



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Departament de Química Analítica i Química Orgànica

**APLICACIÓ DE TÈCNIQUES
CROMATOGRÀFIQUES A LA DETERMINACIÓ
D'ALTERADORS ENDOCRINS EN AIGÜES**

**Memòria presentada per
LÍDIA BROSSA PIÑERO
per optar al grau de
Doctora per URV
Tarragona, 2004**



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
Departament de Química Analítica
i Química Orgànica

La Dra. ROSA M. MARCÉ i RECASENS i la Dra. EVA POCURULL i AIXALÀ,
professores Titulars 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 CROMATOGRÀFIQUES A LA DETERMINACIÓ D’ALTERADORS
ENDOCRINS EN AIGÜES”, presentada per LÍDIA BROSSA PIÑERO 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 què consti, expedim aquest certificat a Tarragona, 10 de setembre
de 2004.

Dra. Rosa M. Marcé i Recasens

Dra. Eva Pocurull i Aixalà

*En memòria del meu cosí,
Oriol Càlix.*

*"He venido para ver semblantes
Amables como viejas escobas,
He venido para ver las sombras
Que desde lejos me sonríen."*

*"...He venido para ver las cosas,
Las cosas soñolientas por aquí."*

*"...He venido para ver las puertas,
El trabajo, los tejados, las virtudes..."*

*"...He venido no sé por qué;
Un día abrí los ojos: he venido."*

*"Por ello quiero saludar sin insistencia
A tantas cosas más que amables:
Los amigos de color celeste,
Los días de color variable,
La libertad del color de mis ojos;*

*Adiós,
Vine por esos besos solamente;
Guardad los labios por si vuelvo."*

*He venido para ver,
Luis Cernuda.*

ÍNDEX

OBJECTIU	1
CAPÍTOL I. INTRODUCCIÓ	5
I.1. Alteradors endocrins i la seva problemàtica	9
I.1.1. Sistema endocrí.....	12
I.1.2. Alteradors endocrins.....	14
I.1.3. Problemàtica ambiental.....	21
I.1.4. Toxicitat	23
I.1.5. Legislació.....	30
I.2. Tècniques analítiques aplicades a la determinació d'alteradors endocrins	37
I.2.1. Esteroids sexuals naturals i sintètics	40
I.2.1.1. Tècniques de separació	45
I.2.1.2. Tècniques d'extracció	54
I.2.2. Alquilfenols i alquilfenols etoxilats	57
I.2.2.1. Tècniques de separació.....	60
I.2.2.2. Tècniques d'extracció	67
I.2.3. Ftalats i adipats	71
I.2.3.1. Tècniques de separació	74
I.2.3.2. Tècniques d'extracció	80
I.2.4. Plaguicides	82
I.2.4.1. Tècniques de separació.....	86
I.2.4.2. Tècniques d'extracció	93
I.2.5. Altres compostos	96
I.2.5.1. Tècniques de separació	98
I.2.5.2. Tècniques d'extracció	102
I.2.6. Estat actual de la qüestió	105
I.3. Bibliografia	125

CAPÍTOL II. PART EXPERIMENTAL I RESULTATS	145
II.1. Aplicació de l'extracció en fase sòlida acoblada en línia a la cromatografia de gasos-espectrometria de masses per a la determinació d'alteradors endocrins en mostres aquoses	151
II.2. Determinació d'alteradors endocrins en mostres aquoses per extracció en fase sòlida acoblada en línia, a través d'un vaporitzador a temperatura programada, a la cromatografia de gasos-espectrometria de masses.....	169
II.3. Determinació d'alteradors endocrins en mostres aquoses ambientals per extracció amb barres magnètiques agitadores, desorció líquida i injecció de grans volums a la cromatografia de gasos	189
II.4. Mètode ràpid per a la determinació d'alteradors endocrins fenòlics en mostres aquoses	205
II.5. Extracció en fase sòlida i cromatografia de líquids d'alta resolució-electrosprai-espectrometria de masses per determinar alteradors endocrins en mostres aquoses.....	219
II.6. Estudi de la presència de vint-i-sis alteradors endocrins en mostres aquoses mediambientals	235
II.7. Estudi de la presència d'alteradors endocrins en aigües d'estacions depuradores d'aigües residuals	253
CAPÍTOL III. CONCLUSIONS	265
ANNEXOS	271
I. Taula d'alteradors endocrins	273
II. Estructures.....	277
III. Abreviacions utilitzades.....	285
IV. Publicacions	289

OBJECTIU

L'objectiu de la present tesi és desenvolupar mètodes analítics per la determinació d'alteradors endocrins a nivells traça en mostres aquoses i estudiar la seva aplicació com a mètodes rutinaris d'anàlisi. Aquest objectiu n'engloba d'altres més específics com són:

- El desenvolupament de diferents mètodes basats en l'acoblament en línia de l'extracció en fase sòlida a la cromatografia de gasos, per tal d'aconseguir un alt nivell d'automatització i millorar la sensibilitat gràcies a la injecció de grans volums al cromatògraf.
- L'estudi de l'aplicabilitat de la cromatografia de líquids d'alta resolució, acoblada a l'espectrometria de masses per a la determinació d'alteradors endocrins.
- La monitorització d'un grup d'alteradors endocrins en mostres aquoses utilitzant algun dels mètodes desenvolupats, per tal de determinar la presència d'aquests contaminants en les aigües del Tarragonès.

CAPÍTOL I

INTRODUCCIÓ

Aquest capítol s'ha distribuït bàsicament en dos apartats. En el primer apartat es descriuen els alteradors endocrins i tots aquells aspectes necessaris per entendre la seva problemàtica ambiental. A continuació s'exposen les tècniques analítiques que s'han aplicat a la determinació d'aquests contaminants classificats per famílies i finalment s'inclou una revisió bibliogràfica més general de l'estat actual de la qüestió i les tendències futures.

En el primer apartat, per portar a terme la descripció dels compostos amb propietats alteradores endocrines i entendre la seva problemàtica ambiental es fa imprescindible fer una breu descripció del sistema endocrí. Tot seguit, s'exposen les diferents definicions existents pels alteradors endocrins i les diferents classificacions que existeixen a la bibliografia, en funció de la seva estructura química o de quina part del sistema endocrí alteren o de com actuen, com a resultat de la no existència d'una definició concreta per aquests contaminants. Degut a la gran quantitat de compostos que poden alterar el sistema endocrí i de la gran diversitat de maneres i diferent grau en què ho poden fer, establir la seva problemàtica avui en dia és encara un tema d'estudi actual. Per això, s'exposen a grans trets els principals estudis sobre la seva toxicitat i els seus efectes additius. I per acabar, es fa un repàs de les diferents normatives existents per alguns d'aquests contaminants en diferents tipus d'aigües i s'exposa en quin punt es troben actualment les accions portades a terme per la Unió Europea i l'Agència de Protecció Mediambiental dels Estats Units per tal de controlar els efectes d'aquests contaminants en el medi ambient.

Les tècniques analítiques aplicades a la determinació dels alteradors endocrins, classificades per cada família de compostos amb propietats alteradores endocrines es descriuen en el segon apartat. Per cada família de compostos es fa primer una breu descripció de les seves característiques fisicoquímiques i la seva problemàtica ambiental per tal d'introduir les diferents tècniques de separació i extracció aplicades.

En la revisió bibliogràfica que s'inclou al final d'aquest segon apartat s'exposa d'una manera global l'estat actual dels mètodes analítics desenvolupats classificats en funció de les tècniques analítiques aplicades.

I.1. ALTERADORS ENDOCRINS I LA SEVA PROBLEMÀTICA

En els últims anys s'ha observat que alguns efectes perjudicials que es donen en humans o espècies vertebrades estan lligats amb l'exposició a compostos naturals o sintètics que es troben en el medi ambient. Molts d'aquests efectes estan relacionats amb el que es coneix com toxicitat endocrina, que es defineix com un efecte advers sobre l'estructura i/o funció del sistema endocrí com a resultat de l'exposició a substàncies químiques [1].

Aquestes substàncies químiques són conegudes col·lectivament en anglès com *endocrine-disrupting chemicals* (EDCs) o *endocrine disruptors* (EDs). El *National Research Council* proposa en el seu informe la no utilització del terme *endocrine-disrupting compounds* per l'efecte emocional que envolta i la utilització en el seu lloc, del terme *hormonally active agent-HAA* (agent actiu hormonalment), que és definit com un agent que demostra una certa activitat hormonal en un sistema d'assaig [2]. Tot i així, normalment s'utilitzen els termes EDCs o EDs per evitar la confusió amb l'acrònim àmpliament acceptat pels àcids haloacètics (HAAs).

Un *disruptor* és un alterador o pertorbador, segons el context en què s'utilitza, d'alguna cosa. Com que aquestes alteracions endocrines es poden produir degut a hormones naturals (fitoestrògens,...), a hormones sintètiques de caràcter mèdic (anticonceptius orals) o a substàncies químiques artificials d'origen industrial (dioxines,...) es podria utilitzar el terme alterador endocrí o pertorbador endocrí, que té una connotació més negativa, per diferenciar les substàncies utilitzades per alterar benèficament el sistema endocrí (per exemple les píndoles anticonceptives) i les que el pertorben accidentalment (els compostos que no es consumeixen voluntàriament, per exemple, les dioxines,...). Però en les traduccions de les normatives de la Comissió Europea apareix més freqüentment el terme alterador endocrí, i per això aquest és el que s'ha decidit utilitzar en aquesta memòria, tot i que es mantindran les sigles angleses EDs.

L'exposició dels éssers vius a aquests compostos és generalitzada degut a la gran varietat de compostos que poden provocar una disfunció endocrina. Com

ja s'ha comentat, els alteradors endocrins poden tenir un origen tant natural (fitoestrògens i hormones sexuals) com antropogènic (hormones sintètiques, plaguicides,...). L'exposició als d'origen natural és inevitable, però el desenvolupament industrial (cada cop més ràpid i en molts casos principalment centrat en el benefici econòmic) i la "qualitat" de vida de la societat actual està contribuint a un augment massiu en el nombre de contaminants amb propietats per alterar el sistema endocrí als quals els éssers vius són exposats involuntàriament.

Una de les principals via d'exposició a aquests contaminants és a través de les aigües mediambientals degut a l'abocament de substàncies que es difonen per rius i llacs. És per això que hi ha un creixent interès en el desenvolupament de mètodes que permetin la determinació d'una gran varietat de contaminants en mostres mediambientals, per tal de controlar la seva presència i nivells i poder així utilitzar aquestes aigües amb tota garantia de qualitat.

I.1.1. SISTEMA ENDOCRÍ

El sistema hormonal o endocrí és un dels sistemes més complexos dels éssers vius. Està format per un gran nombre de components. Com es pot veure a la Figura 1, conté diferents tipus d'òrgans i glàndules que segreguen hormones directament al corrent sanguini. Les hormones estan implicades en el control i regulació de l'activitat cel·lular i un cop s'han sintetitzat, es traslladen als seus teixits corresponents, on la seva funció és la de missatgers que transmeten la informació entre les cèl·lules. Les hormones poden ser tant proteïnes, polipèptids, aminoàcids com esteroids. Les més conegudes són els esteroids sexuals: els estrògens (produïts en els ovaris) com és el 17 β -estradiol, són molt importants en el sistema de reproducció femení, i els andrògens (produïts en els testicles) com és la testosterona en el sistema masculí. Altres hormones, bastant conegudes també, són la tiroxina, produïda en la tiroides i la insulina, produïda en el pàncrees. La pituïtària i l'hipotàlem,

dues glàndules que es troben en el cervell, subministren una varietat d'hormones que afecten altres òrgans, incloent les glàndules sexuals [3-6].

Juntament amb el sistema nerviós, el sistema endocrí és el responsable de diferents processos que permeten a l'organisme funcionar com una unitat. Així, els nivells d'hormones i les seves interaccions amb els receptors hormonals controlen els processos fisiològics, mantenint la homeòstasi del cos.

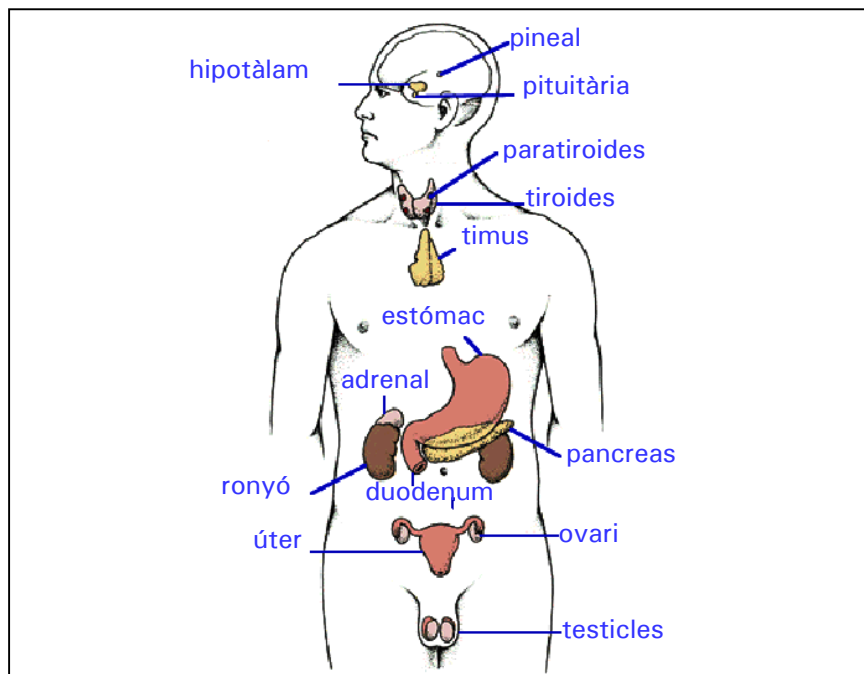


Figura 1. Sistema endocrí humà: òrgans i glàndules implicades en el sistema endocrí [6].

Com ja s'ha comentat, les hormones funcionen interaccionant amb les cèl·lules a través de l'enllaç amb proteïnes específiques anomenades receptors, que es troben en els teixits i els òrgans del cos. L'enllaç és específic, com una clau en

un pany. Quan són ocupats suficients llocs, llavors es transmet un missatge al nucli de les cèl·lules desemmascarant la informació genètica, que al final resulta en reaccions fisiològiques, que són les responsables del desenvolupament, creixement, reproducció i comportament metabòlic dels éssers vius. Per exemple, en les dones els estrògens controlen el cicle menstrual i en els homes, la testosterona controla la producció d'esperma. Les hormones són alliberades a la sang en molt petites quantitats. Els seus nivells són controlats per la velocitat d'alliberació i la velocitat de degradació (aquesta última normalment és controlada pel fetge o el ronyó). El moment d'alliberació de les hormones és sovint crític pel seu funcionament normal, per això un control precís de les hormones és important per no provocar una disfunció d'un o varis sistemes del cos [4,7]. Per exemple, una excessiva concentració d'estrògens en les dones pot portar a un trastorn en la reproducció mentre que en els homes pot portar una feminització en què les característiques masculines poden desaparèixer significativament.

I.1.2. ALTERADORS ENDOCRINS

Un ED pot ser definit simplement com un compost químic que interfereix en el funcionament normal del sistema endocrí. Però, s'han trobat tantes substàncies que poden alterar el sistema endocrí i de tantes maneres diferents, que establir una definició d'alterador endocrí va provocar moltes controvèrsies. Kavlock [8] va publicar una de les primeres definicions que amb el temps ha estat l'acceptada per l'Agència Americana de Protecció Mediambiental (EPA) [9]. Així, un alterador endocrí ha quedat definit per l'EPA com "un agent exogen que interfereix en la síntesi, secreció, transport, enllaç, acció o eliminació de les hormones naturals en el cos, les quals són responsables del manteniment o homeòstasi, reproducció, desenvolupament i/o comportament" [10]. Aquesta definició ha solucionat la controvèrsia existent amb la definició publicada en un inici pel comitè *Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory* (EDSTAC) creat per l'EPA, que entenia un alterador endocrí com "una substància o mescla química exògena que altera l'estructura o funcions del

sistema endocrí i causa efectes adversos -a nivell de l'organisme, la seva progènia, i poblacions o subpoblacions d'organismes- basat en principis científics, dades, evidència de pes i principis de prevenció" [11]. Per una altra banda, la Unió Europea (EU) també va establir una definició bastant general: un alterador endocrí és "una substància o mescla química exògena que causa efectes adversos en un organisme intacte, o secundàriament, en la seva progènia canviant la seva funció endocrina" i un alterador endocrí potencial és "una substància que té certes propietats de les quals es podria esperar que provoqués una disfunció endocrina en un organisme intacte" [12].

Les primeres definicions establertes per l'EPA i l'EU eren molt generals, però van ser imprescindibles per tal de poder impulsar el desenvolupament d'un programa d'investigació per determinar quines substàncies químiques poden provocar disfunció endocrina. També s'han donat definicions més específiques que engloben la manera en què actuen aquests compostos o els seus efectes, com és el cas de l'EPA en un dels seus articles publicats on els EDs es defineixen com "agents exògens que actuen imitant o antagonitzant les hormones naturals, que són responsables de mantenir la homeòstasi i controlar el desenvolupament normal del cos" [13].

L'àmplia diversitat de definicions és degut, per una banda, als amplis modes d'actuació que tenen els EDs per afectar al sistema endocrí i, per una altra banda, a la gran diversitat de propietats fisicoquímiques que tenen els compostos amb capacitat per alterar el sistema endocrí, que fan difícil establir una relació entre l'estructura dels compostos i la seva capacitat estrogènica. És per això que un ampli camp de recerca encara és l'establiment de quins compostos tenen potencialment efectes sobre el sistema endocrí i quines són les característiques principals d'un compost per tenir aquests efectes, com es veurà més endavant.

Com s'ha vist, els EDs estan formats per un grup de substàncies no definides per la seva naturalesa química, sinó pel seu efecte biològic i per tant una àmplia varietat de contaminants poden ser anomenats

col·lectivament com alteradors endocrins. Existeixen llargues llistes que inclouen un gran nombre de contaminants definits com compostos reconeguts o sospitosos de ser alteradors endocrins. La primera llista de compostos sospitosos d'alterar el sistema endocrí va ser publicada per Coborn et al. [14], seguida del seu popular llibre *Our Stolen Future* [15]. Aquesta llista en un principi contenia uns 50 compostos sospitosos de ser EDs. A partir d'aquí, s'han anat publicant llistes cada cop més ampliades que contenen compostos amb una toxicitat endocrina reconeguda o sospitosa, anomenats generalment com alteradors endocrins potencials o sospitosos [1,16-19]. Hi ha llistes bastant complexes on, degut a la dificultat existent en la determinació de quins són EDs i el grau de toxicitat de cada un d'ells, s'indiquen els tests aplicats per determinar la seva activitat endocrina enlloc de classificar-los com a sospitosos o reconeguts [19]. Totes aquestes llistes inclouen una gran diversitat de compostos, com plaguicides, ftalats, alquilfenols, bisfenol A..., la majoria d'origen industrial. Com que avui en dia existeixen sobre uns 1000 plaguicides registrats a l'EU i els Estats Units i unes 100000 substàncies diferents registrades en el mercat comunitari, aquestes llistes de compostos sospitosos de ser EDs continuaran creixent, però la recerca que s'està realitzant actualment ajudarà a aclarir molts aspectes com la relació entre l'estructura química i la toxicitat endocrina, cosa que farà que es generin llistes més uniformes i senzilles.

Als Estats Units encara no existeix una llista oficial d'alteradors endocrins. El 1997 l'estat d'Illinois va publicar una llista d'EDs que contenia 3 categories en funció de l'evidència coneguda de la capacitat d'aquests compostos per alterar el sistema endocrí [20]. Així, els 76 compostos que apareixen en aquesta llista estan classificats en EDs coneguts, probables o sospitosos. Entre els coneguts es troben alguns plaguicides com l'atrazina, el DDD, el DDE, el DDT, el dieldrin, l'endosulfà, el lindà,...; algun alquilfenol, com el p-nonilfenol,...; però en canvi alguns ftalats, compostos considerats per altres llistes amb propietats altament alteradores del sistema endocrí, apareixen en aquesta llista oficial com a sospitosos.

En canvi, l'EU ha donat molta importància a la designació oficial de les substàncies que són EDs, tal com es demostra en l'estratègia adoptada l'any 1999, on es proposa establir una llista prioritària de substàncies per avaluar el seu paper com alteradors endocrins [21]. Així, recopilant estudis sobre molts compostos, el 2000 es va publicar una llista de 564 compostos classificats en 3 grups en funció de la informació disponible que hi ha sobre la seva toxicitat endocrina [22].

A l'Annex I s'ha recopilat una taula d'EDs classificats com a tals per 3 de les llistes més importants, la de Colborn, la de l'EPA i la de l'EU.

Els EDs, com es pot veure a la Figura 2, es poden classificar en funció del seu origen, natural o antropogènic, i de la seva utilització principal. Exemples d'origen natural es troben en les plantes capaces de produir compostos estrogènics. Es poden trobar compostos amb activitat estrogènica en certs aliments com mongetes de soja, cireres, blat, peres, cafè, patates, bròquil... i en algunes plantes, que produeixen substàncies policíclics com són els isoflavonoides, els fitoesterols i els coumestants. Aquests compostos s'anomenen fitoestrògens [23]. Però el grau en què aquestes substàncies provoquen modificacions importants en el sistema endocrí no és clar. El *Institute of Environment and Health* del Regne Unit conclou que, tenint en compte la llarga exposició que es té als fitoestrògens al llarg de tota la vida, és probable que les propietats adverses d'aquests tinguin uns efectes molt més grans sobre els éssers vius que no els beneficis que pugui aportar una dieta rica en vegetals [24]. Afirmació molt atrevida perquè també s'ha de tenir en compte que aquests compostos es troben presents en el cos durant un curt període de temps, ja que són degradats i reduïts a metabòlits que són excretats amb relativa facilitat. Un altre exemple d'origen natural són les hormones naturals, com són els estrògens. Aquests són sintetitzats al propi organisme, s'expulsen per l'orina i també poden ser un factor de contaminació si no s'aconsegueixen eliminar a les plantes depuradores d'aigües residuals.

Els compostos d'origen antropogènic que provoquen disfunció endocrina són molt diversos. Per una banda hi ha els productes d'origen farmacèutic i per una altra banda, hi ha els contaminants ambientals, coneguts com Alteradors Endocrins Mediambientals (EEDs-*Environmental Endocrine Disruptors*) quan causen modificacions en el sistema endocrí.

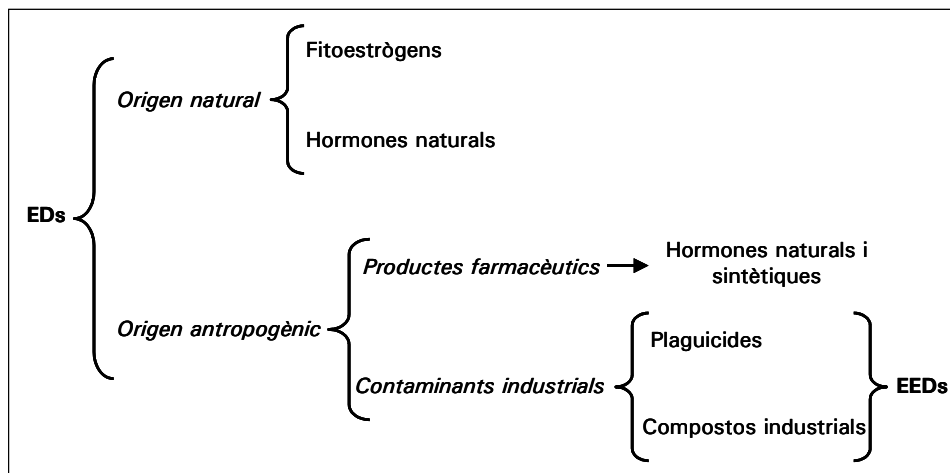


Figura 2. Classificació dels EDs en funció del seu origen i principal utilització.

Els productes d'origen farmacèutic són les hormones naturals i sintètiques que es troben en medicaments que han estat dissenyats especialment per tractar els desequilibris hormonals en humans. Un dels primers compostos sintètics reconegut com a alterador endocrí va ser el dietilestilbestrol (DES), un producte farmacèutic amb fortes propietats estrogèniques administrat a les dones embarassades des del 1948 al 1971 per ajudar a prevenir els avortaments. Als anys 70, es va diagnosticar en els fills de les dones que havien estat medicades amb el DES, un augment en les malformacions congènites, amb tumors en els òrgans reproductius i una disminució de la fertilitat [25]. Altres hormones sintètiques molt conegudes són el 17 α -

etinilestradiol, el levonorgestrel o el mestranol que s'utilitzen en els anticonceptius orals.

L'interès pels EEDs va sorgir, com ja s'ha comentat, amb la publicació del llibre "*Our Stolen Future*", on apareixien els primers compostos d'aquest grup sospitosos de ser EDs. Els EEDs estan formats per totes aquelles substàncies que apareixen en el medi ambient per causes antropogèniques, però principalment amb un origen industrial. Així, dins d'aquest grup hi ha plaguicides, compostos organoclorats, ftalats, alquilfenols... i alguns metalls pesats. En general, els EEDs se solen classificar en dos grans grups, els plaguicides (tributilestany, DDT, atrazina,...) i els anomenats compostos industrials (bisfenol A, ftalats, alquilfenols...). Tot i que també es poden trobar classificats en funció de la seva utilització (antialgues, plastificants,...) o per famílies (plaguicides organoclorats, compostos organoclorats i organobromats,...).

Com que el sistema endocrí és força complex, un determinat compost pot interferir en una gran quantitat de punts al llarg del camí de les hormones en la seva producció, regulació i/o acció [26,27]. Degut a la gran diversitat de mecanismes d'acció que tenen els EDs en el sistema hormonal, també hi ha classificacions en funció de com actuen o a quines hormones afecten: estrògens o xenoestrògens ambientals, antiestrògens o antiandrògens i alteradors mediambientals [28,29]. Però tot i que qualsevol sistema hormonal es pot veure afectat, la informació disponible sobre l'alteració endocrina del sistema hormonal estrògenic, és a dir que afecten als òrgans sexuals, és molt més abundant. Com es pot observar a l'Annex I, la majoria d'EDs provoquen alteracions en aquest sistema hormonal.

S'han descrit cinc mecanismes pels quals certs compostos poden alterar el funcionament del sistema endocrí [30]. Alguns contaminants imiten o actuen com les hormones naturals. Degut a la semblança que tenen en estructura amb les hormones, són capaços d'enllaçar-se als receptors cel·lulars específics de les hormones naturals, fet que provoca una activitat anormal en la cèl·lula. La

majoria de substàncies que es coneixen d'aquests tipus actuen com els estrògens i es coneixen com estrògens o xenoestrògens (ambientals). El terme ambiental s'aplica quan es tracta de compostos no esteroïdals, és a dir quan no són hormones naturals ni sintètiques. Altres EDs, bloquegen o neutralitzen les cavitats dels receptors cel·lulars, impedit que s'hi enllacin les hormones naturals. Per exemple, s'ha trobat que l'ftalat de benzilbutil i el de di-*n*-butil poden bloquejar el receptor de l'hormona femenina 17 β -estradiol [31] i el *p,p'*-DDE (compost de degradació del DDT) pot desactivar el receptor de les hormones masculines [27]. Així, en general, quan les hormones actuen d'aquesta manera es parla de compostos antiestrògens quan afecten a les hormones sexuals femenines i antiandrògens quan afecten a les masculines. Alguns també poden bloquejar, interaccionant directament o indirectament, les hormones naturals canviant els seus missatges i per tant, alterant la seva activitat cel·lular. Un altre mode d'actuació el donen els compostos que es coneixen com alteradors mediambientals. Aquests compostos deterioren les glàndules que segreguen les hormones, de manera que alteren la producció, el funcionament i la degradació de les hormones naturals i les seves proteïnes receptores. S'ha comprovat que encara pot haver un últim mode d'actuació en què alguns contaminants porten a la formació de llocs receptors extra en la cèl·lula. Això pot portar a una ampliació de l'impacte de les hormones sobre l'activitat cel·lular.

Tot i que les propietats alteradores endocrines s'han observat en compostos d'estructura química molt diversa, s'ha trobat que aquestes estructures tenen en comú alguns punts. La relació entre les estructures dels compostos i la seva activitat alteradora s'ha investigat principalment pels compostos amb activitat estrogènica on s'estudia la tendència del compost a enllaçar-se al receptor estrogènic (ER) [32-34]. Fang et al. [32] han estudiat la relació entre l'estructura i l'activitat estrogènica de 230 compostos que inclouen hormones naturals i sintètiques i estrògens ambientals. Es basen, utilitzant el 17 β -estradiol com a compost de referència, en l'estudi d'interaccions essencials com són els enllaços per ponts d'hidrogen, la hidrofobicitat estèrica d'alguns substituents, la hidrofobicitat i l'estructura d'anell. De la seva investigació

extreuen una guia (que es mostra a la Figura 3) per identificar potencials lligands de l'ER.

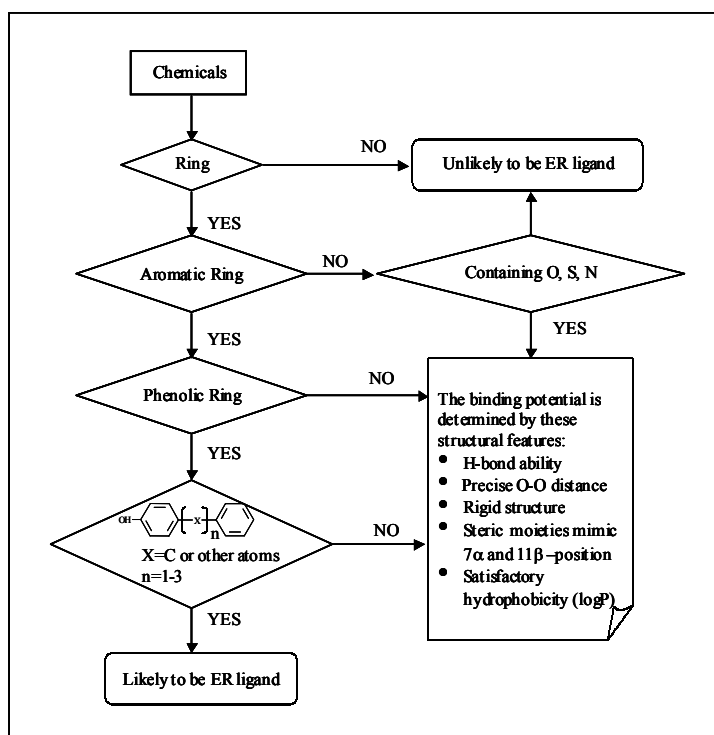


Figura 3. Gràfica de flux per a la identificació de lligands ER [32].

I.1.3. PROBLEMÀTICA AMBIENTAL

L'exposició es defineix com "la condició d'una substància per posar-se en contacte externament amb un organisme" (EPA, 1992). L'exposició d'un organisme als EDs requereix que aquests estiguin a l'ambient i persisteixin en el medi ambient durant una suficient quantitat de temps per tenir contacte amb un organisme. Degut a la gran varietat de compostos que existeixen que poden

provocar una disfunció endocrina als éssers vius i a què molts dels EDs són contaminants relativament persistents, l'exposició a un o varis EDs és molt probable per molts organismes.

L'exposició als fitoestrògens és inevitable, ja que es troben presents en la majoria d'aliments vegetals d'una forma natural. Els efectes que pot presentar el fet de tenir una dieta rica en vegetals i per tant el gran consum de fitoestrògens que es té al llarg de tota la vida, no estan ben establerts, com ja s'ha comentat anteriorment [35-37].

Per altra banda, hi ha l'exposició a les hormones naturals i sintètiques: el 17α -etinilestradiol, els seus compostos de degradació (estriol i estrona), el levonorgestrel, el mestranol,... components estrogènics que s'utilitzen en medicina i veterinària com anticonceptius orals o per altres tractaments hormonals. Aquesta exposició no és deguda només a l'ús habitual d'aquests medicaments, sinó al fet que són compostos que s'eliminen parcialment amb l'orina i que no s'eliminen completament en les plantes d'aigües residuals [38]. L'any 2000, es va fer una estimació de la quantitat d'hormones esteroïdals que alliberen al medi animals de granja tant de l'EU com dels Estats Units [39]. La quantitat d'estrògens alliberats era al voltant de 33 tones a l'EU i de 49 tones als Estats Units. Tot i que aquests valors no són molt grans comparats amb altres contaminants ambientals, l'elevada potència estrogènica dels estrògens fa que aquests nivells tinguin una importància significativa.

L'exposició més preocupant és als EEDs ja que formen les llistes més grans de compostos amb propietats per alterar el sistema endocrí i molts d'ells tenen una elevada persistència. Els EEDs es troben repartits per tot el món degut al seu ús generalitzat, a la seva baixa degradabilitat, la bioacumulació en la cadena tròfica i a què poden ser transportats per l'aire i l'aigua.

Els usos dels EEDs en la vida quotidiana són molt diversos. A l'Annex I es poden veure les diferents aplicacions que tenen aquests compostos. Per exemple, els ftalats s'utilitzen com reblanidors del plàstic, en cables elèctrics,

terres viníliques, automòbils, coles, pintures, vernissos, cosmètics, joguines... L'exposició humana a aquests compostos és a través dels envasos que contenen aliments, les joguines, robes, coles,... Altres compostos es troben formant part de la composició de productes domèstics, com per exemple els alquilfenols etoxilats, que en el medi es degraden a alquilfenols i que s'utilitzen en productes de neteja, aerosols per plantes, plàstics i cosmètics. El Bisfenol A és una reïna que s'utilitza en obturacions i recobriments dentals i en envasos (sobretot en les llaunes). També forma part de vernissos epòxids, ampolles de plàstic per aigua i biberons. El tributilestany (TBT) s'ha utilitzat com a fungicida, alguicida i com additiu en les pintures antiincrustants usades en les embarcacions. Els compostos organoclorats s'han usat molt com insecticides. Alguns, com el DDT i similars, estan prohibits en l'EU, però queden grans quantitats de residus d'aquests productes. Els bifenil policlorats (PCBs) s'utilitzaven com a lubricants, en aparells elèctrics, sistemes de transferència de calor,... la majoria d'aquestes substàncies estan prohibides però queden molts residus en el medi ambient. Les dioxines i els furans, provenen de la producció d'acer, la incineració de residus, la producció de compostos clorats i el blanqueig de paper amb clor [18,40-42].

Com es pot veure, doncs, a la vida quotidiana estem envoltats per tots aquests compostos i, en funció de la persistència que presenten, tant es poden trobar en el menjar com en les aigües, l'atmosfera i el sòl [43]. A més, degut a les propietats químiques que presenten la majoria d'aquests compostos, la seva presència en aigües mediambientals és molt important i cal tenir-ne un control, ja que l'aigua és un recurs indispensable pels éssers vius i la principal via d'exposició als EDs.

I.1.4. TOXICITAT

L'exposició als EDs té efectes molt amplis, des d'alteracions del comportament fins al canvi de sexe d'un individu, ja que depenen del grau d'estrogeneïtat del compost i dels efectes additius que tinguin [44,45]. Els principals efectes que

s'han descrit són alteracions en el sistema reproductor masculí, produint alteracions del tractogenitourinari, augment de càncer de testicle, infertilitat i augment de la incidència de càncer de pròstata, i en el sistema reproductor femení produint malformacions i infertilitat després de l'exposició als EDs del fetus o l'adult. També s'han donat alteracions en el sistema neuroendocrí provocant modificacions en els nivells hormonals i en la producció hormonal de la tiroides.

La recerca que s'ha fet i s'està fent sobre els EDs s'ha centrat principalment en estudiar els seus efectes en la vida salvatge. Tenint en compte la gran complexitat dels seus efectes potencials i els seus mecanismes d'acció, els EDs poden tenir efectes diferents en cada part del cos, en diferents etapes de desenvolupament dels éssers vius, en funció de la salut nutricional, en funció de la disposició genètica i per tant, són diferents en cada tipus d'espècie i dintre d'una mateixa espècie [46,47]. També els seus efectes poden variar degut a la presència d'altres compostos químics i en funció del temps d'exposició a aquests contaminants.

La capacitat de certs contaminants mediambientals per interferir en la funció endocrina va ser establerta fa més de 30 anys quan es va observar una disminució d'ocells piscívors als Estats Units degut als greus problemes reproductius provocats pel DDE (metabòlit del plaguicida organoclorat DDT). El 1980 es va registrar un altre cas d'alteració endocrina. Els caimans del llac Apopka a Florida, van ser exposats als plaguicides dicofol, DDT i els seus metabòlits DDD i DDE degut a un gran abocament produït per una fàbrica propera. Les investigacions portades a terme van concloure que aquests contaminants havien estat els responsables del descens en la població de caimans, d'una mortalitat més elevada en els seus ous i en els rèptils recent nascuts. Les femelles juvenils tenien importants anomalies ovàriques i presentaven concentracions d'estrògens dues vegades superiors a les normals. Els mascles joves estaven efeminats i tenien un penis de mida inferior al normal i concentracions en sang d'estrògens i testosterona superiors a les normals [25,48].

Altres casos que s'han anat donant són els desordres d'expressió del fenotipus sexual en peixos de rius anglesos i canadencs exposats a alquilfenols usats com a detergents i surfactants [49]. La masculinització de gastròpodes i moluscs en aigües marítimes de Catalunya, Galícia o Huelva també s'associa amb l'exposició d'alguns contaminants com són el TBT i altres derivats usats com antialgues en pintures marítimes [50,51].

D'aquesta manera, estudis posteriors suggereixen que els EDs són els responsables d'alteracions físiques en els diferents grups d'animals salvatges. Per exemple, en els animals invertebrats provoquen canvis en les característiques sexuals. Hi ha estudis que indiquen una relació directa entre el nivell d'exposició al TBT i els canvis en les característiques sexuals d'algunes espècies de cargols i moluscs. En peixos provoquen un funcionament anormal de la tiroides, reducció de la fertilitat, desenvolupament de característiques femenines en els mascles i masculines en les femelles. Estudis realitzats en llacs i rius demostren que determinades substàncies químiques com dioxines, furans, DDT, bisfenol A... són capaces de produir alteració endocrina en els peixos, provocant l'aparició de característiques del sexe oposat. En aus provoquen un funcionament anormal de la tiroides, reducció de la fertilitat i del nombre d'ous, desenvolupament de característiques femenines en mascles i alteracions del sistema immunitari. En mamífers provoquen la reducció de la fertilitat, desenvolupament de característiques femenines en els mascles i alteracions del sistema immunitari. Aquestes conseqüències les presenten els mamífers que mengen peix contaminat amb PCBs, DDT, DDE... Un exemple és el descens d'aproximadament el 17% del nombre de balenes a l'oest del mar Wadden que s'ha donat en 25 anys. En rèptils provoquen la reducció del nombre d'ous i el desenvolupament de característiques femenines. Un exemple clar és el caiman del llac Apopka a Florida, que el 1980 es va contaminar degut a un abocament de substàncies químiques, tal i com ja s'ha comentat anteriorment [52].

S'han realitzat estudis que demostren que l'exposició a EDs pot tenir conseqüències importants també en l'organisme humà. En els homes s'ha

observat una reducció en la qualitat del semen (baix recompte d'espermatozoides, baix volum ejaculat, proporció elevada d'espermatozoides anormals, proporció reduïda d'espermatozoides mòbils), càncer de testicle i òrgans sexuals deformes. En les dones s'ha observat un increment en els casos de càncer de mama i en els òrgans de reproducció entre moltes altres malalties d'aquests òrgans. Els més sensibles a l'exposició d'EDs són els fetus i embrions, en què el seu desenvolupament té molta dependència del sistema endocrí [40,53].

Un factor molt important a determinar és a quines concentracions d'EDs es donen aquests efectes per tal de poder establir un control d'aquests contaminants en el medi ambient. Molts dels efectes que s'han descrit s'han obtingut d'estudiar els animals salvatges en el seu hàbitat natural, on s'ha produït una determinada contaminació. Però, també s'han fet estudis amb diferents animals, com rates i peixos, a nivell de laboratori amb molts d'aquests possibles EDs per tal de quantificar la seva potència estrogènica i per tant, determinar a quins nivells de concentració d'aquests contaminants es comencen a donar aquests efectes [47,51].

Per portar a terme estudis de toxicitat s'han desenvolupat tests per facilitar la identificació de les substàncies que són EDs i els seus efectes en éssers vius quan són presents en el medi ambient. Els tests que estudien la relació entre l'estructura i l'activitat (*structural activity relationships-SARs*) i els bioassaigs *in vitro* són útils per la determinació ràpida de l'activitat alteradora endocrina dels compostos o mostres i per fer una estimació dels possibles efectes que poden tenir en els organismes. Però, per determinar d'una manera més acurada aquests efectes són necessaris els bioassaigs *in vivo* [54].

Els SARs es basen en el principi de què les propietats i comportament dels compostos es deriven directament de les seves característiques estructurals i moleculars. Descriuen les propietats químiques i/o biològiques d'una sèrie de compostos en relació a la seva estructura molecular i les seves propietats

fisicoquímiques i en treuen una relació que la poden utilitzar per predir l'activitat d'altres compostos, com s'ha comentat en l'apartat anterior.

Els assaigs *in vivo* utilitzen canvis fenotípics, com són l'expressió proteica i els efectes en el pes d'un òrgan. El *vitellogenin* (VTG) és un precursor proteic de la gemma de l'ou i normalment es troba en femelles fèrtils i la seva inducció en peixos mascles és una reconeguda resposta a la presència de compostos químics estrogènics. El VTG pot ser determinat per varis mètodes bioquímics, però principalment immunoquímics, com són la de *radioimmunoassay* (RIA) i la *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) [55,56]. D'aquests estudis es poden obtenir els valors més baixos en què s'observa algun efecte, els anomenats LOEL (*Low Observed Effect Levels*). Per exemple, s'ha determinat que l'estrogeneïtat del nonilfenol i l'octilfenol en peixos es dona a uns valors LOEL de 20 µg l⁻¹ i 4.8 µg l⁻¹ respectivament. En mamífers l'efecte estrogènic de l'octilfenol es dona sobre 20 mg Kg⁻¹ (LOEL en rates). En canvi, la potència endocrina dels isòmers actius dels PCBs està al voltant de 1 mg Kg⁻¹ (LOEL en rates) [40]. Com es pot veure, aquests nivells són molt diferents en funció del contaminant i de l'espècie i per tant, són necessaris realitzar encara molts més estudis per poder arribar a fer una extrapolació als nivells en què són tòxics pels homes.

Els assaigs *in vitro* són ràpids, necessiten petits factors de preconcentració i poden arribar a límits de detecció més baixos que les anàlisis químiques degut a la seva especificitat. Aquests assaigs poden determinar l'activitat alteradora endocrina d'un compost determinat a través d'un mode específic d'acció i també permeten investigar els efectes additius o sinèrgics. Els bioassaigs que s'apliquen utilitzen la inducció enzimàtica o genètica, l'enllaç a lligands específics, l'augment de l'expressió proteica i la diferenciació i proliferació cel·lular [57]. L'enllaç a lligands específics es pot basar en tècniques immunològiques, com són les tècniques ELISA i RIA [58] o en l'enllaç a un receptor específic, com són les tècniques de *enzyme-linked receptor assay* (ELRA) i la de *recombinant yeast assay* (RYA) entre d'altres [59-62]. Però, el model general del mecanisme d'acció d'aquests assaigs

consisteix principalment en què els EDs actuen imitant els lligands dels ERs (*Yeast based recombinant estrogen receptor-reporter assay*-YES). Però, no només la capacitat d'enllaçar-se al ER és una mesura de l'activitat alteradora dels EDs. La potència d'aquesta activitat també es determina per l'afinitat de l'enllaç i el manteniment del receptor ocupat. Tot i així, els EDs poden actuar a través de mecanismes independentment de l'ER, cosa que pot portar a una determinació inexacta de l'activitat alteradora endocrina i una correlació pobre de l'activitat entre els assaigs *in vitro* i les interferències de matriu [60,63].

En la majoria dels casos, els resultats obtinguts entre els assaigs *in vivo* i *in vitro* són consistents, però alguns compostos poden ser inactius en els assaigs *in vitro* i actius *in vivo* o a l'inrevés. Per exemple, en un estudi *in vitro* i *in vivo* de l'activitat estrogènica de vuit ftalats comercials realitzat per Zacharewski et al. [64], cap dels ftalats estudiats donaven resposta en els assaigs *in vivo* i només uns quants, com els ftalats de di-n-butil, benzilbutil i di-n-hexil, tenien una elevada activitat amb el receptor estrogènic en els assaigs *in vitro* portats a terme. També s'han donat casos de resultats no consistents entre diferents tècniques *in vitro* utilitzades, com és el cas de l'endosulfan [55].

Els assaigs *in vitro* poden sobreestimar l'activitat relativa d'un ED respecte un compost de referència (normalment el 17 β -estradiol). Varis autors han determinat l'estrogeneïtat individual, expressada com un factor relatiu respecte el 17 β -estradiol, d'algunes hormones naturals i sintètiques, alquilfenols i alquilfenols etoxilats, bisfenol A i alguns ftalats, utilitzant diferents bioassaigs [60,64-66]. Com es pot veure a la Taula 1, el grup de compostos més estrogènics es correspon amb les hormones sexuals esteroïdals. Pel que fa als compostos alquilfenòlics, s'observa que els alquilfenols són més estrogènics que els alquilfenols monoetoxilats i que els alquilfenols amb cadenes etoxilades més grans no presenten activitat estrogènica. El bisfenol A i els ftalats tenen valors semblants i són el grup de

compostos estudiats que presenten menys estrogeneïtat comparat amb les hormones sexuals.

Taula 1. Potència estrogènica relativa individual d'alguns EDs expressada com a factor equivalent a l'estradiol i determinada a partir de diferents bioassaigs [60,66].

Compostos	YES ^(a)	Assaig MCF-7 ^(b)	ER-CALUX ^(c)
<i>Hormones sexuals esteroidals</i>			
17β-estradiol	1	1	1
Estriol	3.7x10 ⁻¹	-	-
Etinilestradiol	1.9x10 ⁻¹ -1.2	1.25-1.9	1.2
Dietilestilbestrol	4.5x10 ⁻² -1.1	1.0x10 ⁻²	5.6x10 ⁻²
Estrona	1.9x10 ⁻² -1.0x10 ⁻¹	1.0x10 ⁻²	5.6x10 ⁻²
<i>Compostos alquilfenòlics</i>			
Nonilfenol	7.2x10 ⁻⁷ -4.1x10 ⁻⁴	1.3x10 ⁻⁵ -1.0x10 ⁻⁴	2.3x10 ⁻⁵
Octilfenol	1.0x10 ⁻⁵ -4.9x10 ⁻⁴	1.0x10 ⁻⁴ -2.5x10 ⁻⁴	1.4x10 ⁻⁶
Nonilfenol monoetoxilats	4.0x10 ⁻⁶ -1.3x10 ⁻⁵	-	3.8x10 ⁻⁶
Nonilfenol dietoxilats	-	-	-
<i>Compostos bisfenòlics</i>			
Bisfenol A	1.0x10 ⁻⁶ -8.1x10 ⁻⁵	2.5x10 ⁻⁵ -6.0x10 ⁻⁵	7.8x10 ⁻⁶
<i>Ftalats</i>			
Ftalat de bis(2-etilhexil)	2.5x10 ⁻⁵	-	-
Ftalat de di-n-butil	1.0x10 ⁻⁷ -1.0x10 ⁻⁵	-	1.8x10 ⁻⁸
Ftalat de benzilbutil	1.0x10 ⁻⁶ -8.9x10 ⁻⁶	8.9x10 ⁻⁶	1.4x10 ⁻⁶
Ftalat dimetil	1.0x10 ⁻⁶ -7.0x10 ⁻⁶	-	1.1x10 ⁻⁵
Ftalat de dietil	5.0x10 ⁻⁷ -4.7x10 ⁻⁶	-	3.2x10 ⁻⁸

^(a) YES: *Yeast based recombinant estrogen receptor-reporter assay.*

^(b) MCF-7: *cell proliferation assays.*

^(c) ER-CALUX: *Estrogen receptor-mediated chemical activated luciferase gene expression assay.*

Així, tot i la gran quantitat d'estudis que ja s'han realitzat sobre la toxicitat dels EDs, actualment encara és un tema d'investigació obert en què s'està treballant, ja que no s'han pogut establir totalment quines són les seves repercussions en els éssers vius i a quins nivells de concentració.

I.1.5. LEGISLACIÓ

Tot i la gran quantitat d'estudis realitzats en què s'han obtingut resultats que adverteixen de les conseqüències que tenen per la salut els EDs, cap estat membre de l'EU ni dels Estats Units ha desenvolupat encara una legislació específica per regular-los, tot i que s'han creat comitès d'experts en alguns països [67]. Alguns governs i organitzacions internacionals i intergovernamentals han iniciat activitats destinades a identificar i controlar el problema. Entre totes aquestes organitzacions es pot destacar la Comissió Europea, el Parlament Europeu, l'Agència de Protecció Mediambiental Americana dels Estats Units (EPA), l'Organització per la Cooperació i el Desenvolupament Econòmic (OCDE), el Programa Internacional sobre Seguretat Química de la Organització Mundial de la Salut, la Comissió Econòmica per Europa de les Nacions unides (UNECE), el Programa de les Nacions Unides pel Medi Ambient (PNUMA), la Comissió del Conveni Oslo-París (OSPAR), l'Agència Europea de Medi Ambient, organitzacions no governamentals i la indústria química.

El 1996 la OCDE va redactar un text on s'analitzava i es demanava una revisió dels mètodes de test dels EDs existents i on es proposava la creació de nous tests pels EDs. L'objectiu d'aquests nous tests era la de provar les característiques toxicològiques dels EDs, coordinar les activitats nacionals i internacionals per valorar el risc de l'ús d'EDs, caracteritzar el mal produït pels alteradors i harmonitzar les polítiques nacionals dels països membres en aquest tema. El 1998, el Parlament Europeu adoptà una resolució per tal de millorar la legislació, reforçar els esforços en recerca i fer assequible la informació disponible al públic, i el 1999, el *Scientific Committee for Toxicity, Ecotoxicity*

and the Environment (SCTEE) demanà que la Comissió presentés un document normatiu per a la identificació i avaluació dels EDs [68].

Per una altra banda, el 1996 el *Food Quality Protection Act* (FQPA) i el *Safe Drinking Water Act* (SDWA) van proposar la modificació de les dues lleis sota les quals l'EPA dirigia el procés de regularització pel registre de plaguicides i el seu ús als Estats Units. El que proposaven era molt semblant a la proposta de l'OCDE. Es van incorporar nous requeriments en aquestes dues lleis, incloent el desenvolupament d'un programa d'investigació, utilitzant sistemes apropiats d'assaigs validats i informació científicament rellevant, per determinar si certes substàncies podien tenir efectes en humans que fossin semblants als efectes produïts per les hormones naturals, sobretot els estrògens. Sota el terme "certes substàncies" es van incloure tots els plaguicides i qualsevol altra substància que pugui tenir un efecte acumulatiu als efectes dels plaguicides si una gran part de la població s'exposa a aquesta substància [69]. Aquest programa d'investigació es va crear per una banda per determinar si el compost avaluat té potencial o no per interaccionar amb el sistema hormonal dels estrògens, els andrògens i el sistema de la tiroïdes i per una altra banda per proporcionar una caracterització definitiva dels compostos capaços de trencar algun dels sistemes hormonals. Així, al cap d'uns mesos l'EPA va establir el *Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee* (EDSTAC) per investigar i avaluar els plaguicides i altres compostos químics del seu potencial per a trastornar el sistema endocrí [70].

Tant la Comissió de l'EU com el comitè format per l'EPA es van plantejar objectius similars:

- Desenvolupar una estratègia per seleccionar i prioritzar els compostos químics a investigar i avaluar.
- Definir un procés per identificar-ne de nous i crear assaigs d'investigació.
- Determinar quines proves definitives s'haurien d'usar i quan començar les investigacions.
- Identificar mecanismes per estandarditzar i validar les investigacions i les proves realitzades.

Actualment, la Comissió Europea ha aplicat l'Estratègia Comunitària en matèria d'alteradors endocrins [21] i l'EPA, per altra banda, té establert el Programa d'Investigació pels alteradors endocrins (EDSP-*Endocrine Disruptor Screening Program*) [71]. A la Taula 2 es mostra un resum d'aquestes iniciatives portades a terme per l'EU i l'EPA respecte els alteradors endocrins.

Taula 2. Resum de les principals iniciatives portades a terme per la Unió Europea i l'EPA respecte els alteradors endocrins.

EU	
Iniciativa	Descripció
COM(2001) 262 final	Aplicació de l'Estratègia Comunitària en matèria d'EDs - substàncies de les quals se sospita que interfereixen en els sistemes hormonals d'éssers humans i animals.
COM(1999) 706 final	Publicació de l'Estratègia Comunitària en matèria d'alteradors endocrins.
SCTEE-1999	Es demana que la Comissió presenti un document normatiu per la identificació i avaluació de substàncies que afecten al sistema endocrí.
Parlament Europeu-1998	S'adopta una resolució per tal de millorar la legislació, reforçar els esforços en recerca i fer assequible la informació disponible al públic.
OCDE-1996	<i>European Workshop-"The Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife"</i> .
EPA	
Iniciativa	Descripció
Federal Register Notice-2002	Es publica <i>Proposed Chemical Selection Approach for Initial Round of Screening</i> , al Registre Federal 67 (2002) 79611-79629.
EDMVS-2001	S'estableix el <i>Endocrine Disruptor Methods Validation Subcommittee</i> (EDMVS) per donar suport tècnic i consell en els assaigs desenvolupats per determinar EDs.
Federal Register Noticie-1998	S'inclou l'informe del EDSTAC al Registre Federal 63 (1998) 71541-71568.
EDSTAC Final Report-1998	Després de la publicació d'aquest informe final s'estableix el <i>Endocrine Disruptor Screening Program</i> de l'EPA.
EPA-1997	Recopilació i publicació de bibliografia científica sobre EDs: <i>Special Report on Environmental Endocrine Disruptors. An effects assesment and analysis</i> .
EDSTAC-October 1996	L'EPA crea el EDSTAC per donar recomanacions sobre l'escombrat i assaig de plaguicides i altres compostos pel seu poder potencial per alterar el sistema endocrí.
FQPA i SDWA-Agost 1996	Requereixen a l'EPA el desenvolupament d'un programa d'assaig pels EDs.

L'EDSP inclou competències sobre els efectes dels EDs en humans i animals salvatges, la utilització d'assaigs *in vivo* i *in vitro* per la determinació dels efectes produïts en les hormones estrògenes, andrògenes i tiroïdals i l'avaluació de les substàncies químiques [72]. Les substàncies químiques a avaluar les classifiquen en 4 categories com es pot veure a la Figura 4. La categoria 1 correspon a aquells compostos dels quals es té suficient informació per determinar que no alteren el sistema endocrí. La categoria 2 correspon a aquelles substàncies de les quals no es té prou informació i es necessiten les dades que s'obtenen del primer escombrat per determinar si són EDs. La tercera categoria són aquells dels quals es té informació sobre l'escombrat però han de passar els assaigs corresponents. I la quarta són aquells sobre els quals es té suficient informació com per portar a terme una valoració de risc.

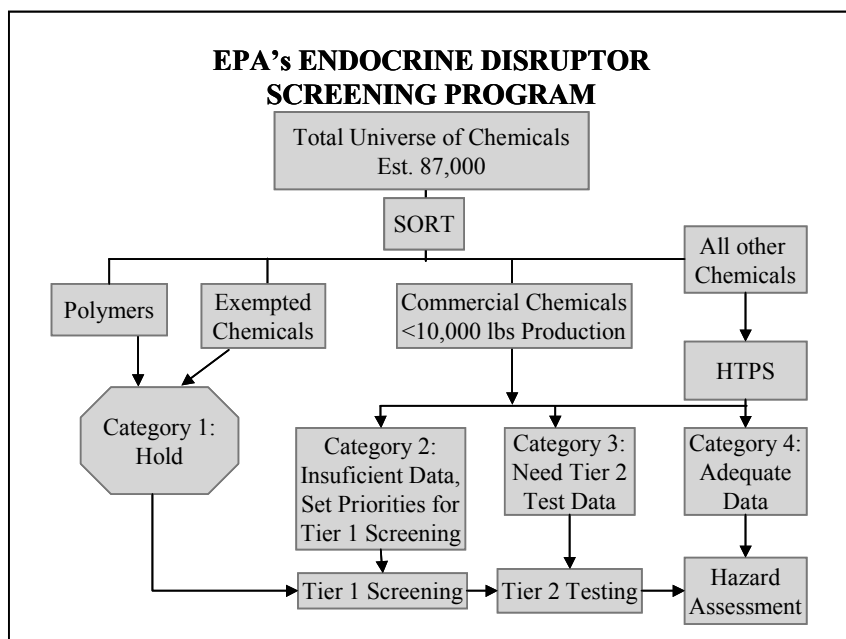


Figura 4. Esquema de l'avaluació de substàncies químiques de l'*Endocrine Disruptor Screening Program* [72].

L'estratègia comunitària de l'EU en matèria d'alteradors endocrins es planteja objectius molts semblants al Programa de l'EPA, però la llista prioritària de contaminants a avaluar inclou menys compostos que la de l'EPA. Aquesta llista conté 553 substàncies artificials i 9 hormones de síntesis o naturals, classificades també en 4 grups en funció de les dades que es tenen sobre el seu poder per alterar el sistema endocrí i en funció de si són o no objecte de regulació per l'EU.

Tot i que no hi ha una regulació específica pels EDs, algunes organitzacions com són la UNECE, el PNUMA i la comissió OSPAR han començat a controlar els contaminants orgànics persistents (*Persistent Organic Pollutants*-POPs) que són considerats EDs. Dins d'aquest conjunt de substàncies es troben compostos de diferents tipus com són els PCBs, els hidrocarburs aromàtics policíclics (PAHs), les dioxines, els furans i alguns plaguicides com el DDT, l'aldrin, el dieldrin, l'hexaclorobenzè, l'heptaclor,...

A més, existeixen algunes directives que són rellevants, ja que molts dels EDs han estat regulats, no com a possibles alteradors endocrins sinó com a contaminants ambientals. Per exemple, en la directiva 98/83/CE de l'EU es limita la concentració màxima permesa (MAC) de plaguicides en aigües destinades al consum humà en $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ per cada compost individual, excepte per l'aldrin, el dieldrin, l'heptaclor i l'epòxid d'heptaclor que és de $0.03 \mu\text{g l}^{-1}$, en $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ per la concentració total de plaguicides, en $0.10 \mu\text{g l}^{-1}$ per la concentració total de PAHs i $0.01 \mu\text{g l}^{-1}$ pel benzo(a)pirè. Però els valors establerts per l'EPA al Registre Federal del 2002 (EPA 816-F-02-013) són per cada compost individual i són valors molt més grans que els de l'EU, per exemple, per l'atrazina és de $3 \mu\text{g l}^{-1}$, per l'endrin de $2 \mu\text{g l}^{-1}$ i pel benzo(a)pirè de $0.2 \mu\text{g l}^{-1}$. En aquest registre però també apareix l'ftalat de bis(2-etilhexil) (DEHP) i l'adipat de bis-(2-etilhexil) amb uns MACs de $6 \mu\text{g l}^{-1}$ i 0.4mg l^{-1} , respectivament. Per aquests compostos l'EU encara no ha establert uns nivells de concentració, tot i que el DEHP ha estat inclòs a la llista de substàncies prioritàries en matèria de política d'aigües, aprovada en la Decisió 2455/2001/CE, junt amb altres contaminants considerats EDs com

són l'atrazina, el diuron, l'endosulfan, l'hexaclorobenzè, el lindà, el nonilfenol, l'octifenol, el pentaclorobenzè, alguns PAHs, la simazina i el TBT. A la Taula 3 es mostra un resum de les principals directives o registres de l'EU i l'EPA pel que fa a la qualitat de les aigües i al control de substàncies químiques perilloses.

Així, tot i que no hi ha una regulació específica, el tema dels EDs s'esmenta en la nova legislació (la directiva marc de la política d'aigües) i en el llibre Blanc relatiu a l'estratègia futura en matèria de productes químics i com s'ha comentat alguns d'aquests EDs estan inclosos en la llista de substàncies perilloses prioritàries en la Directiva Marc Europea d'Aigües 2000/60/EC i a la llista de contaminants prioritària de l'EPA (63 FR 10273). En general, però, es pot deduir que les concentracions màximes permeses que s'establiran en un futur seran de pocs $\mu\text{g l}^{-1}$, ja que per alguns d'aquests contaminants les normatives marquen concentracions màximes permeses sobre aquests valors i s'ha demostrat que la toxicitat endocrina es manifesta a concentracions molt baixes d'EDs.

Taula 3. Resum de les principals iniciatives portades a terme per la Unió Europea i l'EPA per la protecció de la qualitat de les aigües i en relació a substàncies químiques perilloses.

EU	
Iniciativa	Descripció
<i>Protecció i gestió de les aigües (*)</i>	
Decisió 2455/2001/CE	S'aprova la llista de substàncies prioritàries en l'àmbit de política d'aigües.
Directiva 2000/60/CE	S'estableix un marc comunitari d'actuació en l'àmbit de política d'aigües. Al 2007 es derogarà la legislació: Directiva 75/440/CEE; Decisió 77/795/CEE i Directiva 79/869/CEE. I al 2013, la directiva 76/464/CEE entre d'altres. S'estableixen els valors límits d'emissió i normes de qualitat medioambiental derivades de la directiva 76/464/CEE.
Directiva 88/347/CEE	Modifica l'Annex II de la Directiva 86/280/CEE, afegint els valors límits de l'aldrin, el dieldrin, l'endrin, el isodrin i l'hexaclorobenzè.
Directiva 86/280/CEE	Relativa als abocaments de substàncies perilloses. Modifica els valors límits de la llista I de l'Annex de la directiva 76/464/CEE.
Directiva 84/491/CEE	Relativa als abocaments d'hexaclorociclohexà. Modifica la directiva 76/464/CEE.
Directiva 80/68/CEE (**)	Prohibició o limitació en l'abocament de substàncies tòxiques en aigües subterrànies.
Directiva 76/464/CEE (**)	Prohibició o limitació en la contaminació de substàncies tòxiques en aigües interiors superficials, aigües marines territorials, aigües interiors litorals i aigües subterrànies.

Introducció

Qualitat d'aigües superficials destinades al consum humà i aigua potable

Directiva 98/83/CE	Defineix les normes de qualitat bàsiques que han de complir les aigües destinades al consum humà, establint valors límits per molts contaminants.
Directiva 79/869/CEE (**)	Relativa als mètodes de mesura i a la freqüència de mostreig i d'anàlisis d'aigües superficials destinades al consum humà.
Directiva 75/440/CEE (**)	En relació a la qualitat requerida per les aigües superficials destinades a la producció d'aigua potable. Estableix valors límits per alguns contaminants.

Aigües residuals

Directiva 98/15/CE	Modifica la directiva 91/271/CEE.
Directiva 91/271/CEE	Sobre el tractament d'aigües residuals urbanes, es pren consciència de la necessitat de tractar aquestes aigües.

Productes químics

Reglament (CEE) N° 793/93	Estableix un programa destinat a controlar el risc d'algunes substàncies químiques existents que figuren en el catàleg europeu de substàncies químiques comercialitzades.
Directiva 98/8/CE	Comercialització de biocides.
Directiva 96/61/CE	Prevenició i control integrats de la contaminació.
Directiva 91/414/CEE	Comercialització de productes fitosanitaris.
Directiva 90/642/CEE; 86/362/CEE	Límits màxims de residus de plaguicides en aliments i productes agrícoles.
Directiva 83/131/CEE	Prohibició d'alguns plaguicides pel seu ús en l'agricultura, ex. DDT.
Directiva 76/769/CEE	Sobre la limitació de la comercialització i ús de determinades substàncies i preparats perillosos. Conté una llista de substàncies i preparats i mesures, que s'ha anat modificant per diferents directives, incloent els bifenil policlorats, el pentaclorofenol i substàncies carcinogèniques, mutagèniques i tòxiques per la reproducció. L'última modificació (Directiva 2003/53/CE) inclou el nonilfenol i el nonilfenol etoxilat.
Directiva 76/464/CE	Sobre substàncies perilloses.

(*) aigües superficials continentals, de transició, costeres y subterrànies.

(***) Directives que quedaran derogades quan s'adopti la directiva marc 2000/60/CE.

EPA

Iniciativa	Descripció
-------------------	-------------------

Qualitat d'Aigua potable

EPA-Juliol 2002	Estableixen MACs en aigües potables per diversos contaminants classificats en microorganismes, desinfectants i subproductes, compostos orgànics, compostos inorgànics i radionuclis. EPA 816-F-02-013.
Federal Register-1998	<i>Final Drinking Water CCL-63</i> FR 10273-10287.
Federal Register-1997	<i>1st Drinking Water Contaminant Candidate List (CCL)-62</i> FR 52193-52219.

