumn (Free University, Amsterdam, The Netherlands), laboratory-packed with 40-120  $\mu$ m LiChrolut EN (Merck, Germany). This precolumn was on-line coupled to the chromatographic system by a Rheodyne 7010 valve, and an HP1100 isocratic pump was used to deliver samples and condition the precolumn.

## **Chromatographic separation**

The mobile phase consisted of acetonitrile and water acidified to pH 3 with acetic acid. The gradient elution was as follows: the mobile phase started with 40% of acetonitrile, which was linearly increased to 55% in 12 min; then, in 12 min, the percentage was changed to 85% and returned to initial conditions over 4 min. The column was equilibrated for 5 min.

Column temperature was 65°C and the mobile phase flow-rate was 1 ml min<sup>-1</sup>. For direct injection, the volume was 10  $\mu$ l.

## **Mass spectrometry**

The different operating parameters of the interface, including drying gas (N<sub>2</sub>) flow, nebulizer gas pressure, vaporizer temperature, capillary voltage,

corona current and fragmentor voltage, were optimized for each compound. Table 1 shows the optimum conditions for a mixture of all compounds for both positive and negative ionization modes.

**Table 1.** Optimum conditions of the APCI interface for the simultaneous analysis of studied compounds.

APCI Parameter	Ionization mode	
	Positive	Negative
Drying gas (N <sub>2</sub> ) (l min <sup>-1</sup> )	5	6
Nebulizer gas pressure (p.s.i.)	50	50
Vaporizer temperature (°C)	425	425
Corona current (μA)	5	7
Capillary voltage (V)	3000	3000
Fragmentor voltage (V)	75	75

Chromatograms were simultaneously recorded in full-scan ( $m/z=50-400$ ) and under selected-ion monitoring (SIM) acquisition modes. Irgarol 1051 was quantified in the positive mode by selecting ions 198 and 254. Folpet and dichlofluanid were quantified in the negative mode; in this case, the selected ions were 146 for folpet and 199 and 155 for dichlofluanid. We were able to quantify diuron in both positive and negative modes. In the positive mode, the selected ions were 233 and 72, and in the negative mode it was 231.

To improve sensitivity, quantification in full-scan mode was carried out by extracting the suitable peak from the obtained chromatogram.

### **Solid-phase extraction**

All solvents and samples were percolated through the precolumn at a flow-rate of 4 ml min<sup>-1</sup>. The precolumn was sequentially washed with 15 ml of methanol and 15 ml of water at pH 3, adjusted with acetic acid. The tubes were then purged with the sample solution, which had previously been acidified to pH 3 with acetic acid. A 100-ml volume of this sample was then preconcentrated and finally, the analytes were desorbed in the backflush mode by the mobile phase and on-line transferred into the chromatographic system.

### **Sampling**

Seawater samples were collected at a depth of 1 m from the surface once a month between March and July 2000 from five different ports along the Mediterranean coast near Tarragona, Catalonia: the marina and the fishing ports of Tarragona and Cambrils and the port of Salou. As blank samples, seawater samples were also taken from the open sea.

All the samples were collected in 2.5-l precleaned amber glass bottles. They were filtered through a 0.45- $\mu$ m membrane filter (Whatman, Maidstone, UK), acidified to pH 3 with acetic acid and kept at 4°C in the dark until analysis.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **APCI-MS optimization**

The operational parameters of the APCI interface were optimized in both positive and negative ionization modes by the flow injection analysis (FIA) of

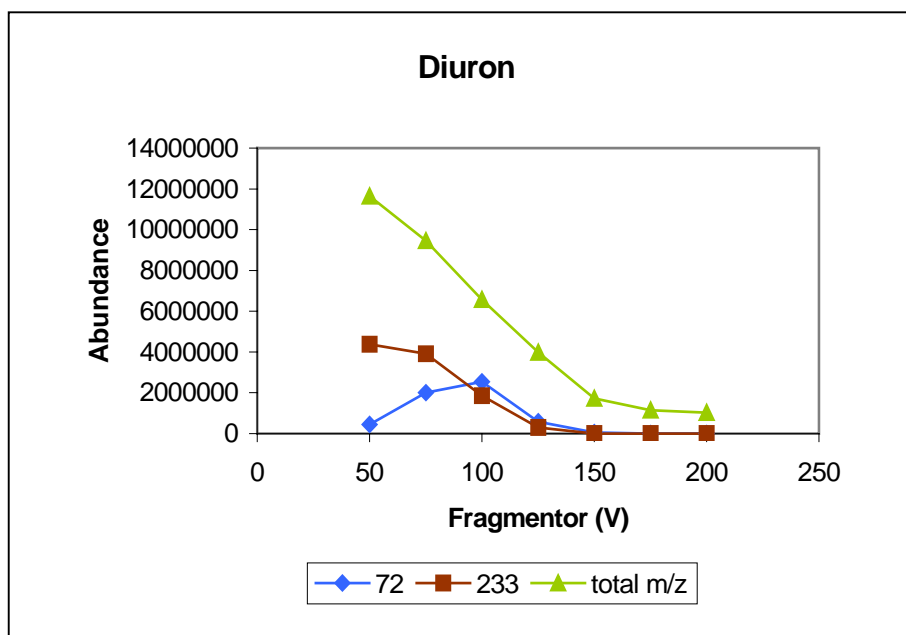
a solution of each compound in a concentration of 50 mg l<sup>-1</sup> into a carrier stream of acetonitrile-acidified water (pH 3) (50:50). As optimum conditions, those in Table 1 were chosen. Under these conditions, folpet and dichlofluanid gave the highest abundance in the negative mode and Irgarol 1051 gave the highest abundance in the positive mode. For diuron, results were similar in the two modes.

The fragmentor voltage, which is related to the molecule fragmentation, was studied for each compound in the 25-200 V range in both positive and negative ionization modes. Generally for low voltages, no fragmentation occurs and only the molecular ion is present in the corresponding spectra. However, at high voltages, fragmentation increases and there is a simultaneous decrease in sensitivity for the molecular ion, although more structural information is obtained. For example, Figure 2 shows the abundance of the ions obtained for diuron in positive ionization mode as a function of the fragmentor voltage. We can see that the abundance of molecular ion (m/z 233) decreases when the fragmentor voltage is increased whereas the abundance of the ion with m/z 72, corresponding to the fragment [MH-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Cl<sub>2</sub>N]<sup>+</sup>, increases. The other compounds behave in a similar way. Table 2 shows the most important fragment ions for each compound in its optimum ionization mode for two fragmentor voltages (75 and 125 V). No molecular fragment is obtained for folpet and dichlofluanid since fragmentation occurs even at low voltages.

### Chromatographic separation

The separation of the compounds was optimized by injecting a solution containing all the compounds at a concentration of 10 mg l<sup>-1</sup> directly into the chromatographic system. Finally, the gradient specified in Experimental section was selected. Under these conditions, separation lasted 21 min. The retention time for each compound is shown in Table 3.