**I.2. TÈCNIQUES ANALÍTIQUES APLICADES A LA DETERMINACIÓ
D'ALTERADORS ENDOCRINS**

Tot i la gran quantitat d'estudis que han sorgit entorn als alteradors endocrins, hi ha encara moltes llacunes sobre la distribució ambiental i la seva toxicitat acumulativa a curt i llarg termini. Però, el fet de reconèixer que aquests compostos són contaminants a l'ambient i que poden contribuir a l'alteració endocrina a través de la seva acumulació en aliments, sediments i principalment en aigües, ha fet que en els últims temps prengui importància la necessitat de desenvolupar mètodes altament específics i sensibles aplicables a l'anàlisi de traces en matrius ambientals complexes.

La determinació de contaminants en mostres mediambientals és sovint complicada degut a la complexitat de les matrius i al baix nivell de concentracions en què es troben aquests contaminants. Per això, per tal de conèixer en quina concentració es troben en el medi i per determinar la seva persistència, tots aquests mètodes es basen generalment en l'aplicació d'una tècnica d'extracció i preconcentració, per tal de separar els compostos de la matriu i augmentar la seva concentració, seguida d'una tècnica de separació que permeti separar els diferents analits entre ells i d'altres substàncies interferents presents en la mostra, i que permeti determinar a nivells traça els compostos estudiats.

En la present tesi s'han seleccionat varis compostos amb capacitats conegudes o sospitoses d'alterar el sistema endocrí que pertanyen a diferents famílies i amb un origen tant antropogènic com natural. Segons la classificació feta en l'apartat anterior, dins dels d'origen farmacèutic s'han seleccionant els esteroids sexuals naturals i sintètics, tenint en compte també algun compost no esteroïdal però amb les mateixes aplicacions que els esteroids sexuals. I dins dels alteradors endocrins mediambientals s'han seleccionat, per la seva gran utilització industrial, els alquilfenols, els ftalats, els plaguicides i altres com són, el bisfenol A i el benzo(a)pirè.

A continuació, es fa un estudi bibliogràfic on s'exposaran els mètodes emprats per la determinació d'aquests compostos i les tendències futures degut al desenvolupament de noves tècniques analítiques. Cada família de

compostos s'introduirà amb una breu descripció de la seva estructura química, les seves principals aplicacions, toxicitat i nivells en què es troben en el medi, per continuar per una banda amb l'estudi de les tècniques cromatogràfiques utilitzades i per una altra banda, amb l'estudi de les tècniques d'extracció on s'inclouen també les etapes de tractament de la mostra més rellevants en els casos que són necessàries.

I.2.1. ESTEROIDS SEXUALS NATURALS I SINTÈTICS

Aquest apartat se centra en els esteroïds sexuals, tant naturals (estrògens endògens) com sintètics (estrògens exògens), que afecten el sistema reproductor femení. Aquests compostos també són coneguts com estrògens mediambientals o xenoestrògens o ecoestrògens, degut a què aquests termes s'apliquen a qualsevol substància química, esteroïdal o no esteroïdal, capaç de provocar una disfunció en el sistema reproductiu femení independentment de la seva estructura química o mecanisme d'acció.

Els principals estrògens produïts en els ovaris són el 17 β -estradiol, el 4-androsteno-3,17-diona i la progesterona. D'altra banda la placenta, a més de secretar l'estradiol i la progesterona, també produeix una altra substància, l'estriol. En el plasma sanguini de la dona s'han arribat a aïllar 6 estrògens naturals, dels quals el 17 β -estradiol, l'estrone i l'estriol són els que es troben en quantitats més grans [4,7]. Com es pot veure en la Figura 5, l'estrone prové de l'oxidació reversible de l'estradiol que es dona en el fetge i aquest dos estrògens es poden convertir en l'estriol, estrogen quasi totalment inactiu.

Aquests estrògens són esteroïds de 18 carbonis, que contenen un anell fenòlic (A) i un grup β -hidroxil o cetona en la posició 17 de l'anell pentacetònic (D). L'anell fenòlic A és la principal característica estructural de la que depèn la unió selectiva i d'elevada afinitat a receptors estrogènics. A la Figura 6, es pot veure que les diferències estructurals es troben

principalment en l'anell D, en funció del tipus de grups funcionals que hi hagi en el carboni de la posició 16 o 17. L'estradiol, l'estrone i l'estriol es conjuguen pels grups hidroxil del carboni 3 i/o 17, en forma de sulfats, d'acetats o de glucuronats (17 β -estradiol-3-sulfat, 17 β -estradiol-17-sulfat, 17 β -estradiol-3,17-disulfat,...) que són els que circulen per la sang i els que més ràpidament són excretats per l'orina. Tot i així per l'orina també s'excreten traces d'esteroides lliures.

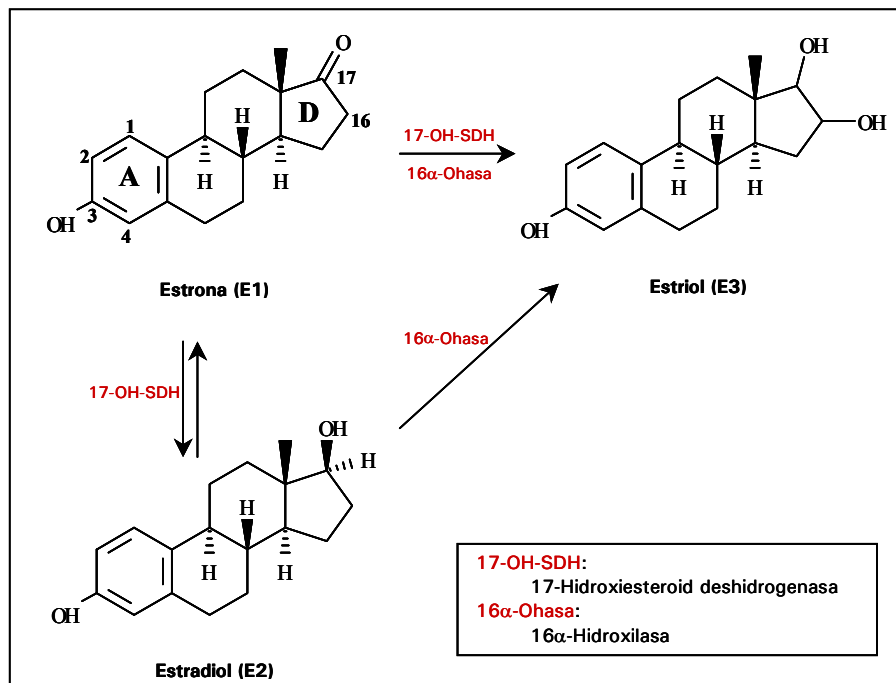


Figura 5. Via biosintètica dels 3 estrògens més importants del sistema reproductor femení.

Els estrògens lliures tenen una solubilitat aquosa baixa i són moderadament hidrofòbics. Són no volàtils i àcids febles. De les propietats fisicoquímiques dels estrògens conjugats no hi ha moltes dades, però se suposa que tenen

una solubilitat en aigua més gran que els estrògens lliures degut als seus grups funcionals sulfats, acetats i glucorònids polars.

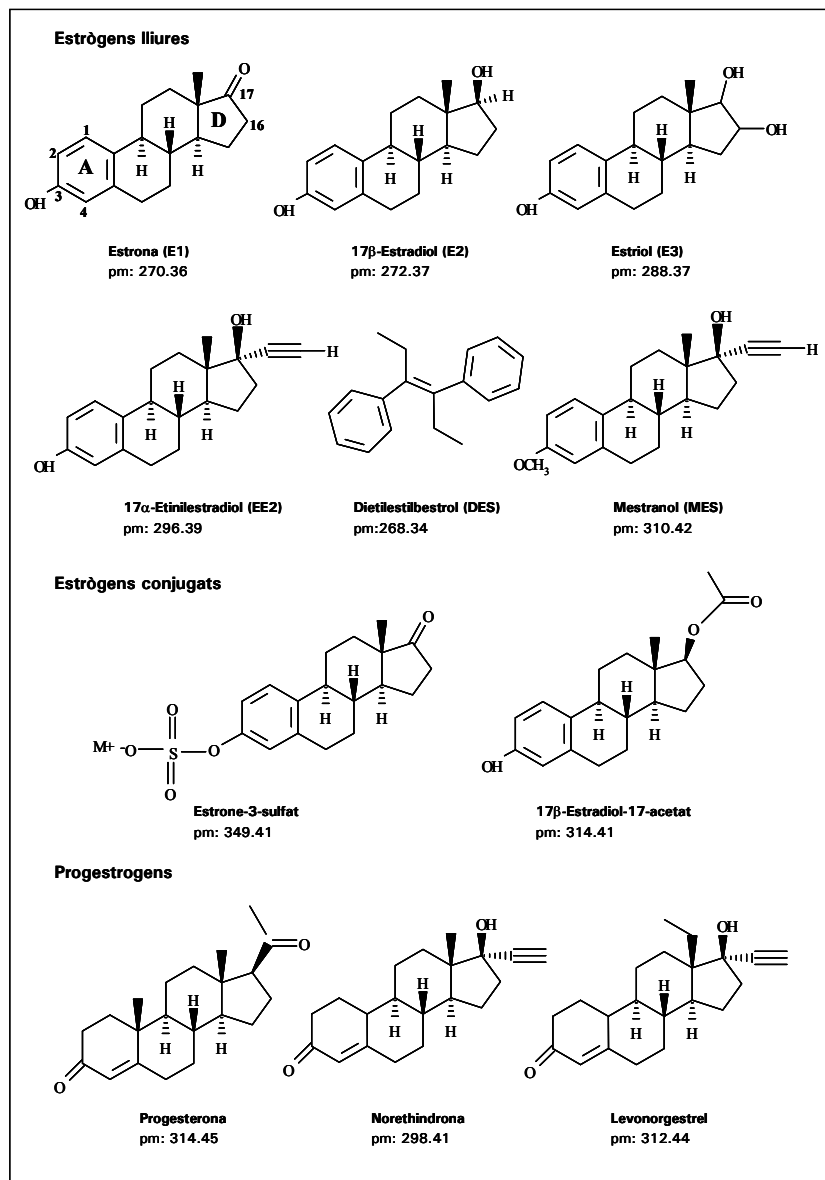


Figura 6. Principals estrògens lliures, conjugats i progèstogens.

L'etinilestradiol i el mestranol són exemples d'esteroids sintètics amb una gran activitat estrogènica. La principal diferència amb els estrògens naturals és que són actius tant per via bucal com per injecció. Un dels primers estrògens no esteroïdal que es va sintetitzar és el dietilestilbestrol (DES), que és similar des del punt de vista estructural a l'estradiol quan s'observa en la conformació trans. Aquest compost, tot i no ser esteroïdal, generalment s'engloba dins d'aquests per la seva utilitat. L'activitat estrogènica que presenta és més intensa que l'estradiol i a més també és actiu per via oral. El DES va ser receptat entre el 1940 i el 1971 per ajudar a les dones amb certes complicacions durant l'embaràs. Més tard, es va descobrir que la seva efectivitat no era l'esperada. Quan s'administrava durant els cinc primers mesos de l'embaràs, el DES podia interferir en el desenvolupament del sistema reproductiu en el fetus. Cap el 1971 es va descobrir una relació entre el DES i el càncer desenvolupat en fills de dones que havien utilitzat aquest estrogen durant l'embaràs [36].

Tots aquests estrògens són àmpliament utilitzats, principalment en formulacions anticonceptives i pel tractament de les funcions hormonals com són la menopausa. En l'Annex I es pot veure més detalladament quina és la principal utilització de cada un d'aquests estrògens.

Els estrògens naturals i sintètics han estat identificats com els principals contribuïdors al fenomen d'alteració endocrina, ja que són els que tenen major potència estrogènica a baixos nivells de concentració. Com ja s'ha comentat són excretats amb l'orina dels mamífers, principalment en la seva forma conjugada. Degut a la solubilitat en aigua que tenen aquestes formes conjugades es troben principalment en el medi ambient aquàtic. Tot i que els esteroids conjugats no tenen una activitat biològica directa, poden actuar com a precursors dels esteroids lliures a través dels bacteris que pugui haver en el medi ambient. És per això que les estacions depuradores d'aigües residuals (EDARs) tenen un paper molt important. Tot i que les EDARs redueixen els nivells d'estrògens lliures [38], no ho fan sempre als nivells als quals els peixos no són afectats i, a més, sempre hi ha la possibilitat de la

hidròlisi del estrògens conjugats. Per això, les metodologies analítiques per determinar aquests compostos es desenvolupen tant per ser aplicades a aigües d'entrada com de sortida d'EDARs. Tot i així, el desenvolupament de metodologies per aigües de rius i mar properes a aquestes EDARs, són també importants pel control de la distribució d'aquests estrògens en el medi ambient.

Tot i així, degut la relativa baixa polaritat d'aquests compostos, la seva adsorció en sediments sembla ser un procés acumulatiu possible. Per això també s'han desenvolupat mètodes per la seva determinació en sediments i fangs [73-75], tot i que s'ha comprovat que l'adsorció d'alguns estrògens, com son l'estrona i el 17 β -estradiol, és relativament lenta i baixa, quedant majoritàriament en la fase aquosa [76]. En mostres fisiològiques, com són orina, cabell, sèrum o esperma, també s'han desenvolupat varis mètodes per determinar els esteroids naturals per portar un control del paper dels estrògens en el càncer de pit i ovaris o per controlar l'ús d'hormones (prohibit per la Comunitat Europea) administrades per a promoure el creixement del bestiar [77,78].

Els efectes en les gònades, com són feminització, desmasculinització, reducció de la mida i reproducció han estat observats en peixos d'aigües on les concentracions eren entre 1 i 100 ng l⁻¹ de 17 β -estradiol i estrona [56]. Per tant, la determinació analítica d'estrògens a les concentracions fisiològicament actives requereix la utilització de mètodes molt selectius i sensibles, els quals en molts casos fan necessari la utilització d'un pas d'extracció.

Generalment, els esteroids naturals i sintètics s'han trobat a les aigües mediambientals a nivells entre 0.04 i 270 ng l⁻¹ [79,80]. Els nivells més elevats es troben a les aigües d'entrada i sortida de les EDARs. En aigües de rius els nivells varien en funció de la proximitat a aquestes EDARs [81].

I.2.1.1. Tècniques de separació

Les tècniques de separació utilitzades per la determinació d'estrògens han estat principalment la cromatografia de gasos (GC) utilitzant sistemes de derivatització previs i la cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC) en fase inversa. Tot i així, l'aplicació de l'electroforesi capil·lar (CE) també ha sorgit recentment com una alternativa a la HPLC per compostos no volàtils o tèrmicament làbils. Per una altra banda, també juguen un paper molt important les tècniques immunoquímiques, utilitzades principalment per determinar l'activitat alteradora endocrina dels compostos o mostres i els efectes que poden tenir en els organismes, però també per la determinació individual d'estrògens.

Tot i les característiques d'aquests estrògens, que fan necessària una etapa de derivatització per la utilització de la GC, aquesta tècnica ha estat la més utilitzada per la separació, identificació i quantificació d'estrògens [74,81-94]. Això s'ha donat principalment per la senzillesa que presenta l'acoblament de la GC a l'espectrometria de masses (MS), detector amb un gran poder per realitzar anàlisis qualitatives i quantitatives i àmpliament utilitzat en les anàlisis de mostres mediambientals. Així la GC bàsicament s'ha utilitzat acoblada a la MS, i en alguns casos a la MS en tàndem, per la determinació d'estrògens i progestrògens en mostres mediambientals.

La separació cromatogràfica s'ha portat a terme utilitzant columnes capil·lars, principalment les de fase estacionària amb un 5% difenil-95% dimetilpolisiloxà [84-87,93]. Generalment, la tècnica *splitless* és la més utilitzada, tot i que darrerament s'han desenvolupats mètodes que utilitzen tècniques d'injecció de grans volums. Per exemple, Jeannot et al. [74] utilitzen un injector vaporitzador a temperatura programada per la introducció de 40 µl dels extractes derivatitzats al cromatògraf.

Tant la MS convencional com la MS en tàndem generalment s'utilitzen en el mode d'ionització per impacte electrònic (EI) a 70 eV

[81,84,86,87,89,91,92,94]. Alguns autors també han utilitzat la ionització química negativa (NCI) amb metà com a gas reactiu per la determinació d'aquests estrògens [85,88,90,95,96], però rarament s'ha utilitzat aquest sistema d'ionització per treballar amb la MS en tàndem [90]. Generalment, la MS amb trampa d'ions és la tècnica que s'utilitza per treballar en tàndem [74,83,89,90].

És habitual la quantificació en el mode de monitorització de l'ió seleccionat (SIM), tot i que en els casos que es té un elevat factor de preconcentració, el mode *full-scan* permet realitzar les determinacions quantitatives i qualitatives. Els límits de quantificació instrumentals de la GC-MS i GC-MS-MS obtinguts per Quintana et al [89] per la determinació d'estrògens són entre 7-20 $\mu\text{g l}^{-1}$ i entre 3-10 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectivament. Aquests límits no difereixen molt, però la quantificació d'estrògens en aigües residuals, utilitzant com a sistema de preconcentració l'extracció en fase sòlida (SPE) en mode *off-line*, només la poden realitzar per GC-MS-MS degut a la complexitat d'aquest tipus de mostres.

Generalment, per millorar l'estabilitat d'aquests estrògens i la sensibilitat i precisió de les anàlisis per GC-MS o GC-MS-MS, els analits són derivatitzats a través dels grups hidroxils de l'anell esteroïdal abans de la seva determinació, per tal d'augmentar la seva volatilitat i estabilitat tèrmica. Quan s'utilitza GC-(NCI)MS, la sensibilitat més elevada s'obté amb els derivats pentafluorobenzil [88,90] i pentafluorobenzoil [85,95] i altres derivats que contenen fluor, preparats a partir d'altres reactius, com són l'àcid heptafluorobutíric, l'àcid trifluoroacètic [96] i l'àcid heptafluoropropiònic [81,86]. Per GC-(EI)MS o tàndem MS (amb trampa d'ions), la derivatització més usada és la sililació, formant els éters d'alquilsilil corresponents [74,84,87,89,93]. Per formar aquests éters, els agents derivatitzants més usats són el N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) i el N-(*tert*-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA). Però, recentment s'ha trobat que aquests agents presenten un problema. Els derivats de l'etinilestradiol es converteixen parcialment en derivats de

l'estrone durant la derivatització o la separació cromatogràfica [93]. Un altre agent de sililació usat alguns cops és el dimetildiclorosilà [83]. Els valors de massa-càrregues (m/z) seleccionats per la quantificació en el mode SIM dependran en cada cas de l'agent derivatitzant utilitzat.

La HPLC s'ha utilitzat per a la determinació d'estrògens i progestrògens acoblada a detectors de díodes en fila (DAD) [60,75,97,98] o de fluorimètric (FD) [58,99], però en els últims anys el sistema de detecció acoblat a la HPLC majoritàriament utilitzat ha estat la MS [60,75,79,97,98,100-107]. Degut al desenvolupament de noves interfases per acoblar la MS a la HPLC i al tediós pas de derivatització necessari en la GC, la HPLC-MS ha anat guanyant terreny progressivament a la GC-MS en la determinació d'estrògens i progestrògens en mostres aquoses. Això es veu reflectit en les diferents revisions bibliogràfiques que s'han anat publicant sobre l'aplicació de HPLC-MS a la determinació d'EDs [63,108-110] i sobretot, en la recent revisió publicada sobre l'aplicació de la MS en tàndem a la HPLC per la determinació d'hormones esteroïdals sexuals, fàrmacs i surfactants alquilfenòlics en el medi ambient aquàtic [108].

Els estrògens naturals i sintètics tenen grups cromòfors que es poden utilitzar per a la seva determinació a longituds d'ona específiques (197 nm per estrògens i 297 nm per progestrògens). Tot i així, quan s'utilitza un DAD, la selectivitat i la sensibilitat d'aquesta tècnica no permeten la determinació d'aquests compostos en matrius tan complexes com les aigües residuals, als baixos nivells als quals normalment estan presents.

La separació cromatogràfica generalment es porta a terme amb fases estacionàries d'octadecilsilà (25 cmx4.6 mm I.D., 5 μ m de mida de partícula) i utilitzant com a fase mòbil mesclades d'aigua-acetonitril i gradients d'elució des de 20-50 a 100% de solvent orgànic.

Quan s'acobla la HPLC a la MS, les interfases més utilitzades per la determinació d'esteroids naturals i sintètics són les d'ionització a pressió

atmosfèrica (API). Per a la determinació de progestrògens s'han utilitzat tant la ionització per electroesprai (ESI) com la d'ionització química a pressió atmosfèrica (APCI), ambdues en mode positiu [75,98]. Normalment la fragmentació que es dona és poca i els adductes de la molècula d'analit amb un àtom de sodi $[M+Na]^+$ formats amb la interfase ESI i l'ió molecular protonat $[M+H]^+$ en APCI, són els ions predominants que se seleccionen per obtenir la màxima sensibilitat en SIM. Per a la determinació d'estrògens aquestes interfases s'utilitzen majoritàriament en el mode negatiu d'ionització (NI), però la interfase ESI és la més utilitzada [60,75,79,98,100,101,104-107] degut a l'elevada sensibilitat que té per la majoria d'estrògens comparada amb la d'APCI en el mode NI i la ESI en el mode positiu d'ionització (PI) [79,98]. L'APCI en el mode PI també ha estat provada per la determinació d'estrògens en estudis recents i s'ha trobat que utilitzant la MS en tàndem amb aquesta interfase s'obtenen sensibilitats comparables en molts casos a les que s'obtenen per GC-MS [103].

Tot i així, la fragmentació dels estrògens per HPLC-(ESI)MS en el mode NI també és molt feble donant únicament l'ió desprotonat $[M-H]^-$. La quantificació es realitza seleccionant aquest únic ió majoritari en el mode SIM. Per això, en els casos que es té disponibilitat de treballar amb la MS en tàndem, aquesta s'utilitza per tal de poder realitzar la confirmació dels analits d'una manera més acurada. Tot i així, quan es treballa amb HPLC-MS s'estableixen diferents criteris per realitzar la confirmació. Per exemple, Céspedes et al. [60] utilitzen la HPLC-(ESI)MS en el mode NI per a la determinació d'estrògens i relacionar la presència i concentració d'aquests estrògens amb l'activitat estrogènica determinada en les mateixes aigües superficials. Per portar a terme la confirmació dels analits tenen en compte l'anàlisi en el mode *full-scan*, buscant que hi hagi correspondència entre els temps de retenció i l'espectre enregistrat en el mode d'ionització corresponent. Per una altra banda, López de Alda et al. [98] utilitzen un DAD junt amb la (ESI)MS en el mode NI per la determinació d'estrògens. En aquest cas per portar a terme la confirmació tenen en compte l'espectre ultravioleta enregistrat i la comparació dels temps de retenció que obtenen

utilitzant dues columnes analítiques diferents. Consideren que l'aproximació de comparar aquests temps de retenció és més fiable que basar-se en la comparació dels senyals de MS obtinguts per dos o més ions d'un compost la mateixa anàlisi cromatogràfica.

En la HPLC-MS en tàndem, la quantificació es realitza recollint els diferents ions resultants de la fragmentació dels ions precursors per la dissociació induïda col·lisionalment (CID) en el mode de monitorització de reacció múltiple. En la Figura 7 es mostren els espectres obtinguts en CID per 3 estrògens en el mode *full-scan*. Els ions majoritaris que s'obtenen provenen d'un trencament de l'anell. Per exemple, en el cas de l'estradiol els ions m/z 183 i 145, provenen de la pèrdua de $C_5H_{12}O$ i $C_8H_{14}O$, respectivament. Aquesta fragmentació dóna més informació dels analits per la seva confirmació, però tot i així alguns autors estableixen uns criteris de confirmació per la identificació dels analits, com són per una banda que els temps de retenció dels analits no han de diferir més d'un 2% dels temps de retenció dels estàndards. I per una altra banda, les abundàncies relatives absolutes de com a mínim dos ions de transició seleccionats no han de diferir més d'un 20% de les abundàncies dels ions obtinguts a partir dels estàndards [111-113].

Per millorar la sensibilitat quan s'utilitza la interfase ESI en el mode NI molts autors proposen la utilització de modificadors de la fase mòbil per tal de promoure la desprotonització dels estrògens amb una acidesa més feble. Els modificadors que generalment s'utilitzen són solucions metanòliques d'amoníac i trietilamina (TEA). Aquests modificadors es poden afegir a la fase mòbil tant abans com després de la separació cromatogràfica.

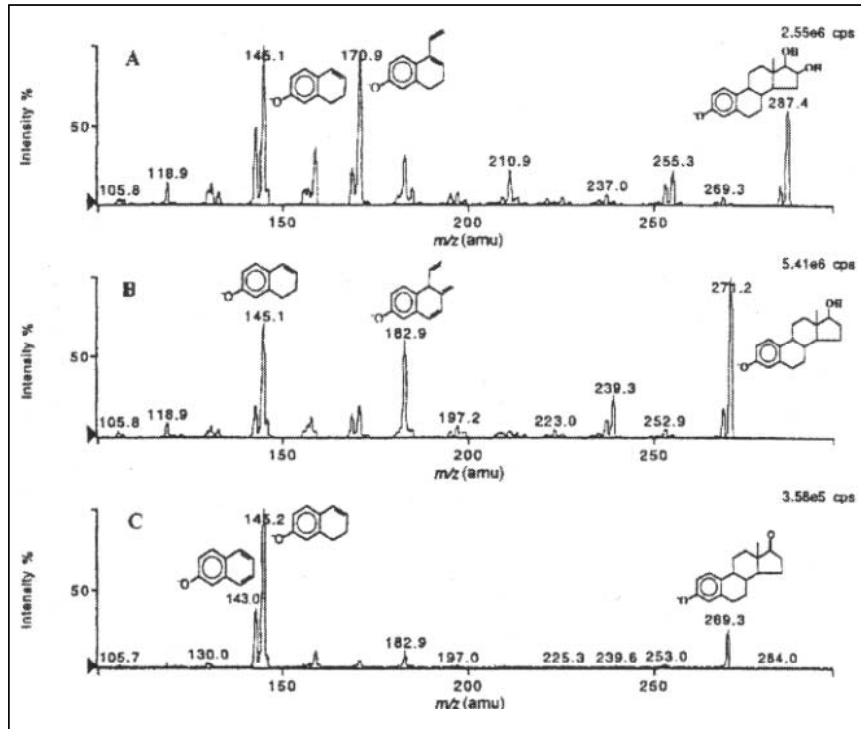


Figura 7. Espectres CID en el mode *full-scan* de (A) estriol, (B) estradiol i (C) estrona [112].

La influència de diferents composicions de fase mòbil en l'eficiència d'ionització d'una interfase d'ESI i en l'efecte matriu ha estat estudiada per varis autors [101,105] sent la mescla d'aigua-acetonitril, sense addició de bases o sistemes tampó, la millor condició per la ionització òptima dels estrògens. La utilització de solvents orgànics, com són l'acetonitril o metanol, augmenta l'eficiència d'ionització, principalment quan s'utilitza acetonitril, però en les condicions no aquoses d'un sistema de gradient, es dóna una reducció de la dissociació electrolítica dels analits i de la solvatació dels ions resultants i, per tant, la utilització d'un 100% de fase mòbil orgànica s'ha d'evitar. La utilització d'additius a la fase mòbil com són

l'hidròxid d'amoni, la isopropilamina i la TEA, usades tant per millorar la separació en HPLC com l'eficiència d'ionització en mode negatiu, no resulten efectives, arribant fins i tot a produir un efecte negatiu en la ionització, com és el cas de la TEA. Els tampons, com són els volàtils d'àcid fòrmic-formiat d'amoni o àcid acètic-acetat d'amoni, i els àcids febles, com són l'àcid acètic i el fòrmic, que sovint s'utilitzen per millorar les condicions cromatogràfiques, s'ha comprovat que provoquen una elevada supressió iònica, a més d'una significant influència en l'efecte matriu. Tot i així, algun cop s'ha utilitzat l'addició *post-column* d'un agent bàsic per promoure la desprotonació dels estrògens amb una acidesa feble, resultant en un augment dràstic de la resposta en un sistema (ESI)MS [79,112].

En una publicació sobre els avenços en les anàlisis per MS de EDs en mostres aquoses mediambientals, es pot veure que des del 2000 la majoria de mètodes utilitzen HPLC-MS [109]. El principal avantatge de la GC-MS és la disponibilitat d'extenses llibreries d'espectres útils per la identificació de pics desconeguts en fraccions estrogènicament actives, però la HPLC-MS permet la determinació de les formes conjugades i no conjugades dels estrògens sense haver de derivatitzar. Croley et al. [114] han desenvolupat tres mètodes utilitzant la MS per la determinació d'estrògens naturals i sintètics en matrius mediambientals. Comparen HPLC-MS (en SIM), HPLC-MS-MS, ambdues amb una interfase d'ESI en el mode NI, i GC-MS-MS amb trampa d'ions. Per la HPLC-MS (en SIM) obtenen un límit de detecció (LOD) al voltant dels $200 \mu\text{g l}^{-1}$, per GC-MS-MS obtenen límits de quantificació entre $2\text{-}20 \mu\text{g l}^{-1}$ i per HPLC-MS-MS obtenen LODs al voltant de $5 \mu\text{g l}^{-1}$. Tot i que en termes de sensibilitat i selectivitat tant la GC-MS-MS com la HPLC-MS-MS són comparables, els autors conclouen que l'últim mètode demostra ser el més prometedor, degut a què la MS en tàndem permet augmentar la sensibilitat i especificitat de l'anàlisi, sense l'inconvenient que presenta la preparació de la mostra en GC. En un altre estudi [111] on es comparen la GC-MS (en SIM), HPLC-(ESI)MS (en SIM) en el mode NI i HPLC-(ESI)MS-MS (en el mode d'aquisició de dades *selected reaction monitoring*) en el mode NI i obtenen LODs entre $1\text{-}10 \mu\text{g l}^{-1}$, $0.5\text{-}10 \mu\text{g l}^{-1}$ i $0.5\text{-}2 \mu\text{g l}^{-1}$, respectivament, arriben a la mateixa conclusió. En

termes de sensibilitat, la GC-MS (en SIM) o la GC-MS-MS i la HPLC-MS-MS són comparables o l'última una mica superior. En termes de precisió i repetibilitat les dues tècniques són satisfactòries excepte pel que fa al pas de derivatització normalment necessari per GC-MS que és un procés molt laboriós i pot ser una font important d'inexactitud.

La utilització de MS amb simple o triple quadrupol en HPLC-(ESI)MS en el mode NI també ha estat comparada en aquest últim estudi comentat [111]. Els LODs obtinguts quan treballen amb un quadrupol simple han estat entre 0.5-10 $\mu\text{g l}^{-1}$ i amb el triple quadrupol entre 0.1-1 $\mu\text{g l}^{-1}$. En aquest treball es pot veure que la utilització d'un triple quadrupol augmenta la selectivitat i la sensibilitat de la determinació, resultant en LODs millors que els que s'obtenen amb un quadrupol simple.

Com ja s'ha comentat en el capítol I.1, les tècniques bioquímiques han estat àmpliament utilitzades, però principalment per determinar l'activitat alteradora endocrina dels compostos o mostres (assaigs *in vitro*) i els efectes que poden tenir en els organismes (assaigs *in vivo*). Tot i així, aquestes tècniques han estat utilitzades per alguns autors per la quantificació dels estrògens individuals. Els bioassaigs principalment aplicats a la determinació d'estrògens en aigües han estat els immunoquímics, com són l'*enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) [115-117] i l'assaig radioimmunoquímic (RIA) [58] o basades en receptors estrogènics, com és la *recombinant yeast assay* (RYA) [62]. Els límits de detecció que s'obtenen amb aquests assaigs estan entre els ng l^{-1} i els pg l^{-1} . Per exemple, utilitzant abans de la seva determinació una tècnica de preconcentració com és la SPE, per l'estradiol es van obtenir límits de detecció entre 0.1 i 10 ng l^{-1} utilitzant els assaigs ELISA i al voltant de 107 pg l^{-1} utilitzant la detecció radioquímica (RIA). Aquestes tècniques presenten algunes avantatges respecte les tècniques analítiques convencionals degut a la seva fàcil manipulació, als petits volums de mostra necessaris i l'elevada sensibilitat que presenten, però estan limitades per la disponibilitat d'anticossos o receptors específics i a la reactivitat creuada que es pot donar en alguns casos [118]. Per això, la

tendència és a utilitzar aquestes tècniques biològiques combinades amb tècniques cromatogràfiques per determinar l'estrogeneïtat total d'una mostra i relacionar-la amb els compostos individuals que apareixen en ella [60,118].

El desenvolupament de tècniques electroforètiques s'ha portat a terme per la determinació de diferents EDs no volàtils o tèrmicament làbils, que no són analitzables directament per GC-MS. Tot i les limitacions que presenta l'electroforesi capil·lar en l'anàlisi mediambiental, com són la sensibilitat, que depenen de la matriu i la força iònica de la mostra, té l'avantatge de la facilitat que presenten els diferents modes de CE per la separació de compostos neutres en presència d'espècies més polars. A més, recentment ha sorgit la possibilitat d'utilitzar aquestes separacions en combinació amb la MS com a mecanisme de detecció per augmentar la sensibilitat.

Els tipus de CE utilitzats per a la determinació d'esteroids sexuals han estat l'electroforesi capil·lar per zones (CZE) [119], la cromatografia capil·lar miscel·lar electrocinètica (MEKC) [119-123] i la de microemulsió electrocinètica (MEEKC) [124]. La CZE, principalment utilitzada per a la determinació de compostos iònics, i la MEKC, que s'utilitza tant per compostos iònics com neutres, s'han comparat per la determinació d'un grup de EDs format per estrògens i fenols [119]. La CZE no té el potencial de separar tots els compostos analitzats entre ells, però sí que s'obté una bona resolució pels més polars, com són els estrògens. Tot i així, la tècnica més utilitzada per la determinació d'estrògens és la MEKC. L'aplicació de la MEEKC per la determinació d'estrògens és molt recent i el principal avantatge que presenta és la compatibilitat amb sistemes de detecció més sensibles com és el detector de fluorescència, gràcies a la transparència òptica que aporta la microemulsió.

Tot i així, el sistema de detecció més utilitzat en CE és l'ultraviolat-visible, però els petits volums injectats i el petit camí òptic, fan que aquest sistema de detecció tingui molt poca sensibilitat. Això és un obstacle important per la determinació dels estrògens en mostres mediambientals on es troben a

nivells traça. Per això, la preconcentració en línia de la mostra en CE representa un procediment efectiu i versàtil per augmentar la sensibilitat quan s'utilitza el detector UV. Aquest sistema de preconcentració en línia s'ha començat a aplicar per la determinació d'estrògens, obtenint-se límits de detecció comparables a les tècniques cromatogràfiques [125].

1.2.1.2. Tècniques d'extracció

La principal tècnica utilitzada per a l'extracció dels estrògens ha estat la SPE utilitzant tant discs com cartutxos. Els sorbents més freqüentment utilitzats han estat l'octadecilsilà [60,74,81,85,86,105], tot i que el carbó negre grafititzat [79,103,112] i els sorbents polimèrics [83,87-90,92,95,100,101,106,107], principalment el poliestirè-divinilbenzè (PS-DVB), també s'han utilitzat. En general, l'eficiència d'extracció pels estrògens és alta pels tres tipus de sorbents. Liu et al. [87] comparen diferents sorbents per la determinació d'estrògens extraient 500 ml d'aigua Milli-Q i tant amb sorbents de sílice enllaçades amb grups de C₁₈ (Isolute C18, 1 g) com amb polímers hidrofílics (OASIS HLB, 200 mg; Strata X, 200 mg) obtenen recuperacions superiors al 80% per l'estradiol, estrona i l'etinilestradiol.

En general quan es desenvolupa un mètode només per a la determinació d'estrògens el sorbent escollit és el l'octadecilsilà i quan es determinen EDs de diferents grups, com són estrògens junt amb alquilfenols i alguns plaguicides, s'utilitzen sorbents polimèrics. López de Alda et al. [98] comproven que per l'extracció quantitativa de l'estriol és més efectiva la utilització d'un sorbent d'octadecilsilà (LiChrolut RP-18, 500 mg) que els sorbents polimèrics que utilitzen (LiChrolut EN, 200 mg i Isolut ENV, 500 mg). En un treball posterior, comproven que l'extracció quantitativa de l'estriol amb sorbents polimèrics és possible amb volums de mostra inferiors a 250 ml [75]. Tot i així, hi ha estudis en què l'estriol és determinat quantitativament utilitzant el sorbent polimèric hidrofílic OASIS HLB per

realitzar la SPE [89,100]. Per exemple, utilitzant 60 mg d'OASIS HLB, Quintana et al. [89] aconseguixen extreure l'estriol junt amb altres hormones naturals i sintètiques amb recuperacions superiors al 80% preconcentrant 2 l d'aigua de riu o 1 l d'aigües de sortida o entrada de plantes de tractament d'aigües residuals. El volum d'aigua residual que es pot preconcentrar obtenint recuperacions quantitatives és relatiu, ja que depèn de la complexitat d'aquestes mostres. Hi ha estudis en què utilitzant 200 mg d'OASIS HLB només aconseguixen preconcentrar 100 ml d'aigua d'entrada i 250 ml d'aigua de sortida [107]. La utilització de sorbents d'octadecilsilà i polimèrics combinats en un mateix cartutx o precolumna també s'ha usat obtenint recuperacions millors (78%), fins i tot per l'estriol, que les que obtenen utilitzant un cartutx amb més quantitat de sorbent polimèric (23%) [84].

Un factor a tenir en compte en la SPE d'estrògens és el seu comportament hifrofòbic. Els estrògens tenen tendència a quedar adsorbits en filtres i material de plàstic com és el cos de propilè dels cartutxos de SPE donant com a resultat recuperacions no quantitatives [126]. Per això, sovint s'afegeixen a la mostra abans de la preconcentració petites quantitats de solvent orgànic, com per exemple un 1% de metanol per millorar la solubilitat d'aquests compostos en mostres aquoses [89,107].

La SPE, s'ha aplicat majoritàriament en mode *off-line*, tot i que també s'han desenvolupat alguns mètodes en línia acoblats a la HPLC [75,97].

La microextracció en fase sòlida (SPME) és una tècnica que presenta alguns avantatges front la SPE i també s'ha aplicat a la determinació d'estrògens. El principal avantatge que presenta respecte la SPE és la no utilització o molt poca de solvent orgànic i també s'ha aplicat per la determinació d'estrògens en mostres aquoses. Moeder et al. [127] han desenvolupat un mètode per la determinació de substàncies biològicament actives, entre elles alguns estrògens, utilitzant la SPME-GC-MS. La tècnica de SPME desenvolupada la comparen amb el mètode àmpliament utilitzat basat en la SPE amb

derivatització i posterior determinació per GC-MS pel que fa a la seva capacitat per la monitorització de contaminants en aigües residuals. El mètode de SPME que desenvolupen no necessita derivatització i la desorció tèrmica en el cromatògraf fa que aquest mètode sigui molt més ràpid i senzill que utilitzar la SPE amb derivatització. Una altra alternativa per la preconcentració d'estrògens en mostres aquoses utilitzant petites quantitats de solvents és l'extracció amb membranes de fibra (*hollow-fiber membrane*) [94].

Una alternativa a la SPE i SPME per aconseguir elevats factors de preconcentració consisteix en extreure grans volums de mostres aquoses, el mètode descrit per portar a terme això és l'extracció líquid-líquid contínua (CLLE). Kolpin et al. [128], van utilitzar un mètode basat en preconcentració d'1 l de mostra a través de la CLLC, derivatitzant-la i analitzant-la posteriorment per GC-MS per tal de monitoritzar hormones esteroïdals en corrents d'aigües residuals urbanes. Més recentment, Solimna et al. [91] han desenvolupat un mètode per la determinació d'un grup de contaminants que inclou els estrògens, utilitzant la CLLC en línia, seguida de GC-MS sense derivatització. La preconcentració és porta a terme amb 40 l d'aigua residuals de sortida per tal d'aconseguir un factor de preconcentració de 40000. D'aquesta manera aconsegueixen arribar a límits de detecció al voltant dels ng l⁻¹ sense necessitat de derivatitzar els estrògens.

Generalment, en mostres aquoses no és necessari portar a terme un pas de neteja. Però, quan les mostres aquoses són molt complexes, com podrien ser algunes mostres d'aigües residuals, la neteja és necessària i pot portar a un procediment amb múltiples passos. Com a etapa prèvia de purificació abans de la determinació per HPLC-MS, sovint s'ha utilitzat l'extracció amb immunosorbents [104]. La principal limitació de l'aplicació d'immunosorbents per l'extracció està en la dificultat de trobar anticossos pels contaminants, per això es preparen immunosorbents mixtes. Aquests immunosorbents són altament selectius i eliminen la majoria de les interferències relacionades amb la matriu que provoquen supressió iònica

quan la determinació es fa per HPLC-MS utilitzant la interfase d'electrosprai.

Tot i així, degut a les limitacions que presenten els immunoassaigs, principalment pel seu elevat cost, la llarga elaboració i la seva estabilitat en condicions d'anàlisi més extremes, alguns autors han considerat la necessitat de desenvolupar nous materials selectius per simplificar la determinació d'estrògens en matrius complexes. Aquests nous materials són els polímers d'empremta molecular (MIPs) utilitzats com a sorbents en la SPE. Els principals avantatges que presenten respecte els immunosorbents són la seva elevada reproductibilitat en la preparació, capacitat i estabilitat, tot i que en algun cas no són tant sensibles com la RIA en la determinació d'hormones esteroïdals en mostres molt complexes com són els fluids biològics [129]. Tarbin et al. [130,131] han desenvolupat diferents MIPs per la retenció selectiva de diverses hormones estrogèniques i altres compostos d'estructures similars.

I.2.2. ALQUILFENOLS I ALQUILFENOLS ETOXILATS

Els alquilfenols etoxilats (APEOs) són contaminants aquosos degut al seu ús com a surfactants no iònics en la producció de detergents industrials i domèstics. Els APEOs més comuns es formen a partir de les cadenes d'òxid d'etilè d'alquilfenols (APs) com són el 4-nonilfenol (4-NP) i 4-*tert*-octilfenol (4-*t*-OP). En diferents condicions de reacció, l'etoxilació d'aquests fenols forma una sèrie d'oligòmers d'entre 1 i 100 unitats d'etoxi. Cada APEO normalment consisteix en una mescla d'aquests oligòmers. L'estructura química d'aquests compostos alquilfenòlics es pot veure a la Figura 8.

Els surfactants són molècules que tenen un segment liposoluble i un altre hidrosoluble. En el surfactants no iònics, com és el cas dels APEOs les propietats hidrofíliques es donen per la hidratació dels grups èter o hidroxil de la cadena polietoxilada. Com més grups èter tenen per molècula, més

solubles són i per tant, el seu caràcter lipofílic disminueix. El caràcter hidrofòbic ve donat pel grup alquilfenil.

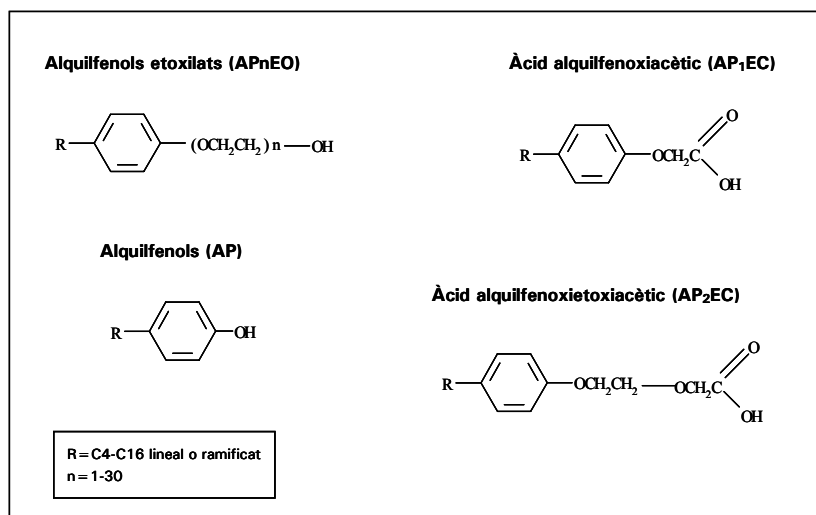


Figura 8. Estructura dels APEOs i els seus productes de degradació.

En els processos de tractament d'aigües residuals o en el medi ambient, els APEOs no s'eliminen completament [132]. Com es pot veure en la Figura 9 es degraden a APs i a APEOs amb cadenes etoxilades inferiors (AP_{n-1}EO) en condicions anaeròbiques i en condicions aeròbiques s'oxida la cadena etoxilada, formant principalment, àcid alquilfenoxiacètic o alquilfenol monocarboxilat (AP₁EC) i àcid alquilfenoxietoxiacètic o alquilfenol dicarboxilat (AP₂EC). El 4-NP i els seus derivats mono- i dietoxilats són els metabòlits més persistents.

Les propietats estrogèniques, toxicitat i persistència estan associades als productes de degradació dels APEOs, principalment al 4-NP i 4-*t*-OP. Però, tot i que la utilització dels APEOs s'ha anat reduint gradualment en molts països europeus i s'han substituït per altres surfactants com són els àcid

grassos i alcohols etoxilats o altres surfactants iònics, els APs també s'utilitzen com additius plastificants (veure annex I). Tot i així la seva aparició en el medi ambient és deguda principalment a la utilització dels APEOs.

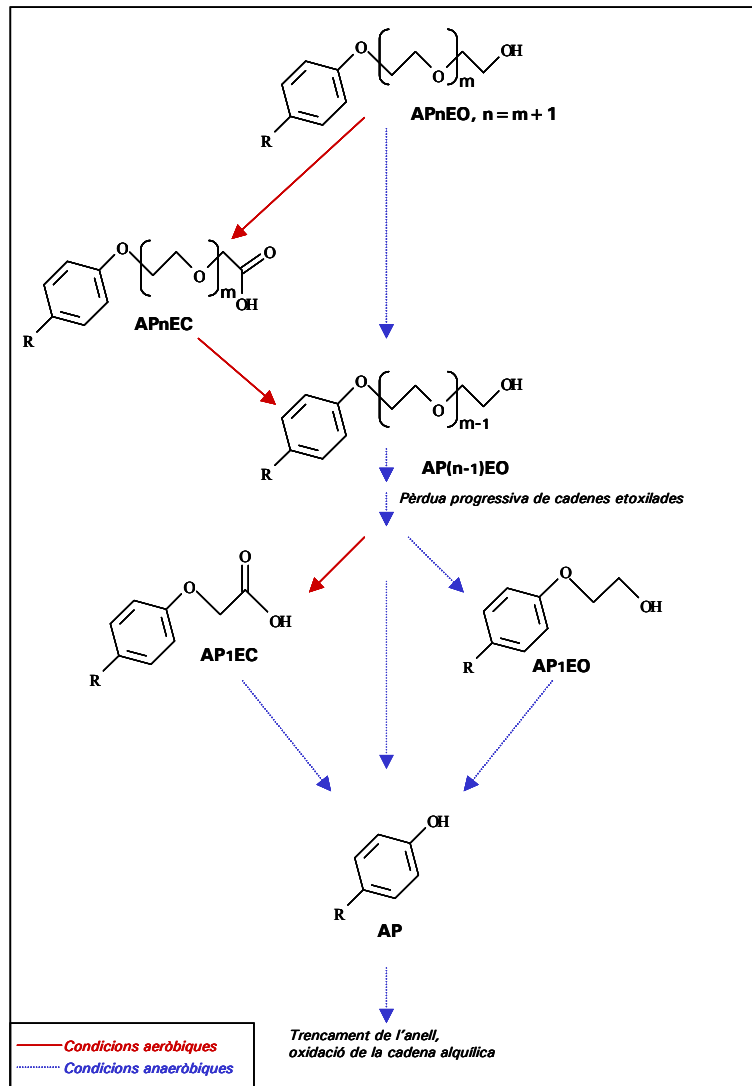


Figura 9. Ruta de degradació dels APEOs en el medi ambient [132].

Les investigacions demostren que els APs són estrogènics a baixos nivells (ng l^{-1}), però tot i que els APEOs no són considerats com EDs, sovint són analitzats simultàniament junt amb els seus productes de degradació, ja que la seva determinació simultània permet establir el grau de degradació dels APEOs i la identificació de les principals fonts de contaminació (descàrrega d'aigües no tractades, aigües residuals tractades o fangs).

En general, com més curta és la cadena etoxilada, més tòxic és el compost. Com s'ha vist en l'apartat de toxicitat, el 4-*t*-OP té 40 vegades més potència estrogènica que el 4-NP i NP₁EC.

Aquests compostos s'introdueixen en l'ambient a través de les plantes de tractament d'aigües residuals o dels fangs acumulats en vertaders. Per això, els APs i els seus derivats es poden trobar en sediments, rius i en les aigües residuals de les depuradores.

Els APs i APEOS es troben a nivells de $\mu\text{g l}^{-1}$. Per exemple, els APs es troben en mostres aquoses a concentracions entre 0.05 i 644 $\mu\text{g l}^{-1}$ [80,133], sent el 4-NP el que es troba sempre a nivells més alts. A diferència dels esteroïds naturals i sintètics, els nivells més elevats es troben tant en rius com en aigües d'entrada i sortida d'estacions depuradores d'aigües residuals, degut a què la seva àmplia utilització fa que la seva distribució mediambiental sigui més àmplia.

1.2.2.1. Tècniques de separació

Degut a l'àmplia utilització dels APEOs des de fa molts anys i a la seva coneguda problemàtica ambiental, la separació cromatogràfica dels APs i APEOs ha estat àmpliament estudiada, tal com demostra l'exhaustiu resum publicat el 1999 on s'exposen els mètodes analítics desenvolupats per la determinació del nonilfenol i compostos relacionats en mostres aquoses i fangs [134]. Tot i així, en el desenvolupament de metodologies per aquests

compostos es continua innovant, sobretot en el camp de l'acoblament de la MS com a sistema de detecció a les tècniques de separació, per tal d'obtenir mètodes rutinaris per la monitorització d'aquests compostos que permetin la seva identificació i quantificació en una mateixa anàlisi. Així, les publicacions més recents es basen en els diferents mètodes operacionals de la MS per aquestes compostos, sobretot en l'acoblament HPLC-MS [78,109,110,135].

Degut a la baixa volatilitat i elevada polaritat d'aquests compostos, la GC és més adequada per la determinació dels APs més volàtils i els APEOs amb menys de 4 grups etoxilats. Tot i així, la GC s'utilitza sovint com a mètode d'anàlisi rutinari en la determinació d'APs i d'APEOS en mostres ambientals, bàsicament acoblada a la MS [74,87,95,96,127,133,136-142], degut a la senzillesa d'aquest acoblament i l'elevada informació estructural que s'obté. Tot i així, per evitar problemes amb la volatilitat, sovint es porta a terme a través d'una etapa prèvia de derivatització que allarga els temps d'anàlisi.

La separació es porta a terme amb columnes capil·lars amb fases estacionàries de baixa polaritat, majoritàriament s'utilitza la formada per un 5% difenil-95% dimetilpolisiloxà. Degut a l'elevada resolució de les columnes capil·lars, pel 4-NP s'obté un grup de pics, que s'atribueixen a la presència dels isòmers de la cadena alquílica (Figura 10). Aquesta resolució també s'observa per cada nivell d'etoxilació del NPEO lliure o derivatitzat.

Els mètodes de derivatització s'han desenvolupat tant per acoblament en línia de la SPE a la GC, en *off-line* o per portar a terme l'extracció i la derivatització en el lloc de mostreig. La derivatització *off-line* s'ha portat a terme formant els corresponents èters d'alquilsilil [87,137] o els èsters d'acetil [96], de pentafluorobenzoil [95] o d'heptafluorobutil [96]. Els reactius normalment usats són el N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), el N-(*tert*-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida, l'àcid de trifluoroacetil (TFA), el clorur de pentafluorobenzoil i l'àcid d'heptafluorobutíric (HFB). Un mètode desenvolupat recentment utilitza un compost pentafluoroaromàtic per portar a

terme una derivatització que no requereix procediments molt complicats, grans quantitats de mostra aquosa, ni temps d'anàlisi llargs [133]. Amb l'extracció líquid-líquid que porten a terme obtenen un factor de preconcentració de 100 i preconcentrant 50 ml de mostra aquosa arriben a LODs al voltant de 10 ng l⁻¹, excepte pel 4-NP (mescla d'isòmers) que s'obté un LOD al voltant de 80 ng l⁻¹.

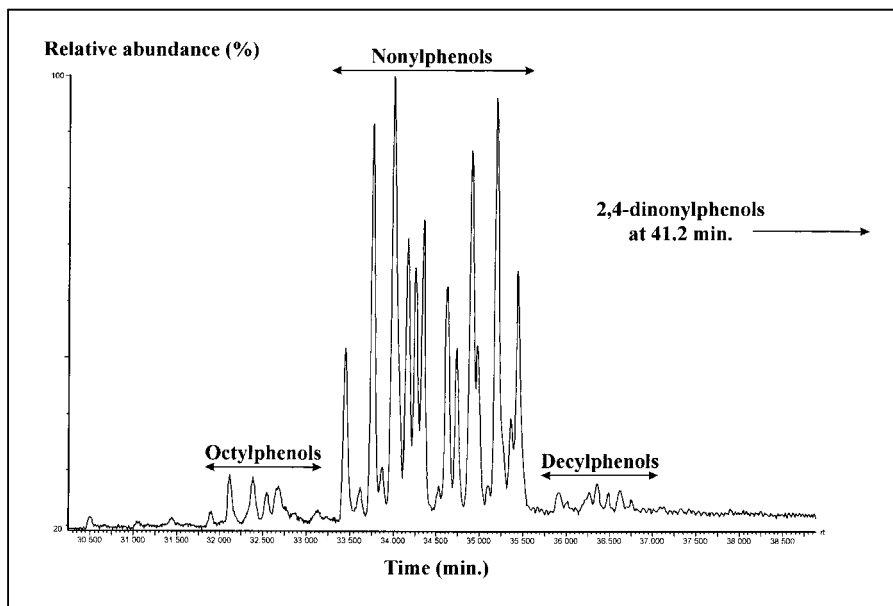


Figura 10. Cromatograma GC-MS d'una mescla tècnica de nonilfenol en el mode de *full-scan* [143].

En la majoria d'aquests mètodes el detector usat és la MS, tot i que en algun cas, en què s'utilitzen derivats que tenen grups halògens, el detector de captura d'electrons (ECD) també s'ha utilitzat junt amb la MS. Els LODs que s'obtenen no són tant bons com els obtinguts amb la MS i el sistema GC-ECD s'utilitza com a un mètode més de confirmació per comparació dels temps de retenció en una columna amb polaritat diferent a la que s'utilitza en el sistema GC-MS (en SIM) [95].

Generalment, la ionització quan s'utilitza la MS es realitza per EI [87,133,137,138,140], però en alguns casos, com quan es treballa amb derivats de HFB o TFA, el mode de detecció per EI dona massa fragmentació, cosa que pot ser un inconvenient per fer una segona fragmentació i disminuir els LODs per MS-MS. En aquests casos, s'utilitza la ionització química (CI) per obtenir compostos amb ions específics que no tenen molta fragmentació. En un estudi recent, s'ha comprovat que la millor ionització química pels derivats de HFB i TFA és en mode positiu [96]. En un altre estudi on es formen derivats de pentafluorobenzoil, obtenen una elevada sensibilitat utilitzant la MS amb el mode de NCI [95].

Una manera de millorar els LODs en GC, en lloc d'utilitzar la MS en tàndem, és utilitzant els mètodes que permeten la injecció de grans volums. Una comparació feta entre l'aplicació de GC-MS amb la injecció de 40 μl de mostra i GC-MS-MS amb injecció de 2 μl , demostra que els límits de quantificació pels derivats amb BSTFA són similars utilitzant les dues tècniques degut a l'aplicació de la injecció de grans volums en GC-MS [74].

En funció del factor de preconcentració que s'aconsegueix prèviament a la determinació cromatogràfica i per tant de la sensibilitat que es té, la quantificació es realitza a partir de les dades obtingudes en *full-scan*, extraient l'ió majoritari [133,137,138], o en SIM [87,140]. Però generalment l'adquisició de dades es fa en *full-scan* per a l'anàlisi qualitativa i en SIM per a l'anàlisi quantitativa. Tot i així, per l'adquisició de dades en SIM, generalment se seleccionen 2 ions, el majoritari per quantificar i un altre de característic per confirmar la presència de l'analit [95,136].

En funció del tipus d'injecció que es porta a terme, per a la quantificació es fa necessari l'ús de patró intern [133,137,138].

La determinació d'APEOs per HPLC es pot realitzar tant en fase inversa [144,145] com normal [146,147]. Quan s'utilitza la fase normal, els APEOS se separen en funció del nombre creixent d'unitats d'òxid etilè (que és el

que els marca el seu caràcter hidrofílic), mentre que els oligòmers corresponents amb el mateix número d'unitats etoxi però diferents substituents alquil coelueixen (Figura 11). En canvi en fase inversa, la separació es dóna en funció del caràcter hidrofòbic (marcat pel grup alquil). En aquest cas, la llargària de la cadena d'òxid d'etilè no influeix en la separació i el oligòmers que tenen el mateix caràcter hidrofòbic coelueixen en un pic. El pic augmenta d'intensitat i per tant, s'observa un augment en la sensibilitat del mètode. Quan s'utilitza la MS, la concentració dels oligòmers individuals (NP₁EO, NP₂EO,...) es pot obtenir extraient el corresponents ions característics del cromatograma que conté tots els ions.

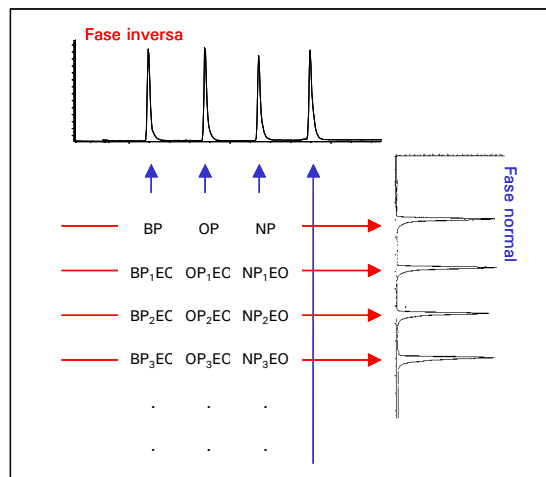


Figura 11. Esquema de la separació dels diferents homòlegs alquilfenòlics en funció del seu caràcter hidrofòbic o lipofílic.

També hi ha casos en què la separació es basa tant en mecanismes d'exclusió de mida com de fase inversa (separació en mode mixt). D'aquesta manera s'obté una bona resolució pels APEOs i APs amb la mateixa cadena alquílica. Per exemple, separació entre els NPEOs i el 4-NP [148].

La determinació dels APEOs per HPLC-MS es pot portar a terme utilitzant les interfases d'ESI i d'APCI, ambdues en condicions d'ionització positiva. Com es pot veure a la Figura 12 (A), els espectres típics dels polietoxilats que s'obtenen utilitzant la interfase d'ESI mostren la característica de senyals espaiades amb la mateixa diferència de massa de 44 Da (una unitat d'òxid d'etilè). Utilitzant la font d'APCI, l'espectre que s'obté mostra diferents sèries de senyals espaiats d'una manera equidistant. Com es pot veure a la Figura 12(B), la sèrie principal correspon als ions $[M + H]^+$ (marcats amb un quadre), la següent sèrie correspon als ions $[M - C_9H_{18}]^+$ (marcats amb un triangle) i la tercera sèrie correspon als adductes de l'ió molecular $[M + NH_4]^+$ (marcats amb un cercle) [135]. Amb ESI, els APEOs mostren una elevada afinitat pels ions metàl·lics alcalins, resultant en la formació únicament del principal adducte $[M + Na]^+$. Però, per una millor fragmentació en la dissociació induïda per col·lisió, són millors els adductes d'amoni que proporcionen una disminució dels LODs en la detecció per monitorització de reacció múltiple [149,150].

Els APs es determinen tant amb la interfase de ESI com la d'APCI en el mode negatiu d'ionització, però la font d'ionització ESI és la més utilitzada degut a la seva elevada sensibilitat per determinar APs (de 40 a 50 cops més gran que usant l'APCI). Tot i així, la interfase de ESI dóna exclusivament els ions $[M - H]^-$ i es necessita la MS en tàndem per portar a terme la seva confirmació. En canvi, l'APCI a elevats voltatges proporciona espectres que tenen una fragmentació similar a la que s'obté amb la MS en tàndem [151].

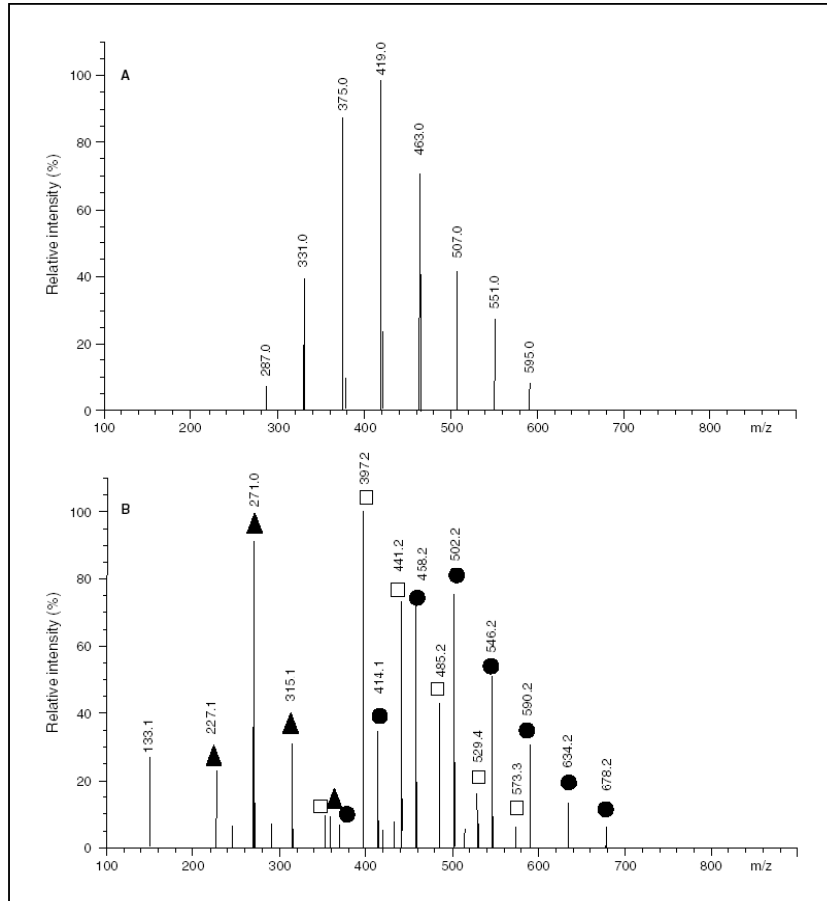


Figura 12. Espectres d'una mescla de l'oligòmer NPEO amb una mitjana de 4 unitats etoxi. a) ESI, b) APCI [135]. □ ions $[M + H]^+$; ▲: ions $[M - C_9H_{18}]^+$; ●: ió molecular $[M + NH_4]^+$.

Un dels principals problemes quan es determinen els APs i els APEOs per MS és la supressió de senyal de l'analít en mostres molt brutes, com són les aigües residuals i principalment les mostres de fangs i sediments. Per tal de reduir aquest efecte de la matriu, hi ha autors que utilitzen procediments d'extracció molt selectius i acurats, realitzant un neteja de la mostra, o apliquen estàndards interns o utilitzen additius a la fase mòbil [135]. Benijts et al. [101] estudien la influència dels additius utilitzats per modificar la fase

mòbil (àcids i tampons), la importància d'utilitzar una neteja eficient de la mostra i el paper que té l'addició d'estàndards interns en l'eficiència d'ionització per 35 EDs, entre ells el 4-*tert*-butilfenol (4-*t*-BP), el 4-*t*-OP i el 4-NP, en HPLC-(ESI)MS-MS en el mode NI. L'eficiència d'ionització no millora amb l'addició d'àcids o sals en la fase mòbil, en canvi la utilització de la SPE amb diferents passos de rentat i pretractament de la mostra, porten a una important eliminació dels components de la matriu que interfereixen en el senyal. Però comproven que l'eina més efectiva per compensar l'efecte matriu és la utilització d'estàndards interns.

1.2.2.2. Tècniques d'extracció

Tot i que els APs i APEOS es troben en mostres mediambientals a nivells de varis ordres de magnitud més grans que les hormones esteroïdals, la seva determinació requereix la utilització de diversos passos de pretractament de la mostra per preconcentrar els analits. Tal com ja s'ha comentat, aquests pretractaments són necessaris tant per reduir el contingut de la matriu de les mostres més complexes quan es treballa amb LC-MS, com pel fraccionament de la mostra quan es pretén determinar els APEOs i tots els seus derivats.

La sublimació del solvent, la corrent de destil·lació i l'extracció líquid-líquid (LLE) són tècniques d'extracció que han estat molt utilitzades fins el 1999, tal com mostra la revisió bibliogràfica sobre les tècniques analítiques més utilitzades per a la determinació de nonilfenol etoxilats i els seus derivats realitzada per Lee [134]. Però degut a les importants limitacions que presenten aquestes tècniques pels APEOs amb cadenes etoxilades més grans, la SPE [74, 107,138,142,152] i en els últims anys, les noves tècniques d'extracció com són la SPME [141,153], són les que actualment s'apliquen. Tot i així, en l'actualitat la LLE s'ha continuat utilitzant en diferents estudis degut a la simplicitat i facilitat d'utilització que presenta, sobretot quan els analits a determinar s'han de derivatitzar [133,140] o a què permet preconcentrar

volums de mostra més grans [148]. Un altre motiu que porta a la utilització de la LLE front la SPE és el que presenten Espejo et al. [143], en què trien la LLE perquè les aigües residuals que analitzen formen una fina emulsió que és molt difícil de filtrar i els taponen molt fàcilment els cartutxos d'SPE.

Però, en general, per la preconcentració d'APEOs i APs en mostres aquoses, la tècnica que es considera més apropiada és la SPE, degut al baix temps d'anàlisi comparat amb les tècniques convencionals anteriorment anomenades, selectivitat i percentatges de recuperació que s'obtenen. El sorbent d'octadecilsilà és el que més s'ha utilitzat amb una eficiència d'extracció en aigües residuals superior al 80% [74,144,152], tot i que els de carbó negre grafititzat (GCB) [138,147,149] i els polimèrics [74,95,100,107,142] també s'han utilitzat obtenint-se recuperacions quantitatives. Excepcionalment, Smith et al. [154] utilitzen un sorbent de sílice enllaçada amb C₂ per preconcentrar 4-NP, 4-*t*-OP i 4-*t*-BP. Aquest sorbent els dona una millor eficiència d'extracció que els de sílice enllaçada amb C₁₈ o C₈ i els de GCB. Liu et al. [87] comparen diferents sorbents per l'extracció del 4-*t*-OP i del 4-NP. Només s'obtenen recuperacions superiors al 80% pel 4-NP utilitzant un cartutx d'octadecilsilà (Isolute-C₁₈, 1000 mg) o un cartutx combinat amb octadecilsilà i polímer (Isolute-C₁₈/ENV+, 400 mg). En canvi, pel 4-*t*-OP només s'obtenen recuperacions superiors al 60% utilitzant sorbents polimèrics com l'OASIS HLB (200 mg) o el DPA-6S (500 mg). En canvi, Ying et al. [99] obtenen millors recuperacions quan utilitzen sorbents polimèrics (PLRP-s i PRP-1) que amb l'octadecilsilà per la SPE acoblada en línia a la HPLC, tant pel 4-*t*-OP com pel 4-NP.

Recentment, els nanotubs amb múltiples capes de carboni en les seves parets (*multiwalled carbon nanotubes*-MWNTs) han estat aplicats per primer cop com a sorbent per l'SPE. Cai et al. [154] han utilitzat aquest sorbent per la determinació de 4-*t*-OP, 4-NP i bisfenol A i l'han comparat amb un sorbent d'octadecilsilà (500 mg). Les recuperacions que han obtingut pel 4-*t*-OP i 4-NP han estat similars amb els dos sorbents i superiors al 90% preconcentrant fins a 1000 ml de mostra.

Sovint, per extreure i fraccionar els APEOs i els seus derivats neutres i àcids alhora, s'ha d'utilitzar un procediment seqüencial de SPE, amb dos cartutxos de diferents sorbents connectats en sèrie, per exemple una sílice enllaçada amb grups alquil i un sorbent polimèric [136,155] o utilitzar una elució selectiva amb solvents de diferents polaritats [156]. Tot i així, el fraccionament i separació de grups depèn de la matriu i en el cas de mostres complexes, com són les aigües residuals, sovint no és possible un fraccionament complert. Però els extractes que s'obtenen d'aquestes SPE seqüencials són més nets i s'obtenen poques interferències degudes a la matriu de la mostra. Aquest efecte de la matriu s'ha de tenir en compte sobretot quan després de la tècnica de pretractament s'utilitza la HPLC-MS per la determinació dels analits. Per això, s'han desenvolupat tècniques que faciliten la manipulació de la mostra com són la SPE en línia o sorbents més selectius, com per exemple els MIPs.

La SPE generalment es porta a terme *off-line* i els solvents d'elució que s'utilitzen principalment són metanol, acetona, diclorometà o mesclades d'aquests solvents. Però, recentment, degut al gran nombre de mostres a analitzar en els laboratoris on es porten a terme monitoritzacions, s'han desenvolupat mètodes que utilitzen la SPE automatitzada a través d'unitats especials de preparació de la mostra [144,157,158]. Aquestes unitats tant permeten la automatització de la SPE *off-line* com l'acoblament en línia de la SPE a la HPLC. Utilitzant aquestes unitats, fins i tot la derivatització pot ser automatitzada, sobretot quan es porta a terme en el mateix sorbent d'extracció [157].

Com alternativa a la SPE i LLE per la determinació d'APs i APEOs, s'han desenvolupat també mètodes basats en la SPME [141,153,159] i més recentment, en les tècniques d'extracció per membranes (*microporous membrane liquid-liquid extraction-MMLLE*) [160].

Les tècniques de SPME desenvolupades per a la determinació d'APs i APEOS s'utilitzen amb espai de cap seguida de GC-MS [141,153] o en el mode de

SPME en què l'extracció es realitza en l'interior d'un fragment de columna capil·lar de GC o micro-LC (*in-tube* SPME). La *in-tube* SPME s'aplica principalment combinada en línia amb la HPLC, obtenint un mètode automatitzat [159]. La MMLLE també té l'avantatge que es necessita poc solvent orgànic i que es pot automatitzar, i en el treball desenvolupat per Liu et al. [160] aconseguixen la separació dels APEOs de cadena llarga dels APEOs de cadena curta.

Tal com s'ha comentat en la introducció d'aquest apartat, al disminuir la cadena etoxilada, disminueix la solubilitat d'aquests compostos i per tant, augmenta la seva tendència a acumular-se en sediments. Això porta a què en molts estudis la determinació d'APEOs i els seus compostos de degradació es realitzi tant en mostres de sediments com d'aigües. D'aquesta manera s'obté informació sobre la història de la contaminació en un punt concret i sobre l'origen dels APs en les aigües mediambientals.

La determinació d'APEOs en mostres mediambientals sòlides és força complicat degut a què l'extracte obtingut a través de les exhaustives tècniques d'extracció utilitzades conté un gran nombre de components de la matriu. Fins el 1999, l'extracció Soxhlet ha estat la tècnica més utilitzada, tot i que l'extracció amb fluids supercrítics era una alternativa més eficient [134]. Però, en un resum recent sobre els mètodes de preparació de la mostra per la determinació d'APEOs i els seus productes de degradació en mostres sòlides mediambientals [73,161] es pot veure que actualment els sistemes d'extracció per sonicació, l'extracció líquida pressuritzada [139] i l'extracció assistida per microones [151] són les tècniques que estan guanyat terreny.

Tot i així, l'extracte que s'obté després d'aquestes tècniques exhaustives d'extracció conté un gran nombre d'interferents provinents de la matriu, que poden coeluir amb els analits i interferir en les anàlisis quantitatives o provocar una supressió del senyal en LC-MS. Això fa imprescindible subseqüents netejes o un fraccionament dels extractes.

I.2.3. FTALATS I ADIPATS

L'estabilitat, fluïdesa i baixa volatilitat dels dièsters d'àcid ftàlics o ftalats (PAEs) i dels dièsters adípics o adipats els fan molt adequats per a la seva utilització com a plastificants, additius polimèrics que s'utilitzen per millorar la seva flexibilitat i resistència i facilitar el seu processat.

Els PAEs es produeixen a través d'una simple reacció d'alcohols amb anhídrid ftàlic i una posterior eliminació d'aigua. Tant els alcohols com l'anhídrid ftàlic són substàncies molt conegudes derivades del petroli i que s'utilitzen des de fa molt de temps. Els alcohols que s'utilitzen van des del metanol (C1) fins alcohols de 17 carbonis (C17). Aquests alcohols també poden ser esterificats amb l'àcid adípic per produir la família dels adipats. Les estructures moleculars dels PAEs i adipat més utilitzats es poden veure a la Figura 13. Es diferencien principalment en funció de si les cadenes alquílques que aporten els alcohols són lineals, ramificades o mixtes, en funció de sí els dos substituents són homòlegs o no.

Els PAEs han estat àmpliament utilitzats des del 1930, principalment per donar flexibilitat als productes basats en el clorur de polivinil (PVC). De fet, més d'un 90% dels PAEs produïts a Europa s'utilitzen en la indústria del PVC [162]. Els principals PAEs de pes molecular entre mig i alt (C4-C13) són els més utilitzats per donar flexibilitat als productes basats en el polímer de PVC, mentre que els de pes molecular inferior s'utilitzen en la fabricació de nitrocel·lulosa i els de pes molecular superior com a lubricants sintètics en la indústria de l'automoció. Per exemple, l'ftalat de di-n-butil (DnBP) s'utilitza en la síntesi de les reïnes epoxi i en els èsters de cel·lulosa i especialment en les formulacions adhesives. L'ftalat de dimetil (DMP) i el de dietil (DEP) normalment s'utilitzen en els plàstics basats en èster de cel·lulosa (acetat i butirat de cel·lulosa). Però no tots s'utilitzen com a plastificants, aquests compostos tenen altres usos en la fabricació de cosmètics (perfums, esmalts per les ungles,...), pintures, alguns adhesius i

lubricants per automòbils [163]. Totes aquestes aplicacions es poden veure en detall en l'Annex I.

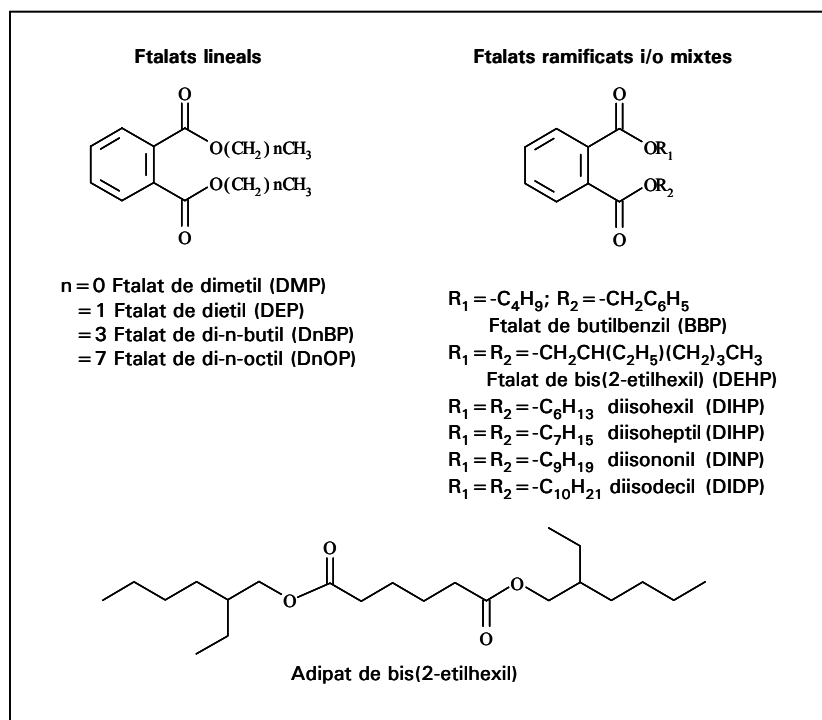


Figura 13. Estructura dels PAEs i adipat.

Altres plastificants que també han estat bastant utilitzats són els adipats, principalment l'adipat de bis(2-etilhexil), ja que donen millors propietats a alguns polímers degut, entre d'altres, a la seva baixa viscositat [164]. Sovint, s'utilitzen conjuntament amb els PAEs per obtenir un compromís en les propietats dels polímers estudiats.

La solubilitat aquosa és una propietat important que influeix en la biodegradació i bioacumulació dels compostos i en la toxicitat aquàtica. Per

tant, és un factor determinant per controlar la distribució mediambiental dels compostos. Aquests compostos són, en general, poc solubles en aigua i bastant lipofílics [165]. Degut a què els plastificants no es troben enllaçats químicament als polímers, es dona una important migració cap el medi ambient. Això, junt amb la seva estesa utilització i a la seva persistència en el medi ambient fan que s'hagin trobat en una gran varietat de mostres, com són aigües superficials, rius i aigua potable [31], sediments i aliments envasats en plàstics.

La degradació dels PAEs ha estat estudiada en condicions aeròbiques i anaeròbiques. La hidròlisis dels dièsters a àcid ftàlic es dona a través de la formació dels mateixos productes intermitjos, els monoèsters, en ambdues condicions (Figura 14). Però la subseqüent degradació de l'àcid ftàlic és diferent en cada cas. La seva biodegradació és el mecanisme d'eliminació propi que s'espera pels PAEs que entren en plantes depuradores d'aigües residuals o els que es troben en aigües superficials i sediments. Tot i així, les vides mitjanes de degradació en aigües superficials i de mar i en sediments són des de menys d'1 dia fins a 2 setmanes [165].

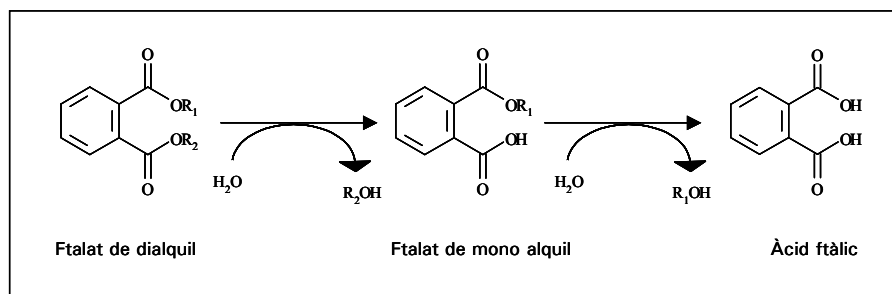


Figura 14. Camí de biodegradació dels PAEs en el medi ambient [165].

Pel que fa a la seva toxicitat, diferents estudis han revelat que alguns d'aquests compostos són cancerígens. A més, compostos com el DnBP, l'ftalat de bis(2-etilhexil) (DEHP) i l'ftalat de benzilbutil (BBP) són alteradors

endocrins segons l'última comunicació de la Comissió de l'EU referent a aquest tipus de substàncies [21] tot i que altres, com l'ftalat de di-n-octil (DnOP) i l'adipat de bis(2-etilhexil), es troben també en altres llistes com a sospitosos de tenir aquest tipus d'efectes [19].

Un dels principals problemes en la determinació d'aquests compostos és la contaminació durant les diferents etapes del mètode, degut a la presència d'aquests compostos en la major part del material utilitzat (sobretot en el material de plàstic). Per això, moltes metodologies donen recomanacions per minimitzar el risc de contaminació, com és el de no utilitzar material de plàstic, netejar i desactivar el material de vidre utilitzat o fer blancs per cada sèrie de mostres [73]. Tot i així, per aquests compostos és important desenvolupar mètodes simples i ràpids, que incloguin tècniques de tractament que utilitzin poc solvent orgànic i minimitzin la utilització de material de vidre.

Els PAEs s'han trobat en afluents industrials, en sediments residuals i en aigües superficials i potables. Els nivells que s'han trobat són fins aproximadament $10 \mu\text{g l}^{-1}$ en aigües superficials, fins $1 \mu\text{g l}^{-1}$ en rius i fins $0.7 \mu\text{g l}^{-1}$ en aigües de mar. En la majoria dels estudis el DEHP és el PAE més abundant.

1.2.3.1. Tècniques de separació

Igual que en els casos anteriors, per aquests compostos s'utilitza tant la GC com la HPLC acoblades, sobretot en aquest últims anys, a la MS com a sistema de detecció.

La GC ha estat la més utilitzada per a la determinació dels PAEs i l'adipat, tot i que per la determinació dels monoèsters i l'àcid ftàlic es requereix una derivatització prèvia [166]. La GC s'ha utilitzat acoblada tant al detector ECD [167] com al FID [168,169]. La majoria de mètodes desenvolupats per

l'EPA per la determinació de PAEs tant en mostres aquoses com sòlides (mètodes EPA 606, 8060, 8061A) utilitzen la GC acoblada a ECD o a FID [170]. Però en els darrers anys, s'han anat substituint per la utilització de la MS com a sistema de detecció [91,166,171-184].

Per aquests compostos les columnes capil·lars majoritàriament utilitzades també són les que tenen fases estacionàries amb 5% difenil-95% dimetilpolisiloxà [166,182-184].

L'elevat poder d'identificació de la GC acoblada a la MS utilitzant com a font d'ionització la d'EI, que permet obtenir llibreries d'espectres, queda limitada per aquests compostos degut a l'obtenció d'espectres característics molt semblants entre tots els PAEs. Com es pot veure a la Figura 15, per tots els PAEs s'obté majoritàriament l'ió m/z 149, corresponent a l'anhídrid ftàlic, excepte pel DMP que dona l'ió base de m/z 163, corresponent a $[M-OCH_3]^+$. La distinció espectral entre els PAEs ramificats i els lineals amb el mateix nombre de carbonis no és possible, tal com es pot veure si es comparen els espectres del DEHP i el DnOP. Però en aquest cas, com que elueixen a diferents temps de retenció, la seva identificació es pot basar en aquesta característica. En el cas de barreges que continguin diferents cadenes alquíliques i que coelueixin, la identificació i quantificació queda limitada degut a la falta de fragmentació que permeti la confirmació de la seva estructura [173]. Tot i així, la (EI)MS és la tècnica de detecció més sensible i és la que es recomana per portar a terme la quantificació d'una mescla ben resolta.

Una identificació més segura dels PAEs és possible utilitzant la CI, ja que degut a la seva ionització més suau proporciona fragmentacions més selectives que la EI. En la ionització química en mode positiu (PCI), el metà com a gas reactiu proporciona més fragmentació que gasos amb una afinitat protònica més gran, com és l'amoni [173]. A més, la PCI amb metà com a gas reactiu permet obtenir l'ió corresponent a la massa molecular i informació sobre el grup èster.

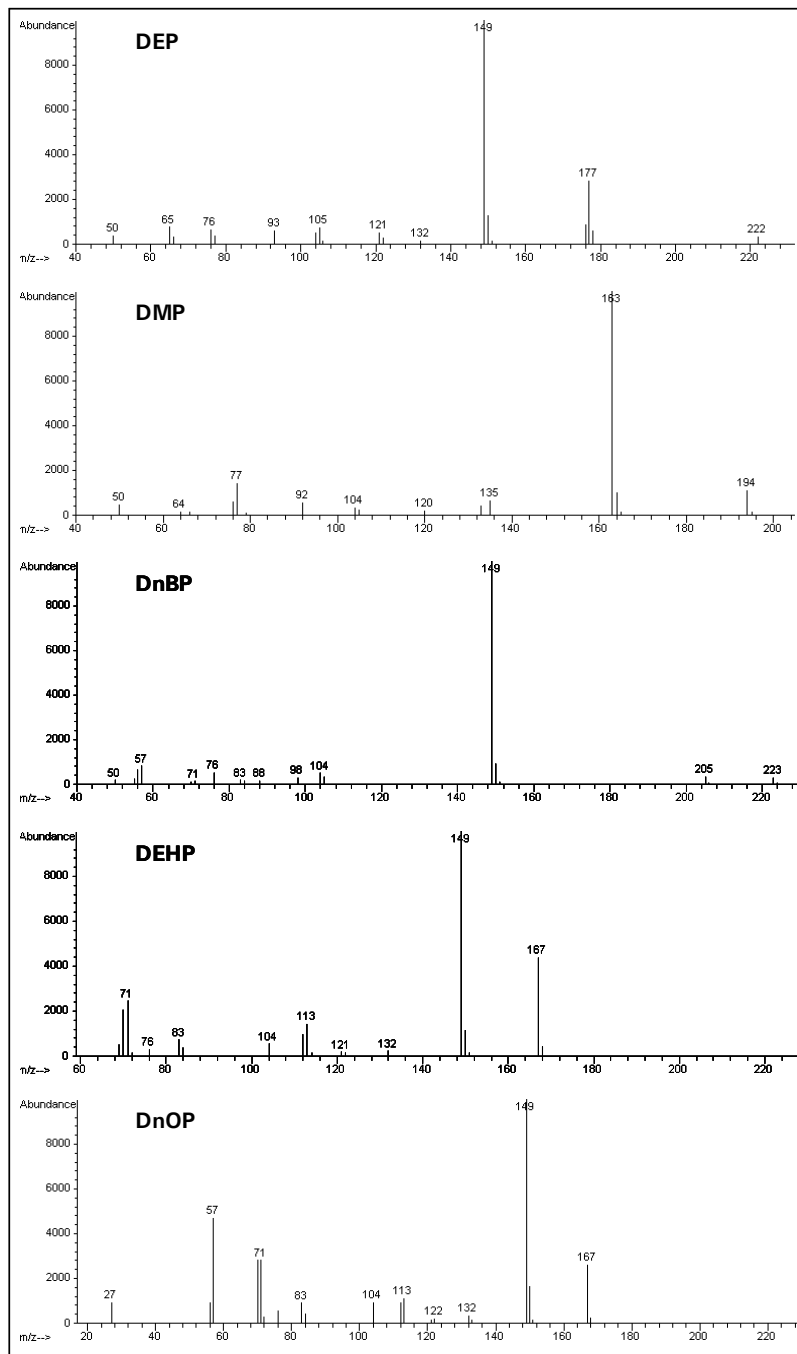


Figura 15. Espectres EI d'alguns PAEs extrets de la llibreria Wiley138.

L'adquisició de dades en GC-(EI)MS generalment es porta a terme en el mode *full-scan* i la quantificació es basa en l'extracció de l'ió majoritari, m/z 149 per tots els PAEs excepte el DMP i el m/z 129 per l'adipat. [184]. Alguns autors utilitzen el mode SIM per la identificació i la quantificació dels PAEs per tal d'augmentar la sensibilitat del mètode [166,182]. Jonsoon et al. [166] seleccionen dos i quatre ions per cada fatat per la seva identificació en el mode SIM, tot i que la fragmentació dels PAEs aporta ions amb abundàncies relatives inferiors al 30%. Per exemple pel DMP seleccionen els ions: 163(100), 194(7) i 133 (6), pel DEP: 149(100), 177(26) i 222(2), pel DnBP: 223(5) i 205 (4) i pel DEHP: 167(29) i 279 (14). Per això, hi ha autors que prefereixen utilitzar els dos modes d'adquisició de dades, *full-scan* per a la identificació i SIM per a la quantificació [183].

Com ja s'ha comentat, la limitació que presenta en alguns casos la GC-(EI)MS és la identificació i quantificació d'isòmers amb variacions en la composició de la cadena alquílica degut a què alguns cops coelueixen i no produeixen diferents fragments en EI per confirmar la seva estructura. Així, la HPLC s'ha aplicat com una alternativa eficaç, sobretot des del desenvolupament de les noves interfases que permeten un acoblament més senzill a la MS. Lin et al. [185] comparen la GC-(EI)MS i la HPLC-(ESI)MS per la determinació de congèneres i mesclades d'isòmers de PAEs i comproven que la GC-MS resulta tenir una pobre resolució per separar les mesclades comercials isomèriques.

Així, els detectors més utilitzats acoblats a la HPLC per a la determinació d'aquests compostos han estat el d'UV-Visible [186-188] i el de MS [185, 189-191], sent aquest últim el més utilitzat per determinacions mediambientals. Per l'acoblament de la MS a la HPLC s'ha utilitzat tant la interfase d'APCI [158,189,192,193] com la d'ESI [60,185,190,191], ambdues en mode positiu. La HPLC-(APCI)MS proporciona el mateix ió base que la GC-(EI)MS, el de m/z 149 pel DEP, DBP, BBP, DnOP i DEHP i el de m/z 163, pel DMP, però també proporciona altres ions característics per

cada PAE que permeten la seva confirmació. La Figura 16 mostra un exemple d'aquesta fragmentació pel DnBP.

La HPLC-(ESI)MS es basa en la formació dels adductes de sodi i proporciona informació de l'ió molecular. Els ions de l'adducte de sodi són característics per cada PAE i per cada grup isomèric. Com es pot veure a la Figura 17, utilitzant la interfase ESI, l'ió base que s'obté pel DEHP és ben diferent de l'ió que s'obté per la mescla isomèrica de 6 carbonis. En algun estudi s'ha comprovat que la fragmentació utilitzant HPLC-(ESI)MS-MS en mode PI és similar a la que s'obté per GC-(EI)MS.

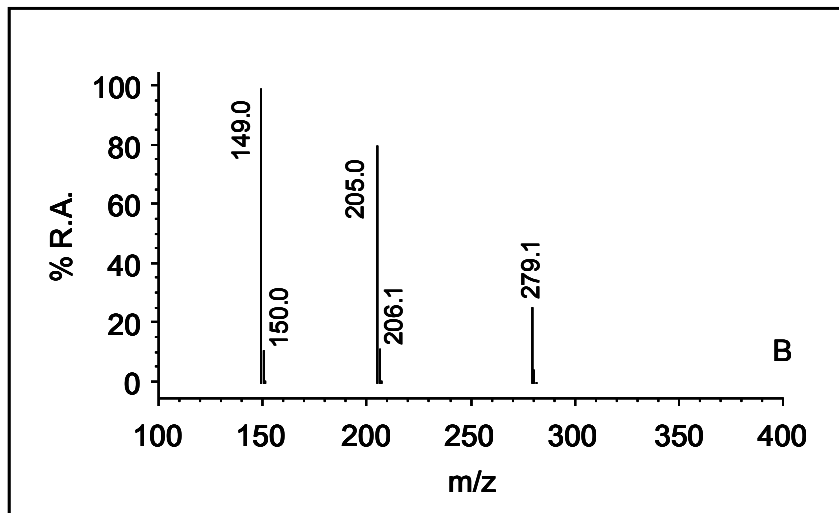


Figura 16. Espectre del DnBP amb la interfase APCI [192].

Per a la determinació de PAEs en mostres aquoses s'han desenvolupat pocs mètodes bioquímics. Ius [194] ha desenvolupat un mètode basat en l'immunoassaig amb detecció fluorimètrica (fluoroimmunoassaig), amb el qual és capaç de determinar el DMP, DEP, DnBP, BBP i el DnOP en mostres aquoses. Amb aquest mètode obté una bona sensibilitat; per exemple, pel

DMP obté un LOD de 97 ng l^{-1} . Per altra banda, Goda et al. [115] han desenvolupat un mètode basat en la determinació directa amb la tècnica ELISA per la determinació específica del DnBP i el BBP, tot i que en aquest cas la sensibilitat no és tan bona, s'obté un LOD de $200 \mu\text{g l}^{-1}$ pel DnBP. Però en aquests mètodes, el PAE més important (DEHP) no és determinat (primer cas) o la tècnica ELISA desenvolupada no el reconeix (segon cas).

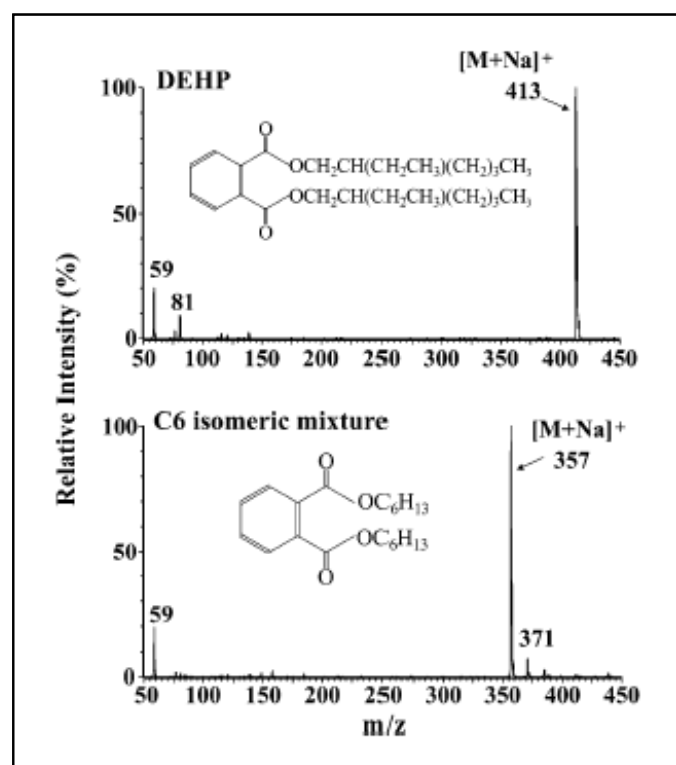


Figura 17. Espectres obtinguts per anàlisi d'injecció de flux (FIA) amb (ESI)MS del DEHP i la mescla isomèrica de 6 carbonis [185].

I.2.3.2. Tècniques d'extracció

Com ja s'ha comentat, el principal problema en la determinació de PAEs és la contaminació durant les diferents etapes del mètode, sobretot en les etapes prèvies a la separació, degut als materials de laboratori utilitzats [195]. Per tal de minimitzar el risc de contaminació, durant l'etapa de mostreig i d'extracció s'han de tenir en compte mesures de precaució adequades, com per exemple, evitar el contacte amb material de plàstic, netejar i desactivar apropiadament el material de vidre, fer blancs per cada sèrie de mostres o preparar alíquotes de l'extracte de la mostra en diferents vials per fer repeticions [196]. Alguns autors, a més de netejar i esbandir el material de vidre amb etanol, fins i tot tenen la precaució de destil·lar per duplicat tots els solvents de grau analític que utilitzen en el seu procediment [197].

La SPE ha estat àmpliament utilitzada per la determinació de PAEs, tot i que degut als problemes de contaminació, la SPME, tal com es comentarà més endavant ha estat més aplicada en els últims anys. La SPE s'ha aplicat amb diferents tipus de sorbents, com són els de sílice enllaçada amb grups C₁₈ o C₈ [169,180,191,198] i els polimèrics [178,188,192,193]. Per als compostos menys polars, com són el DnOP i DEHP, les recuperacions són millors amb els sorbents polimèrics que amb els de sílice enllaçada [198]. Tot i així, hi ha autors que prefereixen utilitzar sorbents de d'octadecilsilà i polimèrics combinats [199]. Quan s'utilitza la SPE s'han d'afegir solvents orgànics a la mostra abans de la seva preconcentració degut a la baixa solubilitat d'aquests compostos a l'aigua i per tal d'evitar la seva adsorció en el sistema [188].

Els MWNTs també s'han aplicat com a sorbents en la SPE per l'extracció de PAEs [200]. El mètode desenvolupat en aquest estudi utilitza la HPLC amb un detector UV. Les recuperacions que s'obtenen són superiors al 90% i arriben a LODs entre 0.18 i 0.86 µg l⁻¹ quan es preconcentren 1000 ml d'aigua. Aquestes recuperacions són comparables o, en la majoria de casos,

millors que les que s'obtenen amb diferents sorbents comercials de sílice enllaçades amb grups C₁₈ o C₈ i polimèrics.

Per tal de minimitzar els problemes de contaminació en la SPE es desenvolupen procediments analítics ràpids i simples, en què el tractament i la manipulació de la mostra té el mínim nombre possible d'etapes, com són en alguns casos els mètodes automatitzats. Per això, la SPE sovint s'utilitza acoblada en línia a la GC o HPLC o s'utilitza la SPE *off-line* automatitzada utilitzant un processador de mostreig automatitzat [60,158,189].

Tot i així, una altra alternativa més estesa ha estat la utilització de la SPME, aplicant tant la immersió directa com l'espai de cap, junt amb la GC-MS. [167,172,176,184,186,201]. Les fibres emprades per la determinació de PAEs han estat comparades per varis autors. De les fibres comparades, com són la de polidimetilsiloxà (PDMS), de polidimetilsiloxà-divinilbenzè (PDMS-DVB) i de carbowax-divinilbenzè (CWX-DVB), varis autors conclouen que la més efectiva per l'extracció de PAEs és aquesta última [201,202]. La SPME ha estat acoblada principalment a la GC, degut a la facilitat i la poca manipulació de la mostra que comporta la desorció tèrmica. Tot i així, mètodes que utilitzen la SPME per una posterior anàlisi per HPLC també s'han desenvolupat, sobretot des del desenvolupament d'interfases que permeten el seu acoblament en línia, cosa que disminueix molt la manipulació de la mostra [186,190].

El desenvolupament de la SPME *in-tube* s'ha presentat com una bona alternativa a l'acoblament convencional de la SPME a la HPLC, ja que permet portar a terme l'extracció, preconcentració, desorció i injecció dels analits d'una forma completament automatitzada. Aquesta tècnica utilitza fragments de columna capil·lar de GC per portar a terme l'extracció, avantatge molt important respecte la SPME on el nombre de fibres comercialitzades és limitat. Per això, aquesta tècnica també ha estat aplicada i estudiada per varis autors per determinar PAEs en mostres aquoses mediambientals [159,187,203-205].

Degut a l'ús d'elevats volums de solvents orgànics utilitzats en la LLE i per tant l'elevat risc de contaminació, aquesta tècnica no ha estat molt aplicada per la determinació de PAEs. Tot i així, s'han desenvolupat alternatives a la LLE com són els nous mètodes basats en la microextracció líquid-líquid (LLME), anomenats microextracció en fase líquida (LPME), que utilitzen fibres poroses de polipropilè [183]. En aquest estudi la LPME és comparada amb la SPME. Tot i que s'obtenen resultats comparables, la LPME presenta l'avantatge d'eliminar l'efecte memòria que presenta la SPME.

I.2.4. PLAGUICIDES

Els plaguicides són substàncies d'origen natural o sintètic que serveixen per a combatre les malalties i els paràsits de tot tipus, que danyen directament o indirecta els conreus o que poden provocar malalties als éssers humans. Els plaguicides es diferencien entre ells per la seva composició química, les seves propietats físiques i els efectes que produeixen i es poden classificar segons diferents criteris, com són la funció que desenvolupen o l'estructura química. Segons la funció desenvolupada es poden esmentar els insecticides, fungicides, herbicides, acaricides i nematocides. Segons l'estructura química hi ha els inorgànics, com són els compostos de sofre o sals de coure, els plaguicides orgànics com són els organofosforats, organoclorats, carbamats, triazines, fenilurees o fenols, i els plaguicides d'origen biològic [206].

Els plaguicides són àmpliament utilitzats en agricultura, però tenen també moltes altres funcions no agrícoles com són pel control de les males herbes en els marges de les carreteres, camins, en àrees industrials, en les vies dels trens o en els aeroports. En l'annex I es detallen els diferents usos que poden tenir alguns dels plaguicides considerats EDs. En totes aquestes aplicacions els plaguicides poden ser arrossegats cap a rius o aigües subterrànies que poden contaminar aqüífers de posterior utilització pel consum humà o ser un risc potencial per la vida aquàtica. També apareixen

en el medi ambient degut als residus generats per les pròpies indústries de plaguicides. Molts d'aquests compostos tenen una elevada persistència en l'ambient, cosa que fa que també es trobin en matrius més complexes, com són els aliments, principalment fruites i verdures, degut al seu ampli ús en l'agricultura, i en sediments, degut a la seva bioacumulació. Tot i així, també s'ha de tenir en compte que alguns plaguicides es degraden en el medi donant lloc a productes de transformació que en alguns casos són més tòxics i persistents que els plaguicides dels quals provenen, com és el cas de la transformació del DDT a DDE. Com es pot veure a la Figura 18, la quantitat de compostos que es formen en la degradació de DDT és molt nombrosa.

La principal problemàtica que presenten els productes de degradació és que sovint se'n coneix molt poc de la toxicitat i els efectes sobre el medi. La formació dels productes de degradació de determinats plaguicides i el seu efecte en el medi ambient ha estat i és ,actualment, objecte de molts estudis [156,207-209].

A part de les característiques tòxiques que es coneixen dels plaguicides, com són carcinogènesi, mutagènesi o neurotoxicitat, la toxicitat endocrina també ha estat demostrada per algun d'ells. El *Pesticide Action Network* (PAN) [210] ha elaborat una llista on es classifiquen els plaguicides sospitosos d'alterar el sistema endocrí, basant-se en diferents fonts d'informació com són les llistes d'Illinois EPA, la de Colborn i la de l'EU. A la Figura 19, es poden veure les estructures químiques d'alguns plaguicides que es consideren que tenen efectes alteradors endocrins segons aquestes llistes. Com es pot veure les seves estructures no tenen moltes semblances amb els compostos que tenen capacitat per enllaçar-se als receptors estrogènics, per això tot i que molts d'ells tenen efectes estrogènics, la majoria afecten a altres hormones com són la tiroides o tenen efectes antiandrogènics.

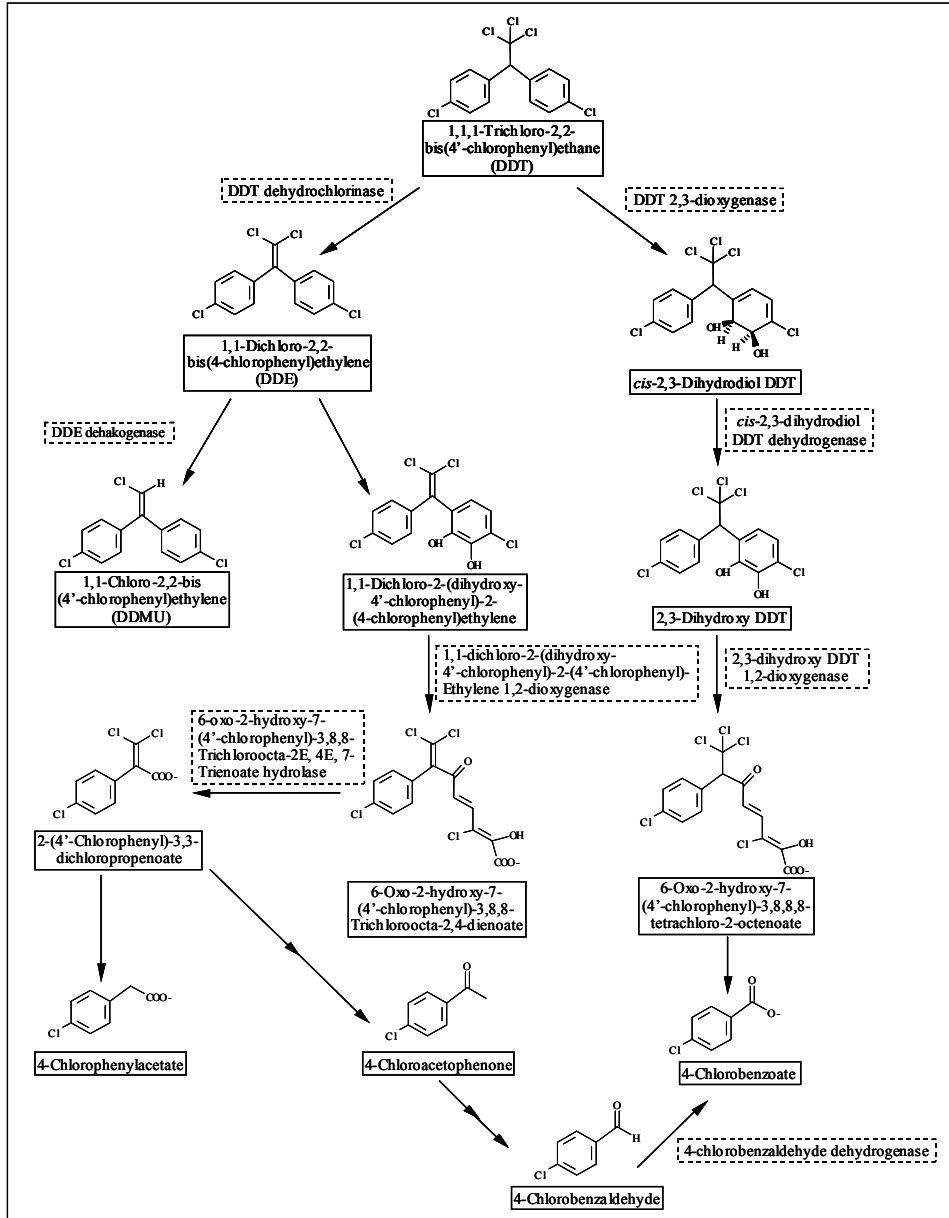


Figura 18. Biodegradació del DDT [211].

Degut a l'impacte ambiental dels plaguicides s'han publicat diverses llistes prioritàries per tal de protegir la qualitat de les aigües de consum i superficials. Així, els límits de plaguicides permesos des del punt de vista normatiu són baixos i això implica la necessitat de mètodes analítics sensibles i selectius per a la seva determinació.

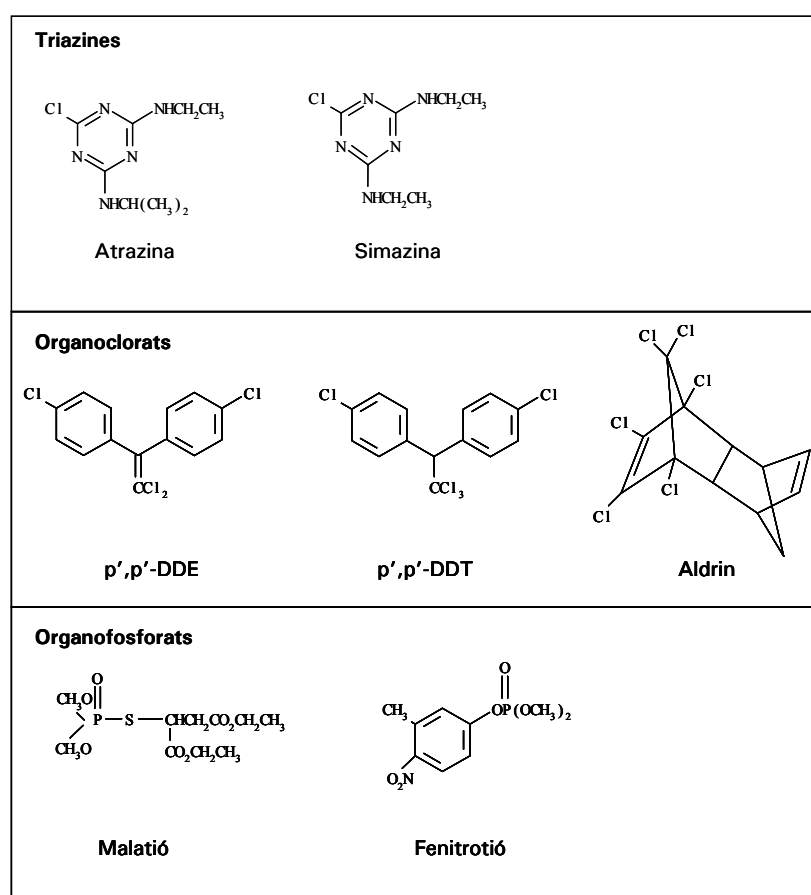


Figura 19. Estructures químiques d'alguns plaguicides de diferents grups considerats EDs.

Els nivells de plaguicides trobats en aigües mediambientals sovint són superiors a l'estàndard de qualitat mediambiental (concentració màxima per sobre de la qual no s'haurien de trobar). Per exemple, en una monitorització de compostos farmacèutics, hormones i altres contaminants orgànics d'aigües residuals realitzada entre el 1999 i el 2000, en una xarxa de 139 canals dels Estats Units, es van determinar els plaguicides dieldrin, lindà i diazinon entre 0.02 i 0.18 $\mu\text{g l}^{-1}$ amb una freqüència de detecció entre 5 i el 30% [128].

De tots els contaminants orgànics determinats en aigües, els plaguicides continuen sent els més estudiats i es continuen desenvolupant nous mètodes, amb una clara tendència a desenvolupar mètodes ràpids utilitzant la HPLC o la GC i utilitzant com a sistema de preconcentració la SPE, la SPME o les noves tècniques d'extracció que s'han desenvolupat recentment. Aquests mètodes tendeixen a acoblar en línia tant la SPME com la SPE al sistema cromatogràfic posterior i sobretot a disminuir els límits de detecció a pocs ng l^{-1} . Existeixen diverses revisions bibliogràfiques publicades sobre la determinació de plaguicides: sobre la determinació a nivells traça per GC [212,213], per HPLC [213], sobre l'aplicació de la SPME [214] o la SPE [215,216] i més recentment sobre l'aplicació de la HPLC-MS per mostres aquoses mediambientals i procedents de depuradores [110].

1.2.4.1. Tècniques de separació

Tant la GC com la HPLC han estat àmpliament utilitzades per a la determinació de plaguicides. L'elecció entre una o l'altra és en la majoria de casos molt clara i per a compostos suficientment volàtils com els plaguicides organohalogenats, alguns nitrogenats o pels organofosforats la GC és la tècnica preferida. El problema sorgeix quan s'han de determinar plaguicides termolàbils o de caràcter polar ja que aquests compostos requereixen una derivatització prèvia per a poder ésser determinats mitjançant la GC i per això és més habitual determinar-los per HPLC. Així, en el camp de l'anàlisi

de plaguicides la situació present està caracteritzada bàsicament per la coexistència d'aquestes dues tècniques cromatogràfiques.

Tot i així, la GC ha estat la tècnica més àmpliament utilitzada en la determinació de plaguicides com són els compostos organohalogenats [217,218], organofosforats [218,219], organonitrogenats [220], organoestànics i organosulfurats. Detectores universals, com el FID i detectores selectius, com són el ECD, el detector de nitrogen-fòsfor (NPD) i el detector fotomètric de flama (FPD) han estat àmpliament utilitzats per a la determinació de plaguicides, tenint en compte l'elecció del detector en funció dels analits a determinar i el tipus de matriu per tenir la sensibilitat i selectivitat adequades. Alguns autors també han utilitzat el detector d'emissió atòmica (AED) acoblat a la GC [221,222]. El AED presenta selectivitat per elements específics, això fa que el considerin més selectiu que els anteriors ja que permet obtenir informació estructural. Tot i així, aquest detector és menys sensible. Eisert et al. [222] van fer un estudi comparatiu de diferents detectores per un grup de plaguicides termolàbils, les tècniques que van utilitzar van ser GC-FID, GC-NPD, GC-ECD i GC-AED. Els de NPD i ECD van ser els més sensibles amb un LOD < 1 pg, seguit del FID (LOD < 20 pg) i finalment el AED (LOD < 300 pg). Però, actualment, com en la majoria de determinacions mediambientals, tots aquests detectores han estat progressivament reemplaçats per MS, degut a la seva elevada sensibilitat, versatilitat i selectivitat [218,220,223-226].

Existeixen diferents fases estacionàries disponibles comercialment amb un ampli interval de polaritats i la utilització d'una o l'altra depèn dels plaguicides a separar. Així, per la determinació de plaguicides organoclorats, organoestànics, organofosforats i organosulfurats s'han utilitzat fases de polaritat intermèdia de (50%-fenil)-metilsiloxà [217,218]. Generalment, les columnes capil·lars més utilitzades són les que presenten característiques no polars o la polaritat més baixa possible, degut a què aquestes presenten una estabilitat superior que les fases més polars. Així, la tria tendeix cap a les fases menys polars que siguin capaces de separar tots els plaguicides a determinar.

Les fases formades per un (5%-fenil)-metilpolisiloxà i les equivalents, de característiques no polars són les que més s'han utilitzat, sobretot quan es vol realitzar la separació cromatogràfica d'una mescla formada per molts plaguicides de diferents característiques [223-225].

Els sistemes d'injecció de *split*, *splitless* i *on-column* han estat àmpliament utilitzats per la determinació de plaguicides [227], utilitzant volums d'injecció entre 0.5 i 1 µl. Aquests volums d'injecció tan baixos són la principal limitació de la GC per a la determinació de plaguicides a nivell traça. Per una banda per la pèrdua d'efectivitat en el factor de preconcentració quan els tractaments de la mostra impliquen la utilització de grans volums de mostra, per injectar finalment tan pocs µl al cromatògraf. I per una altra banda, per la combinació en línia de les tècniques de preconcentració i separació. Per això, els estudis més recents estan basats principalment en la utilització de noves tècniques que utilitzin la injecció de grans volums de solvent orgànic a la GC i que permetin l'acoblament en línia del sistema de pretractament a la tècnica de separació. Aquestes noves tècniques es basen en l'evaporació parcial del solvent (PCSE) emprant una interfase *on-column*, l'evaporació total del solvent (FCSE) emprant una interfase *loop-type* o la injecció amb vaporització programada (PTV) [228-231]. Amb aquestes tècniques es poden arribar a injectar volums de fins a 1 ml en el cromatògraf.

La GC-MS utilitzant la font d'ionització EI en el mode *full-scan* és la tècnica més utilitzada per la identificació i quantificació de plaguicides en mostres aquoses complexes, tot i que sovint també s'ha utilitzat en SIM per la quantificació [218,223-225,230,232-234]. Tot i així, alguns autors utilitzen la CI en mode negatiu per la determinació de plaguicides organoclorats. Aquest tipus d'ionització proporciona més selectivitat i sensibilitat per aquests compostos electrofílics [231].

Com ja s'ha comentat, la utilització de la GC-MS en tàndem ofereix un elevat grau de selectivitat i sensibilitat comparat amb la GC-MS. El principal avantatge que aporta la MS en tàndem és que permet la determinació de plaguicides a

nivells traça en presència de compostos interferents sense cap disminució en la capacitat d'identificació degut a la important disminució del soroll de fons que es dona [235]. L'analitzador més senzill per portar a terme l'acoblament de la MS en tàndem és la trampa d'ions [236]. Martínez et al. [237] disminueixen el LOD un ordre de magnitud respecte la GC-MS per a la majoria de plaguicides que determinen utilitzant la GC-MS-MS. Per exemple, després de portar a terme la SPE de 500 ml de mostra aquosa, s'obté un LOD pel dieldrin utilitzant la GC-MS de $1.0 \mu\text{g l}^{-1}$ i utilitzant la GC-MS-MS en $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$.

Com ja s'ha comentat, degut a la inestabilitat tèrmica i polaritat, alguns plaguicides no són directament determinables per GC. Així, la HPLC és la tècnica més utilitzada pels plaguicides més polars i iònics.

La HPLC s'empra habitualment en el mode de fase inversa, utilitzant principalment fases estacionàries de base sílice enllaçades amb hidrocarburs lineals, com per exemple C_{18} [206]. La majoria de detectors acoblats a la HPLC de gran interval d'aplicació, com són el d'absorbància UV-Visible o el de díodes en fila, o més selectius, com són l'electroquímic i el de fluorescència, han estat utilitzats per a la determinació de plaguicides. Però en els últims treballs es pot observar que el sistema de detecció escollit per la majoria d'autors és la MS, gràcies a la introducció de la ionització a pressió atmosfèrica (API) que recentment han obert les portes a l'HPLC-MS com a tècnica analítica de rutina [223,238]. Els mètodes utilitzant HPLC-MS han estat desenvolupats per determinar triazines, agents antialgues (diuron, Irgarol1051,...), plaguicides organofosforats, organoclorats,... [226,239-245].

Tot i que les interfases més utilitzades últimament pels plaguicides són les d'API [246-248], la de termoesprai (TSP) [249] i la de feix de partícules (PB) [250,251] també han estat molt utilitzades. La TSP i PB van ser molt aplicades entre 5 i 15 anys enrere, però els avantatges que presenten les interfases d'API, han fet que aquestes siguin les més utilitzades en l'actualitat. Tot i així, encara es poden trobar diversos treballs en què utilitzen la interfase de PB, ja que tot i que amb aquesta interfase s'obté una pobre sensibilitat, proporciona

uns espectres tipus els d'EI que generen una abundant informació estructural i permeten fer cerques a través de les llibreries convencionals GC-MS obtingudes per ionització EI.

L'elecció de la font d'ionització a pressió atmosfèrica apropiada per plaguicides es pot extreure del treball realitzat per Thurman et al. [252], on es porta a terme un estudi sobre l'eficiència d'ionització de 75 plaguicides a través de les dues interfases, l'APCI i l'ESI. Com es pot veure a la Taula 4, amb la interfase APCI en mode positiu s'obté una ionització més sensible per plaguicides bàsics i neutres, mentre que pels herbicides catiónics i aniònics resulta més eficient la interfase de ESI, en mode positiu o negatiu en funció dels herbicides.

La selecció del modificador utilitzat per a la separació en fase inversa i per tant, per la introducció dels analits en el sistema de MS pot afectar notablement a la resposta dels analits. Steen et al. [247] utilitzen un mètode basat en LC-(ESI)MS per a la determinació d'un grup de plaguicides polars i comproven que el metanol dona millors resultats que l'acetonitril. Per una altra banda, la matriu de les mostres analitzades també pot provocar una important supressió del senyal. Steen et al. [247] també comproven en el seu treball que la matèria húmica co-extreta junt amb els analits provoca una supressió en la detecció per (ESI)MS. L'efecte d'aquesta supressió depèn del pH i de la naturalesa de la mostra, per exemple si són aigües superficials o d'estuaris.

Un altre factor que també pot influir en el senyal quan es treballa amb interfases d'API és el flux de fase mòbil, com es comprova en l'estudi realitzat per Asperzer et al. [253]. Els plaguicides més hidrofòbics mostren dràstiques disminucions del senyal quan augmenta el flux de fase mòbil en les dues interfases utilitzades (APCI i ESI). En canvi, els compostos més hidrofílics tenen diferents comportaments en funció del flux i la interfase usada. Els autors indiquen que l'aplicació de gradients de flux de fase mòbil seria convenient per aconseguir la màxima sensibilitat per tots els plaguicides estudiats en la detecció per (API)MS.

Taula 4. Respostes per 75 plaguicides utilitzant les interfases d'APCI i ESI en mode positiu i negatiu [252].

Compound	APCI+	APCI-	ESI+	ESI-	Compound	APCI+	APCI-	ESI+	ESI-
<i>acetanilide herbicides</i>					<i>bipyridylum herbicides</i>				
acetochlor	+	+	+	0	chlormequat	0	0	++	0
alachlor	+	+	+	0	mepiquat	0	0	++	0
dimethamide	+	+	+	0	diquat	0	0	++	0
flufenacet	+	+	+	0	paraquat	0	0	++	0
metolachlor	+	+	+	0	<i>actanilide degradates</i>				
<i>phenylurea herbicides</i>					acetochlor ESA	0	0	0	++
chlorotoluron	++	+	++	+	alachlor ESA	0	0	0	++
diuron	++	+	++	+	dimethanamide ESA	0	0	0	++
demethyldiuron	++	0	++	0	flufenacet ESA	0	0	0	++
didemethyldiuron	++	0	++	0	metolachlor ESA	0	0	0	++
fluometuron	++	+	++	+	acetochlor OXA	0			++
demethylfluometuron	++	0	++	0	alachlor OXA	0			++
didemethylfluometuron	++	0	++	0	dimethanamide OXA	0			++
isoproturon	++	0	++	0	flufenacet OXA	0			++
linuron	++	+	++	0	Metolachlor OXA	0			++
<i>Triazine herbicides</i>					<i>chlorophenoxy acid herbicides</i>				
atrazine	++	0	++	0	dicamba	0	+	0	++
deethylatrazine	++	0	++	0	2,4,5-T	0	+	0	++
deisopropylatrazine	++	0	++	0	2,4-DP	0	+	0	++
didealkylatrazine	++	0	+	0	2,4-D	0	+	0	++
deethylhydroxylatrazine	++	0	++	0	<i>organophosphate insecticides</i>				
deisopropylhydroxyatrazine	++	0	++	0	acephate	++	+	++	0
hydroxyatrazine	++	0	++	0	azinophos-ethyl	++	+	++	0
ametryn	++	0	++	0	fenitrothion	++	+	++	0
cyanazine	++	0	++	0	fenthion	++	+	++	0
deethylcyananzine	++	0	++	0	fensulfoton	++	+	++	0
cyanazine acid	++	0	++	0	vamidothion	++	+	++	0
deethylcyananzine acid	++	0	++	0	chloropyrifos	++	+	++	0
irgarol	++	0	++	0	<i>organochlorine insecticides</i>				
decyclopropane-irgarol	++	0	++	0	dieldrin	0	0	0	0
propazine	++	0	++	0	aldrin	0	0	0	0
prometon	++	0	++	0	endosulfan	0	0	0	0
prometryn	++	0	++	0	<i>carbamate insecticides</i>				
deisopropylprometryn	++	0	++	0	carbofuran	++	0	++	0
simazine	++	0	++	0	aldicarb	++	0	++	0
terbutryn	++	0	++	0	methomyl	++	0	++	0
terbutylazine	++	0	++	0	methiocarb	++	0	++	0
<i>phenolic compounds</i>					<i>sulfonylurea herbicides</i>				
phenol	0	0	0	0	metasulfuromethyl	++	+	++	+
3-nitrophenol	0	++	0	+	bensulfuron	++	+	++	+
2,4-dinitrophenol	0	+	0	+	<i>alkyl sulfate surfactant</i>				
2,3,6-trinitrophenol	0	+	0	+	sodium dodecyl sulfate	0	0	0	++
4-chloro-3-methylphenol	0	+	0	+					
2,4,5-trichlorophenol	0	++	0	+					

The 0 means no response (LOD > 1 µg on column), + means method possible (LOD 10 ng- 1 µg on column), ++ means sensitive method possible (LOD < 500 pg- 10 ng on column). Response factors are based on an injection of 25 µl of sample and a LOD defined as a signal-to-noise ratio of 10:1.

Tal com s'ha anat comentant, per obtenir més fragmentació i per tant, més informació estructural sovint s'utilitza la MS en tàndem, però a més, utilitzant aquesta tècnica també es redueixen els LODs un ordre de magnitud. Per exemple, la LC-MS i la LC-MS-MS s'han utilitzat per la determinació de 48 plaguicides i els seus productes de transformació [238]. A través de diferents tècniques d'extracció per mostres d'aigües superficials de França i Canadà, s'obtenen LODs entre 20 i 100 ng l⁻¹ per LC-MS (en *full-scan*) i entre 2 i 6 ng l⁻¹ per LC-MS-MS (en SIM). Tot i que en aquest treball la sensibilitat de LC-MS-MS (en SIM) resulta ser equivalent a la que s'obté quan s'utilitza LC-MS (en SIM).

Les tècniques en tàndem són especialment rellevants quan els plaguicides s'han de determinar a nivells ultratraça i per fer escombrats dels productes de transformació desconeguts dels plaguicides [254]. Així, per portar a terme la identificació, sobretot pels productes de degradació, generalment s'aplica la MS en tàndem utilitzant tant la trampa d'ions com el temps de vol [238].

Tot i que la GC i la HPLC són les tècniques més escollides per a la determinació de plaguicides, l'electroforesi capil·lar en diversos dels seus modes d'operació resulta una alternativa interessant per a la determinació de plaguicides degut als principals avantatges com són elevada eficiència, ràpid anàlisi i baix consum de reactius i solvents. Però, la seva principal limitació, els baixos límits de detecció, impedeix la seva implementació per la determinació de plaguicides en mostres reals. Tot i així, el desenvolupament d'estratègies de preconcentració en línia han permès disminuir aquests límits de detecció fent viable de nou la seva aplicació per l'anàlisi a nivell traça [255-257]. Da Silva et al. [257] comparen tres estratègies de preconcentració en línia per CE i la seva combinació amb l'SPE *off-line* per la determinació de plaguicides en aigua de beguda i en vegetals. Els límits de detecció que obtenen són de l'ordre de 2-46 µg l⁻¹ i aplicant la SPE arriben a límits de 0.1 µg l⁻¹ en aigües de beguda.

I.2.4.2. Tècniques d'extracció

Com ja s'ha comentat en l'apartat de legislació, el total de plaguicides permesos en aigües destinades al consum humà està establert en $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ per l'EU. Per alguns la directiva 98/83/CE també té establerts uns nivells individuals de pocs $\mu\text{g l}^{-1}$. Aquests baixos nivells, fan necessari la utilització de tècniques de preconcentració per determinar aquests compostos en mostres aquoses.

La determinació de plaguicides en aigües, ha estat àmpliament estudiada utilitzant les tècniques convencionals, com són la LLE i la SPE. Però l'aplicació de la SPE automatitzada *off-line* [223,239] i de la SPE en línia [224,240-242] són actualment els mètodes més utilitzats junt amb la SPME i tècniques derivades.

Com a sorbents per portar a terme la SPE, s'han utilitzat les síliques enllaçades [219,237,246], polímers [219,239,241], carbó [247,258] i, puntualment, immunosorbents [259]. Els sorbents polimèrics són estables a intervals de pH més amplis que els d'octadecilsilà i poden ser emprats per a la preconcentració de compostos amb característiques polars que no són suficientment retinguts per l'altre tipus de sorbent. Els sorbents polimèrics més àmpliament utilitzats són el copolímer estirè-divinilbenzè i el copolímer de divinilbenzè-vinilpirrolidona, com és l'Oasis HLB. Tot i així, la utilització d'un sorbent o un altre depèn de la família de plaguicides que es vol preconcentrar. Nogueira et al. [246] proven l'eficiència de l'extracció utilitzant tres sorbents diferents, un d'octadecilsilà (250 mg) i dos polimèrics, el poliestirè-divinilbenzè (500 mg) i un modificat amb grups polars, la N-vinilpirrolidona divinilbenzè (200 mg). Pels plaguicides estudiats, entre ells tres triazines, obtenen millors recuperacions amb l'octadecilsilà (76-111%) que amb el polimèric que conté el monòmer hidrofílic de vinilpirrolidona (30-123%) i el de poliestirè-divinilbenzè (17-125%). Resultats similars obtenen Ballesteros et al. [219] per a la determinació de plaguicides organofosforats. Les millors recuperacions, per sobre del 98%,

les obtenen utilitzant un sorbent d'octadecilsilà enlloc dels diferents sorbents polimèrics que també proven (XAD-2, XAD-4, XAD-7 i XAD-16), on la mitjana de les recuperacions que obtenen està entre el 40 i el 75%.

Davant la necessitat d'obtenir bones recuperacions per als compostos més polars, sovint s'utilitzen copolímers d'estirè altament entrecreuat, com són el LiChrolut EN o l'Isolute ENV, o reïnes polimèriques modificades químicament. Masqué et al. [260] duen a terme un estudi comparatiu entre 4 sorbents diferents per a l'extracció d'un grup de fenols i plaguicides. Tres dels sorbents utilitzats són polímers comercials, el copolímer PLRP-S i els copolímers altament entrecreuat LiChrolut EN i Envi-Chrom P. L'altre és una reïna polimèrica químicament modificada introduint un grup benzoil. Les recuperacions pels analits més polars són superiors per a aquestes reïnes modificades químicament.

Sorbents més selectius, com són els d'empremta molecular (MIPs), també s'han desenvolupat per la determinació de plaguicides en aigües mediambientals, sobretot per l'eliminació dels components de la matriu en mostres molt complexes [243].

La SPME ha estat àmpliament utilitzada per la determinació de plaguicides, tal com indica la revisió bibliogràfica realitzada per Beltran et al. l'any 2000 [214]. Ha estat aplicada, principalment combinada amb la GC, per a la determinació d'un gran nombre de compostos orgànics en aigua [217,220,225,261-263], degut a la rapidesa, senzillesa, poca utilització de solvent orgànic i fàcil automatització, tant amb GC com en HPLC, que presenta aquesta tècnica. La SPME ha estat comparada amb discs de SPE per la determinació de 10 plaguicides organofosforats [264]. Els límits de detecció i recuperacions que s'obtenen amb ambdós mètodes són comparables, però amb la diferència que la SPME només necessita un volum de mostra de 2 a 5 ml.

Altres tècniques més recents derivades de la SPME, com és la SPME *in-tube* introduïda pel grup de Pawliszyn, també s'han desenvolupat per la determinació de plaguicides [248]. Per exemple, Guo et al. [265] han desenvolupat un mètode automatitzat basat en la SPME *in-tube* acoblada a la HPLC per la determinació de plaguicides carbamats.

La SPME s'ha utilitzat per a la determinació de plaguicides en els seus dos modes d'extracció, en el d'immersió directa de la fibra en la mostra aquosa (DI-SPME) i en el d'espai de cap (HS-SPME). Però, el mode d'extracció HS-SPME s'utilitza per diferenciar els compostos volàtils dels menys volàtils. Tot i així, la HS-SPME s'ha aplicat per a la determinació de diferents classes de plaguicides [266-268]. Sakamoto et al. [267] estudien l'aplicabilitat de la HS-SPME per la determinació d'un gran nombre de plaguicides poc volàtils i semi-volàtils en mostres aquoses. Dels 174 plaguicides que estudien, 158 són extrets quantitativament pel sistema HS-SPME.