**Figure 2.** Influence of the fragmentor voltage on the response in positive mode of a standard solution of diuron ( $50 \text{ mg l}^{-1}$ ) in a flow injection analysis using a carrier stream of acetonitrile-water (50:50).

Calibration models were constructed by injecting different standard solutions containing all the compounds at different concentration levels directly into the chromatographic system. The linearity was good for all the compounds between  $0.1$  and  $100 \text{ mg l}^{-1}$  under the SIM acquisition mode, except for folpet, which could only be quantified in concentrations above  $2.5 \text{ mg l}^{-1}$  because of its low response. The correlation coefficients were over  $0.999$ . Calibration models were also constructed in full-scan acquisition mode. In this case, quantification was carried out by using the highest abundance peak for each compound. This was selected through the corresponding spectra to increase sensitivity but, as expected, quantification limits were higher ( $0.25$ - $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) than those under SIM acquisition. The correlation coefficients were over  $0.994$ .

Table 2. Summary of the most important ions for each compound in its optimum ionization mode for two fragmentor voltages<sup>a</sup>

Compound	M <sub>n</sub>	IM	75 V		125 V	
			m/z	R. A. (%)	m/z	R. A. (%)
Diuron	232	P	233 [M+H] <sup>+</sup>	100	233 [M+H] <sup>+</sup>	13
					72 [MH-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>2</sub> N] <sup>+</sup>	100
Irgarol 1051	253	P	231 [M-H] <sup>-</sup>	100	231 [M-H] <sup>-</sup>	90
					186 [MH-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	100
Folpet	297	N	254 [M+H] <sup>+</sup>	100	254 [M+H] <sup>+</sup>	45
					198 [MH-C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> ] <sup>+</sup>	100
Dichlofluaniid	332	N	147 [MH-SCCl <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	100	147 [MH-SCCl <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	100
					199 [MH-SCCl <sub>2</sub> F] <sup>-</sup>	25
			155 [MH-SCCl <sub>2</sub> FNCH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	10	155 [MH-SCCl <sub>2</sub> FNCH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	34
				91 [MH-SCCl <sub>2</sub> FSO <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	100	

<sup>a</sup>M<sub>n</sub>, molecular mass; IM, ionization mode (P, positive; N, negative); R. A., relative abundance.

**Table 3.** Retention time ( $t_R$ ) and mean recoveries ( $n=3$ ) for the on-line SPE-LC-APCI-MS analysis of spiked Milli-Q water samples with LiChrolut EN as a sorbent in the enrichment step.

Compound	$t_R$ (min)	Recovery (%) <sup>a</sup>			
		10 ml	50 ml	100 ml	200 ml
Diuron	10.1	97	97	98	99
Irgarol 1051	15.7	95	93	92	91
Folpet	17.8	88	90	88	85
Dichlofluanid	20.3	89	89	89	87

<sup>a</sup> %RSD between 1 and 8% ( $n=3$ )

### Optimization of SPE process

As previously mentioned, LiChrolut EN was chosen as sorbent in the preconcentration step because of its high retention for polar analytes. To determine the recoveries and the breakthrough volumes for the antifouling compounds, different volumes of Milli-Q water samples (10, 50, 100 and 200 ml) were percolated through the precolumn. These samples were spiked at different concentrations of the analytes, so that the amount of each analyte injected into the chromatographic system was kept constant (200 ng). The pH of these samples was adjusted to 3 with acetic acid. Table 3 shows the recoveries for each compound after preconcentration. For all the compounds, these were above 85%, even for dichlofluanid which could only be recovered at 67% in an on-line preconcentration of 10 ml of sample using PLRP-s as a sorbent [9] or at 20 % in an off-line preconcentration of 500 ml of sample using LiChrolut EN cartridges [12].

Although a sample volume of 200 ml gave good recovery values, 100 ml was finally chosen because this was enough to achieve the concentration levels required for the determination of these compounds in real samples

and because analysis time was considerably longer for a higher sample volume.

To study the capacity of the sorbent, the recoveries were checked for all compounds at different concentration levels. A 100-ml volume of seawater samples spiked with a concentration of between 0.05 and 100  $\mu\text{g l}^{-1}$  was preconcentrated. The recoveries were calculated and no significant differences were found.

#### **On-line SPE-HPLC-APCI-MS calibration**

Under optimum conditions, linearity was studied by preconcentrating 100 ml of seawater samples spiked with the antifouling compounds at a concentration of between 0.01 and 5  $\mu\text{g l}^{-1}$ . The pH of the sample was adjusted to 3 with acetic acid. The calibration models were constructed using SIM and full-scan acquisition mode quantifying by extracting the highest abundance peak for each compound.

Table 4 shows the linear ranges, correlation coefficients and limits of detection for both SIM and full-scan acquisition modes. When SIM acquisition was used, models for diuron (negative ionization mode), Irgarol 1051 and dichlofluanid were linear between 0.01 and 5  $\mu\text{g l}^{-1}$  and correlation coefficients were above 0.993. For diuron, calibration model under positive ionization mode was also possible, but in this case the quantification limit was 0.025  $\mu\text{g l}^{-1}$ , although linearity was also good, with a correlation coefficient over 0.999. For folpet, the quantification limit was higher (0.5  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) due to its low abundance. These results are similar to those from the off-line preconcentration of 500 ml of sample using an HPLC-APCI-MS [12] and are slightly lower than those from SPE-GC-MS analysis [9], where 50  $\text{ng l}^{-1}$  was the quantification limit for Irgarol 1051. For SPME-GC-MS, the quantification limit was higher (200  $\text{ng l}^{-1}$ ) [14].

**Table 4.** Calibration results for spiked seawater samples in SIM and full-scan (quantification by extracting the specified peak) acquisition modes after preconcentration of 100 ml of the samples<sup>a</sup>

Compound	Ion (m/z)	Full-scan			SIM		
		Linear range ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	R <sup>2</sup>	LOD ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Linear range ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	R <sup>2</sup>	LOD ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )
Diuron	PI	-	-	-	0.025-5	0.9990	0.01
	NI	0.1-5	0.9998	0.05			
Irgarol 1051	PI	0.1-5	0.9995	0.05	0.01-5	0.9995	0.005
	NI	0.025-5	0.9995	0.01			
Folpet	PI	1-5	0.9995	0.4	0.5-5	0.9991	0.2
	NI						
Dichlofluamid	PI	-	-	-	0.01-5	0.9936	0.005
	NI	0.05-5	0.9988	0.02			

<sup>a</sup> PI, positive ionization mode; NI, negative ionization mode; R<sup>2</sup>, correlation coefficient; LOD, limit of detection.

The detection limits shown in Table 4, were calculated using a signal-to-noise ratio of 3.