La SPME ha estat comparada amb la SPE per Quiroz et al. [269] per a la determinació de plaguicides organofosforats, comprovant que resulta ser una alternativa viable a la SPE, ja que proporciona una elevada sensibilitat amb petits volums de mostra.

L'extracció amb barres magnètiques agitadores (SBSE), tècnica d'extracció basada en els mateixos principis que la SPME, també s'ha aplicat a la determinació de plaguicides [228,245]. Blasco et al. [245] comparen la SPME i la SBSE per la determinació de plaguicides organofosforats per LC-MS. Les dues tècniques resulten simples, econòmiques, no requereixen cap pas de preparació de la mostra preliminar i redueixen significativament la utilització de solvents orgànics. La linealitat i precisió obtingudes en els dos casos són similars, i els autors descriuen la SBSE com una tècnica més precisa i sensible que la SPME, principalment en matrius molt complexes. Peñalver et al. [228] apliquen la SBSE per la determinació d'un grup de plaguicides considerats EDs. La desorció dels analits la porten a terme amb un solvent orgànic i utilitzant una interfase PTV que permet la introducció de

grans volums a la GC. D'aquesta manera demostren que aquest mètode desenvolupat pot ser una bona alternativa a la desorció tèrmica quan no es disposa d'aquest sistema en el cromatògraf.

També s'han desenvolupat tècniques alternatives a la convencional LLE i per tant a la SPME i SBSE, com per exemple la microextracció en fase líquida (LPME) amb una fibra porosa protegida per contenir el solvent durant l'extracció. Aquesta tècnica s'ha utilitzat per la determinació d'herbicides de la família de les triazines i plaguicides organoclorats en mostres aquoses [220,270,271]. Shen et al. [220] comparen aquesta tècnica amb la SPME i conclouen que la LPME és a més d'una bona tècnica de preconcentració, una excel·lent procediment de neteja de la mostra, cosa que la fa directament aplicable a mostres brutes.

1.2.5. Altres compostos

Altres grups de compostos amb propietats alteradores endocrines, utilitzats principalment en activitats químiques industrials, són els hidrocarburs policíclics aromàtics (PAHs), els dièsters de ftalat (PAEs), les dioxines, el bifenil policlorats i el bisfenol A. Els PAEs, per la seva gran utilització, ja han estat comentats anteriorment i en aquest apartat, es tindran en compte els PAHs amb propietats alteradores endocrines, principalment el benzo(a)pirè i benzo(a)antracè, i el bisfenol A (BPA). La principal utilització o origen d'aquestes compostos es pot veure a la l'Annex I.

Els PAHs són un grup de compostos que es caracteritzen per tenir dos o més anells aromàtics fusionats en la seva estructura (Figura 20). Generalment, es formen com a resultat de combustions incompletes de matèria orgànica que poden originar-se tant de forma natural (incendis forestals,...) com degut a l'activitat humana, com per exemple en la incineració de residus. Això, comporta la seva introducció a les aigües superficials a través de la pluja, on es dipositen les partícules que contenen

els PAHs alliberats a l'atmosfera [272]. Una altra via d'introducció a les aigües superficials és a través de les descàrregues de residus municipals i industrials, cosa que fa que s'hagin trobat en aigües de depuradora, en rius, en llacs i en el mar [273-277].

Els PAHs ja han estat àmpliament estudiats pels seus efectes adversos en el medi ambient, però recentment s'ha considerat que alguns d'ells, com són el benzo(a)pirè i el benzo(a)antracè, poden tenir propietats alteradores del sistema endocrí, fet que fa que siguin sospitosos de EDs [21].

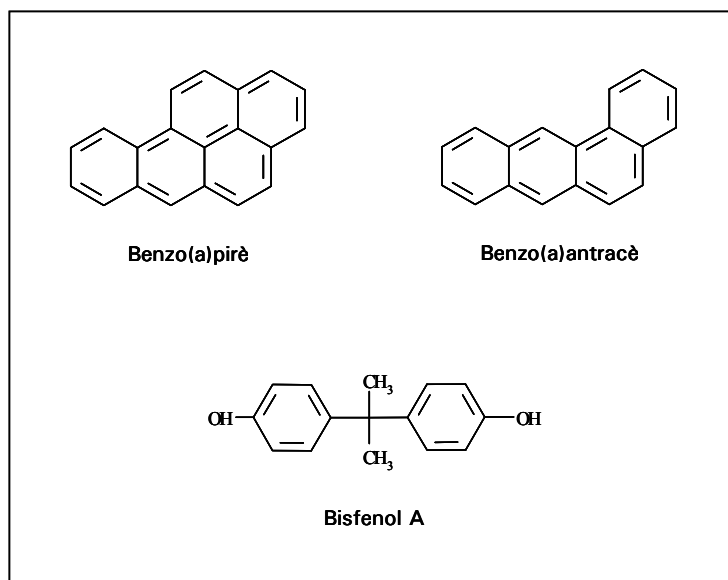


Figura 20. Estructures químiques del benzo(a)pirè, benzo(a)antracè i bisfenol A.

Els PAHs són compostos amb una elevada persistència i, tot i que es troben en mostres aquoses, són poc solubles en aigües. La concentració d'aquests compostos en mostres aquoses acostuma a ser baixa, entre 0.06 i 540 ng l⁻¹ [273-277], degut a què tendeixen a quedar adsorbits en les

partícules que es queden en suspensió i que són dipositades als sediments, on es troben a concentracions més elevades, entre 0.01 i 187 $\mu\text{g kg}^{-1}$ [274,277,278].

El BPA és un additiu polimèric que s'utilitza en la producció de reïnes epoxi i plàstics policarbonats (material que s'utilitza en la majoria d'ampolles de plàstic transparent). Aquests plàstics s'utilitzen principalment per empaquetar o contenir menjars i begudes. El BPA també es pot trobar en polímers utilitzats en tractaments dentals.

Com es pot veure a la Figura 20, la seva estructura química és molt similar a la hormona sintètica dietilestilbestrol. Això fa que sigui considerat altament estrogènic: de fet s'ha comprovat que té una elevada activitat estrogènica a nivells entre 2-5 $\mu\text{g l}^{-1}$ [279].

Els additius polimèrics generalment no es troben enllaçats químicament als polímers i es pot donar una migració cap als aliments o begudes i aigües que es troben en contacte amb el plàstic. Degut a la gran utilització de plàstics en la vida quotidiana, la possibilitat de trobar el BPA en mostres aquoses ambientals és força elevada. Per exemple, els nivells trobats en les aigües mediambientals per Fromme et al. [180] són entre 0.0005-0.41 $\mu\text{g l}^{-1}$ en aigües superficials, entre 0.018-0.702 $\mu\text{g l}^{-1}$ en aigües de sortida de depuradores i entre 0.01-0.19 mg Kg^{-1} en sediments.

1.2.5.1. Tècniques de separació

Com en els altres casos, les tècniques més utilitzades per a la determinació de PAHs són la HPLC i la GC, tot i que puntualment també s'ha utilitzat la CE.

La GC és una tècnica molt utilitzada per a la determinació de PAHs, fins i tot el mètode 610 de l'EPA [280] proposa la utilització de la GC amb un FID, a

més de la HPLC amb detecció UV-visible o fluorescència per a la determinació dels 16 PAHs regulats per aquesta institució en aigües residuals. Tot i així, el detector més utilitzat en l'anàlisi mediambiental d'aquests compostos és la MS principalment per la identificació i confirmació [281,282]. La EI ha estat àmpliament utilitzada per a la determinació d'aquests compostos, però els isòmers no poden ser diferenciats. Utilitzant la CI positiva amb metà, una mescla de metà/argó o èter de dimetil com a reactius, es poden diferenciar aquests isòmers [283].

Tot i així, la tècnica més usual per a la determinació de PAHs és la HPLC, principalment en fase inversa [284,285]. Per la HPLC, existeixen 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 per GC. A més del detector d'UV-visible, detectors més sensibles i/o selectius, com són el detector de fluorescència i l'electroquímic, també s'ha utilitzat. Però, les publicacions més actuals indiquen l'àmplia utilització de la MS per a la determinació d'aquests contaminants.

Degut a la baixa polaritat d'aquests compostos, la seva ionització amb la interfase ESI és molt difícil i per tant, la interfase més utilitzada és la d'APCI [286-288]. Tot i així, els espectres que s'obtenen normalment contenen només l'ió molecular, perquè es necessiten voltatges de fragmentació molt elevats per tal d'obtenir informació estructural.

Les tècniques d'electroforesi que s'han aplicat per a la determinació de PAHs utilitzen principalment la cromatografia capil·lar miscel·lar electrocinètica (MEKC), ja que degut a la hidrofobicitat que presenten aquests compostos la seva separació és difícil utilitzant altres mètodes electroforètics [289].

El BPA generalment es determina junt amb altres compostos fenòlics amb propietats estrogèniques com són els alquilfenols o els esteroïds naturals i

sintètics, degut a les seves similituds estructurals. Així, els mètodes explicats per aquests són extensibles al BPA.

Tal i com s'ha comentat, en general la GC-MS i la HPLC-MS són les tècniques principalment utilitzades per determinar el BPA en mostres mediambientals.

La GC-MS és la tècnica més utilitzada per a la determinació de les formes lliures i derivatitzades dels BPA [74,87,128,136,138,140,290]. La polaritat del BPA influeix en el límit de detecció que s'obté amb GC-MS, tot i així s'obtenen LODs entre $0.1-1 \mu\text{g l}^{-1}$ sense derivatitzar. Utilitzant (EI)MS l'ió base que es forma a m/z 213 correspon al fragment $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ i també s'observa un pic a m/z 228 corresponent al fragment $[\text{M}]^+$. Per millorar la sensibilitat, sovint s'utilitzen tècniques de derivatització abans de la separació cromatogràfica, utilitzant diferents reactius per portar a terme la sililació del BPA [87,140,290] o diferents derivats que contenen fluor [95,96].

Alguns autors opten per la utilització de la CI enlloc de la EI per tal d'augmentar la sensibilitat i selectivitat del mètode disminuint la fragmentació que es dona en la ionització per impacte electrònic. Aquesta tècnica d'ionització més suau dona el pic base corresponent $[\text{M}]^+$ i en segon terme l'ió isotòpic C_{13} $[\text{M}+1]^+$. Generalment, porten a terme la CI en mode negatiu utilitzant el metà com a gas reactiu i formant derivats amb fluor d'elevat pes molecular [95,96]. Kuch et al. [95] porten a terme la quantificació en SIM i obtenen LODs entre $0.02-0.04 \text{ ng l}^{-1}$ en aigües de riu, de depuradora i aigües potables.

Tot i que la MS és la tècnica més utilitzada amb la GC com a sistema de detecció, sovint s'utilitzen reactius per portar a terme la derivatització que permeten la utilització de detectors més selectius. Per exemple, Shin et al. [291] utilitzen la cianometil·lació per portar a terme la derivatització del BPA

i poder utilitzar la GC acoblada al NPD. Amb aquest mètode a partir de l'extracció líquid-líquid de 200 ml d'aigua obtenen un LOD de $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$.

La HPLC-MS és el mètode alternatiu més emprat per la determinació de BPA en matrius mediambientals [74]. Les dues interfases utilitzades han estat tant l'APCI [151] com la ESI [107,152] en el mode NI. Utilitzant la interfase ESI s'obtenen dos ions majoritaris, el m/z 227 $[\text{M-H}]^-$ (ió base) i el m/z 212 corresponent a la pèrdua d'un grup CH_3 . Utilitzant la interfase APCI és dona més fragmentació i s'obtenen ions addicionals, tal com es pot veure a la Figura 21. La ESI en el mode NI dona nivells de sensibilitat més alts que l'APCI. Tot i així, al portar a terme la quantificació amb la interfase d'APCI, sovint s'utilitzen baixos voltatges de fragmentació per tal de maximitzar el senyal de l'ió molecular (m/z 227) i els LODs per mostres aquoses que s'obtenen estan entre $25\text{-}100 \text{ ng l}^{-1}$ [109].

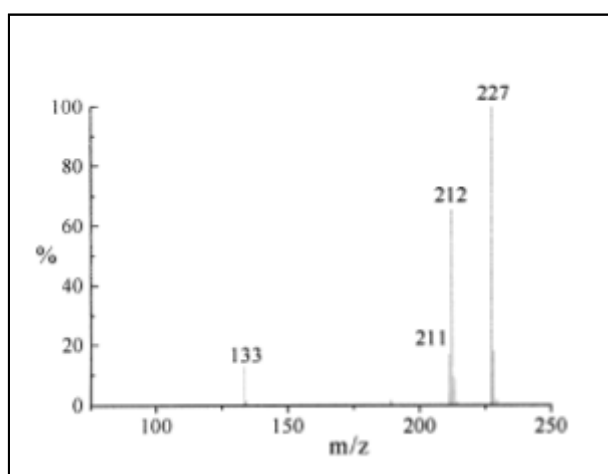


Figura 21. Espectre del bisfenol A obtingut en el mode *full-scan* (m/z 50-250) per LC-APCI(NI)-MS [151].

El BPA pot ser detectat amb un detector de fluorescència sense portar a terme la seva derivatització, tot i així per augmentar l'especificitat de la determinació evitant les possibles interferències d'altres compostos, es derivatitza. Un exemple és amb la utilització del reactiu clorur de dansil que aporta més especificitat a la determinació [292].

Com ja s'ha comentat en l'apartat de tècniques de separació del capítol 1.2.1, diferents modes de l'electroforesi capil·lar, com són l'electroforesi capil·lar per zones (CZE) i la MEKC, s'han provat per la determinació d'un grup d'EDs format per esteroids sexuals naturals i sintètics, APs i pel BPA [119]. En funció del nombre de compostos a separar i les característiques d'aquests una tècnica és més adequada que una altra. Per exemple, la CZE s'utilitza principalment per a la determinació de compostos iònics i la MEKC s'utilitza tant per compostos iònics com neutres. Tot i així, la tècnica electroforètica que presenta més avantatges per a la determinació de bisfenol A, junt amb altres esteroids sexuals i alguns alquilfenols és la cromatografia capil·lar micel·lar de microemulsió electrocinètica, tècnica de més recent aplicació [124].

1.2.5.2. Tècniques d'extracció

Els PAHs han estat molt estudiats tant en mostres aquoses com sòlides. En aquesta tesi però ens centrarem en aquelles tècniques desenvolupades per mostres aquoses. Cal tenir en compte que degut a la baixa solubilitat en aigua que tenen els PAHs tenen tendència a quedar absorbits en els recipients que els contenen. Això dificulta la seva determinació, tant en el procés d'anàlisi com en l'etapa de mostreig i emmagatzement de les mostres. Per això, la majoria de mètodes desenvolupats afegeixen solvent orgànic a la mostra abans de portar a terme la seva extracció o en el moment del mostreig. És important també tenir en compte el tipus de mostra que s'ha de recollir, perquè un alt contingut de matèria en suspensió farà més difícil agafar mostres prou representatives [293].

Els solvents orgànics que se solen utilitzar per evitar que els PAHs es quedin adsorbits en el sistema són el 2-propanol i l'acetonitril. Gimeno et al. [288] van estudiar l'efecte en els volums de ruptura de l'addició d'aquests dos solvents orgànics en diferents proporcions per a la determinació dels sis PAHs regulats per l'EU, els millors resultats els van obtenir quan utilitzaven un 20% d'acetonitril.

Tant la LLE, com la SPME, SBSE i LPME s'han aplicat per l'extracció d'aquests compostos en mostres aquoses, però la més utilitzada ha estat la SPE [294].

Els sorbents més adequats per a la preconcentració d'aquests compostos són els de sílice enllaçada amb grups C₁₈ [276,285], tot i que també s'han utilitzat sorbents polimèrics de poliestirè-divinilbenzè (PS-DVB) [285,288,295] i polimèrics altament entrecreuats [296,297]. Lacorte et al. [296] utilitzen un sorbent hidrofílic altament entrecreuat (OASIS, Waters) per a la determinació de 109 compostos prioritari de la llista de la directiva 76/464/CEE, entre ells un grup de PAHs, a través de la SPE *off-line* i GC-MS. Les recuperacions que obtenen pels PAHs preconcentrant 200 ml de mostra són entre el 29 i el 120%, però pel benzo(a)pirè les recuperacions són del 57% en la fracció neutra i del 31% en la fracció àcida. En canvi, en un treball posterior realitzat per Gimeno et al. [288] utilitzen un sorbent de PS-DVB per la determinació d'una barreja de PAHs en aigua de mar a través de la SPE acoblada en línia a la HPLC. Amb aquest mètode van obtenir recuperacions entre el 40 i el 108% preconcentrant 25 ml de mostra, lleugerament superiors que en el treball anterior per tot el conjunt de PAHs, però pel benzo(a)pirè es van obtenir millors recuperacions (71%).

La SPME també ha estat aplicada per l'extracció d'aquests compostos en mostres aquoses [298-301]. Doong et al. [298] van comparar cinc tipus de fibres diferents per a la determinació dels 16 PAHs regulats per l'EPA en aigües naturals i els dos tipus de procediments per portar a terme l'extracció: la immersió directa de la fibra a la mostra i la HS-SPME. Amb els

dos tipus de procediments obtenen bons resultats, però les fibres que recomanen són les de polidimetilsiloxà (PDMS) de 100 µm i de poliacrilat (PA) de 85 µm.

La SBSE també s'ha utilitzat per la determinació de PAHs [301,302-304]. En el treball realitzat per Heiden et al. [301] obtenen millors recuperacions pels compostos de pes molecular més baix utilitzant la SBSE que amb la SPME i a més la SBSE proporciona millor reproductibilitat que la SPME convencional. Popp et al. [304] comparen la SPME i la SBSE per a l'extracció de PAHs en aigües i conclouen que utilitzant la SPME es poden donar pèrdues dels compostos per adsorció en el tefló o vidre de l'agitador magnètic, el qual no es dona utilitzant la SBSE perquè l'agitador cobert de PDMS, és el propi element actiu. A més amb la SBSE s'obtenen recuperacions més grans i límits de detecció inferiors degut a què aquests agitadors contenen més quantitat de PDMS que la fibra.

Recentment, la LPME basada en la utilització de membranes de polipropilè s'ha aplicat per la determinació de PAHs, com a tècnica alternativa a la SPME per solucionar els seus principals inconvenients i s'han obtingut resultats satisfactoris [270].

Tant la LLE com la SPE són les dues tècniques més utilitzades per l'extracció del BPA. La LLE es continua utilitzant sobretot quan la tècnica posterior de separació és la GC degut a l'etapa prèvia de derivatització que s'ha de portar a terme [140,290,291,305]. La LLE permet portar a terme la derivatització dels analits al mateix temps que es porta a terme la seva extracció, de manera que fa aquesta etapa molt més senzilla i menys tediosa. El solvent utilitzat per portar a terme aquestes extraccions és en la majoria dels casos el diclorometà.

Els sorbents utilitzats en la SPE han estat els de base sílice enllaçada amb grups C₁₈ [137,152], els polimèrics [95,137] i els polimèrics altament entrecreuats [95,107]. En algun cas s'ha utilitzat també el carbó [138] o

fins i tot, els recents *multiwalled carbon nanotubes* [154]. Liu et al. [87], comparen diferents sorbents per l'extracció de compostos fenòlics alteradors endocrins, entre ells el BPA. En aquest treball obtenen recuperacions superiors al 90% quan utilitzen sorbents de sílice enllaçada amb C₁₈, els polimèrics i els polimèrics altament entrecreuats. Amb els de base sílice i polimèrics de cianopropil s'obtenen recuperacions inferiors al 20%.

Alguns polímers d'empremta molecular (MIPs) també s'han sintetitzat per a la determinació específica de BPA [306,307]. Kubo et al. [306] preparen un MIP que els permet determinar el BPA en mostres aquoses ambientals, eliminant completament els àcids húmics presents en les mostres aquoses reals.

En algun treball també s'ha utilitzat la SPME [153,159,308] i més recentment, també s'ha desenvolupat un mètode basat en l'extracció per membranes buides foradades [94].

I.2.6. ESTAT ACTUAL DE LA QÜESTIÓ

Amb els capítols descrits fins ara s'ha anat introduint l'estat actual de la qüestió sobre les tècniques analítiques que s'utilitzen per la determinació de cada grup d'EDs que s'ha seleccionat. Tot i així, degut a la gran varietat de substàncies que poden ser EDs i que interessaria determinar el nombre màxim possible en una mateixa anàlisi, és interessant veure una visió més global de la situació actual sobre la determinació de EDs en aigües, classificada en funció de les tècniques analítiques més utilitzades enlloc de per compostos. Per això, en aquest capítol es presenta un estudi bibliogràfic que recull els mètodes analítics més utilitzats per aquests compostos.

D'aquest estudi bibliogràfic ha sorgit un article que està pendent de publicació a la revista *Trends in Analytical Chemistry*.

A continuació es presenta aquest article on a més de descriure els mètodes analítics desenvolupats per determinar els EDs estudiats en aquest treball, també es descriu la presència d'aquests compostos en aigües procedents de rius, mars, d'entrada i sortida de depuradores d'aigües residuals i aigües potables. En algun cas, també es descriu la seva presència en sediments per la seva relació amb posteriors migracions a aigües superficials.

ANALYTICAL METHODS FOR THE DETERMINATION OF ENDOCRINE DISRUPTORS IN AQUEOUS ENVIRONMENTAL SAMPLES

L. Brossa, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé

Departament de Química Analítica i Química Orgànica. Universitat Rovira i Virgili.
Imperial Tàrraco 1, 43005 TARRAGONA, Spain

Abstract

In this paper we review the analytical methods developed to determine four groups of endocrine disruptors: natural and synthetic steroid sex hormones, alkylphenols, pesticides and other industrial chemicals such as bisphenol A, phthalate esters and benzo[a]pyrene. Due to the diverse properties of the endocrine disruptors, a wide range of instrumental techniques has been used. The methods developed include several extraction techniques followed by separation techniques (mainly gas chromatography and liquid chromatography) and mass spectrometry detection, because qualitative and quantitative analysis of environmental samples can be performed simultaneously. These methods have been used to determine endocrine disruptors at low levels in environmental water samples. An overview of the occurrence of these compounds is also described in this paper.

Keywords: endocrine disruptors; analytical methods; water samples.

INTRODUCTION

In the last few years, much has been learned about how exposure to certain natural products and synthetic chemicals can alter the functioning of the endocrine systems of humans and wildlife [1,2]. These chemicals are known collectively as endocrine disruptors (EDs). EDs constitute a class of substances that are defined not by their chemical nature but by their biological effects. There are several lists, which include a large number of chemicals recognised or suspected of being endocrine disruptors [3-5]. The

first list of suspected endocrine disruptors was published in the scientific literature by Colborn et al [5]. This was followed by the popular book for the layperson, *Our Stolen Future* [6]. Today the Environmental Protection Agency (EPA) has established the Endocrine Disrupter Screening Program (EDSP) [7] and the European Union (EU) has implemented the Community Strategy for Endocrine Disruptors [4]. In these programs extensive work has been done towards the official designation of endocrine-disrupting substances. Literature studies on many chemicals have been

carried out and extensive lists of chemicals under evaluation for endocrine disruption effects have been drawn up.

These long lists include synthetic chemicals and natural products that are commercially manufactured for a specific purpose or produced as a by-product, e.g. pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), phthalate esters (PAEs), bisphenol A (BPA), alkylphenols (degradation product of non-ionic surfactants alkylphenol ethoxylates) and natural and synthetic steroid sex hormones (pharmaceuticals such as birth control pills and those for therapeutic purposes). Sometimes, these chemicals are classified according to the hormones they alter and their action mechanism: environmental estrogens, environmental androgens, anti-estrogens or anti-androgens.

Many of these EDs are relatively persistent chemicals that are widely used in industrial and domestic activities and for specific beneficial and therapeutic purposes. Therefore, exposure to one or more of them is virtually guaranteed for most organisms through drinking contaminated water, breathing contaminated air, ingesting contaminated food or being in contact with contaminated soil.

The need to develop assays for determining the potential of EDs to disrupt the endocrine system and include these compounds in the list of priority substances in the Water Framework directive 2000/60/CE was indicated by the Commission to the

Council and the European Parliament. Several studies have been published on screening and testing programs to determine which chemicals substances have possible endocrine-disrupting effects in humans and wildlife [8]. The development of analytical procedures to assess involuntary exposure to EDs and of analytical methods to detect and quantify EDs in complex matrices was therefore recommended. It was also recommended that these compounds be monitored in environmental samples. A recent review has been published on the biological and analytical methods used to determine estrogenicity and quantification of EDs present in waters and sediments from sewage treatment plants (STPs) [9]. This paper shows the importance of linking biological and chemical methods to determine the endocrine-disrupting activity of a sample or a particular chemical, identify the chemical that causes the activity in a sample and quantify the EDs in the sample. An earlier overview of analytical methods for five groups of compounds considered as EDs in freshwater sediments was also published [10]. This overview showed that it is important to determine EDs in freshwater sediments because the quality of water strongly depends on the quality of the sediments. The authors showed that freshwater sediments are contaminated with EDs and are a potential source of environmental water contamination.

The main aims of the present review are to describe the analytical methods that have been developed to determine four groups of EDs: natural and

synthetic steroid sex hormones (steroid estrogens), alkylphenols (APs), pesticides and other industrial chemicals (PAHs, BPA and PAEs) in environmental water samples. We also revise the occurrence of these compounds in environmental water samples.

The four groups of EDs discussed in this review were selected because they have widespread anthropogenic activities and therefore contribute greatly to the endocrine-disruption phenomena in the aquatic environment. Natural and synthetic steroid sex hormones, used mainly in contraceptive formulations, are excreted in the urine of mammals and are present in the aquatic environment mainly as a result of inefficient removal in sewage treatment plants (STPs). APs are the degradation products of alkylphenols ethoxylate (APEO) surfactants (domestic and industrial detergents), which do not break down effectively in STP processes or in the environment. Pesticides are widely used in agriculture nowadays and are generally highly persistent in the environment. The last group of compounds with endocrine-disrupting properties are used mainly in industrial chemical activities. We have selected benzo(a)pyrene, BPA and PAEs. All of these EDs can be discharged into the environment directly in surface and ground water or by wastewater from treatment plants and must be considered a potential risk both for aquatic life and drinking water quality.

ANALYTICAL METHODS

Due to the diversity of chemical compounds with endocrine-disruption properties, a wide range of methods has been used. The trends in analytical methods for EDs in environmental water samples include the use of several extraction techniques and separation techniques such as gas chromatography and liquid chromatography. The detection technique mainly used today is mass spectrometry (MS).

The power of MS has been shown in several reviews on MS and endocrine-disrupting chemicals [11-13]. Richardson [11] covers developments in environmental mass spectrometry of 2000 and 2001 with regard to emerging contaminants containing several pollutants that are considered to be endocrine disrupting. In 2002, a review was published on the recent advances in the mass spectrometric analysis of EDs, including APs, BPA, PAEs, steroid estrogens and polychlorinated and polybrominated compounds, in aquatic environmental samples [12]. This review concluded that only gas chromatography (GC) and liquid chromatography (LC) combined with MS and tandem MS, respectively, provide sufficient selectivity and inherent sensitivity to determine EDs in environmental samples. The determination of EDs at low ng l^{-1} levels has been made possible mainly due to the availability of MS instrumentation. Progress in coupling LC to MS led to a recent review of the techniques based on LC-MS for determining steroid estrogens and alkylphenolic surfactants [13]. The

application of advanced LC-MS technologies to environmental analysis has enabled a large number of compounds, especially polar compounds, to be determined that were previously difficult or even impossible to determine. LC-MS techniques are limited to the determination of known compounds because the ability of these techniques to screen and to identify unknown compounds is relatively low. The development of tandem MS has enabled accurate mass measurement and structural elucidation that can be used to identify unknown compounds. So, as the more recently published review on LC-MS analysis showed [14], in the aquatic environment and in water samples from treatment plants and in applications for pharmaceuticals, steroid estrogens, surfactants and pesticides, LC-MS-MS has started to be a routine method for several classes of EDs.

Determination techniques

Analytical techniques for determining EDs are dominated by biological assays, gas chromatography (GC) and high-performance liquid chromatography (HPLC). However, as an alternative to HPLC, capillary electrophoresis was also recently used to determine several EDs [15].

Biological techniques are primarily used to determine the endocrine-disrupting activity of a chemical or samples and the effects these may have on organisms. Biological techniques are the most sensitive techniques but they

are limited by the availability of the specific antisera and are subject to cross-reactivity. However, several authors have developed assays based on immunoassays or the yeast-based recombinant estrogen receptor-reporter assay (YES) to quantify individual EDs in environmental water samples [16,17]. Recently, Li et al. [16] developed an SPE-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method to determine estrone in river and sewage water at levels below 1.25 ng l⁻¹. SPE-ELISA showed specific recognition of estrone, without cross-reactions for three major estrogenic compounds (17 β -estradiol, estriol and 17 α -ethinylestradiol) and, in the river, influent and effluent sewage waters tested, was as accurate and precise as chromatographic techniques.

Some methods use biological assays to determine the estrogenicity of the sample in combination with GC or LC techniques to quantify the individual levels of pollutants in these samples. These integrated methods are based on the Toxicity Identification and Evaluation (TIE) procedure that was developed by the EPA at the beginning of the 1990's [18]. Solé et al. [19] determine the occurrence of APEOs and APs and some synthetic and natural steroid sex hormones in water samples and the effects in carp with chemical and biological determinations. Céspedes et al. [20] also used an integrated procedure using LC-MS to determine twenty-seven EDs (containing e.g. steroid estrogens, APs, BPA, PAEs) and the recombinant yeast assay (RYA) to assess total estrogenic activity in river water samples and

corresponding sediments. They conclude that the estrogenic activity was mainly attributed to the presence of nonylphenolic compounds and to the sporadic presence of steroid estrogens.

Capillary GC is the most common technique in environmental pollutant water analysis. The most important groups of pesticides usually analysed by GC are organohalogen, organophosphorus, organonitrogen, organotin and organosulphur compounds [21,22]. PAEs and benzo(a)pyrene have also been widely determined by GC [23,24]. However, as it can be easily coupled GC-MS, has a high separation ability, a low detection limit and wide use, this technique has also been used to determine several polar EDs such as alkylphenols and steroid estrogens. But, these determinations are usually performed after extraction followed by derivatization to overcome problems with volatility and enhance sensitivity [25-29]. APs and APEOs with less than 4-ethoxy groups can be determined without derivatization [30]. Some authors have also developed a rapid GC-MS screening method for routinely measuring several natural and synthetic steroid estrogens such as estrone, 17 α -ethinylestradiol, 17 β -estradiol and estriol, at ng l⁻¹ levels in water samples without derivatization [31].

Selective detectors have been widely used to determine several EDs. For example, an electron-capture detector was used to determine halogenated pesticides, nitrogen-phosphorus detector (NPD) for triazines, a flame-photometric detector (FPD) was used for organotin, organophosphorus and

organosulphur compounds, and a flame ionisation detector (FID) is normally suitable for the sensitive detection of PAHs. Derivatization has sometimes been used to determine pollutants using selective detectors, e.g. to determine BPA using NPD after cyanomethylation [32].

However, these detectors have been progressively replaced by MSD, which is highly sensitive, highly versatile and highly selective. Generally, this technique has been used to determine steroid estrogens and progestogens [25,31], alkylphenols [25,27-30], free and derivatized forms of BPA [25,30], phthalates [23,24], PAHs [23] and pesticides [21,22,33,34]. APs, steroid estrogens and BPA have been determined using both conventional MS (using electronic ionisation) and, to a lesser extent, MS-MS (using ion trap analyser) detection, usually in the selected ion monitoring (SIM) mode and after sample derivatization to improve both the stability of the compounds and sensitivity and precision [25,28,29,31]. The polarity effect of BPA on the detection limits achieved by GC-MS after extraction has been described in the review on recent advances in MS analysis [12]. The detection limits reported were between 100-1000 ng l⁻¹ and 0.4-5.4 ng l⁻¹ for the underivatized and derivatized forms, respectively.

Electronic ionisation (EI) has been successfully used to determine EDs thanks to the extensive libraries of mass spectra that are useful for identifying unknown peaks. However, chemical ionisation (CI) has been used

in some cases to decrease limits of detection or when low fragmentation in EI mode was done. For example, PAH isomers are almost always indistinguishable when EI is used but when positive CI with methane, a mixture of methane/argon, or dimethyl ether as reagent are used, PAH isomers can be differentiated [35]. EI-MS is the most sensitive detection technique for quantifying PAEs, but it provides little information on molecular mass or the nature of the alcohol moiety in the molecule. Positive CI mode with methane as the reagent gas has therefore mainly been used to obtain molecular mass and information about the ester group [36]. Kuch et al. [37] also used negative CI with methane as a reagent gas to reduce the limit of detection of BPA and 4-*tert*-octylphenol at 0.02 ng l⁻¹ for drinking water samples and at 0.05 ng l⁻¹ for effluent of sewage treatment plant water samples. In this method, water samples from 1 to 5 l were extracted by solid-phase extraction and determined by GC-NCI-MS in the selected ion mode.

GC techniques have been improved by the development of large volume injection using several interfaces such as the on-column, the loop-type or a programmed temperature vaporiser (PTV). These techniques are usually applied to reduce the limits of detection and to perform an on-line sample preconcentration or pre-treatment. A group of EDs, containing some phthalates, pesticides and PAHs, have been determined by on-line SPE-GC-MS using an on-column interface [38] or a PTV [39], obtaining

limits of detection between 0.1 and 36 ng l⁻¹.

Due to thermal instability and polarity, some EDs are not directly amenable to GC analysis without a prior derivatization step, so HPLC is the most reliable technique for most polar compounds. The recent development of new interfaces for couple LC-MS, mainly the introduction of atmospheric pressure ionisation (API) techniques, encouraged a more widespread use of LC-MS as a routine technique. It has therefore been used to determine EDs, mainly BPA, steroid estrogens, APs and the most polar pesticides, and is nowadays the most common technique. In a recent review of advances in mass spectrometric analysis related to endocrine-disrupting compounds in aquatic environmental samples, we can see that since 2000 a lot of methods have used LC-MS [12]. PAEs have been analysed with both LC-MS and GC-MS, but it is more difficult to use LC-MS to determine PAHs than GC-MS because these compounds are non-ionic and non-polar and ionisation and fragmentation in API-MS is strongly impeded.

Electrospray (ESI) and atmospheric-pressure chemical ionisation (APCI) in positive (PI) and negative ionisation (NI) mode are currently the most common LC-MS interfaces in the environmental analysis of EDs. Generally, analytes occurring as ions in solution can be analysed by ESI, while non-ionic analytes may be well suited for APCI. The selection of PI or NI mode may have a strong impact on signal intensity, the extent of adduct

formation and the chemical noise encountered. So the mode that appears to be best suited at the beginning may not necessarily be the most sensitive one at the end. APs, steroid estrogens and BPA have therefore mainly been determined using ESI and APCI interfaces under NI conditions, though the ESI source is more often used because it is more sensitive than the APCI source [40]. The NI-ESI interface usually gives only $[M-H]^-$ ions and the MS-MS system is needed for better confirmation and sensitivity. The methods developed for steroid estrogens and APs therefore use LC-ESI-MS-MS more often [41-45] than LC-ESI-MS [19,40,46,47] in the NI mode. Using LC-MS-MS increases the selectivity and sensitivity of the determination and results in far better LODs than those obtained with LC-MS. However, recent studies for steroid estrogens indicate that in many cases the APCI interface operating in the PI mode can provide similar sensitivities to those of NI-ESI when a triple quadrupole MS [42] is used. With an APCI interface, at higher voltages and using so-called in-source CID, the spectra for APs show fragmentation that closely resembles that obtained by the MS-MS technique. APCI gives more fragmentation than ESI, but for quantitative analysis, a lower fragmentation voltage was used in order to maximise the signal from the molecular anion [13].

PAEs and PAHs can be determined using both APCI and ESI interfaces in PI conditions. LC-ESI-MS is based on the formation of sodium adducts that provide molecular ion information and is

used for quantitative analysis. Using LC-ESI-MS-MS, the major pathways of PAE fragmentation are similar to those in GC-EI-MS. However, LC-APCI-MS is most often used [48,49], mainly when PAHs and PAEs are determined with pesticides. The more rigid APCI allows PAH to be determined in the PI mode without derivatization [50], but it is more reliable to use LC-MS to determine the degradation products of PAH, which are more polar and ionise and fragment more readily.

Thurman et al. [51] attempted to rationalise the selection of either ESI or APCI for determining pesticides. These authors developed a so-called ionisation continuum diagram by comparing 75 pesticides. This diagram is shown in Figure 1. LC-APCI-MS is therefore also the most often used interface for determining pesticides considered to be EDs. Triazine and antifouling compounds have better sensitivity with the PI mode [52-54] and phenolic compounds have better sensitivity with the NI mode [52].

One of the problems when analysing EDs by LC-MS is the susceptibility of API interfaces to co-extract matrix components. This matrix effect results either in analyte signal suppression or enhancement suppression in dirty samples such as wastewater samples and mainly sludge and sediments samples. Therefore, to reduce this effect, authors use careful and selective extraction procedure and sample clean-up or apply internal standards and add mobile phase additives. Mobile-phase additives can have a significant influence on matrix effects. Ion suppression and

enhancement originating from matrix components is a common phenomenon associated with the ESI interface because in APCI it is assumed that

solid analyte precipitation or co-precipitation with other non-volatile matrix components causes the gas-phase ion suppression [55].

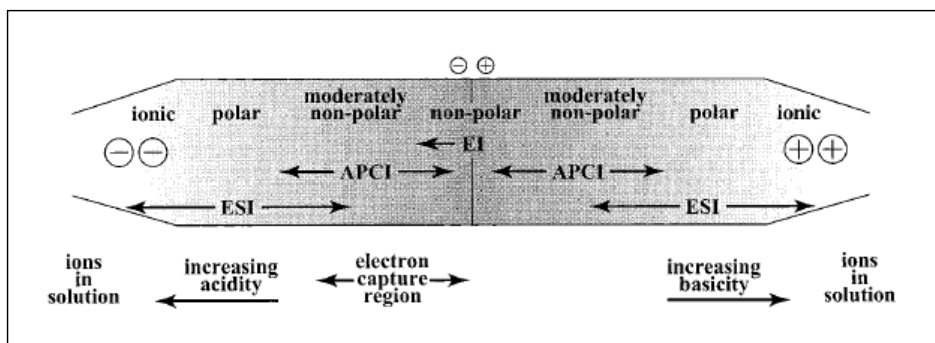


Figure 1. Ionisation continuum diagram of Thurman et al. [51], showing the interrelationship between analyte properties and the API interfaces, including APCI, ESI and EI ionisation.

The mobile phase has been modified to improve the sensitivity of MS detection for APs and steroid estrogens with acetic acid 0.1%, formic acid 0.2%, ammonium acetate 10mM or ammonium hydroxide [41,55,56]. Benijts et al. [41] studied in detail the influence of different mobile phase compositions on the ionisation efficiency of an ionspray interface, and a mixture of water and acetonitrile without the addition of bases or buffer systems is the best choice for the optimal ionisation of steroid estrogens. In a later study, Benijts et al. [56] evaluated the matrix effect of environmental water samples of thirty-five EDs (containing e.g. steroid estrogens, APs, BPA, pesticides) in NI

and PI LC-ESI-MS-MS. For most analytes the addition of acids in the HPLC-solvent led to considerable signal suppression. Conversely, depending on the concentration, buffers demonstrated both positive and negative effects. Figure 2 shows the results obtained with formic acid and ammonium formate for ten representative analytes. A clear compound and ionisation mode dependence was generally observed in both ionisation modes (PI and NI), but (NI)ESI was more influenced by coeluting matrix components than (PI)ESI. An extended sample clean-up and the use of labelled internal standard was evaluated to successfully compensate for the matrix effects.

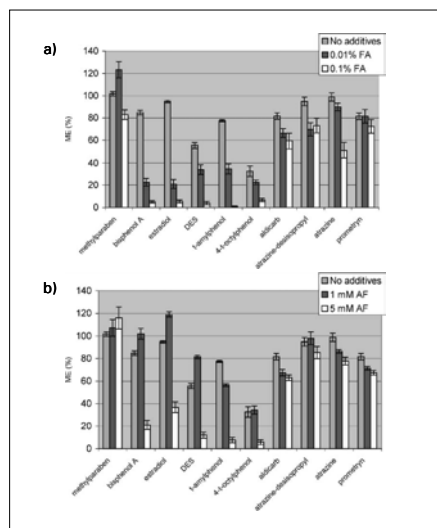


Figure 2. Mean absolute matrix effect (ME%) for a) 10 representative EDs obtained after addition of formic acid and b) 10 representative EDs obtained after addition of ammonium formiate; reprinted from [56] with permission from Elsevier. Absence of absolute matrix effect is indicated by a value of 100%. A value of >100% indicates an ionisation enhancement and a value of <100% indicates an ionisation suppression.

The main advantage of GC-MS is the availability of extensive libraries of mass spectra that are useful for identifying unknown peaks in estrogenically active fractions. However, LC-MS enables most EDs to be determined without derivatization at similar levels and, using LC-MS-MS, identification is possible. Croley et al. [57] have developed three methods using MS to analyse both natural and synthetic steroid estrogens in environmental matrices. They compare LC-MS(SIM), GC-MS-MS and LC-MS-MS methods, and conclude that LC-MS-MS is the most promising technique, because adding tandem MS

increases the sensitivity and specificity of the analysis and because sample preparation was more reliable than with GC. Díaz-Cruz et al. [58] also compared the sensitivities achieved with GC-MS, LC-MS and LC-MS-MS to determine steroid estrogens and progestrogens. LC-ESI-MS-MS was also the technique of choice. GC-MS provides sensitivities that are similar to or slightly higher than those of LC-ESI-MS-MS in selected reaction monitoring (SRM) mode, but has the disadvantage of derivatization. Instrumental sensitivities achieved by LC-ESI-MS in the SIM mode and by LC-ESI-MS-MS in the SRM mode are generally similar, though the latter is much more sensitive and almost essential for avoiding false positive results when analysing real samples.

Sample pre-treatment

To control the distribution of the various EDs groups in the environment, it is also important to develop methods for waters from effluent and influent STP waters, areas near to STP, rivers and the sea. Effects on the endocrine system, such as feminisation, demasculinisation, size reduction and reproduction, were observed at water-borne concentrations between 1 ng l^{-1} and $100 \mu\text{g l}^{-1}$ depending on the compound, species and bioassay used [59]. The analysis of EDs at physiologically active concentrations therefore requires the use of very sensitive and selective methods, which usually require extraction/purification and preconcentration steps.

The main method for extraction from aqueous samples is solid-phase extraction (SPE), mainly using cartridges [19,25,28,34,42] though sometimes LLE or on-line continuous liquid-liquid extractions have been reported [31,60].

SPE has been developed using automatic off-line and on-line methods coupled to HPLC or GC. The on-line SPE-HPLC methods have been widely used because it is easy to couple these techniques [53,54]. It is more difficult to develop on-line SPE-GC methods for determining EDs because large volume injection techniques have to be applied and the derivatization of some EDs, such as steroid estrogens, APs or BPA, is more complex in the on-line SPE system. On-line SPE-GC methods have therefore mainly been developed for pesticides, PAEs and some PAHs [34,38,39]. However, steroid estrogens, APs and BPA have been determined with off-line methods when derivatization is needed [26,32].

The most often used sorbents are octadecyl silica (C₁₈) [19,25,26,40,47], polymeric [42,44,45,48,52,54] and, in a less extent, graphitised carbon black (GCB) [30,43,61]. Generally, steroid estrogens, APs and BPA are extracted using C₁₈ sorbents, though polymeric can also be used. Several sorbents have been tested for off-line and on-line extraction by López de Alda et al. [62]. For off-line extraction, all the sorbents tested (LiChrolut EN, 200 mg; Isolut ENV, 500 mg and LiChrolut RP-18, 500 mg) had similar good extraction abilities and elution efficiency for most of the target analytes, but the octadecyl-bonded silica sorbent was the only

phase that was capable of extracting estriol. For on-line extraction, the authors tested the octadecyl-bonded silica sorbent (C₁₈ Baker), several classical polymeric sorbents (PLRP-s and HySphere-Resin-GP) and the hydrophilic polymer Oasis HLB and, contrary to the previously observed results, the C₁₈ cartridge was the only phase that had a poor extraction efficiency towards estriol. Pesticides and PAEs are usually extracted with polymeric sorbents. GCB are sometimes used because of their strong capacity to extract large volumes of water samples. For example, Jeannot et al. [61] used 500 mg of CarboPack B to determine pesticides by extracting 10 l of surface water, and Baronti et al. [43] used 500 mg of CarboGraph 4 to determine steroid estrogens by preconcentrating 150 ml of raw sewage, 400 ml of treated sewage and 4 l of river water.

The main problem when EDs such as PAEs and PAHs are determined is contamination during extraction, clean-up and analysis. Several methods therefore have recommendations for minimising the risk of contamination, e.g. not to use plastic material, to run blank samples for each series of samples and to add organic solvent in water samples [10]. Another problem is the matrix effect when dirty water samples are analysed. Trends in pre-treatment techniques, therefore, involve developing procedures that are as simple and as fast as possible, and minimising the use of glassware and the consumption of solvents. New extraction techniques, solid-phase microextraction (SPME), liquid-phase microextraction (LPME) and stir-bar sorptive extraction (SBSE), are

other alternatives for improving sample pre-treatment. SPME has been used to analyse a large number of organic compounds in water. This extraction technique is fast, simple, solvent-free and easily automated for both GC and HPLC instruments. SPME methods for determining PAHs [23], BPA and APs [28], pesticides [21] and PAEs [63] have therefore been developed. LPME using porous polypropylene hollow fibre was developed by Psillakis et al. [24]. to determine PAEs in water samples. These authors showed that the performance of hollow-fibre LPME was similar SPME and eliminated any carry-over effects seen in SPME. Hollow-fibre LPME has also been developed to determine triazines in aqueous and slurry samples and BPA, NP and ethinylestradiol in water samples by Müller et al. [64]. These authors concluded that LPME is more precise than SPME and is not only a good sample preconcentration technique but also an excellent sample cleanup procedure, which makes it directly applicable to dirty samples. Conveniently, LPME is also compatible with GC, but unlike LLE, there is no need to evaporate the extract before injection.

To enhance the recoveries and, therefore, the sensitivities obtained in SPME, a new extraction technique has been developed. This technique, known as SBSE, is based on the same principles as SPME, but the sorbent (polydimethylsiloxane) is placed on a stir bar and the amount of sorbent in the stir bar is higher than the amount on an SPME fibre. SBSE can be used with both GC and HPLC. Recently, SBSE/GC-MS methods using liquid desorption and

large volume injection have been developed to determine EDs in water samples [65]. In this study, no matrix effect was found in water samples from river, sea or influent and effluent sewage treatment plant and the recoveries were similar to those obtained with Milli-Q water working solutions.

Lately, to improve the performance of the current methods, new designs have been used. For example, the adsorptive potential of multiwalled carbon nanotubes (MWNTs) for SPE of BPA and some APs has been investigated by Cai et al. [66]. Comparative studies showed that MWNTs were superior to C₁₈ for extracting BPA but inferior for extracting 4-*t*-OP and 4-NP. And compared to the copolymer XAD-2, MWNTs was better for extracting all three analytes. Other authors have developed new selective materials to simplify the determination of steroid estrogens in complex matrices, such as a molecularly imprinted sorbent for the selective retention of stilbene-type estrogenic compounds [67] or immunoaffinity sorbents [46]. The extraction purification using immunoaffinity extraction developed by Ferguson et al. [46] to determine steroid estrogens in wastewater samples was a highly selective technique that, due to the reduction in sample extract matrix, increased the sensitivity of the HPLC-ESI-MS method.

The main limitation with sample pre-treatment for steroid estrogens and APs is the derivatization step when GC analysis is performed. Off-line and on-line derivatization methods have been developed that have sometimes used in-

situ derivatization and extraction. Derivatization such as acylation, alkylation and silylation is the most common procedure. Derivatization may lead to lower analyte recovery and analyst exposure to toxic derivatization reagents. Trends in sample treatment therefore involve developing either relatively simple methods to allow rapid, efficient and simultaneous quantitative analysis without the need for derivatization, or more simple derivatization procedures. Recently, a novel derivatization with pentafluoropyridine to determine alkylphenols has been developed [29]. This derivatization does not require complicated procedures and is not time-consuming.

OCCURRENCE OF EDS IN ENVIRONMENTAL WATER SAMPLES

The global increase in interest in the occurrence of EDs in the environment has led to numerous field studies for identifying which EDs enter the environment and at which levels, in which combinations and how to eliminate them in wastewater treatment plants or drinking water treatment plants. Table I shows the reported concentrations for some natural and synthetic steroid estrogens, alkylphenols, pesticides, PAEs, BPA and benzo(a)pyrene in water samples. Since alkylphenols, PAHs and BPA are lipophilic compounds, they prefer the organic fraction of sediment in the environment and are usually determined in sediment samples to control the distribution between sediment and water samples. Some reported levels of these

compounds in sediments are also shown in Table I.

Natural and synthetic steroid estrogens are excreted from humans in the form of conjugates, mainly glucuronides and sulfates, and are degraded to free steroid estrogens in wastewater treatment plants [43]. The fate of steroid estrogens has therefore mainly been investigated in wastewater samples. However, pesticides and PAEs are usually found at higher levels in river water samples with a significant agricultural and industrial activity. The EDs found at higher concentrations are generally the APs and their precursors APEOs. Natural and synthetic steroid estrogens are the EDs that are found at lower levels (around ng l^{-1}), but these have more estrogenic potency. Figure 3 shows the LC-MS-MS chromatogram in SRM mode of the analysis of an STP influent water sample obtained by Baronti et al. [43] from a typical STP influent sample. In this water sample, estriol, estradiol ethinylestradiol and estrone were determined at levels of 135, 19, 3.6 and 54 ng l^{-1} , respectively.

In influent and effluent STP water samples, the levels of natural and synthetic steroid estrogens are between 0.4-263 ng l^{-1} and 0.1-82.1 ng l^{-1} , respectively. Generally, effluent levels are lower than influents levels. So, STPs reduce steroid estrogens, although frequently not to lower levels than the effective concentrations for fish. Andersen et al [68] investigated the fate of 17 β -estradiol, estrone and 17 α -ethinylestradiol in mechanical and biological sewage treatment as well as in sewage-sludge treatment at a

municipal German STP by GC-MS-MS. In this study, the steroid estrogen concentration was always below the quantification limit of 1 ng l^{-1} in the STP effluent. The elimination efficiency of the natural steroid estrogens (estrone and 17β -estradiol) was over 89% and that of 17α -ethinylestradiol was over 90%. Natural steroid estrogens (estrone, 17β -estradiol and estriol) appeared quantitatively to be as predominant as synthetic steroid

estrogens, but estriol and estrone were by far the most abundant ones because they are the main metabolites of 17β -estradiol. The levels in river water samples (0.10 - 12 ng l^{-1} ; see Table I) were usually lower than in influent and effluent STPs waters, and the highest concentrations were found at sites close to the STPs, which suggests that these plants are involved in the estrogen contamination of surface waters.

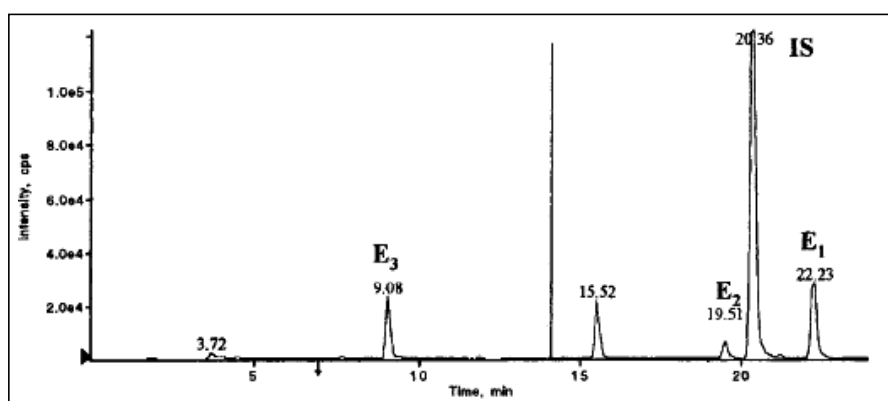


Figure 3. Total selected reaction monitoring LC-MS-MS chromatogram of the analysis of an STP influent water sample [42]. Peak assignment: E₁, estrone; E₂, estradiol; E₃, estriol; EE₂, ethinylestradiol; IS, internal standard.

The environmental levels of APs are usually around $\mu\text{g l}^{-1}$. As Table I shows, 4-NP has been found at the highest levels in environmental samples. Levels of around $200 \mu\text{g l}^{-1}$ were only found in sediment samples for 4-*t*-OP. In rivers, the levels were of two or three orders of magnitude, mainly depending on the local industrial and urban sources. A representative study for determining the abundance of APs and APEOs in several environmental samples (carp, water and sediment) was carried out by Rice et al. [27]. This study showed

that levels of APs and lower ethoxyisomers of APs were higher in sediments than in river water samples.

The highest levels of APs are generally found in industrial areas, which is due to the discharge of industrial wastewaters. APEOs, which are more soluble than APs, have the necessary anaerobic conditions to degrade to APs in STPs, so APs levels found in effluent and influent waters samples are similar to those obtained in river water samples.

Table I. Levels of EDs most found in environmental samples..

Sample class	Levels (ng l ⁻¹)	References
Natural and synthetic steroid sex hormones		
<u>Estrone</u>		
Influent of STPs	4.9-132	[26,42,43,68]
Effluent of STPs	0.10-82.1	[26,42-44,68]
River	0.10-12	[42-44]
<u>17β-estradiol</u>		
Influent of STPs	4-31	[26,42,43,68]
Effluent of STPs	0.10-18.01	[26,42-44,68]
River	1.5-6	[42-44]
<u>Estriol</u>		
Influent of STPs	5.6-263	[19,26,42,43,68]
Effluent of STPs	0.43-18	[26,42,43,68]
River	0.33-5	[42,43]
<u>17α-ethinylestradiol</u>		
Influent of STPs	0.4-13	[26,42]
Effluent of STPs	2-8.9	[26,42]
River	0.04-5.1	[42,43]
<u>Diethylstilbestrol (DES)</u>		
Influent of STPs	43	[19]
Effluent of STPs	34	[19]
Sample class	Levels (μg l ⁻¹ or μg kg ⁻¹)	References
Alkylphenols		
<u>4-nonylphenol (4-NP)</u>		
Influent of STPs	1.1-343	[19,28,30,43,47]
Effluent of STPs	0.1-289	[19,28,43,47]
River	0.1-644	[19,27,29,30,43,46,47]
Seawater	0.15-2.7	[46]
Drinking water	0.002-275	[47]
Sediment	15-590	[27,46,47]
<u>4-tert-Butylphenol (4-t-BP)</u>		
River	0.05-0.07	[29]
<u>4-tert-octylphenol (4-t-OP)</u>		
River	0.05-0.4	[29,46]
Seawater	0.1-0.3	[46]
Sediment	10-204	[46]

Pesticides		
<u>Atrazine</u>		
River	0.005-2.74	[33,52,53]
Drinking water	0.004-0.009	[53]
Influent	0.025-0.029	[34]
Effluent	0.025	34
<u>Simazine</u>		
River	0.01-0.7	[33,52,53]
Drinking water	0.01-0.016	53
Influent	0.025-0.084	34
Effluent	0.025-0.034	34
<u>Diuron</u>		
River	0.008-1.24	[33,52,53]
Drinking water	0.002-0.003	[53]
Seawater	0.10-0.6	[54]
<u>Irgarol</u>		
River	0.01-0.35	[33,52]
Seawater	0.08-0.37	[54]
<u>PCP</u>		
River	0.13-0.31	[52]
<u>Lindane</u>		
River	0.03-0.17	[33]
Phthalates		
<u>DEP</u>		
Sediment	410	[48]
<u>DnBP</u>		
Effluent	2.2	[48]
Sediment	420	[48]
<u>BBP</u>		
Effluent	0.2	[48]
Sediment	130	[48]
<u>DEHP</u>		
Effluent	3.8	[48]
Sediment	9400	[48]
Industrial Chemicals		
<u>Bisphenol A</u>		
Influent	0.332-0.339	[43]
Effluent	0.0003-0.036	[43,48]
River	0.0005-3.0	[30,43,46]
Sediment	10-40	[46]
<u>Benzo(a)pyrene</u>		
River	0.0007-0.504	[69]
Seawater	0.00016-0.115	[69]
Marine sediment	174-218	[50]

The levels of pesticides in the environment are not necessarily in proportion to their use. Many factors affect the transport of a pesticide from an application site into environmental waters. These include the physical and chemical properties of the pesticide, the type of soil and the weather. The occurrence of pesticides with estrogenic properties is sporadic and their levels depend on the treatments applied in the zone. It is estimated that 68% of such contamination results from agricultural uses, 17% from industrial and commercial uses (17%) and 15% from home and garden uses (15%). However, their presence is sometimes due to their bioaccumulation.

PAEs have been widely used in various industrial applications and are ubiquitous in the environment. In all reported studies, DEHP and DnBP were found to be a predominant due to their high level of production and many uses. However, because of the relative hydrophobicity of PAEs, levels in sediments are higher than in water samples, especially those such as DEHP that have a large alkyl chain.

Because of their hydrophobic nature, the concentrations of dissolved PAHs in water are very low in comparison with sediments. Table I shows some environmental levels for benzo(a)pyrene in water and sediments samples. Seawater samples have similar levels to those of river waters, but the highest concentrations in seawater samples are observed at many coastal and estuary sites [69]. Levels of PAHs in seawater sediments

vary significantly and depend on the amount of industrial activity. For example, levels found in marine sediments were about $200 \mu\text{g Kg}^{-1}$ [50].

The occurrence of BPA in water samples is similar to that of benzo(a)pyrene, but their levels in sediment samples are lower.

CONCLUSIONS

Most methods include only selected groups of EDs, such as steroid estrogens or APs or pesticides, to be determined in a single method. Few methods have been developed to determine a group of EDs, including various steroid estrogens, PAEs, pesticides and industrial chemicals, in the same analysis [20,56]. Improvements to existing methods have involved the use of new interfaces for coupling LC to MS and, more recently, the application of LC-MS in tandem and the development of simpler and faster sample treatment methods. These factors are significant for developing multianalysis and on-line methods that enable automatic screening and testing of several environmental water samples.

The presence of EDs in environmental water samples has been confirmed in the papers published on the occurrence of these compounds. EDs have been found in river water, seawater, effluent and influent STP waters and in sediments. Low ng l^{-1} levels have been found in water samples in non-urban areas or in areas with little industrial activity. High $\mu\text{g l}^{-1}$ levels have been found in some sediment and water

samples where there is significant industrial activity. However, toxicity levels depend on the estrogenic activity of each ED, so the assessment of EDs activity in complex environmental mixtures requires procedures that combine chemical analysis and specific bioassays [18]. However, new methods are needed to achieve lower limits of detection for controlling and quantifying emerging contaminants with endocrine-disrupting properties in environmental water samples.

REFERENCES

- [1] G.H. Degen, H.M. Bolt, *Int. Arch. Occ. Env. Hea.* 73 (2000) 433.
- [2] C.R. Tyler, S. Jobling, J.P. Sumpter, *Crit. Rev. Toxicol.* 28 (1998) 319.
- [3] Report on Endocrine Disrupting Chemicals, Illinois EPA, 1997.
- [4] Communication from the Commission to the Council and the European Parliament, Application of the Community Strategy for Endocrine disruptors: A range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife, Brussels, 14-02-2001, COM (2001) 262 final.
- [5] T. Colborn, F.S. Van Saal, A.M. Soto, *Environ. Health Persp.* 101 (1993) 378.
- [6] T. Colborn, D. Dumanoski, J.P. Myers, *Our Stolen Future*, Penguin Books, New York. 1996.
- [7] Environmental Protection Agency, *Endocrine Disruptor Screening Programm*, <http://www.epa.gov/scipoly/oscp/endo/>. Last updated: July 2004.
- [8] H. Fang, W. Tong, L.M. Shi, R. Blair, R. Perkins, W. Branham, B.S. Hass, Q. Xie, S.L. Dial, C.L. Moland, D.M. Sheehan, *Chem. Res. Toxicol.* 14 (2001) 280.
- [9] R.L. Gomes, M.D. Schrimshaw, J.N. Lester, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 697.
- [10] M. Petrovic, E. Eljarrat, M.J. López de Alda, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 637.
- [11] S.D. Richardson, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2719.
- [12] M. Petrovic, E. Eljarrat, M.J. López de Alda, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 974 (2002) 23.
- [13] M.J. López de Alda, S. Díaz-Cruz, M. Petrovic, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 503.
- [14] C. Zwiener, F.H. Frimmel, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 862.
- [15] F. Regan, A. Moran, B. Fogarty, E. Dempsey, *J. Chromatogr. A* 1014 (2003) 141.
- [16] Z. Li, S. Wang, N.A. Lee, R.D. Allan, I.R. Kennedy, *Anal. Chim. Acta* 503 (2004) 171.
- [17] M. Castillo, A. Oubiña, D. Barceló, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 2180.
- [18] M. Petrovic, E. Eljarrat, M.J. López de Alda, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 549.
- [19] M. Solé, M.J. López de Alda, M. Castillo, C. Porte, K. Ladegaard-Pedersen, D. Barceló, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 5076.
- [20] R. Céspedes, M. Petrovic, D. Raldúa, U. Saura, B. Piña, S. Lacorte, P. Viana, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 697.

- [21] B.A. Tomkins, A.R. Barnard, J. Chromatogr. A 964 (2002) 21.
- [22] R. Nageswara Rao, S. Khalid, T. Rajani, S. Husain, J. Chromatogr. A 954 (2002) 227.
- [23] E. Cortazar, O. Zuloaga, J. Sanz, J.C. Raposo, N. Etxebarria, L.A. Fernández, J. Chromatogr. A 978 (2002) 165.
- [24] E. Psillakis, N. Kalogerakis, J. Chromatogr. A 999 (2003) 145.
- [25] R. Jeannot, H. Sabik, E. Sauvard, T. Dagnac, K. Dohrendorf, J. Chromatogr. A 974 (2002) 143.
- [26] A. Mouatassim-Souali, S.L. Tamisier-Karolak, D. Perdiz, M. Cargouet, Y. Levi, J. Sep. Sci. 26 (2003) 105.
- [27] C.P. Rice, I. Schmitz-Afonso, J.E. Loyo-Rosales, E. Link, R. Thoma, L. Fay, D. Altfater, M.J. Camp, Environ. Sci. Technol. 37 (2003) 3747.
- [28] A. Díaz, F. Ventura, M.T. Galceran, Anal. Chem. 74 (2002) 3869.
- [29] M. Kojima, S. Tsunoi, M. Tanaka, J. Chromatogr. A 984 (2003) 237.
- [30] W-H. Ding, C-Y. Wu, J. Chin. Chem. Soc.-Tip 47 (2000) 1155.
- [31] M.A. Soliman, J.A. Pedersen, I.H. Suffet, J. Chromatogr. A 1029 (2004) 223.
- [32] H.S. Shin, C.H. Park, S.J. Park, H. Pyo, J. Chromatogr. A 912 (2001) 119.
- [33] D. de Almeida, S. Lacorte, T. Vinhas, P. Viana, D. Barceló, J. Chromatogr. A 879 (2000) 13.
- [34] J. Quintana, I. Martí, F. Ventura, J. Chromatogr. A 938 (2001) 3.
- [35] K. Riahi, N. Sellier, Chromatographia 47 (1998) 309.
- [36] D. Berget, R. Etter-Holzer, J. AOAC Int. 84 (2001) 383.
- [37] K.M. Kuch, K. Ballschmiter, Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 3201.
- [38] L. Brossa, R.M. Marcé, F. Borrull, E. Pocurull, J. Chromatogr. A 963 (2002) 287.
- [39] L. Brossa, R.M. Marcé, F. Borrull, E. Pocurull, J. Chromatogr. A 998 (2003) 41.
- [40] M. Petrovic, D. Barceló, J. AOAC Int. 84 (2001) 1074.
- [41] T. Benijts, R. Dams, W. Günther, W. Lambert, A. De Leenheer, Rapid Commun. Mass Sp. 16 (2002) 1358.
- [42] B.J. Vanderford, R.A. Pearson, J. Rexing, S.A. Snyder, Anal. Chem. 75 (2003) 6265.
- [43] C. Baronti, R. Curini, G. D'Ascenzo, A. Di Corcia, A. Gentili, R. Samperi, Environ. Sci. Technol. 34 (2000) 5059.
- [44] A. Laganà, A. Bacaloni, I. De Leva, A. Faberi, G. Fago, A. Marino, Anal. Chim. Acta 501 (2004) 79.
- [45] T. Isobe, H. Shiraishi, M. Yasuda, A. Shinoda, H. Suzuki, M. Morita, J. Chromatogr. A 984 (2003) 195.
- [46] P.L. Ferguson, C.R. Iden, A.E. McElroy, B.J. Brownawell, Anal. Chem. 73 (2001) 3890.
- [47] M. Petrovic, A. Diaz, F. Ventura, D. Barceló, Anal. Chem. 73 (2001) 5886.
- [48] R.A. Gimeno, R.M. Marcé, F. Borrull, Chromatographia 58 (2003) 37.
- [49] Y.Q. Cai, G.B. Jiang, J.F. Liu, Q.X. Zhou, Anal. Chim. Acta 494 (2003) 149.

- [50] R.A. Gimeno, A.F.M. Altelaar, R.M. Marcé, F. Borrull, J. Chromatogr. A 958 (2002) 141.
- [51] E.M. Thurman, I. Ferrer, D. Barceló, Anal. Chem. 73 (2001) 5441.
- [52] D.A. Azevedo, S. Lacorte, P. Viana, D. Barceló, Chromatographia 53 (2001) 113.
- [53] A. Asperger, J. Efer, T. Koal, W. Engewald, J. Chromatogr. A 960 (2002) 109.
- [54] R.A. Gimeno, C. Aguilar, R.M. Marcé, F. Borrull, J. Chromatogr. A 915 (2001) 139.
- [55] R. King, R. Bonfiglio, C. Fernandez-Metzler, C. Miller-Stein, T. Olah, J. Am. Soc. Mass Sp. 11 (2000) 942.
- [56] T. Benijts, R. Dams, W. Lambert, A. De Leenheer, J. Chromatogr. A 1029 (2004) 153.
- [57] T.R. Croley, R.J. Hughes, B.G. Koenig, C.D. Metcalfe, R.E. March, Rapid Commun. Mass Sp. 14 (2000) 1087.
- [58] M.S. Díaz-Cruz, M.J. López de Alda, R. López, D. Barceló, J. Mass Spectrom. 38 (2003) 917.
- [59] I.G. Lange, A. Daxenberger, B. Schiffer, H. Witters, D. Ibarreta, H.H.D. Meyer, Anal. Chim. Acta 473 (2002) 27.
- [60] D.W. Kolpin, E.T. Furlong, M.T. Meyer, E.M. Thurman, S.D. Zaugg, L.B. Barber, H.T. Buxton, Environ. Sci. Technol. 36 (2002) 1202.
- [61] R. Jeannot, H. Sabik, E. Sauvard, E. Genin, J. Chromatogr. A 879 (2000) 51.
- [62] M.J. López de Alda, D. Barceló, J. Chromatogr. A 938 (2001) 145.
- [63] G. Prokupková, K. Holadová, J. Poustka, J. Hajslová, Anal. Chim. Acta 457 (2002) 211.
- [64] S. Müller, M. Möder, S. Schrader, P. Popp, J. Chromatogr. A 985 (2003) 99.
- [65] A. Peñalver, V. García, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Chromatogr. A 1007 (2003) 1.
- [66] Y. Cai, G. Jiang, J. Liu, Q. Zhou, Anal. Chem. 75 (2003) 2517.
- [67] T. Kubo, K. Hosoya, Y. Watabe, T. Ikegami, N. Tanaka, T. Sano, K. Kaya, J. Chromatogr. A 987 (2002) 389.
- [68] H. Andersen, H. Siegrist, B. Halling-Sorensen, T.A. Ternes, Environ. Sci. Technol. 37 (2003) 4021.
- [69] E. Manoli, C. Samara, Trends Anal. Chem. 18 (1999) 417.

I.3 BIBLIOGRAFIA

-
- [1] Environmental Defense Scorecard, *Health effects. Endocrine Toxicity*, <http://www.scorecard.org/health-effects/>. Actualització: 2004. Última consulta: juny 2004.
- [2] Committee on Hormonally Active Agents in the Environment. Board on Environmental Studies and Toxicology. Commission on Life Sciences. National Research Council, *Hormonally Active Agents in the environment*, National Academy Press, Washington D.C. 1999. Consultat en línia: <http://www.nap.edu/books/0309064198/html>. Actualització: 2004. Última consulta: juny 2004.
- [3] American Council on Science and Health, *Endocrine Disruptors: A Scientific Perspective, 1999*. Consultat en línia: <http://www.acsh.org/publications/booklets/enddis.html>. Actualització: 1997-2003. Última consulta: juny 2004.
- [4] G. Gómez Jarabo, G. Llorca Ramón, *Hormonas esteroides*, www.biopsicologia.net/fichas/page_893.html. Última consulta: juny 2004.
- [5] K. Montgomery, Assistant Professor of Biology Department in Community College of Rhode Island, *Anatomy Lecture Outlines, Communication Networks: Endocrine System*. <http://faculty.ccri.edu/kamontgomery/anatomy%20endocrine%20system.htm>. Última consulta: juny 2004.
- [6] G.J. Tortora, N.P. Anagnostakos, *Principles of Anatomy and Physiology*, 5th ed. New York, Harper&Row. 1987.
- [7] T.M. Devlin, *Bioquímica. Libro de Texto con Aplicaciones Clínicas*, editorial Reverté, S.A., 2a ed, Tomo II. 1989.
- [8] R.J. Kavlock, *Environ. Health Persp.* 104 (1996) 715.
- [9] U.S. Environmental Protection Agency, *Endocrine Disruptor Screening Program*, <http://www.epa.gov/scipoly/ospendo/>. Actualització: juliol 2004. Última consulta: juliol 2004.
- [10] US.EPA. 1997. *Special report on Environmental Endocrine Disruption: an Effects Assessment and Analysis*. Office of Research and Development, EPA/630/R-96/012, Washington, DC.

- [11] The Bureau of National Affairs, Inc; Daily Environment Report, *Endocrine Disruptors: EPA Panel Fails to Agree on Definition, Opts for 'Description' to Resolve Dispute, 1998*, <http://www.junkscience.com/news/edstac1.htm>. Actualització: 1998. Última consulta: juliol 2004.
- [12] European Commision. 1997. European Workshop on the Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and the Environment and Climate Research programme, DG XII, Report EUR 17549.
- [13] R.L. Melnich, Environ. Health Persp. 107 (1999) 603.
- [14] T. Colborn, F.S. Vom Saal, A.M. Soto, Environ. Health Persp. 101 (1993) 378.
- [15] T. Colborn, D. Dumanoski, J.P. Myers, *Our Stolen Future*, Penguin Books, New York, 1996.
- [16] *Our Stolen Future, Widespread Pollutants with Endocrine-disrupting Effects*, <http://www.ourstolenfuture.org/Basics/chemlist.htm>. Última consulta: juliol 2004.
- [17] Ph.D. Lawrence, H. Keith, *Environmental Endocrine Disruptors: A Handbook of Property Data*, John Wiley & Sons, INC., New York. 1997.
- [18] A.M.Warhurst, WWF Brussels and Belgium, *Introduction to Hormone Disrupting Compounds. Suspected Chemicals*, <http://website.lineone.net/~mwarhurst/chemicals.html>. Actualització: octubre 1999. Última consulta: juliol 2004.
- [19] T. Kaminura, National Institute of Health Sciences, *Endocrine Disruptor Information for Researchers; Lists of Paradigmatic Chemicals*, <http://www.nihs.go.jp/hse/endocrine-e/paradigm/paradigm.html>. Actualització: 1999. Última consulta: juliol 2004.
- [20] Report on Endocrine Disrupting Chemicals, Illinois EPA, 1997.
- [21] Comunicación de la Comisión al Consejo y al Parlamento Europeo, *Aplicación de la estrategia comunitaria en materia de alteradores endocrinos-sustancias de las que se sospecha interfieren en los sistemas hormonales de seres humanos y animales*, COM (2001)262 final.

-
- [22] BKH consulting Engineers and TNO nutrition and food research, *Towards the Establishment of a priority list of substances for further evaluation of their role in endocrine disruption*, appendix 1. June 21, 2000.
- [23] A.C. Hopert, A. Beyer, K. Rank, E. Strunck, Wünsche, G. Vollmer, *Environ. Health Persp.* 106 (1998) 581.
- [24] Institute of Environment and Health (IEH), *Environmental oestrogens: Consequences to human health and wildlife*, University of Leicester, Leicester. 1995.
- [25] A. Basler, J. Lebsanft, *Environ. Sci. Pollut. R.* 6 (1999) 44.
- [26] S.L. Schantz, J.J. Widholm, *Environ. Health Persp.* 109 (2001) 1197.
- [27] J.M. Navas, H. Segner, *Environ. Sci. Pollut. R.* 5 (1998) 75.
- [28] C.R. Tyler, S. Jobling, J.P. Sumpter, *Crit. Rev. Toxicol.* 28 (1998) 319.
- [29] G.H. Degen, H.M. Bolt, *Int. Arch. Occ. Env. Hea.* 73 (2000) 433.
- [30] A.M. Warhurst, WWF Brussels and Belgium, *Introduction to Hormone Disrupting Compounds. Mechanisms of endocrine disruption*, <http://website.lineone.net/~mwarhurst/mechanisms.html>. Actualització: octubre 1999. Última consulta: juliol 2004.
- [31] S. Jobling, T. Reynolds, R. White, M.G. Parker, J.P. Sumpter, *Environ. Health Persp.* 104(1995) 582.
- [32] H. Fang, W. Tong, L.M. Shi, R. Blair, R. Perkins, W. Branham, B.S. Hass, Q. Xie, S.L. Dial, C.L. Moland, D.M. Sheehan, *Chem. Res. Toxicol.* 14 (2001) 280.
- [33] J.A. Dodge, *Pure Appl. Chem.* 70 (1998) 1725.
- [34] L.M. Shi, H. Fang, W. Tong, J. Wu, R. Perkins, R.M. Blair, W.S. Branham, S.L. Dial, C.L. Moland, D.M. Sheehan, *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* 41 (2001) 186.
- [35] W. Mazur, H. Adlercreutz, *Pure Appl. Chem.* 70 (1998) 1759.
- [36] D.L. Davis, N.T. Telang, M.P. Osborne, H.L. Bradlow, *Environ. Health Persp.* 105 (1997) 571.
- [37] S.H. Safe, *Environ. Health Persp.* 103 (1995) 346.

- [38] H. Andersen, H. Siegrist, B. Halling-Sorensen, T.A. Ternes, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 4021.
- [39] I.G. Lange, A. Daxenberger, B. Schiffer, H. Witters, D. Ibarreta, H.H.D. Meyer, *Anal. Chim. Acta* 473 (2002) 27.
- [40] J. Miyamoto, W. Klein, *Pure Appl. Chem.* 70 (1998) 1829.
- [41] Connecticut Department of Environmental Protection, *Common uses of PCBs*, <http://dep.state.ct.us/wst/pcb/common.htm>. Actualització:1999. Última consulta: juliol 2004.
- [42] National Centre for Integrated Pest Management, *List of Pesticides registered or their uses extended during 1999-2000*, <http://www.ncipm.org.in/databases.htm>. Última consulta: juliol 2004.
- [43] I.F.H. Purchase, G.L.P. Randall, *Pure Appl. Chem.* 70 (1998) 1671.
- [44] K. Ramamoorthy, F. Wang, I. Chen, S. Safe, J.D. Norris, D.P. McDonnell, *Science* 275 (1997) 405.
- [45] J. Toppari, J.Chr. Larsen, P. Christiansen, A. Givwerzman, P. Grandjean, L.J.Jr. Guillette, B. Jégou, T.K. Jensen, P. Jouannet, N. Keiding, H. Lefers, J.A. McLachlan, O. Meyer, J. Müller, R.R. de Meyts, J. Scheike, R. Sharpe, J. Sumpter, N.E. Skakkebaek, *Environ. Health Persp.* 104 (1996) 741.
- [46] A.L. Lister, G.J. Van der Kraak, *Water Qual. Res. J. Can.* 36 (2001) 175.
- [47] D. Crews, E. Willingham, J.K. Skipper, *Q. Rev. Biol.* 75 (2000) 243.
- [48] L.J.Jr. Guillette, T.S. Gross, G.R. Masson, J.M. Matter, H.F. Percival, A.R. Woodward, *Environ. Health Persp.* 102 (1994) 680.
- [49] C.R. Tyler, E.J. Routledge, *Pure Appl. Chem.* 70 (1998) 1795.
- [50] J.Miyamoto, W. Klein, *Pure Appl. Chem.* 70 (1998) 1829.
- [51] M.H. Depledge, Z. Billingham, *Mar. Pollut. Bull.* 39 (1999) 32.
- [52] S.H. Safe, *Environ. Health Persp.* 108 (2000) 487.
- [53] American Council on Science and Health, *Endocrine Disruptors: A Scientific Perspective*. 1995.
- [54] S. Jobling, *Pure Appl. Chem.* 70 (1998) 1805.
- [55] M.J. Hemmer, B.L. Hemmer, C.J. Bowman, K.J. Kroll, L.C. Folmar, D.

- Marcovich, M.D. Hoglund, N.D. Denslow, *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (2001) 336.
- [56] E.J. Routledge, D. Sheahan, C. Desbrow, G.C. Brighty, M. Waldock, J.P. Sumpter, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 1559.
- [57] T. Zacharewski, *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997) 613.
- [58] S.A. Snyder, T.L. Keith, D.A. Verbrugge, E.M. Snyder, T.S. Gross, J.P. Giesy, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 2814.
- [59] E. Witters, C. Vangeniechten, P. Berckmans, *Water Sci. Technol.* 43 (2001) 117.
- [60] R. Céspedes, M. Petrovic, D. Raldúa, U. Saura, B. Piña, S. Lacorte, P. Viana, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 697.
- [61] M. Seifert, S. Haindl, B. Hock, *Anal. Chim. Acta* 386 (1999) 191.
- [62] N. García-Reyero, E. Grau, M. Castillo, M.J. López de Alda, D. Barceló, B. Piña, *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (2001) 1152.
- [63] T. Reemtsma, *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 500.
- [64] T.R. Zacharewski, M.D. Meek, J.H. Clemons, Z.F. Wu, M.R. Fielden, J.B. Matthews, *Toxicol. Sci.* 46 (1998) 282.
- [65] W. Körner, U. Bolz, W. Süßmuth, G. Hiller, W. Schuller, V. Hanf, H. Hagenmaier, *Chemosphere* 40 (2000) 1131.
- [66] M. Petrovic, E. Eljarrat, M.J. López de Alda, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 549.
- [67] Parlamento Europeo, *Substancias químicas que producen disrupción endocrina. Un cambio en la regulación medioambiental en la UE?*, <http://disruptor.ugr.es/ParlamEu2.htm>. Actualització: febrer 2001. Última consulta: juliol 2004.
- [68] El portal de la Unió Europea. Medio Ambiente, *Endocrine Disruptors Website*, http://europa.eu.int/comm/environment/endocrine/index_en.htm. Actualització: juliol 2004. Última consulta: juliol 2004.
- [69] P.A. Fenner-Crisp, A.F. Maciorowski, G.E. Timm, *Ecotoxicology* 9 (2000) 85.
- [70] Environmental Protection Agency, *Endocrine Disruptors Research Initiative (EDRI)*, <http://www.epa.gov/endocrine/index.html>. Actualització: juliol 2003. Última consulta: juliol 2004.

- [71] Environmental Protection Agency, *Endocrine Disruptor Screening Programm*, <http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/>. Actualització: juliol 2004. Última consulta: juliol 2004.
- [72] Environmental Protection Agency, *Endocrine Disrupter Screening Program*, Report to Congress. August 2000.
- [73] M. Petrovic, E. Eljarrat, M.J. López de Alda, D. Barceló, Trends Anal. Chem. 20 (2001) 637.
- [74] R. Jeannot, H. Sabik, E. Sauvard, T. Dagnac, K. Dohrendorf, J. Chromatogr. A 974 (2002) 143.
- [75] M.J. López de Alda, D. Barceló, J. Chromatogr. A 938 (2001) 145.
- [76] J.C. Bowman, J.W. Readman, J.L. Zhou, Environ. Geochem. Health 25 (2003) 36.
- [77] R.W. Giese, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 401.
- [78] S. Impens, K. de Wasch, M. Cornelis, H.F. de Brabander, J. Chromatogr. A 955 (2002) 281.
- [79] C. Baronti, R. Curini, G. d'Ascenzo, A. di corcia, A. Gentili, R. Samperi, Environ. Sci. Technol. 34 (2000) 5059.
- [80] M. Solé, M.J. López de Alda, M. Castillo, C. Porte, K. Ladegaard-Pedersen, D. Barceló, Environ. Sci. Technol. 34 (2000) 5076.
- [81] M. Cargouët, D. Perdiz, A. Mouatassim-Souali, S. Tamisier-Karolak, Y. Levi, Sci. Total Environ. 324 (2004) 55.
- [82] P.D. Okeyo, N.H. Snow, J. Microcolumn Sep. 10 (1998) 551.
- [83] A.C. Belfroid, A. Van der Horst, A.D. Vethaak, A.J. Schäfer, G.B.J. Rijs, J. Wegener, W.P. Cofino, Sci. Total Environ. 225 (1999) 101.
- [84] H.M. Kuch, K. Ballschmiter, Fresen. J. Anal. Chem. 366 (2000) 392.
- [85] X.Y. Xiao, D.V. McCalley, J. McEvoy, J. Chromatogr. A 923 (2001) 195.
- [86] A.M. Souali, S.L. Tamisier-Karolak, D. Perdiz, M. Cargouet, Y. Levi, J. Sep. Sci. 26 (2003) 105.
- [87] R. Liu, J.L. Zhou, A. Wilding, J. Chromatogr. A 1022 (2004) 179.
- [88] S. Nakamura, T.H. Sian, S. Daishima, J. Chromatogr. A 919 (2001) 275.
- [89] B. Quintana, J. Carpinteiro, I. Rodríguez, R.A. Lorenzo, A.M. Carro,

- R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1024 (2004) 177.
- [90] D.D. Fine, G.P. Breidenbach, R.L. Price, S.R. Hutchins, *J. Chromatogr. A* 1017 (2003) 167.
- [91] M.A. Soliman, J.A. Pedersen, I.H.(Mel) Suffet, *J. Chromatogr. A* 1029 (2004) 223.
- [92] S. Weigel, R. Kallenborn, H. Hühnerfuss, *J. Chromatogr. A* 1023 (2004) 183.
- [93] A. Shareef, C.J. Parnis, M.J. Angove, J.D. Wells, B.B. Johnson, *J. Chromatogr. A* 1026 (2004) 295.
- [94] S. Müller, M. Möder, S. Schrader, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 985 (2003) 99.
- [95] H.M. Kuch, K. Ballschmiter, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 3201.
- [96] O. Lerch, P. Zinn, *J. Chromatogr. A* 991 (2003) 77.
- [97] M.J. López de Alda, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 911 (2001) 203.
- [98] M.J. López de Alda, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 391.
- [99] G.G. Ying, R.S. Kookana, S. Chen, *J. Environ. Sci. Health B37* (2002) 225.
- [100] T. Benijts, W. Lambert, A. de Leenheer, *Anal. Chem.* 76 (2004) 704.
- [101] T. Benijts, R. Dams, W. Lambert, A. de Leenheer, *J. Chromatogr. A* 1029 (2004) 153.
- [102] B.J. Vanderford, R.A. Pearson, D.J. Rexing, S.A. Snyder, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6265.
- [103] A. Laganà, A. Bacaloni, G. Fago, A. Marino, *Rapid Commun. Mass Sp.* 14 (2000) 401.
- [104] P.L. Ferguson, C.R. Iden, A.E. McElroy, B.J. Brownawell, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3890.
- [105] T. Benijts, R. Dams, W. Günther, W. Lambert, A. de Leenheer, *Rapid Commun. Mass Sp.* 16 (2002) 1358.
- [106] T. Isobe, H. Shiraishi, M. Yasuda, A. Shinoda, H. Suzuki, M. Morita, *J. Chromatogr. A* 984 (2003) 195.
- [107] A. Laganà, A. Bacaloni, I. De Leva, A. Faberi, G. Fago, A. Marino, *Anal. Chim. Acta* 501 (2004) 79.

- [108] M.J. López de Alda, S. Díaz-Cruz, M. Petrovic, D. Barceló, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 503.
- [109] M. Petrovic, E. Eljarrat, M.J. López de Alda, D. Barceló, J. Chromatogr. A 974 (2002) 23.
- [110] MC. Zwiener, F.H. Frimmel, Anal. Bioanal. Chem. 378 (2004) 862.
- [111] M.S. Díaz-Cruz, M.J. López de Alda, R. López, D. Barceló, J. Mass Spectrom. 38 (2003) 917.
- [112] A. Gentili, D. Perret, S. Marchese, R. Mastropasqua, R. Curini, A. di Corcia, Chromatographia 56 (2002) 25.
- [113] H. Zhang, Henion, J. Anal. Chem. 71 (1999) 3955.
- [114] T.R. Croley, R.J. Hughes, B.G. Koenig, C.D. Metcalfe, R.E. March, Rapid Commun. Mass Sp. 14 (2000) 1087.
- [115] Y. Goda, A. Kobayashi, K. Fukuda, S. Fujimoto, M. Ike, M. Fujita, Water Sci. Technol. 42 (2000) 81.
- [116] C.H. Huang, D.L. Sedlak, Environ. Toxicol. Chem. 20 (2001)133.
- [117] K. Shishida, S. Echigo, K. Kosaka, M. Tabasaki, T. Matsuda, H. Takigami, H. Yamada, Y. Shimizu, S. Matsui, Environ. Sci. Technol. 21 (2000) 553.
- [118] R.L. Gomes, M.D. Scrimshaw, J.N. Lester, Trends Anal. Chem. 22 (2003) 697.
- [119] F. Regan, A. Moran, B. Fogarty, E. Dempsey, J. Chromatogr. A 1014 (2003) 141.
- [120] K.C. Chan, G.M. Muschik, H.J. Issaq, P.K. Siiteri, J. Chromatogr. A 690 (1995) 149.
- [121] S.K. Poole, C.F. Poole, J. Chromatogr. A 749 (1996) 247.
- [122] B. Fogarty, F. Regan, W. Dempsey, J. Chromatogr. A 895 (2000) 237.
- [123] F. Regan, A. Moran, B. Fogarty, E. Dempsey, J. Chromatogr. B 770 (2002) 243.
- [124] B. Fogarty, E. Dempsey, F. Regan, J. Chromatogr. A 1014 (2003) 129.
- [125] P.B. McKibbin, T. Ichihashi, K. Tsubota, D.D.Y. Chen, S. Tebare, J. Chromatogr. A 1013 (2003) 65.

-
- [126] M.J. López de Alda, D. Barceló, Fresen. J. Anal. Chem. 371 (2001) 437.
- [127] M. Moeder, S. Schrader, M. Winkler, P. Popp, J. Chromatogr. A 873 (2000) 95.
- [128] D.W. Kolpin, E.T. Furlong, M.T. Meyer, E.M. Thurman, S.D. Zaugg, L.B. Barber, H.T. Buxton, Environ. Sci. Technol. 36 (2002) 1202.
- [129] A. Rachlkov, S. McNiven, A. El'skaya, K. Yano, I. Karube, Anal. Chim. Acta 405 (2000) 23.
- [130] J.A. Tarbin, M. Sharman, Anal. Chim. Acta 433 (2001) 71.
- [131] J.A. Tarbin, M. Sharman, Anal. Commun. 36 (1999) 105.
- [132] M. Ahel, W. Giger, M. Koch, Water Res. 28 (1994) 1131.
- [133] M. Kojima, S. Tsunoi, M. Tanaka, J. Chromatogr. A 984 (2003) 237.
- [134] H.B. Lee, Water Qual. Res. J. Can. 34 (1999) 3.
- [135] M. Petrovic, D. Barceló, J. Mass Spectrom. 36 (2001) 1173.
- [136] U. Bolz, W. Körner, H. Hagenmaier, Chemosphere 40 (2000) 929.
- [137] H.G.J. Mol, S. Sunarto, O.M. Steijger, J. Chromatogr. A 879 (2000) 97.
- [138] W.H. Ding, C.Y. Wu, J. Chin. Chem. Soc.-Taip 47 (2000) 1155.
- [139] W.H. Ding, J.C.H. Fann, J. Chromatogr. A 866 (2000) 79.
- [140] I.H. Helaleh-Murad, Y. TaKabayashi, S. Fujii, T. Korenaga, Anal. Chim. Acta 428 (2001) 227.
- [141] A. Diaz, F. Ventura, T. Galceran, Anal. Chem. 74 (2002) 3869.
- [142] C.P. Rice, L. Schmitz-Afonso, J.E. Loyo-Rosales, E. Link, R. Thoma, L. Fay, D. Altfater, M.J. Camp, Environ. Sci. Technol. 37 (2003) 3747.
- [143] R. Espejo, K. Valter, M. Simona, Y. Janin, P. Arrizabalaga, J. Chromatogr. A 976 (2002) 335.
- [144] M. Petrovic, A. Díaz, F. Ventura, D. Barceló, Anal. Chem. 73 (2001) 5886.
- [145] P.L. Ferguson, C.R. Iden, B.J. Brownawell, Anal. Chem. 72 (2000) 4322.
- [146] D.Y. Sahng, M.G. Ikonou, R.W. Macdonald, J. Chromatogr. A 849 (1999) 467.
- [147] B. Saho, J. Ying Hu, M. Yang, J. Chromatogr. A 950 (2002) 167.

- [148] P.L. Ferguson, C.R. Iden, B.J. Brownawell, J. Chromatogr. A 938 (2001) 79.
- [149] F. Houde, C. de Blois, D. Berryman, J. Chromatogr. A 961 (2002) 245.
- [150] N. Jonkers, R.W.P.M. Laane, P. de Voogt, Environ. Sci. Technol. 37 (2003) 321.
- [151] S.N. Pedersen, C. Lindholst, J. Chromatogr. A 864 (1999) 17.
- [152] M. Petrovic, D. Barceló, J. AOAC Int. 84 (2001) 1074.
- [153] M.I.H. Helaleh, S. Fujii, T. Korenaga, Talanta 54 (2001) 1039.
- [154] E. Smith, I. Ridgway, M. Coffey, J. Environ. Monitor. 3 (2001) 616.
- [154] Y. Cai, G. Jiang, J. Liu, Q. Zhou, Anal. Chem. 75 (2003) 2517.
- [155] M. Castillo, M.C. Alonso, J. Riu, D. Barceló, Environ. Sci. Technol. 33 (1999) 1300.
- [156] E. Evgenidou, K. Fytianos, J. Agr. Food Chem. 50 (2002) 6423.
- [157] Z. Kuklenyik, J. Ekong, C.K. Cutchins, L.L. Needham, A.M. Calafat, Anal. Chem. 75 (2003) 6820.
- [158] P. López-Roldan, M.J. López de Alda, D. Barceló, Anal. Bioanal. Chem. 378 (2004) 599.
- [159] C. Zwiener, F.H. Frimmel, Anal. Bioanal. Chem. 378 (2004) 862.
- [160] J.F. Liu, X. Liang, G-B. Jiang, Y-Q Cai, Q-X Zhou, G-G. Liu, J. Sep. Sci. 26 (2003) 823.
- [161] M. Petrovic, D. Barceló, Chromatographia 56 (2002) 535.
- [162] The European Council for Plasticisers and Intermediates, *Phthalates, Information Centre Europe*, <http://www.phthalates.com>. Última consulta: agost 2004.
- [163] A.M. Api, Food Chem. Toxicol. 39 (2001) 97.
- [164] The European Council for Plasticisers and Intermediates, *Plasticisers Information Center*, <http://www.plasticizers.org>. Última consulta: agost 2004.
- [165] C.A. Staples, D.R. Peterson, T.F. Parkerton, W.J. Adams, Chemosphere 35 (1997) 667.
- [166] S. Jonsson, J. Ejlertsson, B.H. Svensson, Adv. Environ. Res. 7 (2003) 429.

-
- [167] G. Prokupková, K. Holadová, J. Postka, J. Hajslová, *Anal. Chim. Acta* 21 (2002) 1.
- [168] J.M. Cano, M.L. Marín, A. Sánchez, V. Hernandis, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 401.
- [169] O.S. Fatoki, A. Noma, *Water Air Soil Poll.* 140 (2002) 85.
- [170] US Environmental Protection Agency, *Mètode 8061A de l'EPA per a la determinació de PAEs mitjançant GC i ECD*, <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/8061a.pdf>. 26-08-2003.
- [171] J.D. Berset, R. Etter-Holzer, *J. AOAC Int.* 84 (2001) 383.
- [172] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 872 (2000) 191.
- [173] C. George, H. Prest, *Application GC-MS*, Agilent Technologies, March 2001.
- [174] T. Suzuki, K. Yaguchi, S. Suzuki, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 3757.
- [175] D.P. Dodson, R.S. Johnson, *American Lab. News*, April 2001.
- [176] E. Cortazar, O. Suloaga, J. Sanz, J.C. Raposo, N. Etxebarria, L.A. Fernández, *J. Chromatogr. A* 978 (2002) 165.
- [177] J. Vikesoe, M. Thomsen, L. Carlsen, *Sci. Total Environ.* 296 (2002) 105.
- [178] S. Jonsson, H. Borén, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 393.
- [179] A.O. Earls, I.P. Axford, J.H. Braybrook, *J. Chromatogr. A* 983 (2003) 237.
- [180] H. Fromme, T. Kuchler, T. Otto, K. Pilz, J. Müller, A. Wenzel, *Water Res.* 36 (2002) 1429.
- [181] D.J. Letinski, M.J. Connelly, J. Dennis, R. Peterson, T.F. Parkerton, *Chemosphere* 48 (2002) 257.
- [182] S.K. Marttinen, R.H. Kettunen, J.A. Rintala, *Sci. Total Environ.* 301 (2003) 1.
- [183] E. Psillakis, N. Kalogerakis, *J. Chromatogr. A* 999 (2003) 145.
- [184] E. P. Sillakis, D. Mantzavinos, N. Kalogerakis, *Chemosphere* 54 (2004) 849.

- [185] Z.P. Lin, M.G. Ikonou, H. Jing, C. Mackintosh, F.A.P.C. Gobas, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 2100.
- [186] M.T. Kelly, M. Larroque, *J. Chromatogr. A* 841 (1999) 177.
- [187] Y. Saito, Y. Nakao, M. Imaizumi, Y. Morishima, Y. Kiso, K. Jinno, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 81.
- [188] S. Jara, C. Lysebo, T. Greibrokk, E. Lundanes, *Anal. Chim. Acta* 407 (2000) 165.
- [189] M. Castillo, M.F. Alpendurada, D. Barceló, *J. Mass Spectrom.* 32 (1997) 1100.
- [190] M. Möder, P. Popp, J. Pawliszyn, *J. Microcolumn Sep.* 10 (1998) 225.
- [191] W.J. Cheong, C.S. Oh, J.S. Yoo, *Bull. Kor. Chem. Soc.* 19 (1998) 495.
- [192] R.A. Gimeno, R.M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia* 58 (2003) 37.
- [193] M. Castillo, A. Oubiña, D. Barceló, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 2180.
- [194] A. Ius, *Fresen. J. Anal. Chem.* 345 (1993) 589.
- [195] S.C. Leung, B.Y. Giang, *B. Environ. Contam. Tox.* 50 (1993) 528.
- [196] R. Ritsema, W.P. Cofino, P.C.M. Frintrop, U.A.Th. Brinkman, *Chemosphere* 18 (1989) 2161.
- [197] S. Jonsson, A. Ejlertsson, A. Ledin, I. Mersiowsky, B.H. Svensson, *Water Res.* 37 (2003) 609.
- [198] K. Holadová, J. Hajslová, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 59 (1994) 43.
- [199] N. Casajuana, S. Lacorte, *Chromatographia* 57 (2003) 649.
- [200] Y-Q. Cai, G.B. Jiang, J-F. Liu, Q-X. Zhou, *Anal. Chim. Acta* 494 (2003) 149.
- [201] K.L. Betlej, P. Popp, B. Janoszka, H. Paschke, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 93.
- [202] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 922 (2001) 377.
- [203] Y. Saito, M. Nojiri, M. Imaizumi, Y. Nakao, Y. Morishima, H. Kanehara, H. Matsuura, K. Kotera, H. Wada, K. Jinno, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 105.

-
- [204] Y. Morishima, Y. Saito, C. Fujimoto, T. Takeichi, K. Jinno *Chromatographia* 56 (2002) 585.
- [205] L.W. Lim, K. Hirose, S. Tatsumi, H. Uzu, M. Mizukami, T. Takeuchi, J. *Chromatogr. A* 1033 (2004) 205.
- [206] C.Aguilar, Tesi doctoral: *Aplicació de tècniques acoblades a la determinació de plaguicides en aigües*, (1998).
- [207] A. Zaleska, J. Hupka, M. Wiergowski, M. Biziuk, J. *Photoch. Photobio. A* 135 (2000) 213.
- [208] R.N. Lerch, E.M. Thurman, E.L. Kruger, *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997) 1539.
- [209] J.A. Noblet, L.A. Smith, I.H. Suffet, *J. Agr. Food Chem.* 44 (1996) 3685.
- [210] Pesticide Action Network North America, *Pesticide Database*, <http://docs.pesticideinfo.org>. Actualització: desembre 2002. Última consulta: agost 2004.
- [211] The University of Minnesota, *Biocatalysis/ Biodegradation Database*, http://umbbd.ahc.umn.edu/ddt/ddt_map.html. Actualització: juliol 2003. Última consulta: juliol 2004.
- [212] G.R. van der Hoff, P. van Zoonen, *J. Chromatogr. A* 843 (1999) 301.
- [213] R. B. Geerdink, W. M. A. Niessen, U. A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 970 (2002) 65.
- [214] J. Beltran, F.J. López, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 389.
- [215] M.J. M. Wells, L.Z. Yu, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 237.
- [216] Y. Picó, G. Font, J.C. Moltó, J. Mañes, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 251.
- [217] B.A. Tomkins, A.R. Barnard, *J. Chromatogr. A* 964 (2002) 21.
- [218] R. Nageswara Rao, S Khalid, T. Rajani, S. Husain, *J. Chromatogr. A* 954 (2002) 227.
- [219] E. Ballesteros, M.J. Parrado, *J. Chromatogr. A* 1029 (2004) 267.
- [220] G. Shen, H.K. Lee, *Anal. Chem.* 74 (2002) 648.
- [221] C. Asmerssen, H.J. Stan, *J. High Res. Chromatogr.* 21 (1998) 587.

- [222] R. Eisert, K. Levsen, G. Wuensch, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 58 (1995) 103.
- [223] D. de Almeida Azevedo, S. Lacorte, T. Vinhas, P. Viana, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 879 (2000) 13.
- [224] J. Quintana, I. Martí, F. Ventura, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 3.
- [225] C. Gonçalves, M.F. Alpendurada, *J. Chromatogr. A* 1026 (2004) 239.
- [226] F. Hernández, J. V. Sancho, O. Pozo, A. Lara, E. Pitarch, *J. Chromatogr. A* 939 (2001) 1.
- [227] J. Zrostlíkova, J. Hajslová, M. Godula, D. Mastovska, *J. Chromatogr. A* 937 (2001) 73.
- [228] A. Peñalver, V. García, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 1007 (2003) 1.
- [229] M. Forcada, J. Beltrán, F.J. Lopez, F. Hernandez, *Chromatographia* 51 (2000) 362.
- [230] M. Hada, M. Takino, T. Yamagami, S. Daishima, K. Yamaguchi, *J. Chromatogr. A* 874 (2000) 81.
- [231] S. Nakamura, T. Yamagami, S. Daishima, *Analyst* 126 (2001) 1658.
- [232] A. Agüera, L. Piedra, M.D. Hernando, A.R. Fernández-Alba, M. Contreras, *Analyst* 125 (2000) 1397.
- [233] S. Koning, M. Lieshout, H.G. Janssen, U.A.Th. Brinkman, *J. Microcolumn Sep.* 12 (2000) 153.
- [234] S. Lacorte, I. Guiffard, D. Fraise, D. Barceló, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1430.
- [235] J.L. Martínez Vidal, M. Moreno Frías, A. Garrido Frenich, F. Olea-Serrano, N. Olea, *Anal. Bioanal. Chem.* 372 (2002) 766.
- [236] Z. Cai, D. Wang, W.T. Ma, *Anal. Chim. Acta* 503 (2004) 263.
- [237] J.L. Martínez Vidal, M.C. Pablos Espada, A. Garridon Frenich, F.J. Arrebola, *J. Chromatogr. A* 867 (2000) 235.
- [238] R. Jeannot, H. Sabik, E. Sauvard, E. Genin, *J. Chromatogr. A* 879 (2000) 51.
- [239] D.A. Azevedo, S. Lacorte, P. Viana, D. Barceló, *Chromatographia* 53 (2001) 113.

-
- [240] A. Asperger, J. Efer, T. Koal, W. Engewald, *J. Chromatogr. A* 960 (2002) 109.
- [241] R.A. Gimeno, C. Aguilar, R.M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A* 915 (2001) 139.
- [242] C. Aguilar, I. Ferrer, F. Borrull, R.M. Marcé, D. Barceló, *Anal. Chim. Acta* 386 (1999) 237.
- [243] R. Koeber, C. Fleischer, F. Lanza, K-S. Boos, B. Sellergren, D. Barceló, *Anal. Chem.* 73 (2001) 2437.
- [244] S. Irace-Guigand, J.J. Aaron, P. Scribe, D. Barceló, *Chemosphere* 55 (2004) 973.
- [245] C. Blasco, M. Fernández, Y. Picó, G. Font, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 77.
- [246] J.M.F. Nogueira, T. Sandra, P. Sandra, *Anal. Chim. Acta* 505 (2004) 209.
- [247] R.J.C.A. Steen, A.C. Hogenboom, P.E.G. Leonards, R.A.L. Peerboom, W.P. Cofino, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 857 (1999) 157.
- [248] J. Wu, C. Tragas, H. Lord, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 976 (2002) 357.
- [249] P.M. Gates, E.T. Furlong, T.F. Dorsey, M.R. Bukhardt, *Trends Anal. Chem.* 15 (1996) 319.
- [250] J. Slobodnik, A.C. Hogenboom, A.J.H. Louter, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 730 (1996) 353.
- [251] J. Slobodnik, A.C. Hogenboom, J.J. Vreuls, J.A. Rontree, B.L.M. van Baar, W.M.A. Niessen, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 741 (1996) 59.
- [252] E.M. Thurman, I. Ferrer, D. Barceló, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5441.
- [253] A. Asperger, J. Efer, T. Koal, W. Engewald, *J. Chromatogr. A* 937 (2001) 65.
- [254] A. Laganà, A. Bacaloni, E. de Leva, A. Faberi, G. Fago, A. Marino, *Anal. Chim. Acta* 462 (2002) 187.
- [255] C.E. Lin, Y.C. Liu, T.Y. Yang, T.Z. Wang, C.C. Vang, *J. Chromatogr. A* 916 (2001) 239.

- [256] Y.S. Fung, J.L.L. Mak, *Electrophoresis* 22 (2001) 2260.
- [257] C.L. da Silva, E.C. de Lima, M.F.M. Tavares, *J. Chromatogr. A* 1014 (2003) 109.
- [258] R. Jeannot, H. Sabik, L. Amalric, E. Sauvard, S. Proulx, B. Rondeau, *Chromatographia* 54 (2001) 236.
- [259] I.Ferrer, M.C. Hennion, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 777 (1997) 91.
- [260] N. Masqué, M. Galià, R.M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A* 771 (1997) 55.
- [261] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 839 (1999) 253.
- [262] L.J. Krutz, S.A. Senseman, A.S. Sciumbato, *J. Chromatogr. A* 999 (2003) 103.
- [263] C. Gonçalves, M.F. Alpendurada, *J. Chromatogr. A* 968 (2002) 177.
- [264] D. Lambropoulou, T. Sakellarides, T. Albanis, *Fresen. J. Anal. Chem.* 368 (2000) 616.
- [265] Y. Gou, R. Eisert, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 873 (2000) 137.
- [266] H-P. Li, G-C. Li, J-F. Jen, *J. Chromatogr. A* 1012 (2003) 129.
- [267] M. Sakamoto, T. Tsutsumi, *J. Chromatogr. A* 1028 (2004) 63.
- [268] D.A. Lambropoulou, T.A. Albanis, *J. Chromatogr. A* 922 (2001) 243.
- [269] M.E.C. Queiroz, S.M. Silva, D. Carvalho, F.M. Lanças, *J. Environ. Sci. Health B36* (2001) 517.
- [270] C. Basheer, R. Balasubramanian, H-K. Lee, *J. Chromatogr. A* 1016 (2003) 11.
- [271] C. Basheer, V. Suresh, R. Renu, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A* 1033 (2004) 213.
- [272] K. Peltonen, T. Kuljukka, *J. Chromatogr. A* 710 (1995) 93.
- [273] A. Jiries, H. Hussain, J. Lientelmann, *Water Air Soil Poll.* 121 (2000) 217.
- [274] G. Kiss, Z. Varga-Puchony, A. Gelencsér, Z. Krivácsy, A. Molnár, J. Hlavay, *Chromatographia* 48 (1998) 149.

-
- [275] C. Maldonado, J.M. Bayona, L. Bodineau, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 2693.
- [276] H.P. Nirmaier, E. Fischer, A. Meyer, G. Henze, *J. Chromatogr. A* 730 (1996) 169.
- [277] M.A. Rodríguez-Delgado, M.J. Sánchez, V. González, F. García Montelongo, *J. High Res. Chromatogr.* 19 (1996) 111.
- [278] P. Desiri, L. Lepri, L. Checchini, D. Santianni, *Annali di Chimica* 86 (1996) 215.
- [279] P. Sohoni, J.P. Sumpter, *J. Endocrinol.* 158 (1998) 327.
- [280] US EPA, EPA 40 CFR, Part 136, Method 610-Polynuclear aromatic Hydrocarbons, Fed. Regist. 49, Washington, DC, 1984.
- [281] D. Barceló, A. Ouriña, J.S. Salau, S. Perez, *Anal. Chim. Acta* 376 (1998) 49.
- [282] J. Slobodník, S. Ramalho, B.L.M. Van Baar, A.J.H. Louter, U.A.Th. Brinkman, *Chemosphere* 41 (2000) 1469.
- [283] F.J. Santos, M.T. Galceran, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 672.
- [284] F. Sun, D. Littlejohn, M.D. Gibson, *Anal. Chim. Acta* 364 (1998) 1.
- [285] R. El Harrak, M. Calull, R.M. Marcé, F. Borrull, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 64 (1996) 47.
- [286] C.H. Marvin, R.W. Smith, D.W. Bryant, B.E. McCarry, *J. Chromatogr. A* 863 (1999) 13.
- [287] S. Pérez, D. Barceló, *Chromatographia* 53 (2001) 475.
- [288] R.A. Gimeno, A.F.M. Altelaar, R.M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A* 958 (2002) 141.
- [289] G. Kavran, F.B. Erim, *J. Chromatogr. A* 949 (2002) 301.
- [290] J.L. Vilchez, A. Zafra, A. González-Casado, E. Hontoria, M. del Olmo, *Anal. Chim. Acta* 431 (2001) 31.
- [291] H-S. Shin, C-H. Park, S-J. Park, H. Pyo, *J. Chromatogr. A* 912 (2001) 119.
- [292] M. Naassner, M. Mergler, K. Wolf, I. Schuphan, *J. Chromatogr. A* 945 (2002) 133.
- [293] E. Manoli, C. Samara, *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 417.
- [294] R.M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 273.

- [295] J. Dachs, J.M. Bayona, *Chemosphere* 35 (1997) 1669.
- [296] S. Lacorte, I. Guiffard, D. Fraise, D. Barceló, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1430.
- [297] C. Basheer, J.P. Obbard, H.K. Lee, *Water Air Soil Poll.* 149 (2003) 295.
- [298] R. Doong, S. Chang, Y. Sun, *J. Chromatogr. A* 879 (2000) 177.
- [299] P. Popp, C. Bauer, M. Möder, A. Paschke, *J. Chromatogr. A* 897 (2000) 153.
- [300] A.J. King, J.W. Readman, J.L. Zhou, *Environ. Geochem. Health* 25 (2003) 69.
- [301] A.C. Heiden, A. Hoffmann, B. Kolahgar, *Gerstel Application note* 8/2001.
- [302] P. Popp, C. Bauer, L. Wennrich, *Anal. Chim. Acta* 436 (2001) 1.
- [303] B. Kolahgar, A. Hoffmann, A.C. Heiden, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 225.
- [304] P. Popp, C. Bauer, B. Hauser, P. Keil, L. Wennrich, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 961.
- [305] X. Jin, G. Jiang, G. Huang, J. Liu, Q. Zhou, *Chemosphere* 56 (2004) 1113.
- [306] T. Kubo, K. Hosoya, Y. Watabe, T. Ikegami, N. Tanaka, T. Sano, K. Kaya, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 389.
- [307] R. Ikegami, T. Mukawa, H. Nariai, R. Takeuchi, *Anal. Chim. Acta* 504 (2004) 131.
- [308] Y. Takao, H.C. Lee, Y. Ishibashi, S. Kohra, N. Tominaga, K. Arizono, *J. Health Sci.* 45 (1999) 39.

CAPÍTOL II

PART EXPERIMENTAL I RESULTATS

Tal com s'ha vist en el capítol anterior, el desenvolupament de tècniques analítiques per a la determinació simultània d'EDs que pertanyen a diferents famílies no ha estat molt estudiada. En la present Tesi Doctoral s'han desenvolupat diferents mètodes per a la determinació d'aquestes mesclures que inclouen els contaminants de més interès com EDs en diferents tipus de mostres aquoses. Degut a la gran diversitat d'usos i aplicacions dels compostos amb capacitat per alterar el sistema endocrí i per tant, de la seva àmplia dispersió en les aigües mediambientals, les mostres aquoses seleccionades, totes de la comarca del Tarragonès, han estat tant aigües de riu, de mar, de l'aixeta com aigües procedents de plantes depuradores d'aigües residuals.

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 diferents 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 tant en l'acoblament de diferents tècniques d'extracció a la GC-MS utilitzant tècniques d'injecció de grans volums (LVI) com en l'acoblament de la cromatografia de líquids a l'espectrometria de masses utilitzant la SPE com a tècnica de preconcentració. Els EDs seleccionats per la seva determinació per GC han estat en general plaguicides, diesters d'ftalat (PAEs) i hidrocarburs aromàtics policíclics, i per HPLC, esteroides sexuals naturals i sintètics, alquilfenols, bisfenol A i plaguicides. A l'annex II es mostren les estructures de cada un dels analits estudiats.

Les tècniques d'extracció emprades per a la determinació d'EDs en mostres aquoses han estat la SPE, que s'ha acoblat en línia a la GC, i l'extracció amb barres magnètiques agitadores (SBSE) que s'ha acoblat *off-line* a la GC

utilitzant una de les tècniques de LVI aplicades anteriorment. Pel que fa a la HPLC, la tècnica d'extracció utilitzada ha estat la SPE *off-line* i on-line.

La tècnica de detecció que s'ha utilitzat per a la GC ha estat la MS. Per HPLC s'han desenvolupat mètodes utilitzant el detector d'UV-Visible, ja que s'utilitza de forma habitual en els laboratoris, i la MS utilitzant la interfase d'ESI degut a les característiques d'ionització dels compostos estudiats.

En els dos primers treballs presentats en aquest capítol s'utilitza la SPE acoblada en línia a la GC i la espectrometria de masses com a sistema de detecció. En els dos es desenvolupa un mètode analític per a la determinació d'un grup d'EDs format per plaguicides, PAEs i l'hidrocarbur aromàtic políciclic amb més toxicitat endocrina (benzo(a)pirè) en mostres d'aigua de riu, mar, aixeta, canals d'irrigació i depuradores d'aigües residuals. La principal diferència entre els dos treballs és l'optimització de dos sistemes diferents de LVI. En el primer s'utilitza la interfase *on-column* per a la injecció de 100 μ l de solvent orgànic. En el segon, s'aconsegueix augmentar la injecció de solvent orgànic a 300 μ l utilitzant un vaporitzador a temperatura programada (PTV).

En el tercer treball s'utilitza la SBSE acoblada *off-line* a la GC i MS per a la determinació d'un grup d'EDs també format per plaguicides, PAEs, PAHs i, en aquest cas s'afegeix també un alquilfenol (4-*tert*-octilfenol). En aquest treball, s'aprofita la tècnica de LVI, utilitzant el PTV, aplicada anteriorment per la a injecció de 300 μ l de l'extracte obtingut en la SBSE. Aquest mètode també s'aplica a mostres mediambientals com són aigua de riu, mar i de depuradores d'aigües residuals.

En els dos treballs que segueixen es van desenvolupar mètodes utilitzant la HPLC per tal de poder determinar unes famílies de EDs diferents als altres treballs. Primer es va desenvolupar un mètode ràpid, utilitzant la SPE *off-line* i el detector àmpliament utilitzat d'UV-visible, per a la determinació de compostos fenòlics amb un elevat grau d'estrogeneïtat. A continuació es va

desenvolupar un mètode utilitzant la MS com a sistema de detecció. Com ja s'ha comentat en la introducció, aquesta tècnica cada vegada és més utilitzada per la determinació de contaminants medioambientals, ja que permet la confirmació dels analits estudiats en la mostra. En aquest cas el grup d'EDs a determinar es va ampliar amb esteroids naturals i sintètics i alguns plaguicides. Aquests mètodes també es van validar per mostres aquoses reals: aigua de riu, de mar, de l'aixeta, embotellada i aigües residuals.

Tal com s'ha comentat, els mètodes desenvolupats en tots els treballs que es presenten han estat validats per a l'anàlisi de mostres aquoses mediambientals. Per això dos d'aquests mètodes s'han utilitzat per portar a terme dues monitoritzacions durant un període d'un any. La primera monitorització es va fer utilitzant el mètode de SPE-(*on-column*)GC-MS, per tal de controlar els EDs determinats en aquest mètode en aigües de mar, de riu i en un canal d'irrigació. Per l'altra monitorització es va utilitzar la SPE/HPLC-MS per tal de controlar els EDs determinats en aquest mètode en aigües d'entrades i sortida de plantes de tractament d'aigües residuals. Totes aquestes aigües han estat recollides en la comarca del Tarragonès, per tal d'obtenir dades de la zona, fins ara inexistents.

**II.1. APLICACIÓ DE L'EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA ACOBLADA
EN LÍNIA A LA CROMATOGRÀFIA DE GASOS-
ESPECTROMETRIA DE MASSES PER A LA DETERMINACIÓ
D'ALTERADORS ENDOCRINS EN MOSTRES AQUOSES**

Tal com s'ha anat comentant al llarg de la introducció, la GC és una tècnica molt versàtil àmpliament utilitzada per a la determinació de contaminants orgànics en mostres ambientals. Els principals avantatges que presenta són l'elevat poder de resolució, l'elevada velocitat d'anàlisi i la gran quantitat de detectors altament sensibles a què es pot acoblar, però principalment la senzillesa del seu acoblament a la MS.

Un dels principals problemes en la GC és el sistema d'injecció de la mostra, degut principalment als petits volums que s'injecten (entre 0.5 i 2 µl). És per això que s'han introduït noves tècniques que permeten la injecció de grans volums de mostra (LVI) superiors en molts casos als 40 µl. Aquestes noves tècniques solucionen l'inconvenient que suposa la introducció de pocs µl de mostra per a la determinació de contaminants a nivell traça, ja que permeten assolir límits de detecció inferiors, de manera que la sensibilitat s'incrementa. Però el principal avantatge que presenten les tècniques de LVI és que permeten l'acoblament en línia de tècniques de pretractament de la mostra, com la SPE i la GC. Aquest acoblament fa possible el desenvolupament de mètodes automatitzats, fet que comporta menys manipulació de la mostra, utilització de volums inferiors de solvents orgànics i mostra (per arribar als LODs d'interès) i per tant, més sensibilitat perquè tot l'eluat s'introdueix en el sistema cromatogràfic.

Per a la introducció de grans volums de solvent orgànic s'han dissenyat diferents interfases o tècniques d'injecció, com són la *on-column* en què es fa una evaporació parcial del solvent (PCSE), la *loop-type* en què es fa una evaporació total del solvent (FCSE) i la injecció amb vaporització a temperatura programada [1]. Les dues primeres només permeten l'entrada dels analits quan aquests es troben dissolts en solvents orgànics, mentre que l'última permet la introducció de mostres aquoses.

Les interfases han de transferir el solvent orgànic que conté els analits sense cap pèrdua o contaminació al cromatògraf de gasos. En aquest procés de transferència s'ha d'eliminar la major part del solvent i reconcentrar els

compostos transferits a l'entrada de la columna analítica per obtenir pics amb bona eficàcia. Per aconseguir això, amb la interfase *on-column* s'utilitzen llargues columnes buides desactivades (de sílica fosa desactivada o capil·lars de vidres) amb un poder de retenció molt inferior respecte de la columna analítica, anomenades *retention gap* i una sortida del vapor de solvent entre la *retention gap* i la columna analítica [2].

Amb la tècnica PCSE mitjançant una interfase *on-column* la introducció de la mostra té lloc a una temperatura que es troba per sota el punt d'ebullició del solvent (per evitar que el vapor del solvent retorni cap a l'injector) i la velocitat d'introducció de la mostra és generalment superior a la velocitat d'evaporació, així només s'evapora una petita part del solvent i la resta es manté líquid formant una capa líquida sobre la superfície de la columna desactivada i d'aquesta manera s'afavoreix que hi hagi una retenció dels analits, sobretot dels més volàtils.

En el treball que es presenta a continuació, es va utilitzar la GC acoblada a la MS com a sistema de detecció. Com a tècnica de pretractament es va utilitzar la SPE. Per tal d'acoblar-la en línia a la GC es va escollir la interfase *on-column*. El principal avantatge que presenta la interfase *on-column* és que pot usar-se tant per a compostos volàtils com no volàtils. En canvi, les interfases que impliquen l'ús de FCSE només es poden usar per compostos eluïbles a temperatures relativament altes.

Per tal d'acoblar en línia la SPE i la GC, la preconcentració de la mostra i la transferència dels analits cap a la columna analítica amb un volum determinat de solvent orgànic es realitza a través d'un sistema de vàlvules de commutació. En la Figura 1 es mostra un esquema del muntatge utilitzat per portar a terme aquest acoblament SPE-GC utilitzant la interfase *on-column*. El sistema SPE està connectat a l'injector *on-column* a través d'un capil·lar de sílica fosa. Entre la sortida del solvent (SVE) i la *retention gap*, s'ha afegit un petit tros de columna analítica, anomenada precolumna de

retenció, per tal d'evitar que es donin pèrdues dels compostos més volàtils a través de la sortida del solvent.

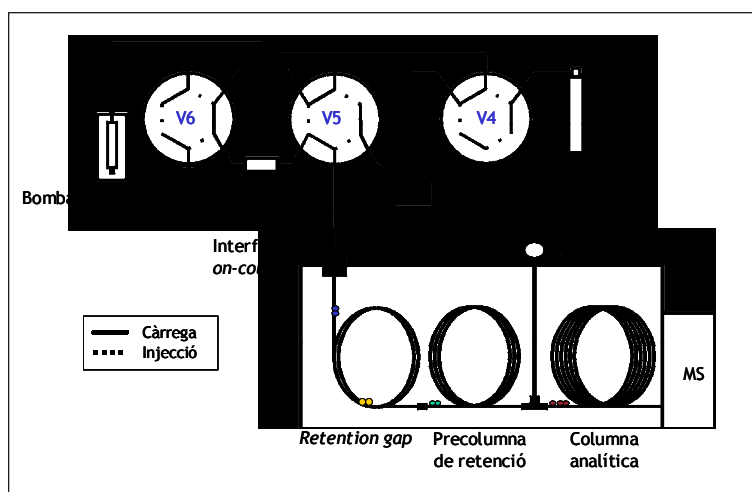


Figura 1. Esquema del sistema SPE-GC-MS utilitzant una interfase *on-column*.

Fins al moment, els mètodes que es poden trobar a la bibliografia en què utilitzen la interfase *on-column*, s'han desenvolupat per la determinació de plaguicides en aigües [3-5], per la determinació de triacilglicèrids en olis minerals [6] o per la determinació de PAHs en sediments [7]. Però no tots aquests mètodes utilitzen les tècniques de LVI pel seu acoblament a tècniques de preconcentració. Sovint, quan s'utilitza la GC-MS, la injecció de grans volums a la GC s'utilitza per reduir els límits de detecció, enlloc d'utilitzar la GC-MS en tàndem perquè en alguns casos pot donar massa fragmentació fent més difícil l'anàlisi qualitativa. Aquest és el primer treball on es desenvolupa un mètode en línia de SPE-GC-MS amb la interfase *on-column* per determinar un grup d'EDs format per plaguicides, dièsters d'ftalat i un PAH.

Per tal de desenvolupar aquest mètode es va optimitzar la separació cromatogràfica, les condicions de transferència de la interfase usada i el procés d'SPE. Per l'aplicació de la tècnica d'evaporació parcial del solvent utilitzant la interfase *on-column* es van optimitzar tres paràmetres: la velocitat de transferència del solvent orgànic a l'injector, la temperatura de transferència i el temps que es triga a eliminar el solvent. El mètode analític es va validar en el mode d'adquisició *full-scan* de l'espectròmetre de masses per la seva aplicació a mostres d'aigua de riu, de mar i de l'aixeta. Aquest mètode va permetre quantificar tots els analits a baixos nivells (0.005-0.06 µg l⁻¹) preconcentrant només 15 ml de mostra i simultàniament portar a terme la seva identificació utilitzant el mode *full-scan*.

A continuació, s'adjunta una còpia del treball publicat en la revista *Journal of Chromatography A* 963 (2002) 287, on s'inclouen els resultats obtinguts en aquest estudi.

Bibliografia

- [1] J.J. Vreuls, G.J. de Jong, R.T. Ghijsen, U.A.Th. Brinkman, J. AOAC Int. 77 (1994) 306.
- [2] A.J.H. Louter, U.A.Th. Brinkman, R.T. Ghijsen, J. Microcolumn Sep. 5 (1993) 303.
- [3] E. Pocurull, L. Brossa, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Chromatogr. A 885 (2000) 361.
- [4] A. Termonia, M. Termonia, J. High Res. Chromatogr. 20 (1997) 447.
- [5] A.J.H. Louter, C.A. Beekvelt, P. Cid, J. Slobodnik, J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman, J Chromatogr. A 725 (1996) 67.
- [6] H.G. Janssen, H. Steenbergen, J. Oomen, J. Beens, J. Microcolumn Sep. 12 (2000) 523.
- [7] J. Slobodnik, S. Ramalho, B.M. van-Baar, A.J.H. Louter, U.A.Th. Brinkman, Chemosphere 41 (2000) 1469.

**APPLICATION OF ON-LINE SOLID-PHASE EXTRACTION-GAS
CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY TO THE DETERMINATION OF
ENDOCRINE DISRUPTORS IN WATER SAMPLES**

L. Brossa, R.M. Marcé, F. Borrull, E. Pocurull

Departament de Química Analítica i Química Orgànica. Universitat Rovira i Virgili.
Imperial Tàrraco 1, 43005 TARRAGONA, Spain

Abstract

We have applied a method based on solid-phase extraction (SPE), on-line coupled to gas chromatography-mass spectrometry through an on-column interface, to determine a group of endocrine-disrupting compounds in water samples. We have optimised the parameters affecting the SPE process and transfer step and used the method to analyse river, coastal and tap waters. In the full-scan acquisition mode, all the compounds were determined by preconcentrating only 15 ml of water sample. Di-*n*-butyl phthalate, benzylbutyl phthalate, bis(2-ethylhexyl) phthalate and bis(2-ethylhexyl) adipate at concentrations between 0.02 and 0.5 $\mu\text{g l}^{-1}$ were determined in some real samples.

Keywords: Endocrine disruptors; Water analysis; Environmental analysis; Phthalates; Adipates; Pesticides; Polynuclear aromatic hydrocarbons.

INTRODUCTION

In the last few years, a wide variety of chemicals have been identified as endocrine disruptors (EDs). These chemicals affect the endocrine system and cause alterations, such as breast cancer or reductions in sperm count, in the organism. They are either organochlorine pesticides (such as DDT, *p,p'*-DDE, endosulfan, dieldrin); natural or synthetic hormones; plasticisers or alkylphenols [1-3]. The number of compounds identified as endocrine disruptors is increasing [4].

Urban and industrial discharges [5] are the main source of ED distribution into the environment and they can cause adverse effects on aquatic life and contaminate ground water. Thus, interest has therefore recently grown in the development of analytical methods for determining such compounds in the aquatic environment.

Endocrine disruptors are usually present in the environment at low concentrations, so a preconcentration technique is usually needed to determine them. Solid-phase extraction

(SPE) is one of the most common techniques [6-8], though solid-phase microextraction (SPME) has also been used [9,10].

Because they are so varied, endocrine disruptors are usually determined either by gas chromatography (GC) [6-12] or high-performance liquid chromatography (HPLC) [6]. More recently, immunoassay techniques have also been used [13,14]. However, methods developed are usually focused on families or groups of chemicals, but not on a large number of compounds with estrogenic activity, which usually belong to different families, in order to control their presence in real water samples.

In this paper we aim to develop an automatic method for determining 14 endocrine disruptors in water samples using an on-line SPE-GC-mass spectrometry (MS) system with an on-column interface. These compounds include pesticides, phthalates and one polycyclic aromatic hydrocarbon. To our knowledge, this on-line combination has never before been used to determine such a wide variety of EDs.

EXPERIMENTAL

Reagents and standards

The compounds studied were atrazine, lindane (γ -hexachlorocyclohexane), vinclozolin, aldrin, α -endosulfan, p,p' -DDE, p,p' -DDT, dieldrin, benzo[a]pyrene, hexachlorobenzene, di-*n*-butyl phthalate (DnBP), benzylbutyl

phthalate (BBP) bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and bis(2-ethylhexyl) adipate. All were purchased from Riedel-de Haen (Seelze-Hannover, Germany) with a purity higher than 98%, except benzo[a]pyrene which was supplied by Aldrich (Steinheim, Germany) with a purity of 97% and hexachlorobenzene which was supplied by Fluka (Buchs, Switzerland) with a purity higher than 99%. A standard solution of 1000 mg l⁻¹ of each pesticide was prepared in ethyl acetate and stored in the refrigerator. Every week, a solution of 40 mg l⁻¹ in ethyl acetate was prepared from the standard solutions and used to prepare working solutions in Milli-Q water and to spike real water samples to the required concentrations.

Ethyl acetate and methanol, both trace analysis grade, were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). Helium (carrier gas) and nitrogen were supplied by Carburos Metalicos (Tarragona, Spain) with a quality of 99.995%.

Equipment

A Hewlett-Packard (HP; Waldbronn, Germany) HP 6890 series gas chromatograph equipped with an on-column injector and a HP 5973 mass-selective detector was used. To inject large volumes and perform the chromatographic separation, we installed a 5 mX530 μ m I.D. retention gap, a HP-5 MS 0.25 μ m retaining precolumn of 2 mX250 μ m I.D. and a solvent vent valve. The analytical

column was a HP-5 MS 0.25 μm of 30 mX250 μm I.D. All connections were made with conventional glass press-frits. Chromatographic data were recorded using an HP G1701CA Chemstation, which was controlled by Windows NT (Microsoft) and equipped with the Hpeest and Wiley 138 mass spectral libraries.

Three six-port Valco valves (Houston, TX, USA), automatically controlled by the GC software, were used for the SPE process. The precolumn (10X2 mm I.D.) was hand-packed with a styrene-divinylbenzene copolymer (PLRP-S, 100 Å, 20 μm particle size) (Polymer Labs., Shropshire, UK). A HP 1100 pump was used to deliver the sample and the solvents needed to clean and activate the sorbent. The ethyl acetate used in the elution step was delivered with a syringe pump (Cole-Parmer, IL, USA). A fused-silica capillary (30 cmX0.10 mm I.D.) permanently mounted in the on-column injector transferred the analytes from the precolumn to the GC system. A 100- μl loop of polyether ether ketone (PEEK) tubing (HP) was used instead of the precolumn for direct injection. The set up of the equipment for the on-line SPE-GC-MS method has been reported in a previous paper [15].

Chromatographic conditions

The oven temperature was held constant at 60 °C until the analytes were preconcentrated and transferred to the GC system. The temperature was then increased to 270 °C at 40 °C min⁻¹ and kept constant for 2 min. Finally, it was increased to 290 °C at 60 °C

min⁻¹ and kept constant for 3 min. The on-column injector worked in the track oven mode and the carrier gas was maintained at a flow-rate of 1.2 ml min⁻¹.

The MS transfer line was kept at 280 °C to prevent the analytes from recondensing. The ion energy used for the electron impact (EI) ionisation was 70 eV and the MS was tuned to m/z 69, 219 and 502 for the EI corresponding to perfluorotributylamine (PFTBA). The mass range was 50-350 in the full scan mode with a rate of 4.72 scans s⁻¹.