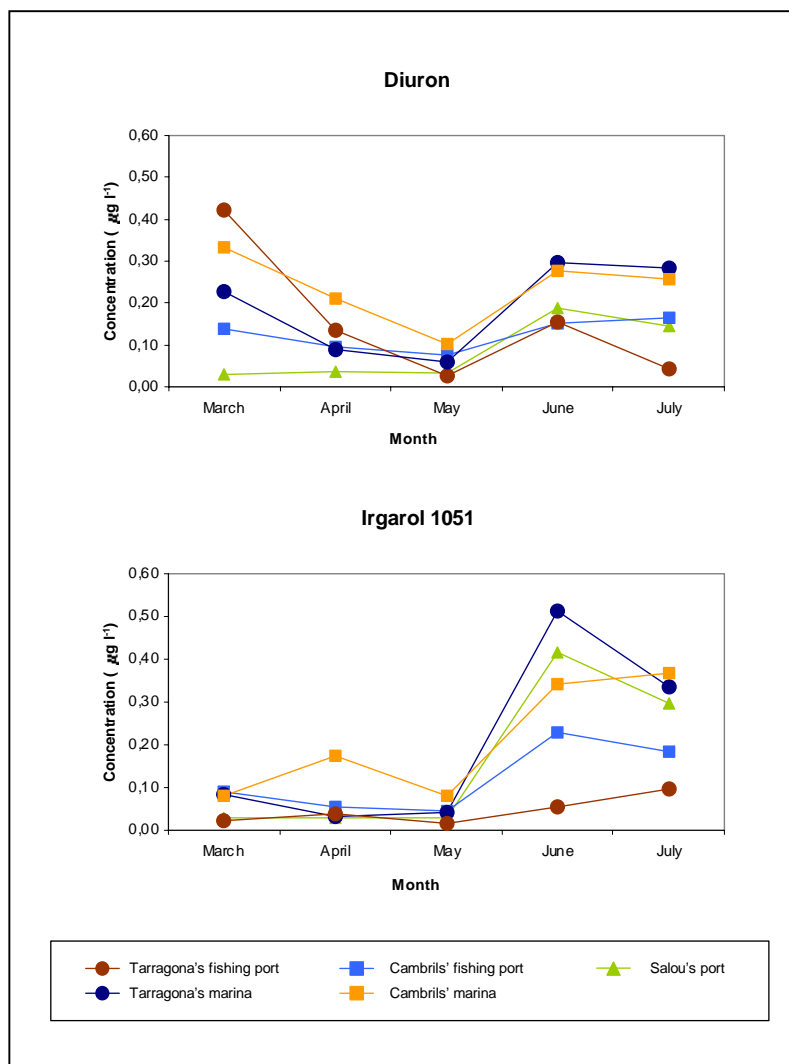
Under full-scan acquisition mode, the compound abundances were studied in the same range of concentrations, and quantification limits were between 0.025 and 0.5  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Linearity was also good, with correlation coefficients above 0.998, and detection limits were between 10 and 100 ng  $\text{l}^{-1}$ . For folpet, these limits were 1 and 0.5  $\mu\text{g l}^{-1}$ , respectively. Full-scan sensitivity was lower than in the SIM acquisition mode, but full-scan supplies some very useful information that could allow the analytes in real samples to be identified.

Repeatability and reproducibility between days of the method were evaluated by analysing five seawater samples spiked at a concentration of 0.1  $\mu\text{g l}^{-1}$  of diuron, Irgarol 1051 and dichlofluanid and 1  $\mu\text{g l}^{-1}$  of folpet. Repeatability, expressed as relative standard deviation (RSD,%), was between 1 and 8%. As expected, reproducibility between days was higher, but this was acceptable taking into account the low levels of quantification. Expressed as RSD, results were between 12 and 18%, except for folpet, for which higher values were obtained due to its low response.

### **Application to real samples**

The method was used to analyse seawater samples from five different ports along the coast of Tarragona (Catalonia, Spain) between March and July 2000.

Diuron and Irgarol 1051 appeared in most of the samples. Figure 3 shows the concentrations of diuron and Irgarol 1051 obtained during this period. The highest levels of concentration correspond to periods when boats and yachts are painted or to the summer, when yachting activity is increased.



**Figure 3.** Concentration of diuron and Irgarol 1051 found in the samples from five different ports along the coast of Tarragona taken between March and July 2000.

Diuron was found in all samples. In most of the ports, the highest concentration was generally found in March and June. Cambrils marina had the highest concentrations of diuron during the period (0.10-0.33 µg l<sup>-1</sup>), but

the most concentrated sample was taken in March from the fishing port of Tarragona.

Low levels of Irgarol 1051 were generally found, although they increased considerably in most of the ports in June and July. The lowest concentration was found in the Tarragona fishing port ( $0.015\text{-}0.095\ \mu\text{g l}^{-1}$ ) and the highest levels appeared in Cambrils marina ( $0.08\text{-}0.37\ \mu\text{g l}^{-1}$ ), although the most concentrated sample corresponded to one taken in June from the Tarragona marina.

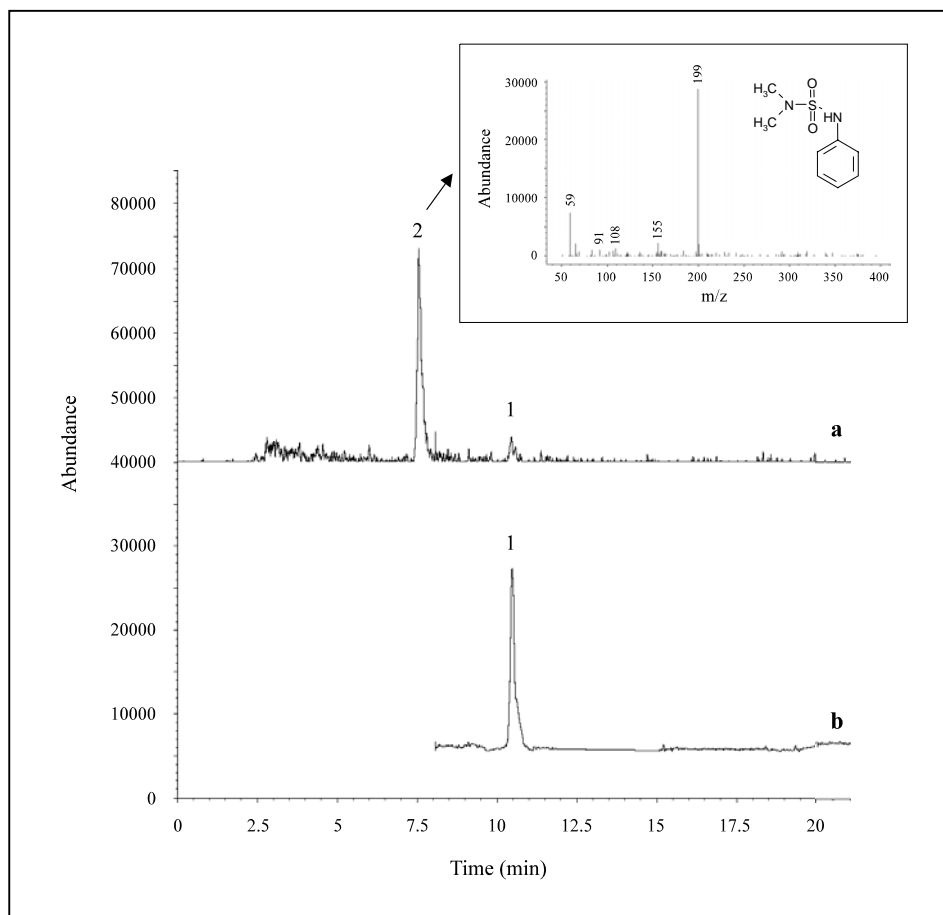
The concentration levels are high when compared to those that were reported in the coast of Tarragona in 1999 [14], where diuron and Irgarol 1051 were detected but could only be quantified in some samples because the concentrations were below the determination level ( $0.05\ \mu\text{g l}^{-1}$ ). The highest concentrations of these compounds found corresponded to the Cambrils marina for diuron ( $0.6\ \mu\text{g l}^{-1}$ ) and the Salou port for Irgarol 1051 ( $0.05\ \mu\text{g l}^{-1}$ ).