On-line trace enrichment

Three six-port valves connected in series were used for on-line sample enrichment. The precolumn was conditioned by flushing 3 ml of methanol and 3 ml of water. Then 50% (v/v) of methanol was added to the sample and 15 ml of the sample was preconcentrated. The tubes were purged with the corresponding solution and this was then passed through the precolumn. The flow-rate throughout the process was 2 ml min⁻¹. Before the elution, the precolumn was dried with 3 bar nitrogen for 15 min. Finally, the analytes were desorbed in the backflush mode with 100 μl ethyl acetate pumped at 47 μl min⁻¹ with a syringe pump and on-line transferred to the GC system via the transfer line. The solvent vapour exit (SVE) was opened a few seconds before the transfer started and closed 1 min after the transfer finished to eliminate the ethyl acetate vapours without losing analytes. The GC temperature

programme was started 7 min after the SVE was closed and data acquisition was started 2 min later to ensure that solvent peak eluted. The total analysis time was 55 min.

Sampling

River and coastal water samples were collected in 2.5 l precleaned amber glass bottles and filtered through a 0.45 μm filter (MSI, Westboro, MA, USA). They were kept at 4 °C in the dark until analysis. Tap water was collected just before the analysis.

The glass material used such as vials, bottles and volumetric material was carefully cleaned to avoid contamination problems.

RESULTS AND DISCUSSION

Chromatographic separation

The chromatographic separation was optimised by GC-MS by manually injecting 0.5 μl of a standard solution containing 10 mg l^{-1} of each compound in ethyl acetate into the on-column injector. The optimal conditions are described in experimental section.

We selected the ions for quantifying the pesticides in the full-scan mode from the spectrum obtained for each compound under EI ionisation and selected the base peak of each pesticide. These ions are shown in Table 1.

Table 1. Selected ions and analytical data obtained in the full-scan acquisition mode for river water analysed by SPE-GC-MS.

Compound	Selected ions (relative abundances)	Linear range ($\mu\text{g l}^{-1}$)	r^2	LOD (ng l^{-1})	RSD (%, $n=3$) ^{b,c}	RSD (%, $n=3$) ^{b,c}
Hexachlorobenzene	284 (100)	0.006-0.6	1	1	14	24
Atrazine	200 (100)	0.05-5.0	0.9999	20	12	27
Lindane	181 (100)	0.06-6.0	0.9999	10	8	28
Vinclozolin	212 (100)	0.05-5.0	1	10	14	14
DnBP	149 (100)	0.007-3	0.9996	0.2 ^d	14	22
Aldrin	263 (100)	0.005-0.5	0.9999	2	19	26
α -Endosulfan	195 (100)	0.06-6.0	1	20	12	20
p,p' -DDE	246 (100)	0.006-0.6	0.9994	2	22	24
Dieldrin	79 (100)	0.005-0.5	0.9997	2	16	8
BBP	149 (100)	0.05-5	0.9997	7 ^d	10	15
Adipate	129 (100)	0.05-5	1	7 ^d	12	18
p,p' -DDT	235 (100)	0.05-0.6	0.9999	8	28	32
DEHP	149 (100)	0.05-3	0.9998	0.1 ^d	16	20
Benzo[a]pyrene	252 (100)	0.005-0.5	0.9993	2	14	20

^a Under repeatability conditions.

^b Under reproducibility between-days conditions.

^c Spiking level: 0.1 $\mu\text{g l}^{-1}$.

^d LODs estimated by calibration curves of direct injection.

Transfer conditions

We optimised the transfer conditions such as transfer flow-rate, transfer temperature and SVE open time following the standard procedure [15], so that partially concurrent solvent evaporation (PCSE) could be used with an on-column interface. The optimal conditions are described in experimental section.

SPE process

First of all, we established certain parameters in accordance with our previous experience in this field and the literature. We selected PLRP-S as the sorbent because it can retain some pesticides with similar characteristics to the compounds studied. Ethyl acetate was selected as the elution solvent because it desorbs analytes with a wide range of polarities from PLRP-S and it is compatible with the transfer conditions we used. Before the elution step, the sorbent was dried with nitrogen to avoid the deactivation of the retention gap to be destroyed. Although 3 bar N₂ for 30 min are the most common conditions [15], we only used 15 min because we experimentally demonstrated that it was enough to dry the sorbent as was shown in the paper of Koning et al. [16].

After selecting these parameters, we optimised the elution volume, sample pre-treatment and sample volume step by step. First, we optimised the elution volume by preconcentrating 10 ml of a working solution of 0.5 µg l⁻¹ and eluting with volumes from 100 to 300

µl of ethyl acetate. We chose a volume of 100 µl of ethyl acetate because recoveries were no greater when the volume was higher. Second, to increase the low recoveries that were probably caused by the adsorption of the analytes in the system, we optimised the sample pre-treatment conditions by preconcentrating 10 ml of working solution of 0.05 µg l⁻¹ and eluting with 100 µl of ethyl acetate. Recoveries were calculated by comparing the areas with those obtained with 100 µl loop injections. We added several volumes of methanol to the sample before the enrichment step to check for the adsorption problems. As Table 2 shows, methanol increased the recovery of all compounds except atrazine. Due to its elution, the recovery of this compound decreased when the percentage of methanol increased. Taking into account the recoveries of all the analytes, we chose 50% of methanol as the best condition. Before preconcentration we also added acetic acid to the sample to study how this affected recoveries. However, recoveries did not increase and acetic acid was not used in further experiments.

Finally, we optimised the sample volume by preconcentrating several volumes between 10 and 20 ml of working solutions (50% methanol) at different concentrations so that the theoretical final amount preconcentrated (5 ng) would remain constant. The retained compounds were eluted by 100 µl of ethyl acetate. As Table 2 shows, the recoveries corresponding to 10 ml and 15 ml of

sample were quite similar and at 20 ml they started to decrease. Consequently, we chose a sample

volume of 15 ml. Further experiments showed that there were no carry over effects with these conditions.

Table 2. Effect of methanol, acetic acid and sample volume on recoveries ($n=3$) by preconcentrating a working solution.

Compound	Recovery, % (RSD, %, $n=3$)							
	10 ml sample ^a						15 ml sample ^a	20 ml sample ^a
	10% Methanol	20% Methanol	40% Methanol	50% Methanol	60% Methanol	60% Methanol + 1% acetic acid	50% Methanol	50% Methanol
Hexachlorobenzene	-	-	16 (11)	68 (2)	82 (3)	64 (9)	68 (4)	62 (5)
Atrazine	100 (4)	44 (9)	35 (8)	10 (11)	9(10)	-	10 (10)	3 (10)
Lindane	70 (6)	64 (8)	66 (5)	78 (3)	74 (5)	68 (10)	80 (4)	64 (6)
Vinclozolin	64 (7)	65 (6)	62 (4)	63 (6)	64 (5)	59 (9)	64 (7)	48 (7)
DnBP	6 (25)	25 (14)	58 (6)	62 (2)	63 (8)	60 (7)	65 (9)	50 (6)
Aldrin	-	-	40 (7)	73 (1)	73 (3)	71 (2)	63 (6)	54 (6)
α -Endosulfan	9 (13)	25 (11)	58 (4)	72 (1)	79 (2)	80 (2)	73 (3)	57 (5)
p,p' -DDE	-	-	43 (11)	71 (1)	66 (9)	66 (10)	70 (8)	53 (3)
Dieldrin	2 (14)	19 (11)	56 (5)	68 (2)	64 (7)	65 (11)	70 (8)	57 (9)
BBP	-	18 (4)	50 (2)	56 (1)	50 (1)	59 (2)	58 (3)	41 (7)
Adipate	-	-	-	42 (1)	46 (3)	58 (2)	41 (4)	38 (3)
p,p' -DDT	-	-	25 (9)	42 (4)	27 (5)	52 (2)	45 (4)	25 (8)
DEHP	-	-	2 (14)	48 (9)	57 (8)	83 (6)	50 (10)	43 (11)
Benzofalpirene	-	-	61 (14)	68 (10)	90 (5)	85 (7)	67 (16)	46 (17)

^a Working solutions spiked at different concentration levels so that the theoretical final amount preconcentrated would be 5 ng.

On-line SPE-GC-MS

After optimising the SPE parameters, we checked the performance of the method by analysing 15 ml of working solutions by SPE-GC-MS (full-scan). We used full-scan acquisition mode because the mass spectra confirm the presence of the EDs and because the levels of concentration are low enough.

When we analysed a blank of Milli-Q water, some peaks appeared at

retention times corresponding to DnBP, BBP, DEHP and adipate. That these peaks were indeed those of these four EDs was confirmed by their spectra. We therefore checked the linear range of the method for these compounds by subtracting the areas obtained in the blank chromatograms ($n=4$) from the areas obtained in the working solutions spiked at different levels of concentration.

The linearity of the response in Milli-Q water was checked in the 0.005 to 6 $\mu\text{g l}^{-1}$ range. Linearity was good in this range for most of the compounds whose correlation coefficients were higher than 0.997. We calculated the limits of detection (LODs), taking into account a signal/noise ratio of 3, were between 0.1 and 20 ng l^{-1} for all compounds except for DnBP, BBP, DEHP and adipate. The LODs for these compounds were estimated taking into account a signal/noise of 3 but subtracting signals obtained in the blank chromatograms from the signals obtained in the working solutions. The repeatability and reproducibility between days were also checked by analysing three working solutions spiked with 0.1 $\mu\text{g l}^{-1}$ of each analyte. The results, expressed as relative standard deviation (RSD), varied from 8 to 15% for repeatability, except for *p,p'*-DDE (20%) and *p,p'*-DDT (25%) and from 10 to 25% for reproducibility, except for *p,p'*-DDT (30%).

In Milli-Q water, DnBP and DEHP were found in concentrations of 0.5 $\mu\text{g l}^{-1}$ and BBP and adipate were found in concentrations of 0.02 and 0.03 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectively ($n=4$).

Application to real samples

We tested the performance of this method with real samples of water from the Ebre river, and real samples of coastal and tap waters.

We first analysed a blank of Ebre river water. This showed several peaks at the same retention times as some of the compounds we studied. The

spectra of these peaks confirmed that they corresponded to DnBP, BBP, DEHP and adipate.

The recoveries for Ebre river water were similar to those obtained with working solutions. With river water spiked with 0.005-6 $\mu\text{g l}^{-1}$ of all the analytes, linearity was similar to that for Milli-Q water. The linear ranges for each compound are given in Table 1. We calculated the linearity of the four compounds identified in the blank of river water blank in the same way as with Milli-Q water. The limits of detection, calculated with a signal/noise ratio of 3, were between 0.1 and 20 ng l^{-1} . Repeatability and reproducibility between days were also checked by analysing three samples of river water spiked with 0.1 $\mu\text{g l}^{-1}$ of each analyte. The results, expressed as RSD, ranged from 8 to 28% for repeatability and from 8 to 32% for reproducibility. The results for river water obtained under full-scan acquisition are given in Table 1. Fig. 1 shows the extracted ion chromatogram of a river-water sample spiked with 0.1 $\mu\text{g l}^{-1}$ of each compound.

In river water, DnBP and adipate were each found at a concentration of 0.08 $\mu\text{g l}^{-1}$ ($n=3$). However, BBP and DEHP could not be quantified because their concentrations lay between the detection limit and the quantification limit of the method. Fig. 2 shows the extracted ion chromatograms for phthalates (m/z 149) and adipate (m/z 129), from the analysis of an unspiked river-water sample in the full-scan acquisition mode.

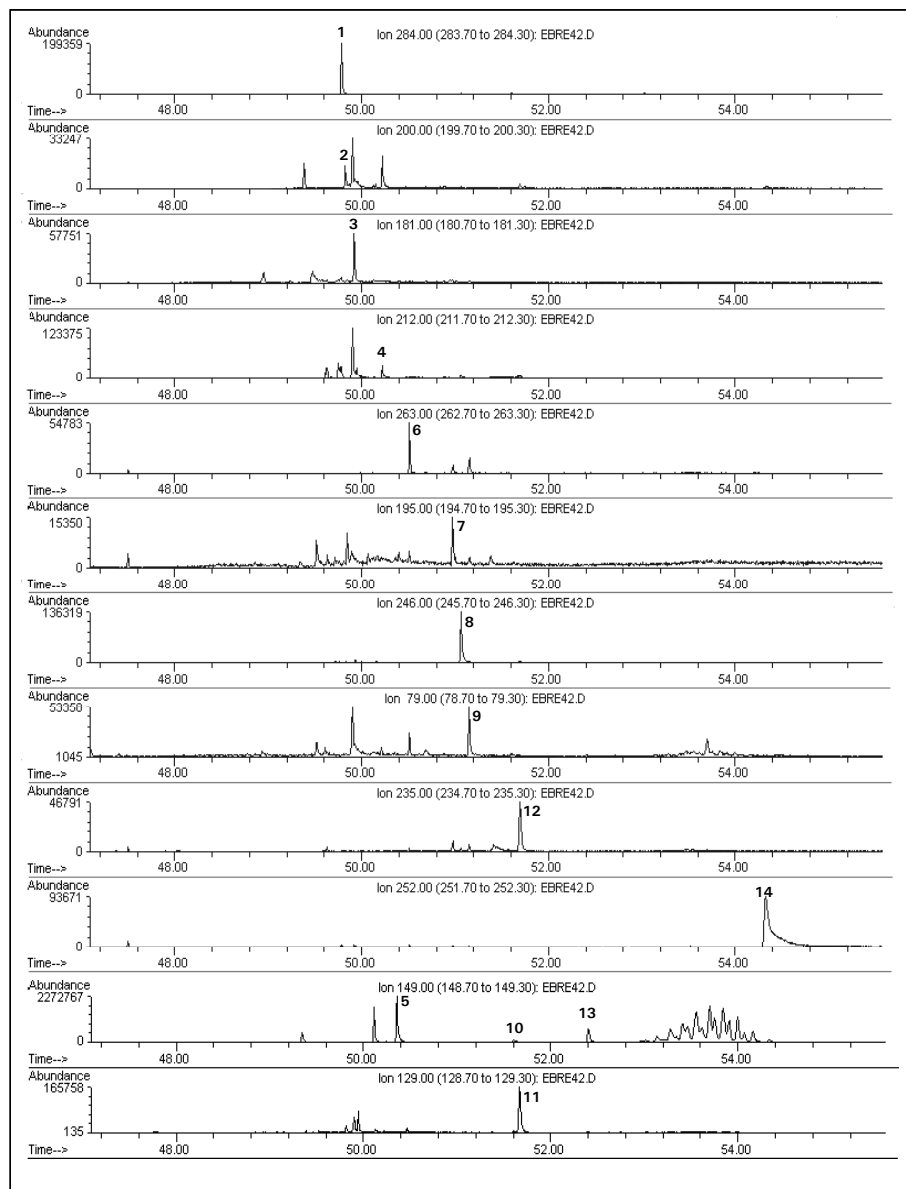


Figure 1. Extracted ion chromatograms for an Ebre river water sample spiked at $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$. Peaks: (1) hexachlorobenzene, (2) atrazine, (3) lindane, (4) vinclozolin, (5) DnBP, (6) aldrin, (7) α -endosulfan, (8) p,p' -DDE, (9) dieldrin, (10) BBP, (11) adipate, (12) p,p' -DDT, (13) DEHP, (14) benzo[a]pyrene. Time scales in min.

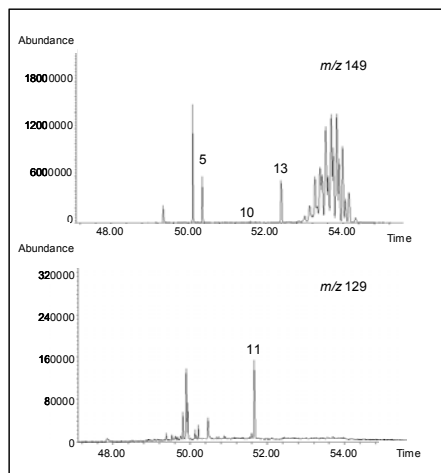


Figure 2. Extracted ion chromatograms at m/z 149 and 129 obtained by on-line SPE-GC-MS of 15 ml Ebre river water. For peak assignation see Fig. 1. Time scale in min.

We also analysed several samples of coastal and tap waters. When methanol was added to the coastal-water sample to 50%, a filtration step was needed before SPE to eliminate the salts precipitated. For example, in one of sample of coastal water BBP, DEHP and DnBP were found at concentrations of 0.08, 0.12 and 0.48 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectively ($n=3$). Fig 3 shows the extracted ion chromatogram (m/z 149) of the blank of coastal water and the spectrum corresponding to DEHP. Adipate, DEHP and DnBP were found in tap water at concentrations of 0.02, 0.1 and 0.3 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectively ($n=3$). Some of these phthalates had been found at levels of around 0.3 and 2 $\mu\text{g l}^{-1}$ in similar matrices (such as Ebre river water and port fishing water) in previous studies [17,18].

The precolumn packed with PLRP-S and the retention gap analysed at least 100 real samples without any change in performance.

CONCLUSIONS

SPE has been on-line coupled to GC-MS through an on-column interface to determine a group of endocrine-disrupting compounds in several water samples.

Parameters affecting the SPE process were optimised and 50% of methanol was added to the samples before the preconcentration step to minimise adsorption problems and enhance the recoveries of the analytes. Optimal transfer conditions were: a syringe pump flow-rate of 47 $\mu\text{l min}^{-1}$, transfer temperature of 60°C and closure of the SVE 1 min after the transfer.

With this method we quantified all the analytes at low levels by preconcentrating only 15 ml of sample and simultaneously identified them using the full-scan acquisition mode. The total analysis time was 55 min.

Three phthalates and adipate were found in several real samples. In river water DnBP and adipate were found at concentrations of 0.08 $\mu\text{g l}^{-1}$. In coastal and tap water the three phthalates and adipate were found at concentrations of between 0.02 and 0.5 $\mu\text{g l}^{-1}$.

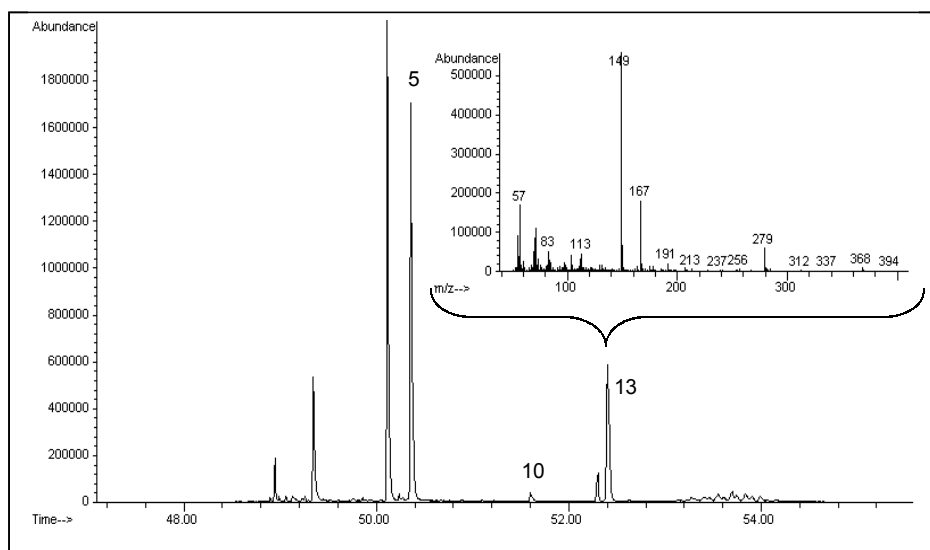


Figure 3. Extracted ion chromatogram (m/z 149) of a coastal-water sample. The insert shows the spectrum of DEHP. For peak assignation see Fig. 1. Time scale in min.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Ministerio de Ciencia y Tecnologia (project AMB1999-0875).

REFERENCES

- [1] P. Preziosi, *Pure Appl. Chem.* 70 (1998) 1617.
- [2] C.R. Tyler, E.J. Routledge, *Pure Appl. Chem.* 70 (1998) 1795.
- [3] S. Jobling, T. Reynolds, R. White, M.G. Parker, J.P. Sumpter, *Environ. Health Persp.* 103 (1995) 582.
- [4] S. Jobling, *Pure Appl. Chem.* 70 (1998) 1805.
- [6] A.R. Fernández Alba, A. Agüera, M. Contreras, G. Peñuela, I. Ferrer, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 35.
- [7] J.L. Martínez Vidal, M.C. Pablos Espada, A. Garridon Frenich, F.J. Arrebola, J. *Chromatogr. A* 867 (2000) 235.
- [8] A. Tanabe, H. Mitobe, K. Kawata, M. Sakai, A. Yasuhara, *J. AOAC Int.* 83 (2000) 61.
- [9] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *Chromatographia* 50 (1999) 685.
- [10] M. Wiergowsk, A. Zaleska, M. Biziuk, J. Hupka, *Anal. Chem. (Warsaw)* 45 (2000) 901.
- [11] R. Sasano, T. Hamada, M. Kurano, M. Furuno, *J. Chromatogr. A* 896 (2000) 41.
- [12] F.J. López, E. Pitarch, S. Egea, J. Beltran, F. Hernández, *Anal. Chim. Acta* 433 (2001) 217.

- [13] M. Seifert, S. Haindl, B. Hock, Anal. Chim. Acta 386 (1999) 191.
- [14] Y. Goda, A. Kobayashi, K. Fukuda, S. Fujimoto, M. Ike, M. Fujita, Water Sci. Technol. 42 (2000) 81.
- [15] E. Pocurull, C. Aguilar, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Chromatogr. A 818 (1998) 85.
- [16] S. Koning, M. Lieshout, H.G. Janssen, U.A.Th. Brinkman, J. Microcolumn Sep. 12 (2000) 153.
- [17] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Chromatogr. A 872 (2000) 191.
- [18] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Chromatogr. A 922 (2001) 377.

**II.2. DETERMINACIÓ D'ALTERADORS ENDOCRINS EN MOSTRES
AQUOSES PER EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA ACOBLADA EN
LÍNIA, A TRAVÉS D'UN VAPORITZADOR A TEMPERATURA
PROGRAMADA, A LA CROMATOGRÀFIA DE GASOS-
ESPECTROMETRIA DE MASSES**

En aquest segon treball es va considerar interessant desenvolupar un altre mètode en línia basat en l'acoblament de la SPE a la GC-MS per la determinació d'un altre grup d'EDs, format també per plaguicides, dièsters d'ftalat i PAHs. En aquest cas es va escollir la utilització de l'injector PTV per portar a terme la LVI, pels avantatges que presenta front la interfase *on-column* per mostres aquoses més brutes o amb més contingut de sals.

A diferència de la interfase *on-column*, quan s'utilitza un injector PTV, la sortida del solvent es porta a terme en el propi injector i per aquest motiu la *retention gap* no és imprescindible. Posteriorment a aquesta etapa es realitza la desorció tèrmica dels analits que seguidament són separats a la columna analítica. Com es pot veure a la Figura 1, l'esquema bàsic d'un injector PTV és molt similar al d'un injector *split/splitless*, la diferència està en el control de la temperatura, ja que en els injectors PTV la cambra de vaporització pot ser escalfada o refredada ràpidament [1]. En aquest sistema la mostra és injectada a una velocitat controlada i a una temperatura per sota del punt d'ebullició del solvent, mantenint la sortida de *split* oberta per tal que els vapors de solvent puguin abandonar la cambra de vaporització. Posteriorment es tanca la purga de *split* per realitzar la transferència dels analits a la columna analítica amb una rampa programada de temperatura [2]. Una limitació d'aquesta tècnica és la possible evaporació dels analits més volàtils juntament amb el solvent d'una forma total o parcial, però aquestes pèrdues es poden minimitzar omplint el *liner* amb un sorbent, com és el Tenax o la llana de vidre [3]. La utilització d'aquest sorbent també permet realitzar múltiples injeccions i l'anàlisi de mostres més brutes.

El sistema de SPE utilitzat per portar a terme l'acoblament de la SPE a la GC va ser el mateix que l'utilitzat en l'anterior treball, però en aquest cas la connexió del sistema de SPE a l'injector PTV es va fer a través d'un tub metàl·lic.

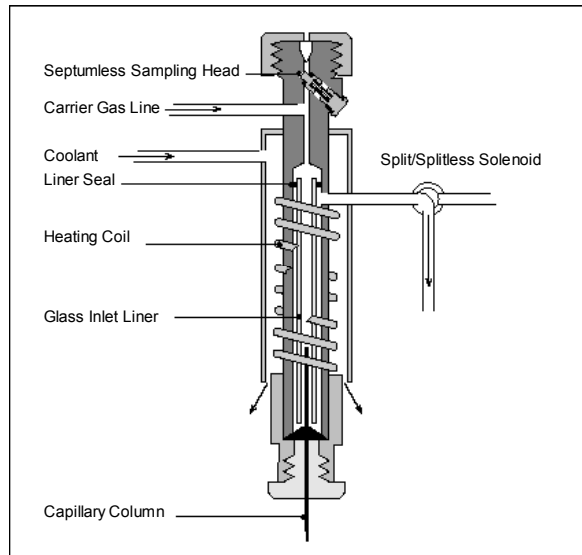


Figura 1. Esquema d'un injector PTV [1].

En la primera part del treball es va optimitzar la LVI amb la interfase PTV. Alguns paràmetres, com la utilització de Tenax en el *liner* i la pressió de l'injector durant la introducció de la mostra i l'eliminació del solvent van ser establerts d'acord amb la bibliografia. Els paràmetres que es van optimitzar van ser el temps necessari per desorbir quantitativament els analits del Tenax i el flux d'heli, el temps i la temperatura necessaris per eliminar el solvent.

El procés d'SPE es va optimitzar partint de les condicions obtingudes en l'anterior treball, però en aquest cas el volum d'elució es va optimitzar des de 100 a 300 μl , fent múltiples injeccions de 100 μl . Finalment el mètode es va validar utilitzant el sistema SPE-PTV-GC-MS en el mode d'adquisició de dades *full-scan* per aigües procedents del mar, del riu, de l'aixeta, d'un canal d'irrigació i d'una depuradora d'aigües residuals.

El mètode va permetre quantificar i identificar els analits estudiats a baixos nivells preconcentrant 15 ml de mostra i eluint els analits amb 3 fraccions de 100 µl que són introduïdes al cromatògraf consecutivament. Tot i que les dades analítiques són similars a les de l'anterior mètode desenvolupat, la interfase PTV resulta ser més robusta quan s'analitzen mostres d'aigua salada, ja que la principal limitació de la interfase *on-column* és el fet que partícules sòlides o compostos poc volàtils poden obstruir la columna.

La introducció de grans volums de solvent orgànic s'ha desenvolupat principalment per la determinació de plaguicides, tant fent combinacions de mètodes en línia com *off-line* amb el sistema de pretractament de la mostra utilitzat [4-8]. En aquests treballs els volums injectats al cromatògraf van des de 40 a 100 µl, tot i que quan s'injecten volums propers als 100 µl s'utilitza la injecció múltiple. Per exemple, Nakamura et. al [5] injecten 20 fraccions de 5 µl.

Actualment, la recerca en GC es basa principalment en aconseguir tècniques d'injecció que facin més fàcil, flexible i robusta la introducció de grans volums de solvent orgànic al cromatògraf. Recentment s'ha desenvolupat una nova tècnica per portar a terme la LVI en la GC [9]. Aquesta tècnica, anomenada injecció *AT-column*, combina fonaments de la interfase *on-column* i de l'injector PTV. Es basa en l'evaporació del solvent en un *liner* buit i la seva eliminació a través de la línia de l'*split* de l'injector, utilitzant un injector semblant al PTV. Aquesta nova tècnica requereix molt poca optimització, l'únic paràmetre important a tenir en compte és la temperatura d'injecció. Els avantatges que aporta aquesta tècnica són combinació dels principals avantatges que tenen les interfases *on-column* i PTV. Per una banda presenta una bona estabilitat pels compostos més termolàbils (interfase *on-column*) i per una altra banda, aporta la flexibilitat i robustesa de la utilització de la interfase PTV. La *AT-column* s'ha aplicat a la determinació d'un grup de plaguicides làbils i additius polimèrics d'elevat pes molecular injectant 100 µl al sistema de GC [8].

El treball que s'adjunta a continuació i que ha estat publicat a la revista *Journal of Chromatography A* 998 (2003) 41, inclou els resultats obtinguts en aquest estudi.

Bibliografia

- [1] H-G. Janssen, *Sample Introduction in Capillary Gas Chromatography-Theory and Experiments*, Gerstel, version 3.0 11/98.
- [2] J.J. Vreuls, G.J. de Jong, R.T. Ghijsen, U.A.Th. Brinkman, J. AOAC Int. 77 (1994) 306.
- [3] J.J. Vreuls, G.J. de Jong, U.A.Th. Brinkman, K. Grob, A. Artho, J. High Res. Chromatogr. 14 (1991) 455.
- [4] R. Jeannot, H. Sabik, L. Amalric, E. Sauvard, S. Proulx, B. Rondeau, *Chromatographia* 54 (2001) 236.
- [5] S. Nakamura, T. Yamagami, S. Daishima, *Analyst* 126 (2001) 1658.
- [6] M. Forcada, J. Beltrán, F.J. Lopez, F. Hernández, *Chromatographia* 51 (2000) 362.
- [7] M. Hada, M. Takino, T. Yamagami, S. Daishima, K. Yamaguchi, J. *Chromatogr. A* 874 (2000) 81.
- [8] S. Koning, M. Lieshout, H.G. Janssen, U.A.Th. Brinkman, J. *Microcolumn Sep.* 12 (2000) 153.
- [9] S. de Koning, M. Kurano, H.G. Janssen, U.A.Th. Brinkman, J. *Chromatogr. A* 1023 (2004) 165.

**DETERMINATION OF ENDOCRINE-DISRUPTING COMPOUNDS IN WATER
SAMPLES BY ON-LINE SOLID-PHASE EXTRACTION-PROGRAMMED-
TEMPERATURE VAPORISATION-GAS CHROMATOGRAPHY-MASS
SPECTROMETRY**

L. Brossa, R.M. Marcé, F. Borrull, E. Pocurull
Departament de Química Analítica i Química Orgànica. Universitat Rovira i Virgili.
Imperial Tàrraco 1, 43005 TARRAGONA, Spain

Abstract

We developed an automated on-line solid-phase extraction (SPE)-gas chromatography-mass spectrometry method to determine a group of endocrine disruptors in water samples. The interface device used for connecting SPE with GC was a programmed-temperature vaporiser (PTV) whose liner was packed with Tenax. We optimized the parameters that affected both SPE and PTV working in solvent vent mode. The performance of the method was tested with several environmental water samples. The limits of detection of the method were between 0.001 and 0.036 $\mu\text{g l}^{-1}$ under full-scan acquisition mode. We determined phthalates and adipate in all real samples at concentrations between 0.11 and 8.10 $\mu\text{g l}^{-1}$. Atrazine and *p,p'*-DDE were also found in an irrigation stream water sample at 0.16 and 0.04 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectively

Keywords: Water analysis; Sample preparation; Injection methods; Programmed-temperature vaporiser; Automation; Environmental analysis; Endocrine disruptors; Pesticides; Phthalates

INTRODUCTION

Endocrine disruptors (EDs) are compounds that can have adverse effects on the living organism because they interfere with the endocrine system. Some of them are suspected of causing abnormalities in sperm and increasing hormone-related cancers in humans [1-3]. Some studies have also

been published on the estrogen-like responses of EDs in wildlife, such as birds, amphibians, reptiles and fish [4]. These compounds include a wide variety of pollutants such as pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons, phthalate plasticizers, alkylphenols, and natural and synthetic hormones [5]. They have many industrial and household uses and therefore they may

appear in environmental samples such as waste, river and sea waters. Analytical methods must be developed so that these contaminants can be determined in aqueous environmental samples and their possible health and ecological effects evaluated [6].

These compounds are present in the environment at low levels of concentration and they can only be determined by using a preconcentration technique. They are generally determined by solid-phase extraction (SPE), liquid-liquid extraction (LLE) or solid-phase microextraction (SPME) [7-9] followed by gas chromatography (GC) or high-performance liquid chromatography (HPLC) [7,8,10-12]. Nowadays, mass spectrometry (MS) is the detection technique generally used because it enables quantitative and qualitative analysis simultaneously [8,10,12-14]. Some EDs have also been determined with immunochemical techniques, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [15]. But there is now increasing interest in developing on-line techniques for water analysis that combine sample preparation, separation and detection. The most frequently used of these hyphenated techniques is on-line SPE-HPLC [16,17] because of its simplicity. These techniques can be fully automated, and they can improve reproducibility, increase sensitivity and minimize contamination from external sources. Consequently, these techniques are suitable for performing monitoring studies.

In this paper, we tested the applicability of an on-line SPE-

programmed-temperature vaporisation-GC-MS method for determining a group of EDs in water samples collected in the south of Catalonia. A programmed-temperature vaporiser (PTV) interface was used because it allows multiple injections in the GC and the analysis of dirty samples when a packed liner is used [18].

EXPERIMENTAL

Reagents and standards

The compounds studied were atrazine, lindane (γ -hexachlorocyclohexane), vinclozolin, malathion, parathion ethyl, aldrin, α -endosulfan, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDT, dieldrin, benzo[a]pyrene, hexachlorobenzene (HCB), di-n-butyl phthalate (DnBP), benzylbutyl phthalate (BBP), bis-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and bis-(2-ethylhexyl) adipate. All were purchased from Riedel-de H en (Seelze-Hannover, Germany) with a purity higher than 98%, except benzo[a]pyrene which was supplied by Aldrich (Steinheim, Germany) with a purity of 97% and hexachlorobenzene which was supplied by Fluka (Buchs, Switzerland) with a purity higher than 99%.

A standard solution of 1000 mg l⁻¹ of each ED was prepared in ethyl acetate and stored in the refrigerator. Every week, a solution of 50 mg l⁻¹ in ethyl acetate was prepared from the standard solutions and used to prepare working solutions in Milli-Q water and to spike real water samples to the required concentrations.

Ethyl acetate was supplied by Merk (Darmstadt, Germany) and methanol was supplied by SDS (Peypin, France), both trace analysis grade. Water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). Helium (carrier gas) and nitrogen were supplied by Carburos Metálicos (Tarragona, Spain) with a quality of 99.995%.

Equipment

We used an Agilent (Waldbronn, Germany) HP 6890 Series gas chromatograph equipped with a PTV injector and an HP 5973 mass spectrometry detector. To perform the chromatographic separation we used an analytical column 0.25- μm of 28 mX250 μm I.D. HP-5 MS supplied by Agilent. Chromatographic data were recorded using an HP G1701CA Chemstation, which was controlled by Windows NT (Microsoft) and equipped with the Hpeest and Wiley 138 mass spectral libraries.

Three six-port Valco valves (Houston, TX, USA), automatically controlled by the GC software, were used for the SPE process. The precolumn (10X2 mm I.D.) was hand-packed with a styrene-divinylbenzene copolymer (PLRP-S, 100 Å, 20- μm particle size) (Polymer Labs., Shropshire, UK). An Agilent HP 1100 pump was used to deliver the sample and the solvents needed to clean and activate the sorbent. The ethyl acetate used in the elution step was delivered with a syringe pump (Cole-Parmer, IL, USA). A metallic tubing (25 cmX0.25 mm I.D.) permanently mounted in the PTV

injector transferred the analytes from the precolumn to the GC system. The PTV liner (7 cmX2 mm I.D.) was packed with 0.014 \pm 0.002 g of Tenax (Supelco, Bellefonte, PA, USA) to reduce losses of volatile solutes. A 100- μl loop of polyethylene ether ketone (PEEK) tubing (Agilent) was used instead of the precolumn for direct injection.

On-line SPE-PTV-GC-MS

Three six-port valves connected in series were used for on-line sample enrichment. The precolumn was conditioned by flushing with 3 ml of methanol and 3 ml of water. We added 50% of methanol to the sample to avoid adsorption problems and 15 ml of this mixture was preconcentrated. The tubes were purged with this solution, which was then passed through the precolumn. The flow-rate throughout the process was 2 ml min⁻¹. Before the elution, the precolumn was dried with 3 bar nitrogen for 15 min. The analytes were desorbed in the backflush mode with three ethyl acetate fractions of 100 μl pumped at 48 μl min⁻¹ with a syringe pump and on-line transferred to the GC system via the transfer line. A PTV injector, working in solvent vent mode, was used as the interface.

PTV involved three steps: sampling/venting, analyte transfer and purge/clean-up. During the first step, sampling/venting, the inlet temperature was 65°C, the vent flow was 30 ml min⁻¹ and the split valve was kept open. Between the multiple injections and the second step (vent end time)

there was a period of 2 min so that most of the solvent vapours were vented. The pressure through the column (6 p.s.i.; 1 p.s.i. = 6894.76 Pa) was lower than the working pressure to accelerate the solvent elimination and to reduce the amount of carrier gas and solvent vapour that entered to the column. In the second step, analyte transfer, the split valve was closed and the inlet was rapidly heated to 300°C at 720°C min⁻¹ and kept constant for 3 min. In this way the analytes were vaporised and introduced into the column. The inlet pressure was set at a variable working pressure so that the flow-rate was a constant 1 ml min⁻¹. In the third step, purge/ clean-up, the split valve was opened again and Tenax was flushed with the carrier gas at 50 ml min⁻¹ to prevent carryover.

The oven temperature was held constant at 60°C until 1 min before the analyte transfer from the Tenax had finished. Then, it was increased to 270°C at 40°C min⁻¹ and kept constant for 2 min; subsequently it was increased to 290°C at 60°C min⁻¹ and kept constant for 3 min. The optimal conditions and time relationships between these parameters are shown in Fig. 1. The chromatographic separation was optimised by GC-MS by manually injecting 1 µl of a standard solution containing 10 mg l⁻¹ of each compound in ethyl acetate. The PTV injector worked in splitless mode at 300°C and its liner was empty. The total analysis time, including sample preparation as well as chromatographic analysis, was 63.3 min.

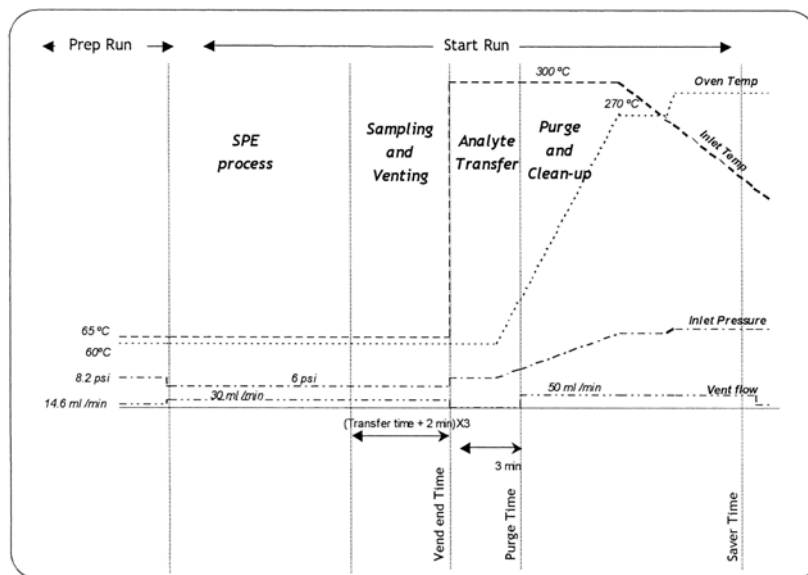


Figure 1. Optimal conditions and time relationships between the parameters for the PTV injector in a solvent vent mode and some GC parameters.

The MS transfer line was kept at 280 °C to prevent the analytes from recondensing. The ion energy used for the electron impact (EI) ionisation was 70 eV and the MS was tuned to *m/z* 69, 219 and 502 for the EI corresponding to perfluorotributylamine (PFTBA). The mass range was 75-400

with a rate of 4.72 scans s⁻¹. Table 1 shows the ions for quantifying the EDs, obtained in the full-scan mode from the spectrum of each compound. All ions corresponded to the base peak, except for ethyl parathion for which we selected a higher *m/z* peak to increase selectivity.

Table 1. Selected ions and analytical data obtained under full-scan acquisition mode for river water analysed by SPE-PTV-GC-MS.

Compounds	Selected ions (relative abundances)	Linear range ($\mu\text{g l}^{-1}$)	r^2	LOD (ng l^{-1})	RSD (%, $n=3$) ^{b,c}	RSD (%, $n=3$) ^{a,c}
Hexachlorobenzene	284 (100)	0.01-5	0.9900	1	2	10
Atrazine	200 (100)	0.05-1	0.9973	20	5	30
Lindane	181 (100)	0.05-5	0.9997	20	7	15
Vinclozolin	212 (100)	0.05-5	0.9994	10	3	6
DnBP	149 (100)	0.05-4	0.9916	8	4	26
Malathion	173 (100)	0.10-10	0.9990	30	11	18
Parathion ethyl	291 (100)	0.05-10	0.9989	10	3	5
Aldrin	263 (100)	0.02-5	0.9990	5	3	3
α -Endosulfan	195 (100)	0.05-5	0.9984	10	2	17
<i>p,p'</i> -DDE	246 (100)	0.003-5	0.9990	1	2	9
Dieldrin	79 (100)	0.05-5	0.9996	10	4	10
BBP	149 (100)	0.05-5	0.9994	5	9	23
Adipate	129 (100)	0.05-5	0.9995	5	5	29
<i>p,p'</i> -DDT	235 (100)	0.02-5	0.9975	7	8	25
DEHP	149 (100)	0.10-10	0.9913	10	32	35
Benzo[a]pyrene	252 (100)	0.10-5	0.9990	36	1	9

RSD(%) has been calculated by spiking all compounds at their LOQ except HCB, *p,p'*-DDE and *p,p'*-DDT at 0.05 $\mu\text{g l}^{-1}$.

^a Under repeatability conditions.

^b Under reproducibility conditions.

Sampling

All water samples were collected in 2.5 l pre-cleaned amber glass bottles and filtered through a 0.45 μm filter (MSI, Westboro, MA, USA). Before they were analysed, they were kept at

4 °C in the dark. Tap water was collected just before analysis.

All the glass material (e.g. vials, bottles and volumetric material) was carefully cleaned with methanol to avoid contamination problems.

RESULTS AND DISCUSSION

Large volume injection

In accordance with the literature, we set parameters such as the inlet pressure during the sampling/venting step and the liner sorbent. The sorbent selected was Tenax because it has a good capacity for retaining compounds with a wide range of volatility, polarity and thermostability [18]. The inlet pressure during the sampling/venting step was set at 6 p.s.i., the minimum value for the GC equipment.

First, we optimised the time needed to quantitatively desorb the analytes from Tenax (purge time) by manually injecting $1 \mu\text{l}$ of a 1 mg l^{-1} working solution in the packed liner at 300°C . Fig. 2 shows the results. A purge time of 3 min was selected because at longer times recoveries did not increase.

Secondly, we optimised the vent flow, vent end time and the initial inlet temperature by introducing $100 \mu\text{l}$ of a working solution of 0.01 mg l^{-1} at $48 \mu\text{l min}^{-1}$. As Fig. 3 shows the optimum vent flow was 30 ml min^{-1} . Subsequently, 2 min was the optimum vent end time and 65°C the optimum initial inlet temperature. We calculated the relative recoveries of these parameters by comparing the areas with those obtained with direct injections of $1 \mu\text{l}$ in a PTV injector with an empty liner working in splitless mode at 300°C .

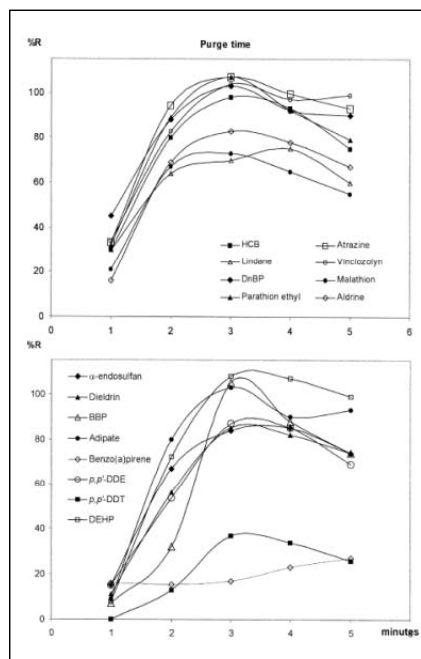


Figure 2. Effect of purge time on recoveries.

Finally, we optimised the carrier gas flow-rate to purge the Tenax and the optimum value was 50 ml min^{-1} .

SPE process

We selected PLRP-S as the sorbent and ethyl acetate as the elution solvent because we had used them successfully in a previous study [19]. We preconcentrated 15 ml of working solution, 50% of which was methanol. Before the elution step, the sorbent was dried with nitrogen at 3 bar for 15 min.

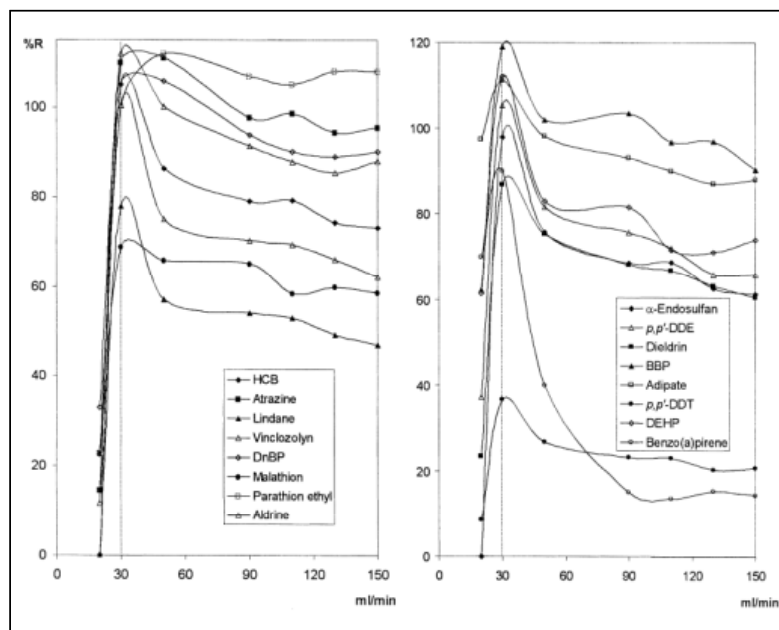


Figure 3. Effect of split vent flow on recoveries.

We optimised the elution volume from 100 to 300 μl of ethyl acetate, doing multiple injections of 100 μl . We chose a volume of 300 μl of ethyl acetate because, as shown in Table 2, the higher the volume, the higher the recoveries. Also, further experiments showed that there were no carry over effects in these conditions. In general, these recoveries are better than those obtained in the previous study [19].

On-line SPE-PTV-GC-MS

We checked the performance of the method by analysing 15 ml of working solutions by SPE-PTV-GC-MS in full-scan acquisition mode.

When we analysed a blank of Milli-Q water, some small peaks appeared at

retention times corresponding to DnBP, BBP, DEHP and adipate and they were identified by their spectra. Due to their ubiquitous presence, contamination with phthalates during experimentation might well interfere with analyses. This contamination hinders the interpretation of measured concentrations. But, using the Milli-Q water collected on the same day, the areas obtained in the blank chromatograms ($n=4$) had good repeatability (RSD below 8%) for the four compounds. So, we checked the linear range of the method for these compounds by subtracting the areas obtained in the blank chromatograms from the areas obtained in the working solutions spiked at different levels of concentration.

Table 2. Effect of elution volume on recoveries ($n = 3$) by preconcentrating a working solution.

Compounds	% Recovery (RSD, %, $n = 3$)		
	15 ml sample, 50% methanol		
	100 μ l Ethyl acetate	200 μ l Ethyl acetate ^a	300 μ l Ethyl acetate ^a
Hexachlorobenzene	41 (14)	54 (3)	64 (7)
Atrazine	12 (8)	13 (8)	29 (25)
Lindane	64 (8)	81 (15)	111 (19)
Vinclozolin	67 (7)	64 (12)	89 (8)
DnBP	70 (6)	87 (5)	93 (9)
Malathion	68 (14)	80 (18)	111 (12)
Parathion ethyl	63 (13)	69 (11)	105 (10)
Aldrin	47 (4)	53 (7)	80 (5)
α -Endosulfan	53 (3)	65 (15)	83 (15)
p,p' -DDE	55 (12)	49 (6)	69 (14)
Dieldrin	59 (5)	51 (8)	80 (12)
BBP	74 (8)	73 (11)	97 (15)
Adipate	51 (3)	92 (7)	98 (4)
p,p' -DDT	48 (8)	66 (9)	78 (15)
DEHP	51 (7)	63 (11)	72 (10)
Benzo[a]pyrene	-	96 (19)	102 (18)

^a By multiple injection of 100 μ l.

The linearity of the response in Milli-Q water was checked in the 0.003 to 10 ng l⁻¹ range. Linearity was good in several ranges with correlation coefficients higher than 0.9900. To calculate the limits of detection (LODs) we took into account a signal/noise ratio of 3. They were between 1 and 36 ng l⁻¹ for all compounds. The LODs for DnBP, BBP, DEHP and adipate were estimated taking into account a signal/noise ratio of 3 but the signals obtained in the blank chromatograms were subtracted from the signals obtained in the working solutions. To check the repeatability and

reproducibility between days, we analyzed three working solutions spiked at their limits of quantification (LOQs) for all the compounds, except HCB, p,p' -DDE and p,p' -DDT, which were spiked at 0.05 μ g l⁻¹. The results, expressed as RSD, varied from 1 to 8% for repeatability, except for DEHP (20%), and from 3 to 25% for reproducibility.

Application to real samples

We tested the performance of this method with real samples of water collected in the south of Catalonia

(from the Ebre river, the sea, the tap, an irrigation stream and a sewage treatment plant).

In the chromatogram of the Ebre river water, several peaks appeared at the same retention times as DnBP, BBP, DEHP and adipate and they were confirmed with the spectra. Some of these phthalates, such as DnBP and DEHP, had also been determined in an Ebre river water sample using SPME-GC-MS by our group [20].

The recoveries for Ebre river water were similar to the recoveries with working solutions. With river water spiked with 0.003-10 $\mu\text{g l}^{-1}$ of all the analytes, linear range was similar to that for Milli-Q water. We calculated the linear range of the four compounds identified in the river water blank in the same way as with Milli-Q water. We

calculated the limits of detection with a signal/noise ratio of 3, and checked the repeatability and reproducibility between days by analysing three samples of river water spiked at their LOQs for all the compounds, except HCB, *p,p'*-DDE and *p,p'*-DDT, which were spiked at 0.05 $\mu\text{g l}^{-1}$. The analytical data for river water obtained under full-scan acquisition are given in Table 1.

In a river water sample, DnBP, DEHP and adipate were found at a concentration of 0.80, 2.10 and 0.11 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectively ($n=3$). However, BBP could not be quantified because its concentration was between the detection limit and the quantification limit of the method. These values found are similar to these obtained for samples from the same origin analysed by SPME [20].

Table 3. Levels ($\mu\text{g l}^{-1}$) of some EDs found in several real samples ($n=3$).

Compounds	River water	Sea water	Irrigation stream water	Waste water (effluent from treatment plant)	Tap water
Atrazine	-	-	0.16	-	-
DnBP	0.80	2.09	3.57	2.10	1.34
<i>p,p'</i> -DDE	-	-	0.004	-	-
BBP	l.q.	0.15	0.10	l.q.	l.q.
Adipate	0.11	0.59	0.24	l.q.	0.20
DEHP	2.10	8.10	5.21	3.97	4.26

We also analysed several samples of water from the sea, the tap, irrigation streams and an effluent sewage treatment plant. As we showed in a previous study [19], when methanol was added to sea-water samples, a filtration step was needed before SPE

to eliminate the precipitated salt. By analysing a lot of samples with a high salt concentration, we proved that this method with a PTV interface was more robust than the method with an on-column interface. The packing material of the liner serves as a filter, protects

the GC column and is easier to change than the retention gap in the on-column interface. Table 3 shows the contaminants found in these samples. Phthalates and adipate were determined at different concentration levels in most of the samples analysed.

Fig. 4 shows the extracted ion chromatograms in merged format for phthalates and adipate (m/z 149 and 129, respectively) from the analysis of an unspiked irrigation stream water sample.

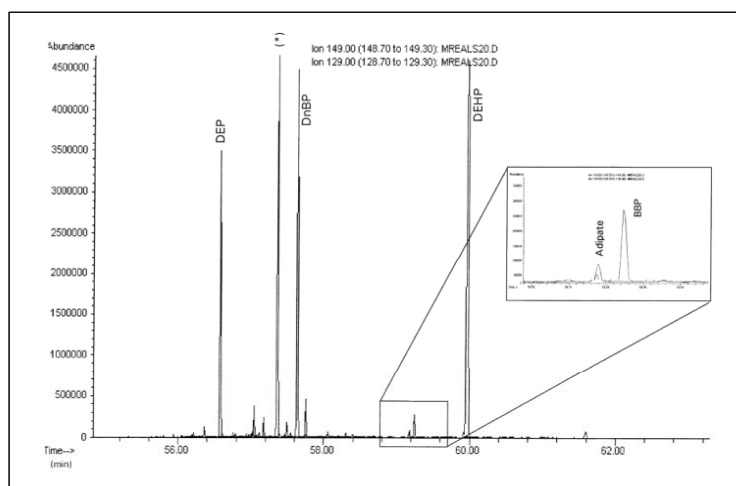


Figure 4. Extracted ion chromatograms, displayed in merged format, at m/z 149 and 129 obtained by on-line SPE-PTV-GC-MS of 15 ml irrigation stream water. (*) Not confirmed.

In this sample, two peaks appeared and were identified as other phthalate compounds because the base peak (m/z 149) of their spectra is a typical fragment of this kind of compound. The first peak was identified by the Wiley138 library as di-*n*-ethyl phthalate (DEP) (95%) and was confirmed with a standard. The second peak was identified by the library as bis(2-methylpropyl) phthalate (72%), but we could not confirm this because no standard was available. The other small peaks could not be assigned to any contaminant.

Although phthalates have several degradation pathways and therefore are not considered to be persistent chemicals, DnBP and DEHP fluxes in the environment are high because of the considerable direct and indirect emissions. In the Netherlands, Van Wezel et al. [21] derived the environmental risk limits (ERLs) for these compounds in water to $10 \mu\text{g l}^{-1}$ for DnBP and $0.19 \mu\text{g l}^{-1}$ for DEHP. They used these ERLs as the estimated ecosystem no-effect concentration concluded that they give sufficient protection against endocrine disruptive

effects. The levels found in various surface waters for DnBP are below the ERL, but for DEHP are generally 5 to 40 times higher than the ERL (see Table 3).

Atrazine and *p,p'*-DDE were determined in an irrigation stream water sample at 0.16 and 0.04 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectively. The sample was collected in spring and in a zone where atrazine is usually used as an herbicide. Its concentration is lower than the maximum admissible concentration suggested by the

European Union (EU) for surface water ($1\text{--}3 \mu\text{g l}^{-1}$). The presence of *p,p'*-DDE in the environment is due to DDT degradation. Nowadays, DDT is banned by an EU Directive and by the US Environmental Protection Agency (EPA), but it was extensively used for decades and it is a persistent organic chemical. Fig. 5 shows the extracted ion chromatograms of atrazine and *p,p'*-DDE. The insert shows the *p,p'*-DDE spectrum that was identified with a quality higher than 90%.

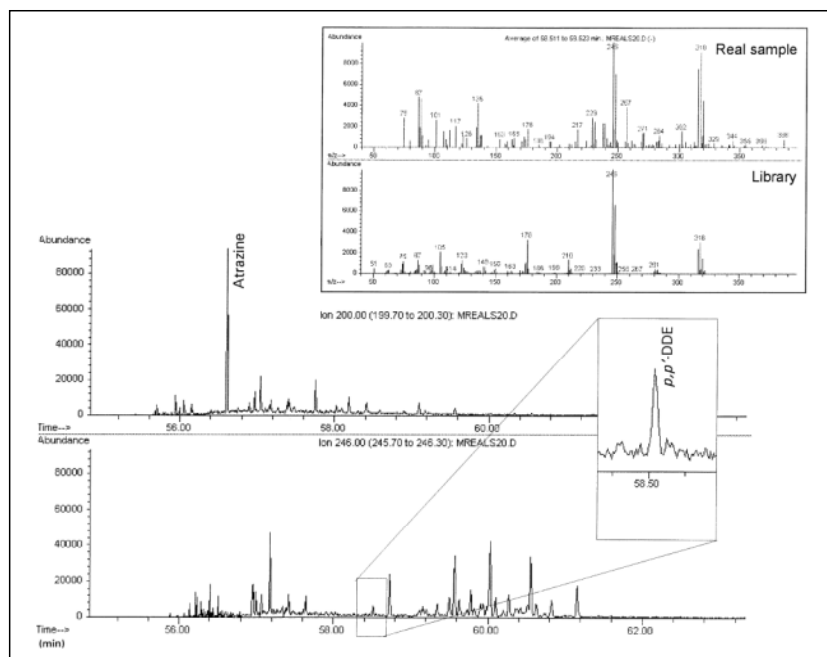


Figure 5. Extracted ion chromatograms at m/z 200 and 246 obtained by on-line SPE-PTV-GC-MS of 15 ml irrigation stream water. The insert shows the spectra of *p,p'*-DDE of the real sample and the library.

CONCLUSIONS

An automatic on-line SPE-PTV-GC-MS method was successfully applied to determine a group of EDs in several water samples.

The method quantified the analytes at ng l⁻¹ levels by preconcentrating only 15 ml of sample and identified them by using full-scan acquisition mode.

The recoveries obtained by this method were better than the recoveries obtained with a SPE-GC-MS using an on-column interface. Although the analytical data were similar in both methods, the PTV interface proved to be more robust than the on-column interface when samples with a high salt concentration were analysed.

DnBP, BBP, DEHP and adipate were found in all real samples. The DEHP concentration was generally between 5 and 40 times higher than the ERL and the DnBP concentration was below its ERL. Atrazine and *p,p'*-DDE were found in an irrigation stream water sample at concentrations of 0.16 and 0.04 µg l⁻¹, respectively.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Ministerio de Ciencia y Tecnologia (project AMB1999-0875).

REFERENCES

- [1] S.H. Safe, *Environ. Health Persp.* 108 (2000) 487.
- [2] D. Crews, E. Willingham, J.K. Skipper, *Q. Rev. Biol.* 75 (2000) 243.
- [3] S.L. Schantz, J. Widholm, *Environ. Health Persp.* 109 (2001) 1197.
- [4] M.J. Hemmer, B.L. Hemmer, C.J. Bowman, K.J. Kroll, L.C. Folmar, D. Mareovich, M.D. Hoglund, N.D. Denslow-N, *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (2001) 336.
- [5] A.L. Lister, G.J. Van der Kraak, *Water Qual. Res. J. Can.* 36 (2001) 175.
- [6] P.A. Fenner-Crisp, A.F. Macrorowsky, G.E. Timm, *Ecotoxicology* 9 (2000) 85.
- [7] M.J. López de Alda, D. Barceló, *Fresen. J. Anal. Chem.* 371 (2001) 437.
- [8] M. Moeder, S. Schrader, M. Winkler, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 873 (2000) 95.
- [9] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 964 (2002) 153.
- [10] T.J. Lepp, C.L. Gerlaeh, E.J. Cooter, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 286.
- [11] M. Petrovic, E. Eljarrat, M.J. López de Alda, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 637.
- [12] M. Petrovic, A. Diaz, F. Ventura, D. Barceló, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5886.
- [13] S.A. Snyder, T.L. Keith, D.A. Verbrugge, E.M. Snyder, T.S. Gross, K. Kannan, J.P. Giesy, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 2814.
- [14] T.R. Croley, R.J. Hughes, B.G. Koenig, C.D. Metcalfe, R.E. March, *Rapid Commun. Mass Sp.* 14 (2000) 1087.
- [15] Y. Goda, A. Kobayashi, K. Fukuda, S. Fujimoto, M. Ike, M. Fujita,

- Water Sci. Technol. 42 (2000) 81.
- [16] M.J. López de Alda, D. Barceló, J. Chromatogr. A 911 (2001) 203.
- [17] R. Wissiack, E. Rosenberg, M. Grasserbauer, J. Chromatogr. A 896 (2000) 159.
- [18] W. Engewald, J. Teske, J. Efer, J. Chromatogr. A 842 (1999) 143.
- [19] L. Brossa, R.M. Marcé, F. Borrull, E. Pocurull, J. Chromatogr. A 963 (2002) 287.
- [20] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Chromatogr. A 922 (2001) 377.
- [21] A.P. van Wezel, P. Van Vlaardingen, R. Posthumus, G.H. Crommentuijn, D.T.H.M. Sijm, Ecotoxicol. Environ. Safety 46 (2000) 305.

**II.3. DETERMINACIÓ D'ALTERADORS ENDOCRINS EN MOSTRES
AQUOSES AMBIENTALS PER EXTRACCIÓ AMB BARRES
MAGNÈTIQUES AGITADORES, DESORCIÓ LÍQUIDA I INJECCIÓ
DE GRANS VOLUMS A LA CROMATOGRÀFIA DE GASOS**

Per tal de corroborar els avantatges que presenten les tècniques de LVI es va realitzar un altre treball utilitzant la GC-MS amb la interfase PTV però en aquest cas utilitzant una altra tècnica de preconcentració de recent aparició en el moment, l'extracció per absorció amb barres magnètiques agitadores o *stir bar sorptive extraction* (SBSE).

La SBSE es basa en els mateixos principis que la SPME, però en la SBSE el sorbent de polidimetilsiloxà (PDMS) està dipositat sobre la superfície d'una barra magnètica agitadora en lloc d'una fibra com en la SPME. D'aquesta manera, la quantitat de sorbent en aquestes barres magnètiques agitadores és més gran que la que es troba en les fibres i la quantitat d'analit extret és més gran [1]. La figura 1 mostra un esquema d'aquestes barres magnètiques agitadores.

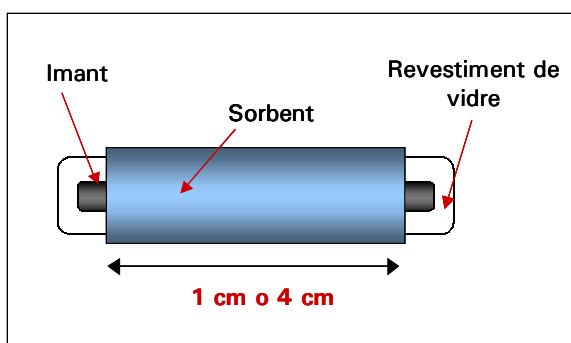


Figura 1. Esquema de les barres magnètiques agitadores recobertes de PDMS utilitzades en la SBSE.

En la SBSE, els analits són extrets introduint, directament a la mostra o en l'espai de cap de la mateixa, una barra magnètica agitadora recoberta de PDMS. A continuació la barra magnètica es retira de la mostra, s'esbandeix amb aigua i s'asseca amb un mocador. La desorció dels analits en SBSE es pot portar a terme de dues maneres: per desorció tèrmica (TD) o desorció

líquida (LD). Quan es treballa en GC generalment es porta a terme la desorció tèrmica en una unitat de desorció que s'acobla al sistema d'injecció del cromatògraf, d'aquesta manera els analits s'introdueixen en línia en el cromatògraf [2,3]. Però amb aquest tipus de desorció les altes temperatures poden resultar en la degradació dels analits termolàbils.

En la LD la desorció es porta a terme a través d'un solvent orgànic per la seva posterior injecció al cromatògraf. Generalment aquesta desorció es porta a terme per l'aplicació posterior de la HPLC [4,5]. Però, en un treball recent es va comprovar que la SBSE amb desorció líquida combinada amb la injecció de grans volums en GC-MS és una bona alternativa a la desorció tèrmica [6]. En el present treball, doncs, es va escollir portar a terme la desorció amb un solvent orgànic perquè disposàvem del sistema PTV-GC-MS.

Els objectius d'aquest treball van ser desenvolupar el mètode SBSE-LD-(PTV)GC-MS per la determinació d'un grup d'EDs diferent de l'anterior treball format també per plaguicides, dièsters d'ftalat, PAHs i un alquilfenol i comprovar la viabilitat d'aquest mètode per a la determinació d'aquests EDs en aigües mediambientals més complexes com aigua de mar i d'entrada i sortida de depuradores d'aigües residuals.

En primer lloc es va comprovar que les condicions de treball per la injecció de 3 fraccions de 100 µl en el cromatògraf fossin les òptimes per aquests compostos. Seguidament es va optimitzar el sistema de SBSE. Un cop escollit el solvent de desorció, es van optimitzar els paràmetres que afecten el procés d'absorció i desorció en SBSE. El mètode es va validar amb mostres d'aigua de riu, obtenint-se límits de detecció entre 0.005-0.06 µg l⁻¹, i es va comprovar la seva aplicabilitat a mostres d'entrada i sortida de depuradores d'aigües residuals.