Figures 4 and 5 show the chromatograms obtained in negative and positive ionization modes from a sample taken from the Tarragona marina in June 2000. In this sample, diuron and Irgarol 1051 were found at concentrations of  $0.30$  and  $0.51\ \mu\text{g l}^{-1}$ , respectively.

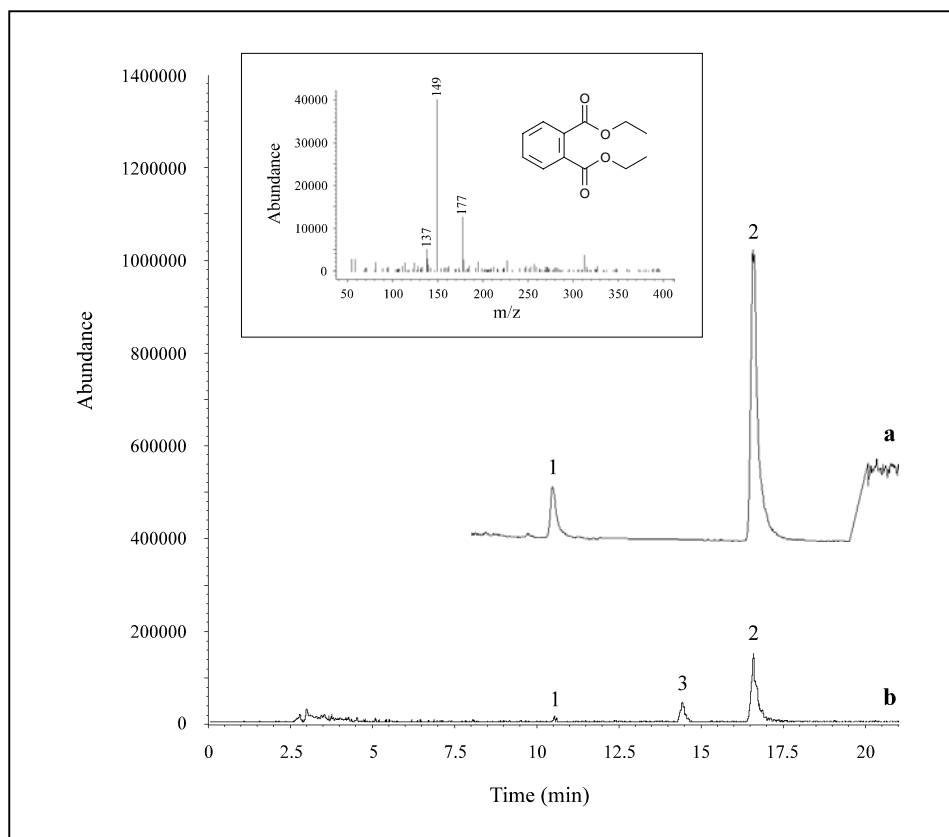
Folpet was not found in these samples, nor was dichlofluanid, although a peak which appeared in some chromatograms obtained in negative ionization mode was tentatively identified as *N,N'*-dimethyl-*N*-phenylsulfonyldiamide, which has been reported to be a degradation product of this compound [20]. The obtained spectrum and the structure of this compound is shown in Figure 4, which Y. Akiyama *et al.* [20] determined using a GC-MS system. For this reason, their spectra cannot be compared to ours, but some peaks do coincide. Moreover, all the majority peaks could be tentatively identified: these were 199, 155, 108, 91 and 65, which corresponded to the fragments  $[\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{-H}]^+$ ,  $[\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}\text{SO}_2]^+$ ,  $[\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}]^+$ ,  $[\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2]^+$



and  $[\text{SO}_2]^-$ , respectively. They could not be identified by retention time because the standard of this degradation product was not available.



**Figure 4.** Chromatograms obtained under full-scan (a) and SIM (b) acquisition in negative ionization mode for a Tarragona marina sample taken in June 2000. The concentration of diuron was  $0.30 \mu\text{g l}^{-1}$ . Peaks: 1=diuron; 2=tentatively identified as N',N'-dimethyl-N-phenylsulfonyldiamide. The MS spectrum of peak 2 and the structure of N',N'-dimethyl-N-phenylsulfonyldiamide are also included.



**Figure 5.** Chromatograms obtained under SIM (a) and full-scan (b) acquisition in positive ionization mode for a Tarragona marina sample taken in June 2000. The concentrations of diuron and Irgarol 1051 was  $0.30 \mu\text{g l}^{-1}$  and  $0.51 \mu\text{g l}^{-1}$ , respectively. Peaks: 1=diuron; 2=Irgarol 1051; 3=tentatively identified as diethylphthalate. The MS spectrum of peak 3 and the structure of diethylphthalate are also included.

Another peak was tentatively identified as a phthalate because it presented ions 149 and 177, as can be seen in Figure 5, where the spectrum is shown. The first is a typical fragment that appears in the spectrum of this kind of compounds and corresponds to  $[\text{C}_6\text{H}_4\text{COOCO} + \text{H}]^+$  [21]. The second is typical of diethylphthalate and corresponds to  $[\text{C}_6\text{H}_4\text{COOCOCH}_2\text{CH}_2]^+$ . A standard of this compound was available, so it was directly injected into the

chromatographic system and the spectrum and the retention time were similar.

## **CONCLUSIONS**

An automatic method based on the on-line coupling of SPE-HPLC-APCI-MS has been developed to determine four antifouling compounds in seawater samples. The highly crosslinked polymer LiChrolut EN, used as sorbent in the SPE step, allowed all the compounds, even the most polar ones such as dichlofluanid, to be recovered at more than 85% when 100 ml of sample was preconcentrated. These recovery values and the high sensitivity of the MS detection under SIM acquisition mode with an APCI interface allowed the quantification of all the compounds at low concentration levels ( $10 \text{ ng l}^{-1}$ ), except folpet which could only be quantified at  $500 \text{ ng l}^{-1}$  because of its low response. Repeatability and reproducibility of the method between days were also evaluated and good results were obtained. This automatic method allowed for monitoring the presence of some of the compounds in samples taken from different ports along the coast near Tarragona. Only diuron and Irgarol 1051 could be detected and quantified at concentration levels of 27-420 and 15-511  $\text{ng l}^{-1}$ , respectively.

Moreover, some additional peaks were tentatively identified as diethylphthalate and a degradation product of dichlofluanid.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work has been financially supported by CICYT (project AMB98-0913-C03-02). The authors thank Ciba-Geigy (Barcelona, Spain) for donating the Irgarol 1051.

**REFERENCES**

- [1] K. Martinez, I. Ferrer, M. D. Hernando, A. R. Fernández-Alba, R. M. Marcé, F. Borrull, D. Barceló, *Environ. Technol.* 22 (2001) 543.
- [2] C. Tixier, P. Bogaerts, M. Sancelme, F. Bonnemoy, L. Twagilimana, A. Cuer, J. Bohatier, H. Veschambre, *Pest. Manage. Sci.* 56 (2000) 455.
- [3] L. W. Hall, J. M. Giddings, K. R. Solomon, R. Balcomb, *Critical Rev. Toxicol.* 29 (1999) 367.
- [4] J. Ranke, B. Jastorff, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 7 (2000) 105.
- [5] I. Ferrer, D. Barceló, *J. Chromatogr. A*, 854 (1999) 197.
- [6] I. Tolosa, J. W. Readman, A. Blaevoet, S. Ghilini, J. Bartocci, M. Horvat, *Mar. Pollut. Bull.* 32 (1996) 335.
- [7] S. Biselli, K. Bester, H. Hühnerfuss, K. Fent, *Mar. Pollut. Bull.* 40 (2000) 233.
- [8] I. Tolosa, J. W. Readman, *Anal. Chim. Acta* 335 (1996) 267.
- [9] E. Pocurull, L. Brossa, F. Borrull, R. M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 361.
- [10] V. Voulvoulis, M. D. Scrimshaw, J. N. Lester, *Chromatographia* 50 (1999) 353.
- [11] A. R. Fernández-Alba, A. Agüera, M. Contreras, G. Peñuela, I. Ferrer, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 35.
- [12] K. Martínez, I. Ferrer, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 879 (2000) 27.
- [13] K. V. Thomas, *J. Chromatogr. A* 825 (1998) 29.
- [14] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R. M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 839 (1999) 253.
- [15] B. Ballesteros, D. Barceló, F. Camps, M. P. Marco, *Anal. Chim. Acta* 347 (1997) 139.
- [16] B. Ballesteros, D. Barceló, F. Sánchez-Baeza, F. Camps, M. P. Marco, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4004.
- [17] J. Penalva, M. A. González-Martínez, R. Puchades, A. Maquieira, M. P. Marco, D. Barceló, *Anal. Chim. Acta* 387 (1999) 227.

- [18] N. Masqué, R. M. Marcé, F. Borrull, Trends Anal. Chem. 17 (1998) 384.
- [19] M. C. Hennion, J. Chromatogr. A 856 (1999) 3.
- [20] Y. Akiyama, N. Yoshioka, M. Tsuji, J. Food Hyg. Soc. Jpn. 39 (1998) 303.
- [21] M. Castillo, M. F. Alpendurada, D. Barceló, J. Mass Spectrom. 32 (1997) 1100.



### **CAPÍTOL III**

---

### **CONCLUSIONS**





Dels treballs realitzats en la present Tesi Doctoral es poden extreure les següents conclusions :

1. L'acoblament de sistemes de preconcentració i detecció a l'HPLC permet desenvolupar mètodes per a la determinació de compostos orgànics a concentracions baixes en mostres d'aigua de mar.
2. La utilització del sorbent polimèric PLRP-s permet l'obtenció de recuperacions acceptables en la SPE acoblada en línia a la cromatografia líquida per a la determinació de NS en mostres d'aigua de l'aixeta i de riu, així com de PACs en mostres d'aigua de mar i de depuradora.
3. L'ús dels sorbents polimèrics altament entrecruats LiChrolut EN i Isolute ENV+ en l'extracció en fase sòlida de contaminants orgànics de mostres d'aigua de mar i de depuradora fa possible l'obtenció de recuperacions elevades per a la majoria dels compostos estudiats en la present Tesi.
4. L'acoblament en línia de la SPE utilitzant el LiChrolut EN a l'HPLC permet obtenir bons resultats per a la determinació de BZS i NS en mostres d'aigua de mar a baixes concentracions, si bé s'ha de realitzar l'elució únicament amb la fracció orgànica de la fase mòbil emprada per a la separació cromatogràfica. Tot i que pels compostos més polars les recuperacions són baixes, aquestes són superiors a les obtingudes amb els sorbents polimèrics convencionals.
5. Donada la hidrofobicitat dels PACs i els ftalats i adipats estudiats en la present tesi, ha estat necessària l'addició d'un 20% d'acetonitril a la mostra abans de la seva preconcentració per tal d'augmentar la solubilitat dels compostos i evitar la seva adsorció a les parets del

material en què es posen en contacte. D'aquesta forma, s'han obtingut unes recuperacions acceptables per a tots els compostos estudiats.

6. L'extracció amb solvents orgànics, combinada en alguns casos amb ultrasons, és una bona tècnica per a l'extracció de contaminants orgànics de mostres de sediments marins, ja que és una tècnica senzilla i permet obtenir bones recuperacions. En la present tesi, aquesta tècnica s'ha aplicat a la determinació de compostos aromàtics policíclics i ftalats i BEHA, utilitzant com a solvents orgànics acetonitril i diclorometà respectivament i s'han obtingut recuperacions superiors al 70% per a tots els compostos estudiats.
7. L'acoblament de l'HPLC i la MS mitjançant la interfase APCI permet el desenvolupament de mètodes analítics sensibles que permeten assolir els nivells de concentració en què es troben els contaminants en mostres reals. A més, l'ús de la MS com a sistema de detecció permet la confirmació dels contaminants en les mateixes.
8. L'APCI-MS és una bona tècnica complementària a la FLD per a la detecció i quantificació de PACs en mostres reals, tot i que aquest sistema de detecció no va permetre la determinació d'alguns dels compostos estudiats.
9. Juntament amb l'ús de les tècniques d'extracció anteriorment esmentades, el mètode basat en l'acoblament HPLC-APCI-MS ha permès la identificació i quantificació dels ftalats i BEHA estudiats en mostres de depuradora i en sediments marins, si bé aquests compostos no han estat detectats en aigua portuària.
10. L'ús de la MS com a tècnica de detecció no només permet assolir els nivells de concentració en què es troben els contaminants en mostres reals i confirmar la presència, sinó que també permet la detecció

d'altres substàncies presents en les mostres. Aquesta tècnica, acoblada a un sistema *on-line* SPE-HPLC mitjançant la interfase APCI, ha permès la determinació de diuron i Irgarol 1051 en mostres d'aigua costanera, així com la identificació d'un dels productes de degradació del diclofluanid i d'un ftalat, el DEPH.