Els resultats obtinguts estan inclosos en un treball que ha estat acceptat per a la seva publicació a la revista *Chromatographia*. A continuació se n'adjunta una còpia.

Bibliografia

- [1] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, J. Microcolumn. Sep. 11 (1999) 737.
- [2] V.M. León, B. Álvarez, M.A. Cobollo, S. Muñoz, I. Valor, J. Chromatogr. A 999 (2003) 91.
- [3] P. Popp, C. Bauer, B. Hauser, P. Keil, L. Wennrich, J. Sep. Sci. 26 (2003) 961.
- [4] P. Popp, C. Bauer, L. Wenrich, Anal. Chim. Acta 436 (2001) 1.
- [5] B. Tienpont, F. David, K. Desmet, P. Sandra, Anal. Bioanal. Chem. 373 (2002) 46.
- [6] A. Peñalver, V. García, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Chromatogr. A 1007 (2003) 1.

**DETERMINATION OF ENDOCRINE DISRUPTORS IN ENVIRONMENTAL WATER
SAMPLES BY STIR BAR SORPTIVE EXTRACTION-LIQUID DESORPTION-
LARGE VOLUME INJECTION-GAS CHROMATOGRAPHY**

L. Brossa, R.M. Marcé, F. Borrull, E. Pocurull
Departament de Química Analítica i Química Orgànica. Universitat Rovira i Virgili.
Imperial Tàrraco 1, 43005 TARRAGONA, Spain

Abstract

A method based on stir bar sorptive extraction with liquid desorption combined with gas chromatography and mass spectrometry detection has been developed to determine a group of endocrine disruptors in water samples. Large volume injection was used with a programmed temperature vaporiser injector in gas chromatography to enhance sensitivity. The parameters affecting stir bar sorptive extraction and large volume injection were optimised. The limits of quantification in the full scan mode were between 0.02 and 0.2 $\mu\text{g l}^{-1}$ and the limits of detection were between 0.005 and 0.02 $\mu\text{g l}^{-1}$ for river water samples. The reproducibility between days of the method ($n=3$) for river water samples spiked at 0.2 $\mu\text{g l}^{-1}$ was below 15%. The performance of the method was checked with several water samples from the sea, and effluent and influent sewage treatment plants. We found 4-tert-octylphenol, benzylbutyl phthalate and bis(2-ethylhexyl) adipate in all the water samples analysed at levels between 0.02-14.04 $\mu\text{g l}^{-1}$. Diazinon was found in only one effluent wastewater sample at 0.16 $\mu\text{g l}^{-1}$.

Keywords: Stir bar sorptive extraction; Liquid desorption; Large volume injection-GC-MS; Endocrine disruptors; Environmental water samples.

INTRODUCTION

Nowadays, several analytical methods have been developed to determine endocrine disruptors (EDs) in environmental water samples because these compounds can affect the normal endocrine and reproductive functions of animals and humans.

These methods have been developed to determine a broad range of compounds such as phthalate esters, pesticides, alkylphenol ethoxylates and their metabolites, bisphenol A and some synthetic and natural estrogens, because they have been reported to have endocrine disrupting effects [1,2].

At present, gas chromatography (GC) and high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry (MS) are the most commonly used techniques because of the capacity of MS to quantify and confirm the presence of pollutants in the same analysis [3-5]. Biological techniques have also been applied to determine these compounds, mainly to test estrogenic capacity [6,7]. The analytical methods developed usually include a preconcentration technique for determining these compounds at the levels at which they are present in the environmental water samples. The most common technique is solid-phase extraction (SPE) [8,9], but solid-phase microextraction (SPME) [10,11] has also been used because it requires smaller amounts of organic solvents so sample volumes can be smaller. Recently, a novel sample preparation technique, stir bar sorptive extraction (SBSE), based on the use of a stir bar coated with polydimethylsiloxane (PDMS) has been introduced by P. Sandra and co-workers [12]. In the SBSE, the amount of PDMS coated on the stir bar is considerably higher than on a SPME fiber, which results in high recoveries and, therefore, better sensitivity and higher capacity, especially for volatile compounds.

In the methods developed by SBSE, the analytes are usually desorbed by thermal desorption (TD) combined with GC and MS detection. These methods have been developed mainly for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in aqueous

samples [13-16]. Organotin compounds in harbour water [17], off-flavour compounds in drinking and river waters [18,19] and pesticides in environmental water samples [15,16] have also been determined. In general, not many applications have been published using SBSE-TD-GC-MS to determine EDs and only two alkylphenols (4-tert-octylphenol and 4-nonylphenol) have been determined recently [20]. But, analogous to the off-line coupling of SPME to LC, the extracted analytes can be desorbed with small amounts of organic solvent. The first study with liquid desorption (LD) was done by Popp et al. [21] for determining PAHs in water samples, using HPLC and fluorescence detection. LD can also be combined with GC and large volume injection (LVI) when a thermal unit is not available. The first study using SBSE/LD-LVI-GC-MS was made by our research group [22]. We determined a group of pesticides (considered endocrine disruptors) at low $\mu\text{g l}^{-1}$ levels in river water samples and demonstrated that LD combined with LVI in GC is a useful alternative to SBSE-TD-GC-MS.

This paper has two objectives. One is to develop a method using SBSE-LD-GC-MS with LVI for a group of EDs involving some pesticides, PAHs, phthalates and alkylphenols. The other objective is to check the matrix effect of SBSE in water samples from rivers, the sea and influent and effluent sewage treatment plants.

EXPERIMENTAL

Reagents and standards

The endocrine disruptors studied were: 4-tert-octylphenol (4-t-OP) (supplied by Aldrich, Steinheim-Germany), diazinon, heptachlor, fenitrothion, diethyl phthalate (DEP), di-n-butyl phthalate (DnBP), bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), benzylbutyl phthalate (BBP), di-n-octyl phthalate (DnOP), bis(2-ethylhexyl) adipate (from Riedel-de Haën, Seelze-Hannover, Germany), benzo(a)pyrene and benzo(a)anthracene (from Sigma, St. Louis NO, USA). The purities of these reagents were over 96%. Standard solutions of each compound were prepared at a concentration of 1000 mg l⁻¹ in ethyl acetate from Merck (Darmstadt, Germany) and stored at 4°C. All the working solutions were prepared by diluting these solutions.

The sodium chloride (over 99.5% pure) which was added to the aqueous samples was obtained from Riedel-de Haën (Seelze-Hannover, Germany). The pH of the aqueous samples was also adjusted with hydrochloric acid from Probus (Badalona, Spain) or with a solution of sodium hydroxide (Riedel-de Haën). Methanol was supplied by SDS (Peypin, France). Isooctane from Merck was used to desorb the compounds in the SBSE procedure.

Instrumentation

We used an Agilent (Waldbronn, Germany) HP 6890 Series gas chromatograph equipped with a programmed temperature vaporiser

(PTV) injector and an HP 5973 mass spectrometry detector. The column used was an Agilent HP-5MS fused-silica capillary column 0.25- μ m of 30 mX250 μ m I.D. Two six-port Valco valves (Houston, TX, USA), automatically controlled by the GC-MS software, were used for the large volume injection in the gas chromatograph [23]. The PTV injector worked in solvent vent mode with a liner of 7 cmX2 mm I.D. packed with 0.014 g of Tenax from Supelco (Bellefonte, PA, USA).

The stir bars (10 mm longX3.2 mm O.D.), coated with an extracting phase of PDMS (63 μ L), are commercialised by Gerstel (Mülheim an der Ruhr, Germany). A stirrer and heater unit from Selecta (Abrera, Spain) was used to perform the SBSE process.

PTV-GC-MS conditions

The PTV was used in solvent vent mode for the multiple large volume injection (3X100 μ L). The PTV conditions were: initial inlet temperature, 65°C; vent flow, 30 ml min⁻¹; vent pressure, 6 p.s.i.; vent end time, 2 min between injections; inlet temperature, 315°C; purge time, 6 min and purge flow, 100 ml min⁻¹.

The oven temperature was held constant at 60°C until the analyte transfer from the Tenax to the column began. Once the transfer had begun, it was increased to 230°C at 15°C min⁻¹ and then to 290°C at 20°C min⁻¹, which was kept constant for 3 min. The total analysis time was 30.64 min.

The MS transfer line was kept at 280°C to prevent the analytes from recondensing. The ion energy used for the electron impact (EI) ionisation was 70 eV and the MS was tuned to m/z 69, 219 and 502 for the EI corresponding to perfluorotributylamine (PFTBA). The mass range was 75-350 with a rate of 5.10 scans s^{-1} . Chromatograms were recorded under full-scan acquisition mode and the base peak was selected for each compound for the quantification.

SBSE procedure

Stir bars were conditioned in a split/splitless injector under He flow (1.2 ml min^{-1}) for 4 h at 300°C. Then, a blank was run to check that the sorbent had not caused any spurious peaks in the chromatogram.

The SBSE was carried out with 10 ml of aqueous sample containing the endocrine disruptors, 20 g l^{-1} of NaCl and 10% of methanol. The pH was not modified. The stir bar was immersed in the vial containing the aqueous sample, and it was stirred in the sample for 30 min at 50°C and 1200 rpm. Then, the stir bar was removed from the vial and dried with a lint-free tissue. The analytes were desorbed by placing the stir bar in a vial containing 0.5 ml of isooctane, in the stirrer unit (1000 rpm) for 30 min at room temperature. Three consecutive aliquots of $100 \mu\text{l}$ of this sample were then introduced into the PTV injector, which was at a temperature of 65°C, at $47 \mu\text{l min}^{-1}$ by a syringe pump.

Real samples were collected in precleaned 1 l amber glass bottles and filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ filter (MSI, Westboro, MA, USA). These were kept in the dark at 4°C until the analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimisation of the large volume injection

We set parameters such as the inlet pressure during the sampling/venting step and the liner sorbent in accordance with our previous paper [23]. Purge time and desorption inlet temperature were optimised by manually injecting $1 \mu\text{l}$ of a 5 mg l^{-1} working solution in ethyl acetate. Vent flow, vent end time and the initial inlet temperature were optimised by introducing $100 \mu\text{l}$ of a solution of 0.05 mg l^{-1} in ethyl acetate. Then, we checked the multiple injection of $3 \times 100 \mu\text{l}$ of a solution of 0.017 mg l^{-1} in ethyl acetate. Finally, we optimised the purge flow to clean the Tenax between runs. The optimal conditions are described in Section 2.3.

Optimisation of the SBSE procedure

Before optimising the absorption and desorption steps, we selected the organic solvent used for desorption. In accordance with the literature, the organic solvent compatible with the PDMS-coated stir bars and GC was isooctane [22,24].

The parameters optimised in the extraction step were the time and temperature of extraction, sample pH,

and addition of NaCl and organic solvent to the sample. In the solvent desorption step, we optimised the volume of organic solvent, time and temperature. The SBSE parameters were optimised by injecting 3X100 μ l of the extract into the PTV injector.

Absorption process

The parameters affecting the absorption process were optimised with 10 ml Milli-Q water samples spiked at 1 μ g l⁻¹ of endocrine disruptors. Desorption was carried out in a magnetic stirrer unit (1000 rpm) by placing the stir bar with the analytes in a vial containing 1 ml of isooctane for 15 min at room temperature (25°C).

To optimise absorption time, the absorption temperature was set at 50°C, the sample pH was not modified and NaCl was not added. Different times between 15 and 60 min were tested and the results showed that the amount of analyte extracted increased with the absorption time. However, at 30 and 60 min the recoveries were similar and an absorption time of 30 min was selected for further analysis because it was a good compromise between time of analysis and response.

The absorption temperature was tested between 25 and 80°C by maintaining the other parameters (pH, NaCl) at the values previously used and fixing the absorption time at 30 min. At 70°C the absorption of the PAHs was slightly higher than at 50°C and the other compounds maintained the recoveries. However, we chose 50°C because at

higher temperatures the reproducibility was poor.

The pH of the sample was not adjusted because recoveries did not increase when it was modified. NaCl concentrations were tested from no salt addition to 40 g l⁻¹. The recoveries increased for most of the compounds studied up to 20 g l⁻¹ but at higher concentrations the amount extracted did not increase significantly. Thus, we selected the addition of 20 g l⁻¹ to the sample.

Finally, we evaluated the addition of an organic solvent to the aqueous sample before extraction to prevent the retention of some compounds (such as PAHs) on the walls of the vials during extraction and to improve recoveries. Some authors have shown that methanol or hyamine (an ionic tenside) can prevent losses to glass walls [13,15]. When methanol was used, the authors recommended a concentration of 10%. We tested the effect of adding 10% methanol to the sample and the recoveries increased for the compounds eluting last, mainly for PAHs. So this percentage was added to the water samples before the preconcentration step.

Desorption process

The desorption process was optimised with a magnetic stirring at 1000 r.p.m. The desorption time was tested at 15, 30 and 60 min. The amount of analyte extracted increased until 30 min for all the compounds. At 60 min, the recoveries only increased for PAHs.

Therefore, we selected 30 min because recoveries were acceptable for the two PAHs analysed.

The volume of isooctane in the desorption was studied between 0.5 and 2 ml. The recoveries were constant in all the volumes tested, so we selected 0.5 ml so that the concentration factor would be higher.

The desorption temperature was tested at room temperature (25°C) and 50°C. At 50°C the chromatogram was dirtier and the reproducibility lower. Therefore, we used room temperature. Further experiments showed that there were no carries over effects in the stir bar after it had been cleaned and conditioned.

Performance of the SBSE/LVI-GC-MS method

The performance of the method was validated with 10 ml of working solutions in Milli-Q water using SBSE/LVI-GC-MS. We used the full-scan acquisition mode because the mass spectra can confirm the presence of EDs and because the responses of these compounds are high enough to be determined in the samples.

When we analysed a blank of Milli-Q water, some peaks appeared at retention times corresponding to DEP, DnBP, BBP, DEHP and adipate. They were confirmed by the spectra. For BBP and adipate, the linear range of the method for these compounds was checked by subtracting the areas

obtained in the blank chromatograms (n=5) from the areas obtained in the working solution spiked at different levels of concentration. But for DEP, DnBP and DEHP, the repeatability of the areas obtained in the blank chromatograms was not good in any conditions. Therefore, these compounds cannot be determined in Milli-Q water. Linearity was checked in the 0.02 to 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ range and the correlation coefficients (r^2) were higher than 0.9940. The limits of detection (LODs), calculated taking into account a signal/noise ratio of 3, were between 0.005 and 0.06 $\mu\text{g l}^{-1}$. The repeatability and reproducibility between days were tested using three working solutions spiked at 0.2 $\mu\text{g l}^{-1}$. The results, expressed as relative standard deviations, RSD (%), varied from 1 to 9% for repeatability and from 1 to 17% for reproducibility. The recoveries were between 51-83% for all compounds, except for DnOP which was lower (20%).

We tested the performance of this method with river water. The recoveries were similar to the recoveries with Milli-Q water working solutions. In the chromatogram of the Ebre river water, several peaks appeared and only DEP, DnBP, BBP, DEHP and adipate were confirmed with the spectra. No reproducibility was found for DEP, DnBP and DEHP and the peaks corresponding to BBP and adipate were taken into account in the calibration as they were in the Milli-Q water calibration. Table 1 shows the analytical data with the SBSE/LVI-GC-MS method for river water using full scan acquisition mode. The slopes of

the calibration curves were statistically similar (F- and t-tests were used with $\alpha=0.05$) to those obtained with Milli-Q water, so matrix interference was not significant. Figure 1 shows the chromatograms of a water sample from the Ebre river unspiked and spiked with $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ of the EDs studied. In this

sample, DEP, DnBP, BBP; DEHP and adipate were present and, as mentioned, only BBP and adipate were quantified. Although fenitrothion and DnBP coeluted (see Figure 1b), they can be identified from the extracted ion chromatogram.

Table 1. Linear ranges, limits of detection, correlation coefficients, recoveries and relative standard deviations for Ebre river water samples analysed by SBSE/LVI-GC-MS.

	Linear Range ($\mu\text{g l}^{-1}$)	LODs ($\mu\text{g l}^{-1}$)	r^2	R (%) $n=3$ ($0.2 \mu\text{g l}^{-1}$)	*RSD (%) $n=3$ ($0.2 \mu\text{g l}^{-1}$)
4- <i>t</i> -OP	0.02-5	0.005	0.9997	48	8
Diazinon	0.05-5	0.02	0.9997	65	6
Heptachlor	0.2-1	0.05	0.9945	68	8
Fenitrothion	0.2-5	0.06	0.9939	32	6
BBP	0.05-5	0.02	0.9949	98	12
Adipate	0.05-5	0.02	0.9979	56	1
Benzo[<i>a</i>]anthracene	0.02-5	0.005	0.9999	81	5
DnOP	0.1-5	0.02	0.9939	18	15
Benzo[<i>a</i>]pyrene	0.2-5	0.05	0.9996	89	13

*reproducibility between days

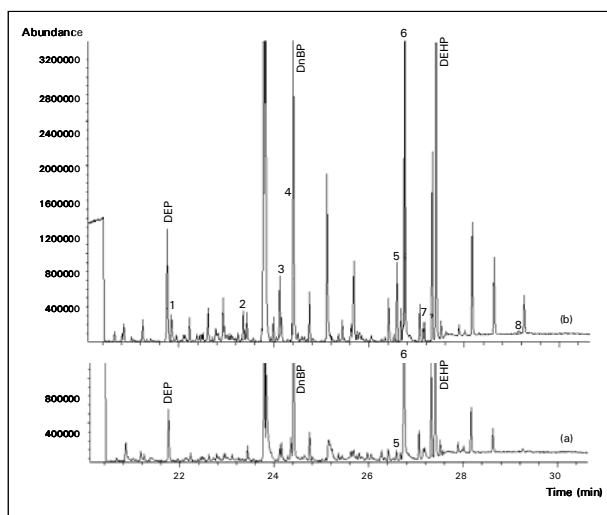


Figure 1. Chromatograms obtained by SBSE/LVI-GC-MS of: (a) Ebre river water; (b) Ebre river water spiked with $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$. Peak assignment: (1) 4-*t*-OP; (2) Diazinon; (3) Heptachlor; (4) Fenitrothion; (5) BBP; (6) Adipate; (7) Benzo(*a*)anthracene; (8) Benzo(*a*)pyrene.

Application to real samples

We also checked the performance of the method with water samples from the sea and influent and effluent sewage treatment plants. Matrix interference was not significant and, as Table 2 shows, the recoveries obtained in these matrices were similar to the recoveries with Milli-Q water working solutions with a RSD < 14% (n = 3).

Table 2. Recoveries obtained by preconcentrating 10 ml of Milli-Q, river and effluent sewage treatment plant water spiked at 0.25 $\mu\text{g l}^{-1}$.

Compounds	Recoveries (%)		
	Milli-Q ^a water (n = 3)	Ebre River ^b (n = 3)	Effluent ^c (n = 3)
4-t-OP	52	48	49
Diazinon	63	65	69
Heptachlor	78	68	65
Fenitroton	37	32	40
BBP	79	78	66
Adipate	51	57	56
Benzo[a]antracene	77	81	71
DnOP	20	18	15
Benzo[a]pyrene	83	89	82

^a %RSD < 14; ^b %RSD < 17; ^c %RSD < 16

Three peaks appeared in all the samples analysed at the same retention times as 4-t-OP, BBP and adipate and they were confirmed from the spectra. 4-t-OP was quantified between 0.02-0.03 $\mu\text{g l}^{-1}$ in all water samples.

The levels of adipate found in sea and river water samples (8.50 and 14.04 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectively) were around 5 or 50 times higher than the levels found in effluent and influent wastewater

samples (1.73 and 0.28 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectively). However, the levels of BBP were similar in all the samples (between 0.16-0.38 $\mu\text{g l}^{-1}$).

In an effluent wastewater sample, we also found diazinon at 0.16 $\mu\text{g l}^{-1}$. It was confirmed with the library with a 99% of quality. Figure 2 shows the extracted ion chromatogram for diazinon (m/z 179) from the analysis of an unspiked effluent wastewater sample and the experimental spectrum and library spectrum for diazinon.

CONCLUSIONS

SBSE in combination with GC-MS with liquid desorption and large volume injection can be used to determine a group of EDs which includes some pesticides, PAHs, phthalates and alkylphenols in several environmental water samples.

No matrix effect was found in water samples from river, sea and influent and effluent sewage treatment plant and the recoveries were similar to those obtained with Milli-Q water working solutions.

Using LVI and full scan mode acquisition, the compounds studied can be determined at low $\mu\text{g l}^{-1}$ in water samples. 4-t-OP, BBP and adipate were found in all the water samples analysed at levels between 0.02 and 14.04 $\mu\text{g l}^{-1}$ and diazinon was found at 0.16 $\mu\text{g l}^{-1}$ in an effluent wastewater sample.

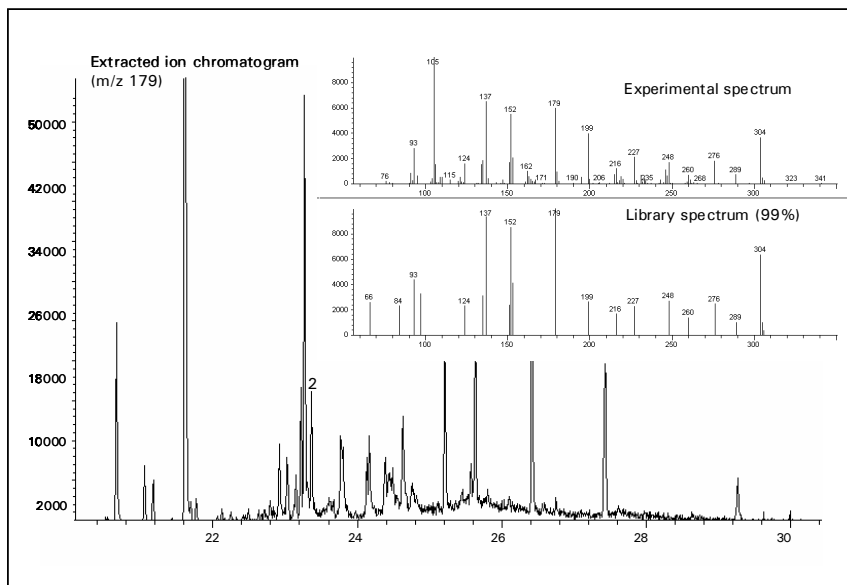


Figure 2. Extracted ion chromatogram (m/z 179) obtained by SBSE/LVI-GC-MS of 10 ml of effluent sewage treatment plant water. The inserts show the experimental spectrum and library spectrum.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the *Ministerio de Ciencia y Tecnología* (projects AMB1999-0875 and PPQ2001-1805-CO3). We would like to thank Dr P. Sandra for kindly providing the stir bars.

REFERENCES

- [1] T. Colbron, D. Dumanoski, J.P. Myers, *Widespread pollutants with reproductive and endocrine-disrupting effects. Our Stolen Future*, www.ourstolenfuture.com/Basics/chemlist.htm. Consulted: January 2004.
- [2] Communication from the Commission to the Council and the European Parliament. *Application of the Community Strategy for Endocrine disruptors: a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife*, Brussels, COM (2001) 262.
- [3] M. Petrovic, E. Eljarrat, M.J. López de Alda, D. Barceló, J. Chromatogr. A 974 (2002) 23.
- [4] F.J. Santos, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 125.
- [5] M.J. López de Alda, S. Díaz-Cruz, M. Petrovic, D. Barceló, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 503.
- [6] N. García-Reyero, E. Grau, M. Castillo, M.J. López de Alda, D. Barceló, B. Piña, *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (2001) 1152.

- [7] Y. Goda, A. Kobayashi, K. Fukuda, S. Fujimoto, M. Ike, M. Fujita, *Water Sci. Technol.* 42 (2000) 81.
- [8] T. Isobe, H. Shiraishi, M. Yasuda, A. Shinoda, H. Suzuki, M. Morita, *J. Chromatogr. A* 984 (2003) 195.
- [9] A. Asperger, J. Efer, T. Koal, W. Engewald, *J. Chromatogr. A* 960 (2002) 109.
- [10] A. Díaz, F. Ventura, M.T. Galceran, *Anal. Chem.* 74 (2002) 3869.
- [11] A.J. King, J.W. Readman, J.L. Zhou, *Environ. Geochem. Health* 25 (2003) 69.
- [12] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 737.
- [13] A.C. Heiden, A. Hoffmann, B. Kolahgar, *Application Note 8*, Gerstel, Mülheim/Ruhr, 2001.
- [14] B. Kolahgar, A. Hoffmann, A.C. Heiden, *J. chromatogr. A* 963 (2002) 225.
- [15] V.M. León, B. Álvarez, M.A. Cobollo, S. Muñoz, I. Valor, *J. Chromatogr. A* 999 (2003) 91.
- [16] P. Popp, C. Bauer, B. Hauser, P. Keil, L. Wennrich, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 961.
- [17] J. Vercauteren, C. Pérès, C. Devos, P. Sandra, F. Vanhaecke, L. Moens, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1509.
- [18] N. Ochiai, K. Sasamoto, M. Takino, S. Yamashita, S. Daishima, A. Heiden, A. Hoffman, *Analyst* 126 (2001) 1658.
- [19] S. Nakamura, N. Nakamura, S. Ito, *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 674.
- [20] M. Kawaguchi, K. Inoue, M. Yoshimura, R. Ito, N. Sakui, H. Nakazawa, *Anal. Chim. Acta* 505 (2004) 217.
- [21] P. Popp, C. Bauer, L. Wennrich, *Anal. Chim. Acta* 436 (2001) 1.
- [22] A. Peñalver, V. García, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 1007 (2003) 1.
- [23] L. Brossa, R.M. Marcé, F. Borrull, E. Pocurull, *J. Chromatogr. A* 998 (2003) 41.
- [24] P. Sandra, *Plenary Lecture, 30th Scientific Meeting of the Group of Chromatography and Related Techniques*, Valencia, Spain. 2001.

**II.4. MÈTODE RÀPID PER A LA DETERMINACIÓ D'ALTERADORS
ENDOCRINS FENÒLICS EN MOSTRES AQUOSES**

Degut a la semblança de l'anell fenòlic amb els lligands dels receptors estrogènics, molts compostos que contenen aquest anell són capaços d'alterar el sistema endocrí i per tant, són considerats estrogènics [1]. Aquests compostos són els alquilfenols, productes de degradació dels alquilfenoletoxilats àmpliament usats com ingredients actius dels detergents, el bisfenol A i els esteroids sexuals naturals i sintètics. Les propietats físico-químiques d'aquests compostos fan que no siguin directament determinables per GC, fent necessari una etapa de derivatització o la utilització d'una altra tècnica cromatogràfica com és la HPLC.

Per a la determinació d'estrògens, alquilfenols i bisfenol A, s'han desenvolupat varis mètodes basats en la HPLC i la GC. Normalment, la HPLC és la tècnica escollida per la majoria d'autors per la determinació dels estrògens i els alquilfenols perquè, a diferència de la GC, no és necessària una etapa prèvia de derivatització. Els detectors més emprats són el d'UV-visible [2], el de fluorescència [3] i recentment, la MS [4]. El Bisfenol A, tot i necessitar en alguns casos una etapa prèvia de derivatització, generalment es determina per GC utilitzant el detector de MS [5,6]. Les tècniques de preconcentració utilitzades per la determinació d'aquests compostos a baixos nivells són principalment la SPE i, en funció de la derivatització que es porta a terme, la LLE. Tot i així, en pocs mètodes aquestes tècniques s'han utilitzat acoblades en línia a les tècniques cromatogràfiques.

En el següent treball es va optar per desenvolupar un mètode utilitzant la HPLC acoblat a un detector d'UV-visible, per tal d'obtenir un mètode ràpid per la determinació dels tres alquilfenols més estrogènics (4-*tert*-butilfenol, 4-*tert*-octilfenol i el 4-nonilfenol) i del bisfenol A en mostres aquoses.

Per la preconcentració d'aquests analits es va escollir la utilització de la SPE en línia, per tal de que es pogués aplicar per portar a terme anàlisis de rutina. En primer lloc es van optimitzar totes les condicions de la SPE, utilitzant el sorbent polimèric PRP-1 per la seva capacitat per retenir compostos amb propietats similars.

Aquest mètode es va validar per mostres aquoses de riu, mar, aigua embotellada, de l'aixeta i aigües residuals procedents de depuradores.

El mètode va permetre determinar els compostos estudiats a baixos nivells de concentració, preconcentrant 100 ml d'aigües de riu, mar, de l'aixeta, embotellada i residuals. Els LODs que es van obtenir són entre 0.01 i 0.1 $\mu\text{g l}^{-1}$, inferiors als obtinguts per Ding et al. [7] pel 4-NP i el BPA, a través d'un mètode basat en la SPE de 200 ml de mostra aquosa i determinació per GC-MS.

En una mostra d'aigua embotellada es van trobar dos analits als temps de retenció corresponents al BPA i el 4-NP, tot i que no es van poder quantificar perquè estaven per sota del límit de quantificació. Però, en una mostra de sortida d'una depuradora d'aigües residuals es va observar la presència d'un dels compostos al temps de retenció del BPA i es va quantificar a 3 $\mu\text{g l}^{-1}$.

Aquest mètode desenvolupat comporta la utilització d'una instrumentació senzilla i per tant, és una tècnica de fàcil aplicabilitat per portar a terme escombrats d'aquests compostos a nivells traça en mostres aquoses mediambientals. Tot i així, es fa evident que la presència d'aquests compostos trobats en aquestes mostres s'han de confirmar amb una altra tècnica com podria ser la MS.

Aquest treball, que es presenta a continuació, ha estat publicat a la revista *Chromatographia* 56 (2002) 573.

Bibliografia

- [1] J.M. Navas, H. Segner, Environ. Sci. Pollut. R. 5 (1998) 75.
- [2] M.J. López de Alda, D. Barceló, J. Chromatogr. A 911 (2001) 203.

- [3] S.A. Snyder, T.L. Keith, D.A. Verbrugge, E.M. Snyder, T.S. Gross, J.P. Giesy, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 2814.
- [4] M.J. López de Alda, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 391.
- [5] J.L. Vilchez, A. Zafra, A. González-Casado, E. Hontoria, M. del Olmo, *Anal. Chim. Acta* 431 (2001) 31.
- [6] A. Laganà, A. Bacaloni, G. Fago, A. Marino, *Rapid Commun. Mass Sp.* 14 (2000) 401.
- [7] W-H. Ding, C-Y. Wu, *J. Chin. Chem. Soc.-Taip* 47 (2000) 1155.

A RAPID METHOD FOR DETERMINING PHENOLIC ENDOCRINE DISRUPTORS IN WATER SAMPLES

L. Brossa, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé

Departament de Química Analítica i Química Orgànica. Universitat Rovira i Virgili.
Imperial Tàrraco 1, 43005 TARRAGONA, Spain

Abstract

We have developed a method based on solid-phase extraction coupled on-line to liquid chromatography with UV detection (SPE-HPLC-UV) to determine bisphenol A and a group of alkylphenols, which have been recognised as endocrine disruptors (ED), in water samples. We optimised the conditions used for both SPE and the chromatography. The SPE-HPLC-UV method developed is rapid and it enables routine analysis. Its performance was checked with a variety of aqueous samples collected in the south of Catalonia from the Ebre river, from the sea, and from tap water and waste-water-treatment plants. Drinking water in plastic bottles was also analysed. The method enabled determination of ED at low levels; the limits of detection were between 0.01 and 0.1 $\mu\text{g l}^{-1}$. Bisphenol A and nonylphenol were detected in some samples.

Keywords: Column liquid chromatography-UV detection; Solid-phase extraction; Endocrine disruptors; Water samples

INTRODUCTION

The presence in the environment of compounds with estrogenic properties has become a subject of major concern throughout the world. The normal operation of the endocrine system can be disrupted by several anthropogenic and naturally occurring compounds that affect physiological processes normally under hormonal control. In the last few years a wide variety of chemicals have been classified as endocrine disruptors, because it is

suspected they affect the endocrine system and, therefore, cause disorders in the organism such as breast cancer or sperm count reduction. One group of compounds identified as ED are estrogenic phenolic compounds such as bisphenol A and the alkylphenols [1-4]. Urban and industrial discharges are the main sources of these compounds in the environment, because they cannot be eliminated by water and wastewater treatment [5]. Recently, therefore, there has been much interest in developing analytical

methods for determining such compounds in the aquatic environment.

Several methods have been developed for determination of these phenolic compounds in environmental samples. Lee [6], for example, has reviewed analytical methods developed for determination of nonylphenol and related compounds, and Petrovic et al. [7] have developed a method for determining a group of anionic and non-ionic surfactants, including bisphenol A and some alkylphenols, in sewage sludge.

Methods using high-performance liquid chromatography (HPLC) [7-12] and gas chromatography (GC) [13-20] have been reported for determination of bisphenol A and alkylphenols. Normal- or reversed-phase HPLC is the separation technique of choice for determining phenolic compounds because, unlike GC, derivatization of the higher molecular weight phenols is not needed [19, 20]. UV and fluorescence detection have usually been used with HPLC, and FID and ECD with GC. Mass spectrometric detection has been used with both HPLC and GC [7,19].

Because these compounds are usually present in the environment at low concentrations a preconcentration technique is usually required. SPE is one of the most widespread [7-11,15,17,19,20], although solid-phase microextraction (SPME) has also been used [18]. In very few methods, however, have these techniques been coupled on-line [11]. The aim of the

work discussed in this paper was, therefore, to develop an automatic method for determining a group of endocrine disrupter phenolic compounds such as bisphenol A, 4-*tert*-butylphenol, 4-*tert*-octylphenol, and nonylphenol in water samples by use of an on-line SPE-HPLC-UV method.

EXPERIMENTAL

Reagents and Standards

The compounds studied were bisphenol A (BA), 4-*tert*-butylphenol (4-*t*-BP), 4-*tert*-octylphenol (4-*t*-OP), and nonylphenol (NP). They were purchased from Aldrich (Steinheim, Germany). A standard solution (2000 mg l⁻¹) of each compound was prepared in methanol and stored under refrigeration. Working standard solutions (100 mg l⁻¹) were prepared weekly in methanol from the standard solutions and used to prepare dilute solutions and to spike water samples to the required concentrations. Sodium chloride (> 99.5% pure), added to aqueous samples before SPE, was obtained from Riedel-de Hæn (Seelze-Hannover, Germany). The pH of the samples was adjusted with acetic acid or sodium hydroxide, both from Prolabo (Bois, France).

The HPLC-grade methanol for the mobile phase was from SDS (Peypin, France) and water was obtained from a Milli-Q water-purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Instrumentation

HPLC was performed with an Agilent (Waldbronn, Germany) HP 1050 liquid chromatograph equipped with an UV spectrophotometric detector and a 150 mm x 4.6 mm I.D., 5 μm particle, Zorbax Eclipse XDB-C8 analytical column, supplied by Agilent. Chromatographic data were collected and recorded by means of an HP-3365 Series II Chemstation, version A.03.34.

A Rheodyne (California, USA) valve was used for SPE and for on-line elution. The poly(styrene-divinylbenzene) (PRP-I) SPE precolumn was obtained from Spark Holland (Emmen, The Netherlands). An Applied Biosystems (Foster, USA) 400 solvent delivery system was used to deliver the sample and the solvents needed to clean and activate the adsorbent.

Chromatographic conditions

The binary mobile phase was prepared from Milli-Q water containing 1% (v/v) acetic acid (solvent A) and methanol (solvent B). The separation was performed by use of a gradient from 55% to 100% B in 15 min and then isocratic for 3 min. The mobile phase was then returned to its initial composition in 2 min. The mobile phase flow-rate was 1 ml min⁻¹. The oven temperature was set at 30 °C. The loop volume was 20 μl and all compounds were monitored at 280 nm by UV spectrophotometric detection.

On-Line trace enrichment

A Rheodyne valve was used for on-line sample enrichment. The adsorbent was conditioned and cleaned by flushing with methanol (5 ml) and with Milli-Q water adjusted to pH 2.8 \pm 0.1 with acetic acid (5 ml). The pH of the sample (100 ml) was adjusted to 2.8 \pm 0.1 with acetic acid, and sodium chloride (0.5 g l⁻¹) was added to adjust the ionic strength; the sample was then preconcentrated. Tubing was cleaned by purging with sample solution, before further sample was passed through the adsorbent. The flow-rate throughout the process was 4 ml min⁻¹. On-line desorption of the analytes, with the mobile phase, was performed in back-flush mode. While chromatographic separation was taking place a new water sample was preconcentrated. Figure 1 shows the arrangement of the analytical system.

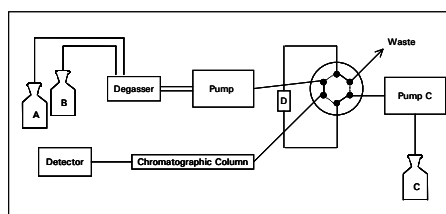


Figura 1. Schematic diagram of the analytical equipment. A. Milli-Q water at pH 2.8. B. methanol. C. sample-delivery system. D. PRP-1 precolumn.

Samples of tap water, river water, sea water and waste water from treatment plants were collected in 2.5 l, precleaned, amber glass bottles and filtered through a 0.45- μm filter (M S1, Westboro, MA, USA). They were kept at 4 °C, in the dark, until analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Chromatographic separation

When the chromatographic separation had been optimised we determined analytical data by direct injection. To determine the linear range of the response for direct injection, 20 μl of standard solutions in Milli-Q water were injected. Linearity was good between 0.3 and 10 mg l^{-1} for 4-*t*-OP and between 0.4 and 10 mg l^{-1} for the other analytes. Correlation coefficients were > 0.998 . Limits of detection (LOD) were calculated as the response for which the signal-to-noise ratio was 3 and were 0.1 mg l^{-1} for all the compounds. The repeatability, and the reproducibility between days, at a level of 0.5 mg l^{-1} , expressed as relative standard deviation (RSD), were between 2 and 6% ($n=3$) and between 2 and 7% ($n=3$), respectively.

SPE

We selected PRP-1 as the adsorbent for SPE because of its capacity to retain compounds with characteristics similar to those of the compounds studied. We then optimised sample pre-treatment and sample volume. For sample pre-treatment we studied the pH of the sample and the ionic strength by preconcentrating 10 ml of a 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ standard solution. First, acetic acid or sodium hydroxide, not NaCl, was added to optimise the pH of the standard solution between 2.0 and 8.0. The results were best at pH 2.8 ± 0.1 . NaCl (0-2 g l^{-1}) was then added to the standard solution at pH

2.8 to optimise the ionic strength. As is apparent from Table 1, recoveries of all the compounds were higher when NaCl was added at 0.5 g l^{-1} .

Table 1. Effect of adding different amounts of NaCl, before the preconcentration step, on the recoveries of the compounds from a 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ standard solution ($n=3$).

Amount of NaCl (g l^{-1})	Recovery (%)			
	BA	4- <i>t</i> -BP	4- <i>t</i> -OP	NP
0	60	61	32	22
0.5	101	88	60	41
1.0	102	85	61	40
2.0	98	85	60	41

Finally, the sample volume was optimised by preconcentrating different volumes, between 10 and 250 ml, of standard solutions (containing 0.5 g l^{-1} NaCl and at pH 2.8) of different concentration, so that the theoretical final amount preconcentrated (0.1 μg) was kept constant. We finally selected a sample volume of 100 ml because, as is apparent from Table 2, use of larger volumes led to reduced recoveries of all the compounds. Figure 2 shows a chromatogram obtained under the optimised conditions by preconcentrating 100 ml of a standard solution spiked at 1 $\mu\text{g l}^{-1}$. Additional experiments revealed the absence of carry-over effects under the conditions selected.

Application to Real Samples

We tested the performance of the method on water samples from the Ebre river. First, a river water sample

was analysed. None of the peaks eluted at the same retention time as the analytes studied, so this sample was used as a blank. Figure 3 shows the chromatograms obtained from Ebre river water and from the same sample spiked with each analyte at $1 \mu\text{g l}^{-1}$.

Table 2. Recoveries obtained by preconcentrating different volumes of standard solutions containing the same amount ($0.1 \mu\text{g}$) of the compounds. NaCl ($0.5 \mu\text{g l}^{-1}$) was added to the samples and the pH was adjusted to 2.8 ($n=3$).

Volume (ml)	Recovery (%)			
	BA	4- <i>t</i> -BP	4- <i>t</i> -OP	NP
10	100	90	60	41
20	97	86	57	39
50	99	89	61	41
100	104	89	60	40
200	83	67	44	31

When we analysed river water spiked at different levels with all the analytes studied, linearity was good. For bisphenol A it was between 0.06 and $1 \mu\text{g l}^{-1}$ and for the other compounds between 0.3 and $5 \mu\text{g l}^{-1}$. The results obtained for Ebre river water are given in Table 3. The limits of detection, calculated as the response for which the signal-to-noise ratio was 3, were between 0.01 and $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$. The repeatability and reproducibility between days were also checked by analysis of three samples of river water spiked with $0.08 \mu\text{g l}^{-1}$ bisphenol A and $0.3 \mu\text{g l}^{-1}$ of the other compounds. The results, expressed as relative standard deviation (RSD), varied between 3 and 12% for repeatability and between 6 and 15% for reproducibility.

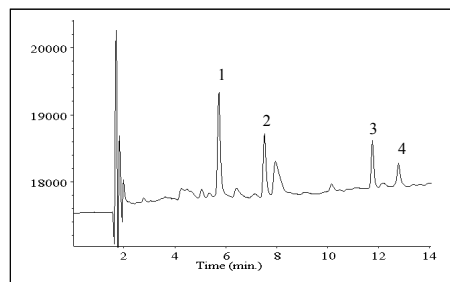


Figure 2. Chromatogram obtained from SPE-HPLC-UV analysis of 100 ml Milli-Q water spiked with $1 \mu\text{g l}^{-1}$ of the compounds studied. Peaks: 1=bisphenol A, 2=4-*tert*-butylphenol, 3=4-*tert*-octylphenol, 4=nonylphenol.

We checked whether the method could be applied to different matrixes by analysing samples of sea water, drinking water, tap water and waste water from treatment plants. Recoveries for these samples were similar to those obtained with river water samples.

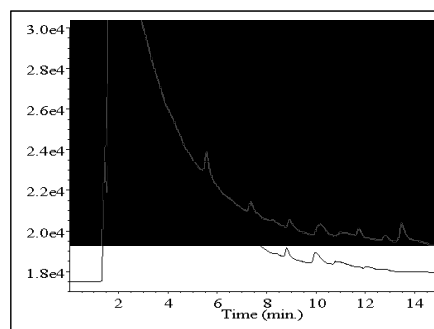


Figure 3. Chromatograms obtained from SPE-HPLC-UV analysis of: (a) 100 ml river water, (b) 100 ml river water spiked with $1 \mu\text{g l}^{-1}$ of the compounds studied. (Peak numbering as in Figure 2).

Table 3. Results from SPE-HPLC-UV analysis of river-water samples.

Compounds	Linear range ($\mu\text{g l}^{-1}$)	r^2	LOD ($\mu\text{g l}^{-1}$)	RSD (%) ($n=3$)	RSD (%) ($n=3$)
BP	0.06-1	0.9960	0.01	3	6
4- <i>t</i> -BP	0.3-5	0.9998	0.1	8	15
4- <i>t</i> -OP	0.3-5	0.9984	0.1	12	13
NP	0.3-5	0.9990	0.1	8	11

Analysis of samples of drinking water in plastic bottles revealed the presence of compounds eluting at the same retention times as bisphenol A and nonylphenol, but they could not be

quantified because they were below the limit of quantification. The sample of effluent from the outlet of the waste water treatment plant contained $3 \mu\text{g l}^{-1}$ bisphenol A. Figure 4 shows a chromatogram obtained from on-line SPE-HPLC-UV of 100 ml of this sample.

Although the presence of these compounds can be confirmed by other techniques (for example mass spectrometry), the method developed involves simple instrumentation and is very useful for monitoring low $\mu\text{g l}^{-1}$ levels.

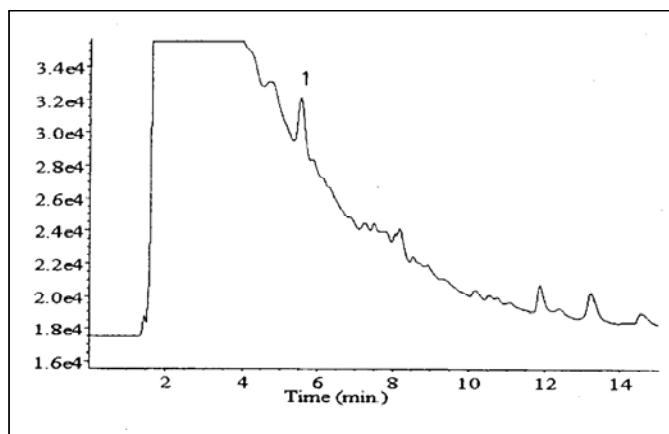


Figure 4. Chromatogram obtained from SPE-HPLC-UV analysis of a 100 ml sample from a waste-water treatment plant. The sample contained approximately $3 \mu\text{g l}^{-1}$ bisphenol A (Peak 1).

CONCLUSIONS

An on-line SPE-HPLC-UV method has been developed for determination of a group of estrogenic phenolic compounds in water samples of different origin. The method enables

rapid routine analysis, because one sample can be preconcentrated while another is being chromatographically separated.

The conditions affecting the SPE process were optimised and NaCl (0.5

g l⁻¹) and acetic acid were added to the samples before preconcentration to adjust the ionic strength and pH (2.8±0.1). In this way, recoveries of the analytes were enhanced.

The method was used to analyse river water, sea water, tap water, drinking water and waste water from a treatment plant; by concentration of 100 ml samples all the analytes were quantified at low µg l⁻¹ levels.

Bisphenol A was present in one sample from the waste-water-treatment plant at 3 µg l⁻¹, and both bisphenol A and nonylphenol were detected in commercial mineral water samples.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported financially by CICYT (AMB99-0875).

REFERENCES

- [1] T.Colborn, D. Dumanoski, J.P.Myers, *Our Stolen Future*, Dutton, NY. 1996.
- [2] T. Tanaka, K. Yamada, T. Tonosaki, T. Konishi, H. Goto, M. Taniguchi, *Water Sci. Technol.* 42 (2000) 89.
- [3] M.J. Hemmer, B.L. Hemmer, C.J. Bowman, K.J. Kroll, L.C. Folmar, D. Marcovich, M.D. Hogle, N.D. Denslow, *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (2001) 336.
- [4] T. Christiansen, B. Korsgaard, A. Jespersen, *J. Exp. Biol.* 201 (1998) 179.
- [5] W. Körner, D. Bolz, W. Sübmuth, G. Hiller, W. Schuller, V.H. HanfHagenmaier, *Chemosphere* 40 (2000) 1131.
- [6] H.B. Lee, *Water Qual. Res. J. Can.* 34 (1999) 3.
- [7] M. Petrovic, D. Barceló, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4560.
- [8] M. Castillo, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.* 16 (1997) 574.
- [9] J.A. Tarbin, M. Sharman, *Anal. Commun.* 36 (1999) 105.
- [10] D. Puig, D. Barceló, T. Silgoner, M. Grasserbauer, *J. Mass Spectrom.* 31 (1996) 1297.
- [11] R. Wissiack, E. Rosenberg, M. Grasserbauer, *J. Chromatogr. A* 896 (2000) 159.
- [12] K. Inoue, K.Y. Kato, Y. Yoshimura, T. Makino, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. B* 749 (2000) 17.
- [13] M.I.H. Helaleh, Y. Takabayashi, S. Fujii, T. Korenaga, *Anal. Chim. Acta* 428 (2001) 227.
- [14] J.L. Vilchez, A. Zafra, A. González-Casado, E. Hontoria, M del Olmo, *Anal. Chim. Acta* 431 (2001) 31.
- [15] W.H. Ding, C.Y. Wu, *J. Chin. Chem. Soc.-Taip* 47 (2000) 1155.
- [16] W.H. Ding, J.C.H. Fann, *J. Chromatogr. A* 866 (2000) 79.
- [17] D. Bolz, W. Körner, H. Hagenmaier, *Chemosphere* 40 (2000) 929.
- [18] Y. Takao, H.C. Lee, Y. Ishibashi, S. Kohra, N. Tominaga, K. Arizono, *J. Health Sci.* 45 (1999) 39.
- [19] H.G.J. Mol, S. Sunarto, O.M. Steijger, *J. Chromatogr. A* 879 (2000) 97.
- [20] M.L. Bao, K. Barbieri, D. Burrini, O. Griffini, F. Pantani, *Annali. di Chimica* 86 (1996) 343.

**II.5. EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA I CROMATOGRÀFIA
DE LÍQUIDS D'ALTA RESOLUCIÓ-ELECTROESPRAI-
ESPECTROMETRIA DE MASSES PER DETERMINAR
ALTERADORS ENDOCRINS EN MOSTRES AQUOSES**

En els últims anys, el desenvolupament de mètodes que acoblen la MS a la HPLC ha sofert un creixement important per la determinació i identificació de compostos més polars o amb característiques iòniques. Això es deu a la introducció de les noves interfases que porten a terme la ionització a pressió atmosfèrica i fan més senzill aquest acoblament que les interfases que hi havia fins al moment [1].

Degut al potencial que presenta la MS per portar a terme anàlisis quantitatives i qualitatives es va creure convenient ampliar el treball anterior aplicant aquesta tècnica a la HPLC. El nombre d'analits estudiats també es va ampliar afegint algunes hormones naturals i sintètiques i alguns plaguicides com el diuron i el pentaclorofenol, considerats també alteradors endocrins.

En la majoria d'aplicacions en què s'utilitza la ionització a pressió atmosfèrica es poden distingir bàsicament dos tipus d'ionitzacions: l'APCI i la ESI. En l'APCI el solvent que s'introdueix es calenta i es nebulitza amb nitrogen gas, per generar posteriorment els ions amb una descàrrega elèctrica. En canvi en la ESI l'evaporació del solvent i la formació d'ions es porta a terme simultàniament a través d'un gas de nebulització sense portar a terme cap escalfament. Per això, principalment la interfase ESI és efectiva per a la ionització de compostos de polaritat entre mitjana i alta.

Per la determinació d'hormones naturals i sintètiques i alquilfenols s'ha utilitzat tant la interfase d'APCI com la d'ESI, tot i que aquesta última ha estat la més àmpliament utilitzada degut a la sensibilitat que té comparada amb l'APCI [2,3]. Principalment la ionització d'aquests compostos es porta a terme utilitzant la ESI en mode negatiu [4,5], tot i que en algun estudis recents s'ha comprovat que l'APCI en mode positiu pot donar sensibilitats comparables en molts casos a la utilització de la ESI en mode negatiu [6].

Segons el treball realitzat per Thurman et al. [7] en què compara les interfases APCI i ESI per 75 plaguicides, els determinats en aquest treball

tenien sensibilitats acceptables utilitzant ambdues interfases o, com en el cas dels plaguicides fenòlics, les sensibilitats eren millors quan s'utilitzava la interfase ESI.

Així, en aquest treball per tal d'acoblar la HPLC a la MS es va utilitzar la interfase ESI, ja que segons la bibliografia la majoria d'EDs estudiats presentaven millor sensibilitat amb aquesta interfase. Per tal de poder determinar-los en mostres aquoses a nivell traça es va optar per la utilització de la SPE ja que és una tècnica de preconcentració àmpliament usada per aquests compostos.

En primer lloc es va comprovar quin mode d'ionització, positiu o negatiu, era el més adequat pels EDs estudiats, resultant ser el més sensible el negatiu. Tot seguit es va portar a terme l'optimització dels paràmetres de la interfase ESI que influeixen en la ionització dels analits. Tot i l'optimització del voltatge d'ionització, per la majoria d'aquests EDs s'obtenia molt poca fragmentació, amb el que només es va seleccionar un ió per l'adquisició de dades en el mode SIM. Degut a aquesta baixa fragmentació, l'espectre en el mode *full-scan* proporcionava molt poca informació estructural, però tot i així es va utilitzar per evitar falsos positius.

Per portar a terme la preconcentració de la mostra en aquest cas es va escollir la SPE *off-line*. Es va utilitzar un sorbent polimèric altament entrecreuat per la seva eficàcia amb compostos de característiques similars [8] i per prevenir problemes d'adsorció en el sistema, s'afegia un 5% d'acetonitril a les mostres abans de la seva preconcentració. El pretractament de la mostra, el volum de mostra i del solvent d'elució a utilitzar es van optimitzar per mostres aquoses amb diferents matrius, com són aigües de riu, mar i d'entrada i sortida de depuradores. Preconcentrant 500 ml de mostra es van obtenir recuperacions quantitatives en totes les matrius, excepte per les aigües d'entrada a depuradores en què es van haver de preconcentrar 100 ml.

Finalment el mètode es va validar per aquest dos tipus de matrius i va permetre quantificar els analits en el mode d'adquisició de dades SIM a concentracions de ng l^{-1} , preconcentrant 500 ml d'aigua de mar, riu i sortida de la depuradora i 100 ml d'aigua d'entrada a la depuradora. Alguns EDs, com són el 4-*t*-BP, 4-*t*-OP i PCP es van determinar en algunes mostres aquoses a nivells entre 0.06 i 1.30 $\mu\text{g l}^{-1}$.

Tot i les possibilitats de la LC-MS per a la determinació d'aquests EDS amb característiques més polars en mostres mediambientals, la seva utilització com a tècnica per a la identificació de contaminants i per portar a terme escombrats és relativament baixa. Per això, recentment s'han desenvolupat mètodes que utilitzen la MS en tàndem per la determinació d'aquests contaminants en mostres aquoses mediambientals [2], tot i que encara no són prou assequibles per la seva utilització en laboratoris de rutina.

Seguidament, s'adjunta una còpia del treball publicat en la revista *Chromatographia* 59 (2004) 419, que inclou els resultats obtinguts en aquest estudi.

Bibliografia

- [1] C. Zwiener, F.H. Frimmel, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 851.
- [2] M.J. López de Alda, S. Díaz-Cruz, M. Petrovic, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 503.
- [3] C. Zwiener, F.H. Frimmel, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 862.
- [4] M.J. López de Alda, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 391.
- [5] T. Benijts, R. Dams, W. Günther, W. Lambert, A. De Leenheer, *Rapid Commun. Mass Sp.* 16 (2002) 1358.
- [6] A. Laganà, A. Bacaloni, G. Fago, A. Marino, *Rapid Commun. Mass Sp.* 14 (2000) 401.
- [7] E.M. Thurman, I. Ferrer, D. Barceló, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5441.

- [8] K.A. Grong, S.V. Vejup, B.B. Mogensen, B. Halling-Sorensen, J. Chromatogr. A 957 (2002) 45.

**SOLID-PHASE EXTRACTION/HIGH-PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY-ELECTROSPRAY MASS SPECTROMETRY TO
DETERMINE ENDOCRINE DISRUPTORS IN WATER SAMPLES**

L. Brossa, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé

Departament de Química Analítica i Química Orgànica. Universitat Rovira i Virgili.
Imperial Tàrraco 1, 43005 TARRAGONA, Spain

Abstract

A method for determining a group of endocrine-disrupting compounds in water samples was developed. This method was based on high-performance liquid chromatography-(electrospray) mass spectrometry (HPLC-(ESI)MS), working in negative ionisation (NI) mode. Solid-phase extraction (SPE) with 200 mg Lichrolut EN was used to preconcentrate the water samples. The performance of the method was tested with several environmental water samples such as river, marine and influent and effluent water from a sewage treatment plant (STP). The limits of detection (LODs) of the method were between 0.001 and 0.3 $\mu\text{g l}^{-1}$ under selective-ion monitoring (SIM) acquisition mode for 500 ml of river, marine and STP effluent water samples and between 0.01 and 3 $\mu\text{g l}^{-1}$ for 100 ml of STP influent water. We determined some EDs, such as diuron, bisphenol A (BPA), estrone, 4-*tert*-butylphenol (4-*t*-BP), 4-*tert*-octylphenol (4-*t*-OP) and pentachlorophenol (PCP), in several water samples at levels of $\mu\text{g l}^{-1}$

Keywords: Column liquid chromatography; Electrospray-mass spectrometry detection; Solid-phase extraction; Endocrine disruptors in wastewater; Water samples.

INTRODUCTION

Many man-made chemicals and natural substances, called endocrine disruptors (EDs), can interfere with the proper functioning of estrogen, androgen and thyroid hormones in humans and animals. Exposure to EDs can cause sterility or decreased fertility, impaired development, birth defects of the reproductive tract and metabolic

disorders [1-3]. EDs display a wide range of structural diversity. For example, some alkylphenols, phthalates, steroid sex hormones and pesticides are considered as priority EDs in the European Union and the United States [4,5].

It is well known that there is a certain estrogenic activity in rivers and seas and in the effluents and influents of

municipal wastewater treatment plants due to industrial activity and the use of pharmaceuticals [2,6]. Highly sensitive and specific analytical methods must be developed to determine and monitor EDs in environmental samples.

The analytical techniques that have been used to determine EDs are chromatographic techniques, GC [7-13] and LC [7,13-20], depending on the chemical structure of the ED. In some cases, immunochemical techniques such as recombinant yeast assay (RYA) have been used [21].

Nowadays, in GC and LC, the detection technique that is generally used for quantitative and qualitative analysis is MS [22]. Coupling GC-MS has been widely used, although a derivatization step is needed to determine some EDs such as alkylphenols and estrogens [7-12]. Robust LC-MS interfaces have been developed and these techniques have been used by several authors [7,13-20]. Principally, steroid sex hormones (estrogens) and alkylphenols have been determined using LC-MS with electrospray ionisation (ESI) in negative mode (NI) [7,13,14,16-20]. In some cases, the atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) in negative mode has been used to determine alkylphenols [15].

To determine these compounds at low levels, a preconcentration step is needed and the techniques used are generally solid-phase extraction (SPE) [7,14,15] or solid-phase microextraction (SPME) [23,24].

In this paper, we developed a method using HPLC-(ESI)MS in negative mode to determine a group of EDs in water samples preceded by SPE and applied it to several water samples. The groups of EDs studied were alkylphenols, estrogens, an antifouling (diuron), 2,4-dichlorophenol and bisphenol A.

EXPERIMENTAL

Reagents and standards

17- α -estradiol, 17- β -estradiol, 17- α -ethinylestradiol, estrone and diethylstilbestrol (DES), were obtained from Sigma (St. Louis NO, USA). 4-*t*-BP, 4-*t*-OP, 4-nonylphenol (4-NP), 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) and bisphenol A were obtained from Aldrich (Steinheim, Germany). Diuron was obtained from Riedel-de Haën (Seelze-Hannover, Germany) and PCP was obtained from Jansen Chemie (Geel, Belgium). The purities of these reagents were over 97%. Standard solutions of each compound at a concentration of 1000 mg l⁻¹ were prepared in acetonitrile and stored at 4°C. All the working solutions were prepared by diluting these solutions.

The HPLC-grade acetonitrile for the mobile phase and extraction steps was obtained from SDS (Peypin, France) and water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). The pH of the mobile phase and samples was adjusted with acetic acid and sodium hydroxide, both from Prolabo (Fontenay, France).

Instrumentation

We used a HP1100 series LC-MSD system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The chromatographic column was a 25x0.40 cm LichroCART 250-4 Lichrospher 100 RP-18 with a particle size of 5 µm (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

For the SPE process, we used a solid-phase extraction manifold (Teknokroma, Barcelona, Spain) connected to a vacuum pump (Gast Manufacturing Company, Buckinghamshire, United Kingdom). The water samples were extracted using 200-mg LiChrolut EN cartridges (Merck, Darmstadt, Germany).

Chromatographic separation

The binary mobile phase consisted of Milli-Q water containing 0.5%(v/v) acetic acid as solvent A, and acetonitrile as solvent B. Separation was performed using a gradient profile. The operating conditions of the HPLC were: 30% B at 0 min, 52% B at 18 min, 80% B at 20.3 min, 80% B at 26.5 min, 90% B at 27.5 min, 90% B at 30 min, 100% B at 31 min and 100% B at 33 min. At the end of the chromatogram, the mobile phase returned to its initial composition in 2 min and the column was equilibrated for 10 min. Column flow rate was 0.8 ml min⁻¹ and chromatographic separation time was 33 min.

ESI-MS conditions

Electrospray ionisation was performed in negative mode. The operational

parameters were set as follows: the nebulizer gas pressure was 40 p.s.i.; the drying gas was nitrogen at 12 l min⁻¹ at 350 °C; the capillary voltage was 4500 V and the fragmentor voltage was programmed as shown in Table 1.

Table 1. Ion and fragmentor for each compound in its optimum ESI parameters.

Compounds	<i>Ion selected</i> *	<i>Fragmentor</i>
BPA	227	125
Diuron	231	75
17-β-estradiol	271	125
2,4-DCP	161	125
17-α-estradiol	271	125
17-α-ethinylestradiol	295	125
Estrone	269	125
4- <i>t</i> -BP	149	75
DES	267	125
PCP	265	125
4- <i>t</i> -OP	205	75
4-NP	219	75

*all the ions are the base peak

Chromatograms were recorded under full-scan acquisition mode (m/z 60-300) and under SIM acquisition mode. In this case, the base peak was selected for each compound. Table 1 shows the ion selected for each compound for the SIM acquisition.

Extraction

The sorbent was conditioned by flushing with 5 ml of acetonitrile and 5 ml of Milli-Q water (1% acetic acid). The pH of the sample was adjusted to 5 ± 0.1 with acetic acid and 5%

acetonitrile was added. The sample volume was 500 ml for Milli-Q, river, marine and effluent treatment plant water, and 100 ml for influent treatment plant water. Elution of the retained compounds was performed with 5 ml of acetonitrile. This volume was evaporated until dryness with N₂ and redissolved with 1 ml of a mixture of Milli-Q water and acetonitrile (80:20). All solvents except the elution solvent (5 ml min⁻¹) were percolated through the cartridge at a flow rate of 10 ml min⁻¹.

Sampling

Several types of water, such as river water, marine water and STP influent and effluent water samples collected in the area of Tarragona (Catalonia, Spain) were analysed.

The samples were collected in precleaned 2.5 L amber glass bottles and filtered through a 0.45 µm filter (MSI, Westboro, MA, USA). These were kept in the dark at 4°C until the time of analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

ESI-MS optimisation

Most of the compounds studied, such as steroid estrogens and alkylphenols, have been detected in negative ionisation mode with electrospray interface in previous studies [16,20,22]. We checked positive and negative ionisation modes because we had other compounds with different chemical structures (diuron, PCP,...). In

the end we selected the negative ionisation mode because the response for the positive mode was low or null for nearly all the compounds. We then optimised the operational parameters of the ESI interface and MS detection by flow injection analysis (FIA) of several solutions containing the individual compounds at 5 mg l⁻¹. These parameters and their studied ranges were: drying-gas flow (1-13 l min⁻¹) at 250 and 350°C, nebulizer pressure (40-60 p.s.i.), capillary voltage (2000-4500 v), gain (3-15) and fragmentor voltage (25-125 v). The optimum conditions (shown in experimental section) were chosen by taking into account the results for all the compounds.

Fragmentor voltage optimum was tested for these EDs. Most of the EDs studied have a low fragmentation that was not increased by higher voltages. We therefore only could select one ion for each compound in the SIM acquisition mode chromatogram. This ion was the base peak for all compounds.

Calibration models were constructed using SIM acquisition mode. The linearity of the response was checked in the 0.005 to 5 mg l⁻¹ range by injecting 50 µl of standards in Milli-Q water/acetonitrile (80:20). Linearity was good in several ranges with correlation coefficients (r²) higher than 0.991 and the quantification limit were between 0.005 and 0.5 mg l⁻¹. To calculate the limits of detection (LODs), we took into account a signal/noise ratio of 3. LODs were between 0.001 and 0.15 mg l⁻¹ for all compounds.

Due to the low fragmentation, full-scan spectrum provided little structural information, but we used this acquisition mode to avoid false positives.

Extraction optimisation

We used an off-line SPE to extract the compounds from the water samples. A highly crosslinked polymer (Lichrolut EN) was chosen because it retains compounds with similar characteristics to the EDs studied [14,15,17], although all the compounds tested had not been studied together previously. To prevent possible adsorption problems, we added 5% acetonitrile to the samples. We chose some conditions from prior studies [14,15] and optimized the sample volume, elution solvent volume and sample pre-treatment.

We optimised the sample pre-treatment parameters by preconcentrating 10 ml of a standard in Milli-Q water at 0.25 mg l⁻¹ and eluting with 5 ml of acetonitrile. Sample pH was tested at 3, 5 and 9 by adding acetic acid or sodium hydroxide (1 N). When the pH was 3 or 5, the recoveries were similar, and these recoveries were better than when the pH was 9. We then chose a pH of 5. We studied NaCl addition by adding some concentrations of NaCl (0-10 g l⁻¹), but the recoveries were similar in all conditions so we did not add NaCl to the sample.