11. Els algorismes de calibració de segon ordre poden ser una bona alternativa a l'hora de solventar alguns problemes sorgits en l'aplicació de les tècniques acoblades, com per exemple, la quantificació dels analits a partir de pics cromatogràfics parcialment solapats que no poden separar-se mitjançant la modificació dels paràmetres que afecten a la separació cromatogràfica, com la composició de la fase mòbil o la temperatura.
12. Per a la determinació de compostos la separació cromatogràfica dels quals és difícil i requereix molt de temps, com és el cas dels NS, l'aplicació de l'algorisme de calibració de segon ordre 3-PLS ha estat molt útil per a disminuir el temps d'anàlisi, ja que permet la quantificació a partir de pics parcialment solapats, la qual cosa fa que no sigui necessària una separació completa dels analits.
13. El GRAM ha permès la determinació de contaminants orgànics en sediments marins, mostres complexes que presenten efecte matriu. Aquest algorisme no només permet la quantificació en presència de substàncies interferents sense haver d'optimitzar una nova separació cromatogràfica, sinó que per a aquesta quantificació únicament es requereix una mostra de calibració, la qual cosa permet determinar la concentració dels analits sense haver de realitzar una nova recta de calibració univariant per a cada nova mostra.
14. L'aplicació dels mètodes analítics desenvolupats en la present Tesi Doctoral ha permès la determinació d'alguns dels compostos estudiats

en mostres d'aigua de depuradora i de diferents ports de la costa de Tarragona, tot i que les concentracions en què han estat trobats no són alarmants. Concretament, en aigua costanera s'ha detectat la presència del 4-hidroxí-1-naftalensulfonat, el 2-naftalensulfonat, el diuron i l'Irgarol 1051. Mentre que el primer compost no ha pogut ser quantificat degut al baix nivell de concentració, la resta han estat quantificats en concentracions de 0.14  $\mu\text{g l}^{-1}$ , 27-420  $\text{ng l}^{-1}$  i 15-511  $\text{ng l}^{-1}$  respectivament.

15. Tot i que no han estat trobats en mostres d'aigua de mar dintre dels límits de concentració establerts pel mètode, en les mostres de sediments portuaris es van trobar alguns PAHs (benzo[b]fluorantè, benzo[k]fluorantè, benzo[a]pirè, benzo[ghi]perilè i indeno[1,2,3-cd]pirè) i alguns ftalats (DMPH, DEPH, BBPH, DBPH i EHPH). Els límits de quantificació dels diferents mètodes desenvolupats ha permès la seva quantificació en concentracions que varien entre 0.086 i 9.4  $\text{mg kg}^{-1}$ .
16. El mètode desenvolupat per a la determinació de plaguicides antialgues ha permès avaluar la presència d'aquests compostos en mostres de la costa de Tarragona. En totes les mostres analitzades es van trobar el diuron i l'Irgarol 1051, mentre que folpet i diclofluanid no van ser detectats en cap d'elles. Tot i això, un dels productes de degradació d'aquest últim, el N',N'-dimetil-N-fenilsulfonildiamida, va ser detectat en algunes de les mostres.

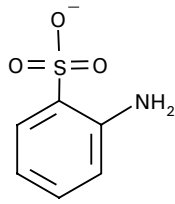
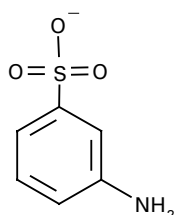
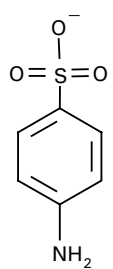
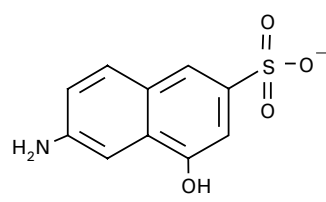
---

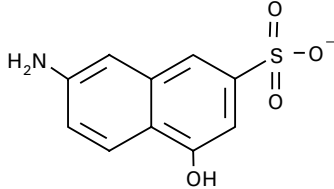
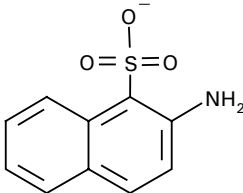
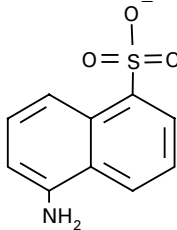
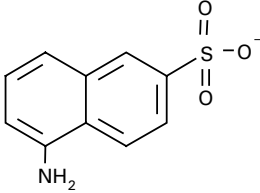
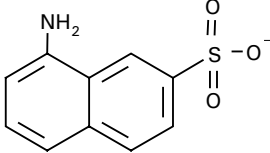
**ANNEXOS**



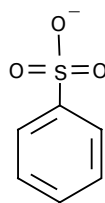
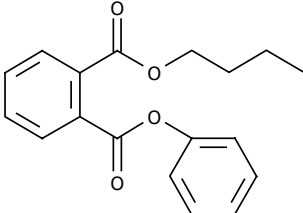
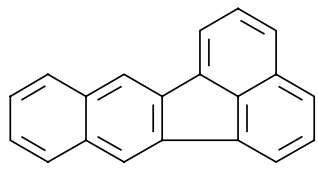
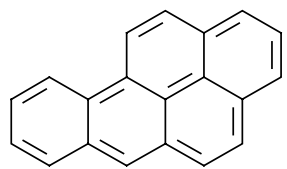
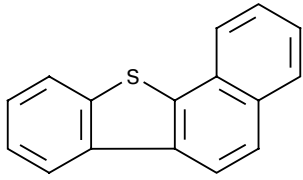
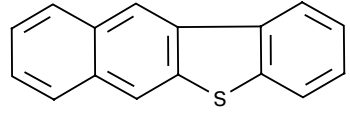
## ANNEX I

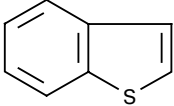
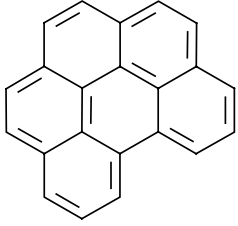
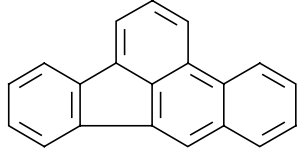
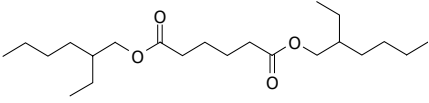
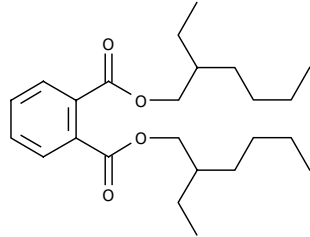
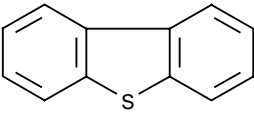
Estructura química dels compostos analitzats:

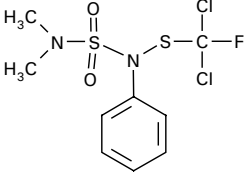
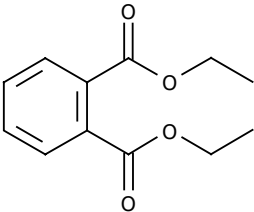
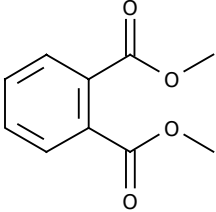
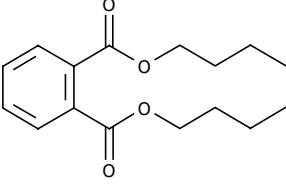
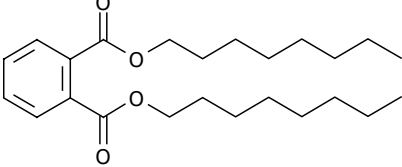
Nom	Família	Estructura
2-aminobenzensulfonat	benzensulfonats	
3-aminobenzensulfonat	benzensulfonats	
4-aminobenzensulfonat	benzensulfonats	
6-amino-4-hidroxi-2-naftalensulfonat	naftalensulfonats	

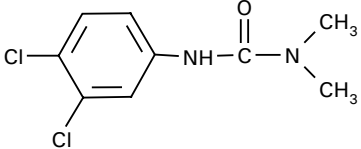
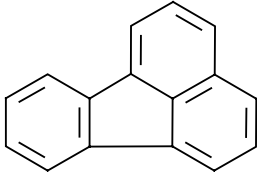
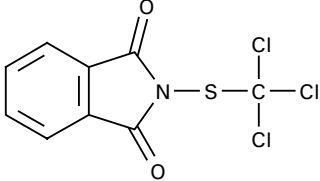
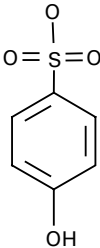
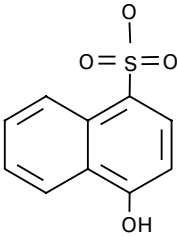
Nom	Família	Estructura
7-amino-4-hidroxi-2-naftalensulfonat	naftalensulfonats	
2-amino-1-naftalensulfonat	naftalensulfonats	
5-amino-1-naftalensulfonat	naftalensulfonats	
5-amino-2-naftalensulfonat	naftalensulfonats	
8-amino-2-naftalensulfonat	naftalensulfonats	

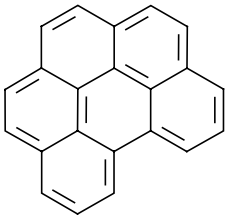
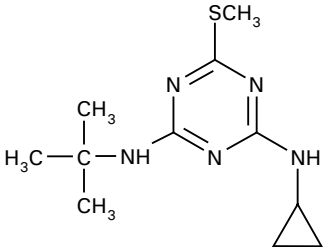
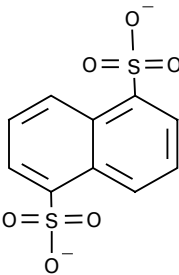
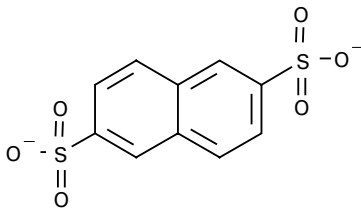
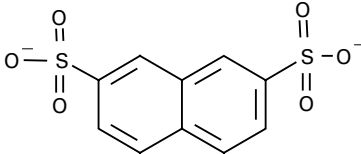


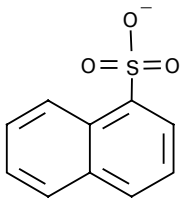
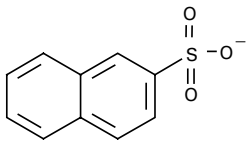
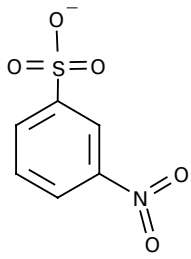
Nom	Família	Estructura
1-benzensulfonat	benzensulfonats	
benzilbutilftalat (BBPH)	ftalats (plastificants)	
benzo[a]pirè	hidrocarburs aromàtics	
benzo[b]fluorantè	hidrocarburs aromàtics	
benzo[b]nafto[2,1-d]tiofè	hidrocarburs aromàtics heterocíclics	
benzo[b]nafto[2,3-d]tiofè	hidrocarburs aromàtics heterocíclics	

Nom	Família	Estructura
benzo[b]tiofè	hidrocarburs aromàtics heterocíclics	
benzo[ghi]perilè	hidrocarburs aromàtics	
benzo[k]fluorantè	hidrocarburs aromàtics	
bis(2-ethylhexil)adipat (BEHA)	adipat (plastificants)	
bis(2-ethylhexil)ftalat (EHPH)	ftalats (plastificants)	
dibenzotiofè	hidrocarburs aromàtics heterocíclics	

Nom	Família	Estructura
dichlofluanid	plaguicides N-trihalometiltio (antialgues)	
dietilftalat (DEPH)	ftalats (plastificants)	
dimetilftalat (DMPH)	ftalats (plastificants)	
di-n-butilftalat (DBPH)	ftalats (plastificants)	
di-n-octilftalat (DOPH)	ftalats (plastificants)	

Nom	Família	Estructura
Diuron	plaguicides, triazines (antialgues)	
fluorantè	hidrocarburs aromàtics	
folpet	plaguicides, triazines (antialgues)	
4-hidroxibenzensulfonat	benzensulfonats	
4-hidroxi-1-naftalensulfonat	naftalensulfonats	

Nom	Família	Estructura
indeno[1,2,3-cd]pirè	hidrocarburs aromàtics	
irgarol 1051	plaguicides triazines (antialgues)	
naftalen-1,5-disulfonat	naftalensulfonats	
naftalen-2,6-disulfonat	naftalensulfonats	
naftalen-2,7-disulfonat	naftalensulfonats	

Nom	Família	Estructura
1-naftalensulfonat	naftalensulfonats	
2-naftalensulfonat	naftalensulfonats	
3-nitrobenzensulfonat	benzensulfonats	

**ANNEX II**

Abreviatures utilitzades en la present tesi:

3-PLS:	Regressió amb mínims quadrats parcials de tres vies ( <i>Three-way Partial Least Squares</i> )
APCI:	Ionització química a pressió atmosfèrica
APCI-MS:	Espectrometria de masses amb ionització química a pressió atmosfèrica
APPI:	Fotoionització a pressió atmosfèrica
ASE:	Extracció accelerada amb solvent
BBPH:	Butilbenzilftalat
BEHA:	Bis(2-etilhexil)adipat
BZS:	Benzensulfonat
CE:	Electroforesi capil·lar
CEC:	Electrocromatografia capil·lar
CPE:	Extracció en punt de núvol
CWX-DVB:	Carbowax-divinilbenzè
CX-DVB:	Carboxen-divinilbenzè
CZE:	Electroforesi capil·lar per zones
DBPH:	Di-n-butilftalat
DBT:	Dibutilestany
DEPH:	Dietilftalat
DMPH:	Dimetilftalat
DOPH:	Di-n-octilftalat
DVB-CX-PDMS:	Divinilbenzè-Carboxen-polimetilsiloxà
ECD:	Detector de captura electrònica
EFA:	<i>Evolving Factor Analysis</i>
EHPH:	Bis(2-etilhexil)ftalat
EPA:	Agència de Protecció Ambiental dels Estats Units
ES:	Electrosprai
ES-MS:	Espectrometria de masses amb electrosprai
EU:	Unió Europea

---

FID:	Detector d'ionització de flama
FLD:	Detector de fluorescència
FSFS:	<i>Fast-Scanning Fluorescence Spectrometry</i>
GC:	Cromatografia de gasos
GC-MS:	Cromatografia de gasos amb espectrometria de masses
GPC :	Cromatografia de permeació en gel
GRAM:	Mètode generalitzat d'anihilació de rang ( <i>Generalized Rank Annihilation Method</i> )
HCHs:	Hexaclorociclohexans
HPLC:	Cromatografia líquida d'alta resolució
HPLC-FLD:	Cromatografia líquida d'alta resolució amb detector de fluorescència
HS-SPME:	Microextracció en fase sòlida d'espai de cap
IPLC:	Cromatografia líquida de parell iònic
ITP:	Isotacoforesi
ITTFA:	<i>Iterative Target Transformation Factor Analysis</i>
LAS:	Benzensulfonats alquílics lineals
LIFD:	Detector de fluorescència induïda per làser
LLE:	Extracció líquid-líquid
LLME:	Microextracció líquid-líquid
LVSS:	<i>Sample stacking</i> mitjançant la injecció de grans volums de mostra
MAE:	Extracció assistida amb microones
MBT:	Monobutilestany
MCR-ALS:	<i>Multivariate Curve Resolution by Alternating Least Squares</i>
MEHPH :	Mono(2-etilhexil)ftalat
MEKC:	Cromatografia micel·lar electrocinètica
MS:	Espectrometria de masses
NPD:	Detector de nitrogen-fòsfor
NPEO:	Etoxilats de nonilfenol
NS:	Naftalensulfonat
PA:	Poliacrilat



---

PACs:	Compostos aromàtics policíclics
PAHs:	Hidrocarburs aromàtics policíclics
PARAFAC:	<i>Parallel Factor Analysis</i>
PB:	Interfase de feix de partícules
PCA:	<i>Principal Component Analysis</i>
PCBs:	Bifenils policlorats
PCR:	<i>Principal Component Regression</i>
PDMS:	Polidimetilsiloxà
PDMS-DVB:	Polidimetilsiloxà-divinilbenzè
PLS:	<i>Partial Least Squares</i>
PS-DVB:	Poliestirè-divinilbenzè
PVC:	Clorur de polivinil
RSD:	Desviació estàndard relativa
SBSE:	Extracció per sorció amb barres magnètiques agitadores
SDS:	Dodecilsulfat sòdic
SDSA:	Àcid dodecansulfònic
SFC:	Cromatografia de fluids supercrítics
SFE:	Extracció de fluids supercrítics
SPE:	Extracció en fase sòlida
SPME:	Microextracció en fase sòlida
SVD:	Descomposició en valors singulars
SWE:	Extracció amb aigua subcrítica
TBT:	Tributilestany
TBTs:	Compostos de tributilestany
TCMS piridina:	2,3,5,6-tetracloro-4-metilsulfonil de piridina
TCMTB:	(2-tiocianometiltio)benzotiazol
TLD:	<i>Trilinear Decomposition</i>
TMS:	Tetrametilsilà



### ANNEX III

Els treballs que han sorgit de la present Tesi Doctoral, inclosos als capítols I i II, que s'han publicat o estan pendents de publicació en revistes científiques, són els següents:

- R. A. Gimeno, R. M. Marcé, F. Borrull, *Determination of organic contaminants in seawater*, Trends Anal. Chem., (pendent de publicació) (apartat I.2.5).
- R. A. Gimeno, R. M. Marcé, F. Borrull, *Determination of Aromatic Sulfonates in Coastal Water by On-Line Ion-Pair Solid-Phase Extraction/Ion-Pair Liquid Chromatography with UV Detection*, Chromatographia, 53 (2001) 22-26 (apartat II.1).
- R. A. Gimeno, J. L. Beltrán, R. M. Marcé, F. Borrull, *Determination of naphthalenesulphonates in water by on-line ion-pair solid-phase extraction and ion-pair liquid chromatography with fast-scanning fluorescence detection*, J. Chromatogr. A, 890 (2000) 289-294 (apartat II.2).
- R. A. Gimeno, A. F. M. Altelaar, R. M. Marcé, F. Borrull, *Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic sulfur heterocycles by high-performance liquid chromatography with fluorescence and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry detection in seawater and sediment samples*, J. Chromatogr. A, 958 (2002) 141-148 (apartat II.3).
- R. A. Gimeno, E. Comas, R. M. Marcé, J. Ferré, F. X. Rius, F. Borrull, *Second-order bilinear calibration for determining polycyclic aromatic compounds in marine sediments by solvent extraction and liquid chromatography with diode array detection*, Anal. Chim. Acta (acceptat) (apartat II.4).

- R. A. Gimeno, R. M. Marcé, F. Borrull, *Determination of plasticizers by high-performance liquid chromatography and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry in water and sediment samples*, *Chromatographia*, 58 (2003) 37-41 (apartat II.5).
- R. A. Gimeno, C. Aguilar, R. M. Marcé, F. Borrull, *Monitoring of antifouling agents in water samples by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, 915 (2001) 139-147 (apartat II.6).

Durant la realització de la present Tesi Doctoral, també s'ha contribuït a la realització dels següents treballs relacionats amb el tema de la mateixa:

- E. Comas, R. A. Gimeno, J. Ferré, R. M. Marcé, F. Borrull, F. X. Rius, *Time-shift correction in second-order liquid chromatographic data with iterative target transformation factor analysis*, *Anal. Chim. Acta*, 470 (2002) 163-173.
- E. Comas, R. A. Gimeno, J. Ferré, R. M. Marcé, F. Borrull, F. X. Rius, *Using second-order calibration to identify and quantify aromatic sulfonates in water by high-performance liquid chromatography in the presence of coeluting interferences*, *J. Chromatogr. A*, 988 (2003) 277-284.
- E. Comas, R. A. Gimeno, J. Ferré, R. M. Marcé, F. Borrull, F. X. Rius, *Quantification of high drifted and overlapped peaks using second order calibration*, (en preparació).