We determined the sample volume to be concentrated by testing several

volumes (10 to 1000 ml) of Milli-Q water samples. These samples contained 5% acetonitrile and were spiked at different concentrations of the analyte so that the concentration of each compound in the resulting enriched solution after preconcentration was 0.5 mg l⁻¹. We chose a sample volume of 500 ml because this was enough to achieve the concentration levels required for analysing these compounds and because of timesaving considerations.

Recoveries for 500 ml of spiked river water, marine water or wastewater samples were similar to those when Milli-Q water samples were preconcentrated for all matrixes except those of STP influent water. For this sample, the recoveries were acceptable for all the compounds at a sample volume of 100 ml. Table 2 shows the recoveries obtained in river water and in influent STP water.

Table 2. Recoveries obtained by preconcentrating 500 ml of river water at 1 µg l⁻¹ and 100 ml of influent STP water at 5 µg l⁻¹.

Compounds	Recoveries (%)	
	500 ml	100 ml
	Ebre River	Influent
BPA	93	40
Diuron	104	61
17-β-estradiol	83	50
2,4-DCP	58	48
17-α-estradiol	90	51
17-α-ethinylestradiol	87	51
Estrone	91	42
4- <i>t</i> -BP	88	69
DES	99	56
PCP	100	74
4- <i>t</i> -OP	93	80
4-NP	82	57

Method performance

Table 3 shows the linear ranges and limits of detection for a signal-to-noise ratio of 3 when 500 ml of river water sample and 100 ml of STP water influent sample at several concentrations were preconcentrated. For both matrixes, linearity was good and correlation coefficients (R^2) were above 0.992. Reproducibility between days was also evaluated by preconcentrating

three river water samples spiked at $0.2 \mu\text{g l}^{-1}$, except for 2,4-DCP (spiked at $1 \mu\text{g l}^{-1}$) and three STP influent water samples spiked at $5 \mu\text{g l}^{-1}$. The results, expressed as relative standard deviation (RSD), were between 4 and 21% and between 5 and 27%, respectively. Fig. 1 shows the chromatograms of a river water sample and a river water sample spiked at $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ in SIM acquisition mode.

Table 3. Linear ranges, limits of detection and relative standard deviations for river (500 ml) and influent STP water (100 ml).

Compounds	500 ml			100 ml		
	Linear Range	LODs	*RSD (%) $n=3$	Linear Range	LODs	*RSD (%) $n=3$
	($\mu\text{g l}^{-1}$)	($\mu\text{g l}^{-1}$)	($0.2 \mu\text{g l}^{-1}$)	($\mu\text{g l}^{-1}$)	($\mu\text{g l}^{-1}$)	($5 \mu\text{g l}^{-1}$)
BPA	0.01-2	0.002	8	0.1-20	0.02	9
Diuron	0.01-2	0.002	4	0.1-20	0.02	15
17- β -estradiol	0.1-1	0.03	8	1-10	0.4	16
2,4-DCP	1-10	0.3	5 (*)	10-100	3	20
17- α -estradiol	0.2-2	0.06	4	2-20	0.6	8
17- α -ethinylestradiol	0.1-10	0.03	7	1-100	0.3	8
Estrone	0.01-10	0.002	12	0.1-100	0.02	7
4- <i>t</i> -BP	0.1-6	0.03	5	1-60	0.4	15
DES	0.01-3	0.001	12	0.1-30	0.01	8
PCP	0.01-1	0.004	14	0.1-10	0.04	18
4- <i>t</i> -OP	0.02-6	0.008	3	0.2-60	0.08	5
4-NP	0.1-3	0.03	21	1-30	0.3	27

(*) at $1 \mu\text{g l}^{-1}$

*between days

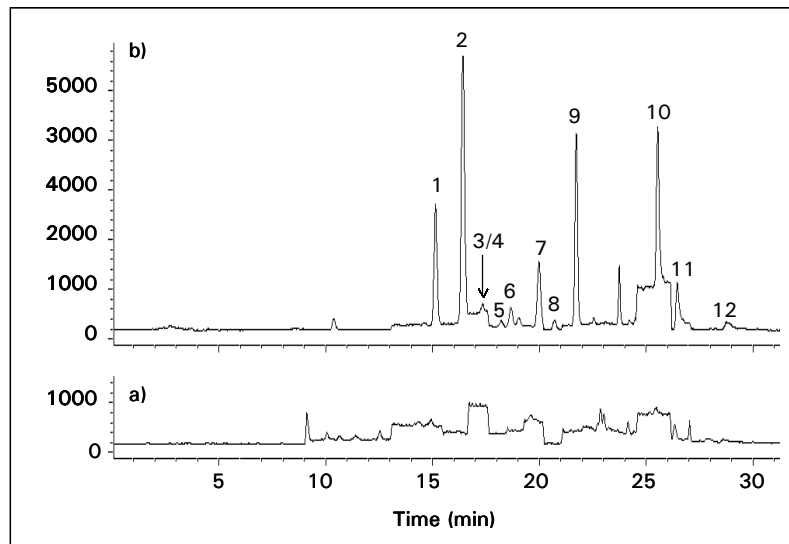


Figure 1. Chromatograms obtained by SPE/HPLC-(ESI)MS in SIM acquisition mode of: a) 500 ml river water sample, b) 500 ml river water sample spiked at $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ of each compound. Assignment peaks: 1=BPA; 2=Diuron; 3=17- α -estradiol; 4=2,4-DCP; 5=17- β -estradiol; 6=17- α -ethinylestradiol; 7=Estrone; 8=4-*t*-BP; 9=DES; 10=PCP; 11=4-*t*-OP; 12=4-NP.

Application to real samples

We checked the performance of this method with several matrices such as marine and effluent STP samples. We then analysed samples of river water, marine water and effluent and influent STP water.

Diuron was detected in river and marine water samples at levels between the limit of detection and limit of quantification, except in a marine water sample from the port of Tarragona, which was collected in July and had $0.06 \mu\text{g l}^{-1}$ of diuron. Diuron is a pesticide used as an antifouling agent in boat paints to prevent algae and other organisms from growing on the

surface of the hull. Antifouling compounds have been monitored in coastal water samples by Gimeno et al. [25], who found diuron at levels of between 0.10 and $0.33 \mu\text{g l}^{-1}$.

We analysed effluent and influent STP water samples. In an influent sample we found several peaks corresponding to the retention time of BPA, diuron, estrone and 4-*t*-BP. BPA, estrone and 4-*t*-BP were identified and quantified at 0.06 , 0.26 , $0.46 \mu\text{g l}^{-1}$, respectively. Diuron was at a level below the limit of quantification. In an effluent sample, we found four peaks at the same retention time of diuron, 4-*t*-BP, 4-*t*-OP and PCP. The four compounds were identified and quantified at $0.03 \mu\text{g l}^{-1}$,

0.30 $\mu\text{g l}^{-1}$, 1.30 $\mu\text{g l}^{-1}$ and 0.01 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectively. The 4-*t*-OP is usually found in effluent samples because it is a persistent metabolic product generated during wastewater treatment

from octylphenol ethoxylate (OPEO) used as industrial cleaning agent [19]. Fig. 2 shows the chromatogram in SIM acquisition mode corresponding to the effluent STP water sample.

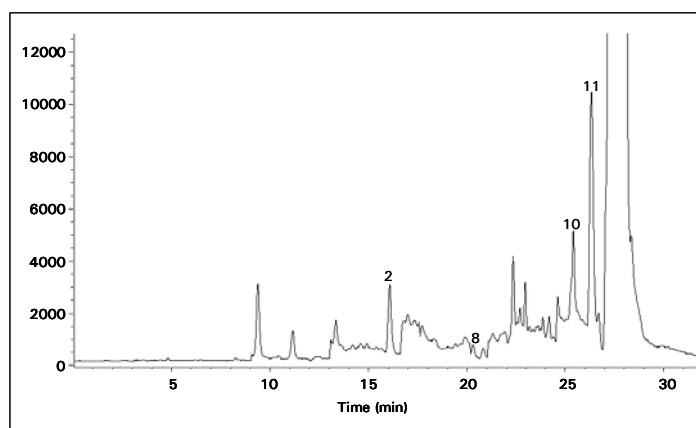


Figure 2. Chromatogram obtained by SPE/HPLC-(ESI)MS of 500 ml STP effluent water in SIM acquisition mode. For peak identification see Fig. 1.

CONCLUSIONS

We developed a SPE/HPLC-ESI-MS method and used it to determine a group of EDs in several water samples. This method quantified the analytes in SIM acquisition mode at ng l^{-1} levels by preconcentrating 500 ml of marine, river and STP effluent water samples and 100 ml of STP influent water sample. We identified the EDs using full-scan acquisition mode.

This method allows some EDs, such as diuron, BPA, estrone, 4-*t*-BP, 4-*t*-OP and PCP, to be determined in several

water samples at levels between 0.06 and 1.30 $\mu\text{g l}^{-1}$.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Ministerio de Ciencia y Tecnologia (projects AMB1999-0875 and PPQ2001-1805-CO3).

REFERENCES

- [1] S.L. Schantz, J.J. Widholm, Environ. Health Persp. 109 (2001) 1197.

- [2] H.E. Witters, C. Vangenechten, P. Berckmans, *Water Sci. Technol.* 43 (2001) 117.
- [3] A.L. Lister, G.J. Van der Kraak, *Water Qual. Res. J. Can.* 36 (2001) 175.
- [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] Report on Endocrine Disrupting Chemicals, Illinois EPA (February, 1997).
- [6] I.G. Lange, A. Daxenberger, B. Schiffer, H. Witters, D. Ibarreta, H.H.D. Meyer, *Anal. Chim. Acta* 473 (2002) 27.
- [7] R. Jeannot, H. Sabik, E. Sauvard, T. Dagnac, K. Dohrendorf, *J. Chromatogr. A* 974 (2002) 143.
- [8] S. Nakamura, T.H. Sian, S. Daishima, *J. Chromatogr. A* 919 (2001) 275.
- [9] X.Y. Xiao, D.V. McCalley, J. McEvoy, *J. Chromatogr. A* 923 (2001) 195.
- [10] H.G.J. Mol, S. Suanarto, O.M. Steijger, *J. Chromatogr. A* 879 (2000) 97.
- [11] K. Shimada, K. Mitamura, T. Higashi, *J. Chromatogr. A* 935 (2001) 141.
- [12] M.I.H. Helaleh, Y. Takabayashi, S. Fujii, T. Korenaga, *Anal. Chim. Acta* 428 (2001) 227.
- [13] M.J. López de Alda, D. Barceló, *Fresen. J. Anal. Chem.* 371 (2001) 437.
- [14] M.J. López de Alda, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 145.
- [15] K.A. Krogh, S.V. Vejrup, B.B. Mogensen, B. Halling-Sorensen, *J. Chromatogr. A* 957 (2002) 45.
- [16] P.L. Ferguson, C.R. Iden, A.E. McElroy, B.J. Brownawell, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3890.
- [17] M.J. López de Alda, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 391.
- [18] P.L. Ferguson, C.R. Iden, B.J. Brownawell, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 79.
- [19] M. Petrovic, A. Diaz, F. Ventura, D. Barceló, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5886.
- [20] M. Petrovic, D. Barceló, *J. AOAC Int.* 84 (2001) 1074.
- [21] N. Garcia-Reyero, E. Grau, M. Castillo, M.J. López de Alda, D. Barceló, B. Piña, *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (2001) 1152.
- [22] M. Petrovic, E. Eljarrat, M.J. López de Alda, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 974 (2002) 23.
- [23] E. González-Toledo, M.D. Prat, M.F. Alpendurada, *J. Chromatogr. A* 923 (2001) 45.
- [24] A. Díaz, F. Ventura, M.T. Galceran, *Anal. Chem.* 74 (2002) 3869.
- [25] R.A. Gimeno, C. Aguilar, R.M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A* 915 (2001) 139.

**II.6. ESTUDI DE LA PRESENCIA DE VINT-I-SIS ALTERADORS
ENDOCRINS EN MOSTRES AQUOSES MEDIAMBIENTALS**

Tal com s'ha comentat en la introducció, els compostos amb propietats alteradores endocrines s'utilitzen en una gran diversitat d'activitats, com són industrials, agràries, domèstiques,... Per això és important controlar la seva presència i distribució en el medi ambient, principalment les aigües mediambientals. Alguns EDs com són l'atrazina, la simazina, el diuron,... han estat monitoritzats en aigües procedents de diferents orígens, com són aigües de mar, de rius, residuals,... [1,2]. Els estrògens, alquilfenols i alquilfenols etoxilats han estat determinats principalment en aigües residuals, degut a la seva elevada utilització en la indústria i en productes d'ampli ús domèstic i alguns estudis també s'han portat a terme en aigües de riu o canals properes a aquestes plantes depuradores [3,4].

Aquestes monitoritzacions s'han portat a terme tant utilitzant la GC com la HPLC acoblades principalment a la MS i en alguns casos s'utilitzen aquests mètodes integrats amb mètodes biològics. Per exemple, Céspedes et al. [5] han utilitzat un procediment integrat basat en la LC-MS per la determinació individual de 27 EDs i l'assaig RYA (*recombinant yeast assay*) per determinar l'estrogeneïtat total en aigües de riu i els sediments corresponents.

En aquest estudi s'ha portat a terme una monitorització d'un grup de vint-i-sis EDs formats per plaguicides, dièsters d'ftalat i PAHs en aigües de riu, mar i un canal d'irrigació de la comarca del tarragonès, ja que fins al moment no hi havia estudis d'aquest tipus en aquesta zona. Per la determinació d'aquests EDs es va utilitzar el mètode prèviament desenvolupat basat en l'acoblament en línia de la SPE a la GC-MS a través d'una interfase *on-column*.

Les aigües de riu es van recollir en diferents punts del riu Ebre per tal de controlar els EDs que generalment procedeixen dels nuclis urbans, industrials i agrícoles, com són alguns plaguicides, els dièsters d'ftalat i els PAHs. També es va escollir com a punt de mostreig un canal d'irrigació del Delta de l'Ebre on predominen les plantacions d'arròs. Les aigües de mar es van

recollir en el Delta de l'Ebre i en aigües de la costa i el port de Salou, per tal de controlar la contaminació que podria provocar la intensa activitat de barques que hi ha en aquesta zona.

Els resultats d'aquesta monitorització mostren que en les aigües analitzades hi ha una important presència dels dièsters d'ftalat i adipat. Puntualment, s'han trobat alguns plaguicides a baixos nivells en les mostres aquoses recollides en zones on hi ha una certa activitat agrària, com en l'aigua de riu recollida en el seu pas per Tortosa o en les aigües procedents dels canals d'irrigació. Tot i que la seva presència puntual no demostra una distribució regular durant tots els mesos de l'any, els alts nivells que es troben en mostres puntuals indiquen que és important portar a terme un control per tal d'evitar la utilització o els abocaments incontrolats d'alguns contaminants.

Els estrògens i el bisfenol A s'han observat a nivells de $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ en mostres d'aigua del riu i del port industrial. Aquests nivells trobats són els que generalment s'observen en mostres d'aigües recollides prop de les plantes depuradores d'aigües residuals, el que indica el seu possible origen.

A continuació es presenten els resultats obtinguts en aquesta monitorització i que es publicaran al número 24 de la revista *Environmental Toxicology & Chemistry* que sortirà el 2005.

Bibliografia

- [1] J. Quintana, I. Martí, F. Ventura, J. Chromatogr. A (2001) 938.
- [2] D.A. Azevedo, S. Lacorte, P. Viana, D. Barceló, Chromatographia 53 (2001) 113.
- [3] M. Solé, M.J. López de Alda, M. Castillo, C. Porte, K. Ladegaard-Pedersen, D. Barceló, Environ. Sci. Technol. 34 (2000) 5076.
- [4] N. García-Reyero, E. Grau, M. Castillo, M.J. López de Alda, D. Barceló, B. Piña, Environ. Toxicol. Chem. 20 (2001) 1152.

- [5] R. Céspedes, M. Petrovic, D. Raldúa, U. Saura, B. Piña, S. Lacorte, P. Viana, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 697.

OCCURRENCE OF TWENTY-SIX ENDOCRINE-DISRUPTING COMPOUNDS IN ENVIRONMENTAL WATER SAMPLES FROM CATALONIA, SPAIN

L. Brossa, R.M. Marcé, F. Borrull, E. Pocurull

Departament de Química Analítica i Química Orgànica. Universitat Rovira i Virgili.

Imperial Tàrraco 1, 43005 TARRAGONA, Spain

Abstract

We monitored twenty-six compounds known or suspected to be endocrine disruptors in several environmental water samples from river, sea and irrigation canal. Because of the various chemical properties of the compounds monitored, analysis were carried out using two different methods. One method is based on solid-phase extraction on-line coupled to gas chromatography-mass spectrometry through an on-column interface. Another is based on high-performance liquid chromatography-(electrospray) mass spectrometry working in negative ionisation mode and using off-line SPE. The limits of detection for the two methods were at levels of low $\mu\text{g l}^{-1}$. Phthalates and bis-(2-ethylhexyl) adipate were found at levels between 0.05 and 13 $\mu\text{g l}^{-1}$ in all of the water samples analysed. Some pesticides, alkylphenols and estrogens were determined in a few samples at levels below 0.1 $\mu\text{g l}^{-1}$.

Keywords: Monitoring study, Endocrine disruptors, Environmental waters, Solid-phase extraction, High-performance liquid chromatography

INTRODUCTION

A large number of contaminants are known to have adverse effects on the living organism because they interfere with the endocrine system [1-3]. These contaminants, which are called endocrine disruptors (EDs), include a wide range of pollutants such as pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons, phthalate plasticisers, alkylphenols, and natural and synthetic hormones [4-6]. The first European Union (EU) strategic document [7] showed the need to develop and

validate appropriate environmental tools for monitoring the EDs. These contaminants can be present in various environmental samples, but they are mainly present in water samples because they have many industrial, agricultural and household uses. They can be found in environmental waters due to the direct discharge of industrial and domestic wastewaters, the discharge of sewage treatment plant effluents and agricultural drains to streams and rivers.

Some EDs, such as atrazine, simazine,

diuron, lindane, α -endosulfan, which are widely used as pesticides, have been monitored in river and sewage treatment plant waters [8-11]. Atrazine was found at levels below $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ in all the water samples from the Ter and Llobregat rivers (Catalonia, Spain) entering the water treatment plants collected during the year 2000 [8]. Atrazine and diuron were found at levels between 0.01 to $2.61 \mu\text{g l}^{-1}$ and 0.01 to $1.24 \mu\text{g l}^{-1}$, respectively, in several river water samples from Portugal, where some pesticides and phenols were monitored for six months [9,10]. Diuron was also monitored for five months in seawater samples from the coast of Tarragona (Catalonia, Spain) [11]. It was found in all samples at levels between 0.03 to $0.42 \mu\text{g l}^{-1}$. Some phthalates, known or suspected to be EDs, have been monitored in water samples [12-14]. For example, T. Suzuki et al. [12], monitored phthalic acid monoesters in river water sample because these compounds are metabolites of phthalic acid diesters and are widely used as plasticizers, so they can be found in many water samples.

The occurrence of natural and synthetic hormones, alkylphenols, and alkylphenol ethoxylates has been studied mainly in wastewater samples [15-17]. Influent and effluent sewage treatment plant (STP) water samples were analyzed to determine the efficacy of the STPs and to evaluate the biological effects on freshwater fish of compounds discharged to the rivers [16]. To correlate levels of EDs in water samples with the estrogenicity in wildlife, some authors have

monitored these EDs in water samples and fish for chemical and biological determinations [15]. A certain correlation was found between nonylphenol in water and vitellogenin induction in fish.

The methods used to determine these pollutants in water samples are mainly based on solid-phase extraction (SPE) in combination with gas chromatography (GC) [8,10,12,18,19] and high-performance liquid chromatography (HPLC) [9-11,15,20,21], and mass spectrometry (MS) detection in both separation techniques. In some cases biological techniques have also been used to control the estrogenicity levels of the compounds [15,16].

In this paper we have monitored a group of twenty-six EDs containing some pesticides, phthalates, alkylphenols, and natural and synthetic hormones in river, sea, and irrigation canal water samples. We used SPE-GC-MS or SPE/HPLC-(ESI)MS, depending on the chemical properties of the EDs determined. The environmental water samples were collected every month for one year in the area of Tarragona (Catalonia, Spain), where few monitoring studies for EDs have been carried out.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

We collected fresh water samples from two sites along the Ebre River (in the Ebre Delta, and Tortosa) and an

irrigation canal of the Delta and seawater samples from the marina and coast of Salou and the industrial port

of Tarragona. These sites are shown in Figure 1.

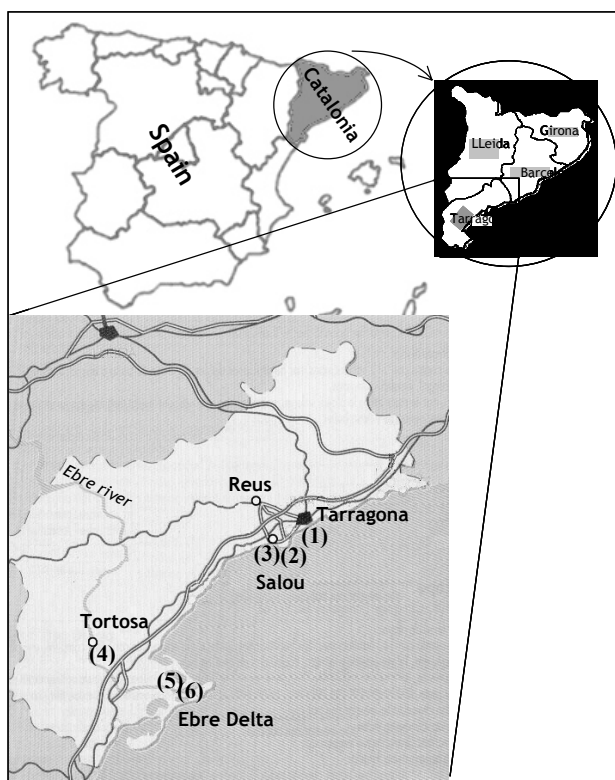


Figure 1. Map of the sites where water samples were collected (Spain). (1) Industrial port of Tarragona; (2) coast of Salou; (3) marina of Salou; (4) River Ebre in Tortosa; (5) Irrigation canal of agricultural area in Ebre Delta; (6) River Ebre Delta.

River water collected along the banks of the Ebre River was analysed to control the EDs of urban, industrial and agricultural origins and uses (e.g., nonionic detergent metabolites, some pesticides, phthalates, and some polycyclic aromatic hydrocarbons). This water is treated in a water treatment plant and distributed mainly

along the Tarragona region as tap water. An irrigation canal water sample in the Ebre Delta, where rice is grown as the main agricultural crop, was selected to determine the EDs used in agriculture (e.g. atrazine, aldrin, and α -endosulfan). The Ebre Delta and the sites where we collected sea water samples (the marina and coast of Salou

and the industrial port of Tarragona) were selected because of the sailing activities there, which cause contamination by EDs such as diuron, an antifouling agent used in the boat paints.

These samples were collected every month between September 2001 and August 2002 in 2.5 l precleaned amber glass bottles and filtered through a 0.45 μm filter (MSI, Westboro, MA, USA). They were divided in two fractions. One, for the on-line method, was kept in the dark at 4°C until analysis and was analyzed as soon as possible by SPE-GC-MS. The other one, for the off-line method, was immediately preconcentrated and the dried cartridge was stored in the freezer before their elution and analysis by SPE/HPLC-MS (to prevent the degradation of steroids).

All the glass material (e.g., vials, bottles, and volumetric material) was carefully cleaned with methanol to avoid problems due to contamination.

Chemicals

Group A: Atrazine, lindane (g-hexachlorocyclohexane), vinclozolin, aldrin, α -endosulfan, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDT, dieldrin, di-n-butyl phthalate (DnBP), benzylbutyl phthalate (BBP), bis-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), and bis-(2-ethylhexyl) adipate (adipate) were purchased from Riedel-de H  en (Seelze-Hannover, Germany) with a purity of over 98%. Benzo[a]pyrene was supplied by Aldrich (Steinheim, Germany) with a purity of 97% and

hexachlorobenzene (HCB) was supplied by Fluka (Buchs, Switzerland) with a purity of over 99%.

Group B: 17 α -estradiol, 17 β -estradiol, 17 α -ethinylestradiol, estrone, and diethylstilbestrol (DES), were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). The 4-t-butylphenol (4-t-BP), 4-t-octylphenol (4-t-OP), 4-nonylphenol (4-NP), 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP), and bisphenol A (BPA) were obtained from Aldrich. Diuron was obtained from Riedel-de H  en, and pentachlorophenol (PCP) was obtained from Jansen Chemie (Geel, Belgium). The purities of these reagents were over 97%.

A standard solution of 1000 mg l⁻¹ of each ED was prepared in ethyl acetate (group A) or in acetonitrile (group B). These solutions were stored at 4°C. All the working solutions were prepared by diluting these solutions. The linear range for each compound is shown in Table 1.

Ethyl acetate was supplied by Merk (Darmstadt, Germany). The HPLC-grade acetonitrile and methanol was obtained from SDS (Peypin, France) and water was obtained from a Milli-Q[®] water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). The pH of the mobile phase and samples was adjusted with acetic acid from Prolabo (Fontenay, France). Water was obtained from a Milli-Q water purification system. Helium (carrier gas) and nitrogen (drying gas) were supplied by Carbueros Metálicos (Tarragona, Spain) with a quality of 99.995%.

Table 1. Analytical data obtained by on-line solid-phase extraction (SPE)-gas chromatography (GC)-mass spectrometry (MS) of 15 ml of river water [22] and off-line SPE/high-performance liquid chromatography-(electrospray ionization)MS of 500 ml of river water [23]. Limits of detection (LODs) were estimated taking into account a signal/noise ratio of 3. The reproducibility between days was checked by analysing three working solutions and was expressed as relative standard deviation (RSD).

On-line SPE-GC-MS				SPE/HPLC-(ESI)MS			
Compounds	Linear Range ($\mu\text{g l}^{-1}$)	LODs ($\mu\text{g l}^{-1}$)	RSD (%) $n=3$ ($0.1 \mu\text{g l}^{-1}$)	Compounds	Linear Range ($\mu\text{g l}^{-1}$)	LODs ($\mu\text{g l}^{-1}$)	RSD (%) $n=3$ ($0.2 \mu\text{g l}^{-1}$)
HCB	0.006-0.6	0.001	24	BPA	0.01-2	0.002	8
Atrazine	0.05-5	0.02	27	Diuron	0.01-2	0.002	4
Lindane	0.06-6	0.01	28	17 β -estradiol	0.1-1	0.03	8
Vinclozolin	0.05-5	0.01	14	2,4-DCP	1-10	0.3	5 (*)
DnBP	0.007-3	0.0002(*)	22	17 α -estradiol	0.2-2	0.06	4
Aldrin	0.005-0.5	0.002	26	17 α -ethinylestradiol	0.1-10	0.03	7
α -Endosulfan	0.06-6	0.02	20	Estrone	0.01-10	0.002	12
<i>pp'</i> -DDE	0.006-0.6	0.002	24	4-t-BP	0.1-6	0.03	5
Dieldrin	0.005-0.5	0.002	8	DES	0.01-3	0.001	12
BBP	0.05-5	0.007(*)	15	PCP	0.01-1	0.004	14
Adipate	0.05-5	0.007(*)	18	4-t-OP	0.02-6	0.008	3
<i>pp'</i> -DDT	0.05-0.6	0.008	32	4-NP	0.1-3	0.03	21
DEHP	0.05-3	0.0001(*)	20				
Benzo[a]pyrene	0.005-0.5	0.002	20				

(*)LODs estimated by calibration curves of direct injection. HCB = hexachlorobenzene; DnBP = di-n-butyl phthalate; BBP = benzylbutyl phthalate; DEHP = bis(2-ethylhexyl) phthalate, adipate = bis(2-ethylhexyl) adipate.

(*)at $1 \mu\text{g l}^{-1}$. 2,4-DCP = 2,4-dichlorophenol; 4-t-BP = 4-tert-butylphenol; DES = diethylstilbestrol; PCP = pentachlorophenol; 4-t-OP = 4-tert-octylphenol; 4-NP = 4-nonylphenol.

Chemical analysis

We used the on-line SPE-GC-MS method with an on-column interface to determine compounds included in group A and the SPE/HPLC-(ESI)MS method for those in group B. These methods have been optimised in previous studies [22,23]. Table 2 shows the optimum conditions for each method and Table 1 shows the analytical performance data

for the on-line SPE-GC-MS and SPE/HPLC-(ESI)MS methods in river water samples. Standard external calibration was used for the quantitation. The performance of these methods has already been tested with several water samples from river, sea, tap irrigation stream, and sewage treatment plant in the previous studies mentioned. Before analysis of the real water samples, we ran blanks of the two systems used.

Part experimental i resultats

Due to the ubiquitous presence of some compounds, such as DnBP, BBP, DEHP, and adipate, we calculated the linearity by subtracting the areas obtained in the blank chromatograms (n=3) from the

areas obtained in the real water samples. All real water samples have been analysed two times to ensure the data obtained.

Table 2. Optimum conditions of the methods used to determine endocrine disruptors studied in water samples.

On-line solid-phase extraction (SPE)-gas chromatography (GC)-mass spectrometry (MS).

<i>Chromatographic separation</i>			
Ramp	°C/min	Next °C	Hold (min)
Initial		60	SPE process
Ramp 1	40	270	2
Ramp 2	60	290	3
Column flow: 1.2 ml min ⁻¹			
Initial on-column injector temperature: 65 °C			
<i>MS parameters</i>			
Transfer line:	280 °C		
MS source	230 °C		
MS Quadrupol	150 °C		
Mode ionisation:	Electron impact		
Ion energy:	70 eV		
Acquisition mode:	Full-scan (50-350 m/z)		
<i>SPE process</i>			
Sample volume:	15 ml		
Sample pretreatment:	50% methanol		
Flow-rate:	2 ml min ⁻¹		
Clean and conditioning:	3 ml methanol and 3 ml Milli-Q water		
Evaporation:	3 bar N ₂ for 15 min		
On-line desorption:	100 µl ethyl acetate (in backflush) at 47 µl /min ⁻¹		

SPE/high-performance liquid chromatography-(electrospray ionisation)MS.

<i>Mobile phase</i>				
		Solvent A: Milli-Q® water (0.5% acetic acid)		
		Solvent B: Acetonitrile		
<i>Chromatographic separation</i>				
Ramp	min	%B	min	%B
Initial	0	30	27.5	90
	18	52	30	90
	20.3	80	31	100
	26.5	80	33	100
Column flow: 0.8 ml min ⁻¹				
Time equilibration: 10 min				
<i>MS parameters</i>				
Mode ionisation:	ESI in negative mode			
Nebulizer gas pressure:	40 p.s.i.			
Drying gas and temperature:	N ₂ at 12 l min ⁻¹ ; 350 °C			
Capillary voltage:	4500 v			
Fragmentor voltage:	Variable [15]			
Acquisition mode:	Full-scan (60-300 m/z) for qualitative analysis SIM for quantitative analysis (m/z selected in [15])			
<i>SPE process</i>				
Sample volume:	500 ml			
Sample pre-treatment:	pH 5 ± 0.1; 5% acetonitrile			
Flow-rate:	10 ml min ⁻¹			
Clean and conditioning:	5 ml acetonitrile and 5 ml Milli-Q water (1% acetic acid)			
Elution:	5 ml acetonitrile			
Elution flow-rate:	5 ml min ⁻¹			
Evaporation:	Until dryness with N ₂			
Redissolution:	1 ml Milli-Q water: acetonitrile (80:20)			

Equipment

On-line SPE-GC-MS

An Agilent (Waldbronn, Germany) HP 6890 Series gas chromatograph equipped with an on-column injector, working in the track oven mode, and an HP 5973 mass selective detector were used. To inject large volumes and perform the chromatographic separation, we installed a 5-m x 530 μm I.D. retention gap, a 0.25- μm retaining precolumn of 2-mx250- μm I.D. HP-5 MS and a solvent vent valve. The analytical column was a 0.25- μm of 30 mx250 μm I.D. HP-5 MS. All connections were made with conventional glass press-frits.

Three six-port Valco valves (Houston, TX, USA), automatically controlled by the GC software, were used for the SPE process. The precolumn (10x2 mm I.D.) was hand-packed with a styrenedivinylbenzene copolymer (PLRP-S, 100, 20- μm particle size) (Polymer Laboratories, Shropshire, UK). An HP 1100 pump was used to deliver the sample and the solvents needed to clean and activate the sorbent. The ethyl acetate used in the elution step was delivered with a syringe pump (Cole-Parmer, IL, USA). A fused-silica capillary (30 cmx0.10 mm I.D.) permanently mounted in the on-column injector transferred the analytes from the precolumn to the GC system. A

100- μl loop of polyether ketone (PEEK) tubing (HP) was used instead of the precolumn for direct injection.

SPE/HPLC-(ESI)MS

We used a HP1100 series liquid chromatography- mass spectrometry detector (LC-MSD) (spell out LC-MSD) system (Agilent). The chromatographic column was a 25x0.40 cm LichroCART 250-4 Lichrospher 100 RP-18 with a particle size of 5 μm (Merck).

For the SPE process, we used a solid-phase extraction manifold (Teknokroma, Barcelona, Spain) connected to a vacuum pump (Gast Manufacturing, Buckinghamshire, UK). The water samples were extracted using 200-mg LiChrolut EN cartridges (Merck).

RESULTS AND DISCUSSION

The occurrence of EDs in the samples analysed is given in Table 3. Levels of several EDs between 0.01 and 13 $\mu\text{g l}^{-1}$ were found. Except for phthalates and adipate, which were present in all the water samples, only fourteen of the twenty-six compounds monitored were sometimes found. Some of these were only found at low $\mu\text{g l}^{-1}$.

Table 3. Occurrence of endocrine disruptors in the samples analysed (in $\mu\text{g l}^{-1}$).

Compound	River Ebre (Tortosa)		River Ebre (Delta)		Industrial port (Tarragona)		Marina (Salou)		Coast (Salou)		Irrigation canal (Ebre Delta)	
	Min-max.	<i>n</i>	Min-max.	<i>n</i>	Min-max.	<i>n</i>	Min-max.	<i>n</i>	Min-max.	<i>n</i>	Min-max.	<i>n</i>
DnBP	1.02-6.58	12	0.71-3.23	12	0.11-2.36	12	0.44-4.62	12	0.30-2.02	12	1.04-3.56	12
BBP	0.09-0.44	12	0.06-0.87	12	0.08-0.33	12	0.14-0.46	12	0.12-0.42	12	0.05-2.01	12
DEHP	1.94-11.83	12	1.33-8.41	12	<0.05-8.38	12	2.1-12.74	12	0.05-7.16	12	1.28-12.42	12
Adipate	<0.05-2.33	12	<0.05-0.73	12	0.05-0.65	12	<0.05-0.38	12	0.05-0.14	12	<0.05-1.64	12
HCB	0.006	1	0.006/0.021	2	-	-	0.01	1	-	-	0.14	1
Atrazine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.16	1
Aldrin	0.11	1	<0.06/0.08	2	-	-	-	-	-	-	-	-
pp-DDE	0.006-0.06	4	0.02-0.05	2	0.035	1	<0.006	1	-	-	0.04	1
α -Endosulfan	-	-	-	-	-	-	1.60	1	-	-	-	-
Dieldrin	<0.005	1	0.03	1	-	-	-	-	-	-	-	-
BPA	0.01/0.02	2	-	-	0.01/0.02	2	NA		NA		-	-
17- α -ethynilestradiol	0.13	2	0.10	1	-	-	NA		NA		-	-
Diuron	-	-	-	-	<0.01-0.06	3	NA		NA		-	-
17- β -estradiol	-	-	-	-	0.10	1	NA		NA		-	-
4-t-BP	-	-	-	-	0.13	1	NA		NA		0.11	1
PCP	-	-	0.02	1	0.03	1	NA		NA		-	-
4-t-OP	0.02-0.07	2	0.06	1	0.03-0.19	3	NA		NA		0.08-0.13	4
4-NP	-	-	0.18	1	<0.10-0.12	2	NA		NA		0.10/0.17	2

Min-max: minimum and maximum concentrations; *n*: number of samples where we found the compounds; NA. = not analyzed. DnBP = di-n-butyl phthalate; BBP = benzylbutyl phthalate; DEHP = bis-(2-ethylhexyl) phthalate; adipate = bis-(2-ethylhexyl) adipate; HCB = hexachlorobenzene; BPA = bisphenol A; 4-t-BP = 4-tert-butylphenol; PCP = pentachlorophenol; 4-t-OP = 4-tert-octylphenol; 4-NP = 4-nonylphenol..

The occurrence levels of phthalates and adipate along the seasons are shown in Figure 2. These are the mean levels found in the months corresponding to each season. As we can see, the most used plasticizers, DnBP and DEHP, were present at higher concentrations than BBP and adipate. Levels of BBP and adipate were between 0.05 to 0.87 $\mu\text{g l}^{-1}$ in all samples, except in the samples collected in river Ebre (Tortosa) in Spring where the mean level was around 2 $\mu\text{g l}^{-1}$ for adipate and in two punctual samples collected in the canal containing irrigation water in September whose levels were also around 2 $\mu\text{g l}^{-1}$ for adipate and BBP. The mean levels found for DnBP were around 3 $\mu\text{g l}^{-1}$, with a Spring high average value for the river Ebre (Tortosa) of about 6 $\mu\text{g l}^{-1}$ and another

maximum for the winter at Marina (Salou) of about 4 $\mu\text{g l}^{-1}$. The highest levels of DEHP (around 12 $\mu\text{g l}^{-1}$) were found for Irrigation canal (Delta) and Marina (Salou) in Autumn and Winter, respectively. Levels of DEHP found in river water samples and irrigation canal were higher in Autumn. In the marina of Salou and the industrial port of Tarragona, the levels were highest in the samples collected in winter, but generally in the months of spring and summer the sea water samples had higher levels of DEHP than other samples. Some months, low levels around 0.1 $\mu\text{g l}^{-1}$ were found for DnBP and DEHP, but high means values were obtained because one single high monthly value have a major influence on the average.

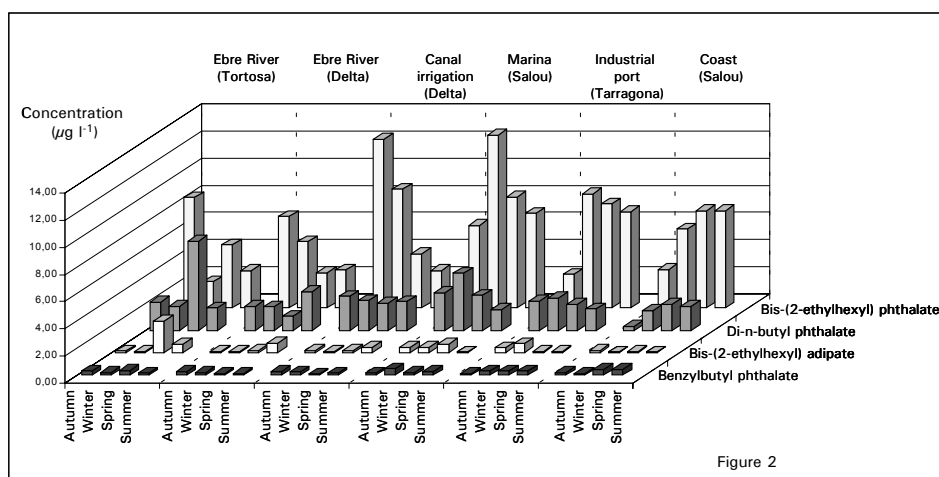


Figure 2. Distribution of phthalates and adipate by seasons in the water samples analysed.

The occurrence of pesticides with estrogenic properties is sporadic. There were samples in which no contaminant was found, such as the water samples from the coast of Salou. However, in a marina (Salou) water sample collected in March, we found α -endosulfan at $1.6 \mu\text{g l}^{-1}$. This high level can be due to a specific treatment with this insecticide. In Ebre river water samples (Tortosa and Delta), only the HCB, used as fungicide, and aldrin and dieldrin, used as insecticides, were found in the months of Spring and Summer at low levels between the limit of detection and $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$. Their presence is due to their bioaccumulation, because they are totally banned for agricultural uses in 1983 (Directive 83/131/European Economic Community). In the irrigation canal (Ebre Delta) HCB also was found at $0.14 \mu\text{g l}^{-1}$ and atrazine, a common herbicide widely used in agriculture, was found at $0.16 \mu\text{g l}^{-1}$ in water samples collected in Spring. In these months atrazine is widely used for aggressive treatments. Similar levels of atrazine were found a few years ago in a study that monitored pesticides in the Ebre river delta area during the same months [24]. But, nowadays the treatments with pesticides are more controlled because they are found in punctual water samples.

The p,p' -DDE, a breakdown product of DDT, was found in several water samples. DDT was a widely used insecticide in agriculture from the 1960s. DDT and its breakdown products (DDE and DDD) are persistent substances that can travel long distances through the atmosphere and

in water and can accumulate in sediments. A background of p,p' -DDE was not determined in all water samples. Only in some water samples from river, sea and irrigation canal p,p' -DDE was found at levels between 0.006 and $0.04 \mu\text{g l}^{-1}$. Their presence in these water samples is due to uncontrollable factors, because DDT was also totally banned for agricultural uses in March 1983 (Directive 83/131/European Economic Community).

Diuron, an herbicide also used as an antifouling agent in boat paints, was only found in the months of spring and summer and only in the sea water samples of the industrial port (Tarragona). In these seasons, boating activity increases and boats are often repainted. These concentration levels are lower than those reported in a previous study of our group [11] in several ports along the coast of Tarragona between March and July 2000. In this study, diuron was found in these samples at between 0.01 and $0.06 \mu\text{g l}^{-1}$ and its highest level was in a sample collected in March.

Estrogens, such as 17α -ethynilestradiol and 17β -estradiol (used in oral contraceptives) and bisphenol A (widely used in industrial activities) were only found in some river and industrial port (Tarragona) water samples at levels around $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$. These levels are usually found in water samples near of sewage treatment plants (STPs), such as industrial port (Tarragona) water sample, and in urbanised areas, such as Ebre River

water samples collected near of the cities.

Alkylphenols, the degradation products of alkylphenol polyethoxylates present in detergents and many other formulated products (e.g., cosmetics, paints, and pesticides) were found in river, sea and irrigation canal water samples collected between spring and autumn. The levels ($0.02\text{-}0.2 \mu\text{g l}^{-1}$) were lower than those found in several influents and effluents STPs [15]. Therefore, their presence in waters from nonurbanised and rural sections of the river could be due to their incomplete elimination in water-treatment plants. The highest levels are usually found in water samples from urban and industrialised zones [25].

CONCLUSIONS

The results of this monitoring study show that in environmental water samples there is a large presence of phthalates and adipate ($0.01\text{-}12 \mu\text{g l}^{-1}$) and *p,p'*-DDE ($0.06\text{-}0.11 \mu\text{g l}^{-1}$), the persistent metabolite of DDT.

In any river water sample from Tortosa, the total level of pesticides with estrogenic activity is not higher than the total pesticides permissible in drinking water ($0.5 \mu\text{g l}^{-1}$) [26]. The pesticides levels are not higher than the individual levels permitted for drinking water ($0.10 \mu\text{g l}^{-1}$ except for aldrin, $0.03 \mu\text{g l}^{-1}$). Diuron was only found in water samples where yachting is popular and atrazine, a herbicide widely used in agricultural, was only found in irrigation canal.

The effects of incomplete degradation of estrogens and alkylphenols in STPs are showed in the low levels found of these compounds in water samples from river, irrigation canal and industrial port.

However, the sometimes high levels of these compounds shows that they need to be controlled in these kinds of samples because it is important to prevent their negative effects on living organisms in the aquatic environment.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Ministerio de Ciencia y Tecnologia (Projects AMB1999-0875 and PPQ2001-1805-CO3).

REFERENCES

- [1] S.H. Safe, *Environ Health Persp.* 108 (2000) 487.
- [2] D. Crews, E. Willingham, J.K. Skipper, *Q. Rev. Biol.* 75 (2000) 243.
- [3] S.L. Schantz, J. Widholm, *Environ Health Persp.* 109 (2001) 1197.
- [4] A.L. Lister, G.J. Van der Kraak, *Water Qual. Res. J. Can.* 36 (2001) 175.
- [5] T. Colborn, D. Dumanoski, J.P. Myers, *Our Stolen Future*, Penguin Books, New York. 1996.
- [6] Communication from the Commission to the Council and the European Parliament, *Application of the community strategy for endocrine disruptors: A range of substances suspected of interfering*

- with the hormone systems of humans and wildlife.* COM (2001) 262. Brussels, Belgium.
- [7] Communication from the Commission to the Council and the European Parliament, *Community strategy for endocrine disruptors: A range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife.* COM (1999) 706. Brussels, Belgium.
- [8] J. Quintana, I. Martí, F. Ventura, J. Chromatogr. A 938 (2001) 3.
- [9] D.A. Azevedo, S. Lacorte, P. Viana, D. Barceló, Chromatographia 53 (2001) 113.
- [10] D.A. Azevedo, S. Lacorte, T. Vinhas, P. Viana, D. Barceló, J. Chromatogr. A 879 (2000) 13.
- [11] R.A. Gimeno, C. Aguilar, R.M. Marcé, F. Borrull, J. Chromatogr. A 915 (2001) 139.
- [12] T. Suzuki, K. Yaguchi, S. Suzuki, Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 3757.
- [13] E. Cortazar, O. Zuloaga, J. Sanz, J.C. Raposo, N. Etxebarria, L.A. Fernández, J. Chromatogr. A 978 (2002) 165.
- [14] O.S. Fatoki, A. Noma, Water Air Soil Poll. 40 (2002) 85.
- [15] M. Solé, M.J. López de Alda, M. Castillo, C. Porte, K. Ladegaard-Pedersen, D. Barceló, Environ. Sci. Technol. 34 (2000) 5076.
- [16] N. García-Reyero, E. Grau, M. Castillo, M.J. López de Alda, D. Barceló, B. Piña, Environ. Toxicol. Chem. 20 (2001) 1152.
- [17] D.W. Kolpin, E.T. Furlong, M.T. Meyer, E.M. Thurman, S.D. Zaugg, L.B. Barber, H.T. Buxton, Environ. Sci. Technol. 36 (2002) 1202.
- [18] A. Mouatassim-Souali, S.L. Tamisier-Karolak, D. Perdiz, M. Cargouet, Y. Levi, J. Sep. Sci. 26: (2003) 105.
- [19] M. Kojima, S. Tsunoi, M. Tanaka, J. Chromatogr. A 984 (2003) 237.
- [20] M.J. López de Alda, S. Díaz-Cruz, M. Petrovic, D. Barceló, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 503.
- [21] B.J. Vanderford, R.A. Pearson, D.J. Rexing, S.A. Snyder, Anal. Chem. 75 (2003) 6265.
- [22] L. Brossa, R.M. Marcé, F. Borrull, E. Pocurull, J. Chromatogr. A 963 (2002) 287.
- [23] L. Brossa, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, Chromatographia 59 (2004) 419.
- [24] C. Aguilar, I. Ferrer, F. Borrull, R.M. Marcé, D. Barceló, Anal. Chim. Acta 386 (1999) 237.
- [25] C.P. Rice, I. Schmitz-Afonso, J.E. Loyo-Rosales, E. Link, R. Thoma, L. Fay, D. Altfater, M.J. Camp, Environ. Sci. Technol. 37 (2003) 3747.
- [26] Official Journal of the European Communities. *Council Directive 98/83/CE of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption.* L330/32. Luxembourg, 1998.

**II.7. ESTUDI DE LA PRESENCIA D'ALTERADORS ENDOCRINS EN
AIGÜES D'ESTACIONS DEPURADORES D'AIGÜES RESIDUALS**

Degut a l'àmplia utilització dels EDs en activitats industrials, agrícoles i en la vida domèstica, una de les principals vies d'introducció d'aquests EDs a les aigües mediambientals és a través de les aigües residuals que es generen en aquestes activitats. És per això que molts EDs, principalment els esteroids sexuals naturals i sintètics i els alquilfenols es troben principalment en aigües d'entrada i, degut a què no s'eliminen totalment, en aigües de sortida procedents de depuradores d'aigües residuals. Les hormones sexuals naturals i sintètiques han estat determinats per diversos autors en aquest tipus de mostres a nivells de ng l^{-1} i els alquilfenols (APs) a varis ordres de magnitud per sobre [1,2]. Tot i que els APs tenen una activitat estrogènica molt inferior a la de les hormones naturals i sintètiques, els elevats nivells en que es troben fan que tinguin una important influència en la toxicitat estrogènica total de les aigües mediambientals.

Això ha fet que l'eficàcia de les depuradores en l'eliminació d'aquests contaminants ha estat estudiada per varis autors, realitzant un balanç entre els trobats a l'entrada i la sortida [1,3,4]. Degut a la importància que té aconseguir eliminar la presència d'aquests compostos en les aigües mediambientals a través de les plantes de tractament d'aigües residuals, l'objectiu d'aquest treball va ser portar a terme una monitorització d'un grup d'EDs, format per estrògens, alquilfenols, bisfenol A i algun plaguicida, en aquest tipus d'aigües. Concretament, es van recollir mostres aquoses d'entrada i sortida de dues depuradores de la zona de Tarragona, ja que fins el moment no hi havia dades sobre les depuradores de la zona, per tal de controlar en quina proporció aquests compostos són abocats en les aigües mediambientals.

Aquestes depuradores recullen aigües residuals principalment d'origen domèstic, tot i que també tenen una bona part d'aigües residuals procedents de la indústria degut a la proximitat d'aquesta a les depuradores. Les mostres d'aigua d'entrada i sortida d'aquestes depuradores es van recollir integrades cada dos mesos durant un període d'un any.

Degut a les característiques dels EDs escollits per realitzar aquesta monitorització es va optar per la utilització del mètode basat en la HPLC-(ESI)MS i la utilització de la SPE com a tècnica de preconcentració, desenvolupat anteriorment (capítol II.5).

En aquestes mostres es van trobar la majoria dels EDs estudiats en aquest treball. Les hormones naturals trobades més freqüentment van ser l'estradiol i l'estrone, a nivells superiors als trobats en altres depuradores [5,6]. En canvi, els APs es van trobar a nivells més baixos que els trobats en altres depuradores on principalment reben aigües residuals d'origen industrial [1]. Tot i així, en la depuradora de Tarragona entra una proporció més gran d'aigües industrials que la de Reus degut a la proximitat d'aquesta al polígon industrial. Això va quedar comprovat en la freqüència i els nivells de 4-NP i bisfenol A que van aparèixer en les mostres de Tarragona.

A continuació es presenta el treball que inclou aquest resultat i que està pendent de publicació a la revista *Environmental Toxicology & Chemistry*.

Bibliografia

- [1] M. Solé, M.J. López de Alda, M. Castillo, C. Porte, K. Ladegaard-Pedersen, D. Barceló, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 5076.
- [2] A. Laganà, A. Bacaloni, I. De Leva, A. Faberi, G. Fago, A. Marino, *Anal. Chim. Acta* 501 (2004) 79.
- [3] C. Baronti, R. Curini, G. D'Ascenzo, A. Di Corcia, A. Gentili, R. Samperi, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 5059.
- [4] A. Mouatassim-Souali, S.L. Tamisier-Karolak, D. Perdiz, M. Cargouet, Y. Levi, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 105.
- [5] T. Isobe, H. Shiraishi, M. Yasuda, A. Shinoda, H. Suzuki, M. Morita, *J. Chromatogr. A* 984 (2003) 195.
- [6] A. Laganà, A. Bacaloni, I. De Leva, A. Faberi, G. Fago, A. Marino, *Anal. Chim. Acta* 501 (2004) 79.

OCCURRENCE OF ENDOCRINE-DISRUPTING COMPOUNDS IN WATER SAMPLES FROM SEWAGE TREATMENT PLANTS

L. Brossa, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé

Departament de Química Analítica i Química Orgànica. Universitat Rovira i Virgili.
Imperial Tàrraco 1, 43005 TARRAGONA, Spain

Abstract

Sewage treatment plant (STP) effluents are one of the major causes of endocrine disruptors (EDs) in environmental water samples because they generate degradation products, such as alkylphenols, or do not completely remove such products as natural and synthetic steroid estrogens. EDs can be determined in many compartments of the treatment process, but influent and effluent STP water samples are the matrices that are most often investigated to control the occurrence of EDs in environmental waters and the efficacy of these STPs. For this purpose, we monitored some compounds that are known or suspected to be EDs in wastewater samples from two sewage treatment plants. We used a method based on high-performance liquid chromatography-(electrospray) mass spectrometry (HPLC-(ESI)MS) working in negative ionisation (NI) mode and off-line solid-phase extraction (SPE). The limits of detection were at levels of ng l^{-1} . Natural and synthetic steroid estrogens, alkylphenols, bisphenol A and diuron were found in some of the wastewater samples analysed at levels between ng l^{-1} and $\mu\text{g l}^{-1}$.

Keywords: monitoring study, endocrine disruptors, sewage treatment plant waters.

INTRODUCTION

A wide variety of endocrine effects can be attributed to several environmental pollutants, which are called EDs. They include pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons, phthalate plasticisers, alkylphenols, and natural and synthetic hormones [1]. These contaminants are present in various environmental samples, but are expected to enter environmental waters through the

direct discharge of industrial and domestic wastewaters, the discharge of STP effluents and agricultural drains into streams and rivers. Sometimes, STP effluents appear to be one of the major routes for the release of pollutants into natural waters. This is particularly so for alkylphenols, which are degradation products of the widely used alkylphenol ethoxylate surfactants, and natural and synthetic sex steroid hormones.

Several authors have studied the occurrence of natural and synthetic hormones, alkylphenols and alkylphenol ethoxylates in wastewater samples [2-4]. Natural and synthetic steroid estrogens, which are the main contributors to the endocrine-disruption phenomena, are excreted in the urine of mammals and are present in the aquatic environment mainly as a result of being discharged in untreated domestic wastewater or being inefficiently removed in STPs. It is known that municipal STPs reduce steroid estrogens, although frequently not to levels lower than the known effective concentrations for fish [5]. Solé et al. [2]. have analysed influent and effluent STP water samples to determine the efficacy of STPs and to control the biological effects that compounds discharged into rivers have on freshwater fish. In these STP water samples, natural and synthetic steroid estrogens were less abundant than 4-nonylphenol (4-NP) and certain correlations were found between 4-NP present in water and vitellogenin in male fish plasma response. The estrogenic activities of alkylphenols (APs) are lower than those of natural and synthetic steroid estrogens. But the high levels found, mainly for 4-NP, in STP water samples make an important contribution to the total estrogenic activity [6,7]. In general, the percentage of the total measured concentration of organic wastewater contaminants was also higher for synthetic and natural steroid estrogens and detergent metabolites (APs) [8].

The objective of this study is to monitor a group of EDs, which contain

mainly natural and synthetic sex steroid hormones, alkylphenols and some pesticides, in wastewater samples from two STPs in the area of Tarragona (Catalonia, Spain). The method used is based on high-performance liquid chromatography-(electrospray) mass spectrometry (HPLC-(ESI)MS) working in negative ionisation (NI) mode and off-line SPE [9]. Wastewater composite samples from effluent and influent STPs were collected to control how efficiently the EDs of interest were removed.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

We collected wastewater samples from two conventional sewage-treatment plants that had activated sludge biological treatment in Tarragona and Reus (Catalonia, Spain). These STPs receive mostly urban wastewaters and some industrial discharges. The Reus and Tarragona STPs are connected to similar population equivalents (around 140000) with a DBO_5 of 400 mg l^{-1} . The average flow rate is $30000 \text{ m}^3\text{day}^{-1}$ for Tarragona and $16000 \text{ m}^3\text{day}^{-1}$ for Reus. Twenty-four hours composite effluent and influent wastewater samples were analysed every two months between September 2002 and August 2003.

These samples were kept in the dark at 4°C and filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ filter (MSI, Westboro, MA, USA) immediately before they were analysed.

Chemical analysis

The method used for monitoring the target EDs was optimised in a previous study [9] and its performance has already been tested with influent and effluent STP water samples.

We used a HP1100 series LC-MSD system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The chromatographic column was a 25x0.40 cm LichroCART 250-4 Lichrospher 100 RP-18 with a particle size of 5 μm (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The binary mobile phase consisted of Milli-Q water containing 0.5% (v/v) acetic acid as solvent A, and acetonitrile as solvent B. Separation was performed using a gradient profile. The operating conditions of the HPLC were: 30% B at 0 min, 52% B at 18 min, 80% B at 20.3 min, 80% B at 26.5 min, 90% B at 27.5 min, 90% B at 30 min, 100% B at 31 min and 100% B at 33 min. At the end of the chromatogram, the mobile phase returned to its initial composition in 2 min and the column was equilibrated for 10 min. The column flow rate was 0.8 ml min⁻¹. Electrospray ionisation was performed in negative mode. The operational parameters were set as follows: the nebulizer gas pressure was 40 p.s.i.; the drying gas was nitrogen at 12 l min⁻¹ at 350 °C; the capillary voltage was 4500 V and the fragmentor voltage was programmed to get the best sensitivity for each compound. Chromatograms were recorded under full-scan acquisition mode (m/z 60-300) and SIM acquisition mode. In this case, the base peak was selected for each compound.

For the SPE process, we used a solid-phase extraction manifold (Teknokroma, Barcelona, Spain) connected to a vacuum pump (Gast Manufacturing Company, Buckinghamshire, United Kingdom). The water samples were extracted using 200-mg LiChrolut EN cartridges (Merck, Darmstadt, Germany). We preconcentrated 500 ml of effluent wastewater and 100 ml of influent wastewater with 200-mg LiChrolut EN cartridges. The sorbent was conditioned by flushing with 5 ml of acetonitrile and 5 ml of Milli-Q water (1% acetic acid). The pH of the sample was adjusted to 5 ± 0.1 with acetic acid and 5% acetonitrile was added. The retained compounds were eluted with 5 ml of acetonitrile. This volume was evaporated until dryness with N₂ and redissolved with 1 ml of a mixture of Milli-Q water and acetonitrile (80:20).

Chemicals

17 α -estradiol (α -E₂), 17 β -estradiol (β -E₂), 17 α -ethinylestradiol (EE₂), estrone (E₁) and diethylstilbestrol (DES) were obtained from Sigma (St. Louis NO, USA). 4-*tert*-butylphenol (4-*t*-BP), 4-*tert*-octylphenol (4-*t*-OP), 4-nonylphenol (4-NP), 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) and bisphenol A (BPA) were obtained from Aldrich (Steinheim, Germany). Diuron was obtained from Riedel-de Haën (Seelze-Hannover, Germany) and pentachlorophenol (PCP) was obtained from Jansen Chemie (Geel, Belgium). The purities of these reagents were over 97%. Standard solutions of each compound at 1000

mg l⁻¹ were prepared in acetonitrile and stored at 4°C. All the working solutions were prepared by diluting these solutions.

The HPLC-grade acetonitrile was obtained from SDS (Peypin, France) and water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). The pH of the mobile phase and samples was adjusted with acetic acid from Prolabo (Fontenay, France).

RESULTS AND DISCUSSION

The levels of EDs found in the influent and effluent STP water samples collected between September 2002 and August 2003 are shown in Table 1. 2,4-DCP and EE₂ were not detected in any STP water samples and PCP was only found in one at 10 ng l⁻¹.

Natural steroids β-E₂, α-E₂ and E₁ were the estrogens mainly found in the STP water samples analysed. This finding was expected because these estrogens are excreted in abundance by menstruating women and because the influents tested contain mainly urban discharge where steroidal estrogens are certainly present as a consequence of human excretion. The levels of β-E₂ and α-E₂ (60-1410 ng l⁻¹) and E₁ (30-300 ng l⁻¹) found in STP effluents from Reus and Tarragona were higher than those observed in STPs from other places, where the levels were between 0.35 and 18 ng l⁻¹ for E₂ and between 0.1 and 80 ng l⁻¹ for E₁ [2-4,10-12]. The synthetic estrogen, DES, was only found in two samples. The highest

level of DES was found in the influent sample of the month of August (Reus), but the removal rate for this compound at this STP was efficient.

Although the levels found in STP effluent water samples from Reus and Tarragona for β-E₂, α-E₂ and E₁ were higher than in other STPs, they were lower than the limits of quantification for STP influent water samples. So, we can deduce that the analytes were partially eliminated. Removal rates were in general higher than 80% (for example E₁ in April 2003), but the levels of these estrogens in effluent were sometimes very high (for example, α-E₂ in December 2003). High levels of estrogens in effluent samples may be because the estrogens entering the STPs are mainly conjugated species (of sulphuric and glucuronic acids) and are biotransformed to free estrogens during sewage treatment [3]. The high levels of estrogens in effluent STP water samples can be studied by controlling the presence of conjugated species in effluent and influent water samples and determining whether the transformation of conjugated species to free estrogens is due to the procedure used in these STPs (eg. activated sludge).

The STPs from Tarragona and Reus receive mainly municipal wastewaters, so the levels of alkylphenols were lower than those in STPs that receive waters from industrial discharges where levels were between 6-343 μg l⁻¹ [2]. 4-t-BP was only found in Reus and Tarragona STP water samples collected in October 2002 and about

80% was removed. However, 4-*t*-OP was found in all the samples collected and levels in effluent water samples are higher than in influent water samples, mainly for Reus STP. This may be because the sewage treatment degrades alkylphenol ethoxylates, present in detergents, which increases the levels of their by-products, alkylphenols. It is estimated that 60-65% of all alkylphenolic compounds that enter a conventional STP are discharged into the environment, around 25% as alkylphenols [14]. 4-NP was found at higher levels in Tarragona STP water samples than in Reus, except for the Reus influent water sample collected in August where the level of 4-NP was higher. In general, for 4-NP these STPs had removal rates higher than 80%. This shows that their presence is not due to the nonylphenol ethoxylates present in detergents, but 4-NP is also used in paints, herbicides,

pesticides and many other formulated products (e.g. cosmetics).

Diuron, a pesticide with estrogenic properties that is widely used as an antifouling agent, was determined at similar levels in the STP water samples from Reus and Tarragona and their levels were lower in effluent STP waters than influent STP waters. The occurrence of BPA, used mainly as a plasticiser, was higher in Tarragona STP water samples than in Reus STP water samples, but in general both STPs had an efficient removal rate. The levels of BPA were similar to those found in other STPs [11].

Figure 1 shows an effluent STP water chromatogram collected in Reus (August). In this sample, α -E₂, E₁, diuron, BPA and 4-*t*-OP were found at 833, 42, 54, 64 and 670 ng l⁻¹, respectively.

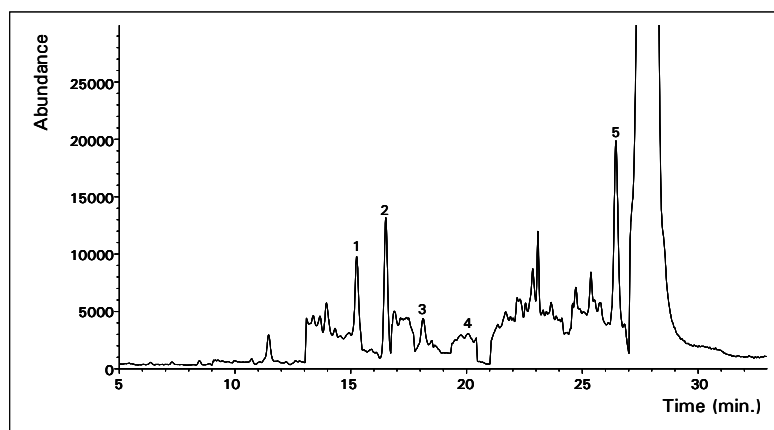


Figure 1. Effluent STP from Reus water sample chromatogram obtained by SPE/HPLC-MS in the SIM acquisition mode. Sample collected in August 2003. Peak assignment: 1, bisphenol A; 2, Diuron; 3, 17 β -estradiol; 4, estrone; 5, 4-*tert*-octylphenol.

Table 1. Occurrence of EDs in the samples analyzed (in ng l⁻¹)

STP TARRAGONA												
Compounds	October 2002		December 2002		February 2003		April 2003		June 2003		August 2003	
	Influent	Effluent	Influent	Effluent	Influent	Effluent	Influent	Effluent	Influent	Effluent	Influent	Effluent
β -E ₂	<1000	n.d.	n.d.	200	n.d.	n.d.	n.d.	60	n.d.	420	<1000	n.d.
α -E ₂	<2000	430	n.d.	1410	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	440	<2000	640
E ₁	n.d.	30	220	n.d.	n.d.	n.d.	300	40	n.d.	n.d.	1071	37
DES	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	40	n.d.	n.d.
EE ₂	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Diuron	<100	170	n.d.	50	n.d.	50	250	30	n.d.	30	n.d.	58
PCP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,4-DCP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BPA	250	80	390	40	n.d.	40	390	370	360	90	<100	28
4-t-BP	<1000	310	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4-t-OP	<200	270	1960	560	270	410	670	n.d.	n.d.	850	392	315
4-NP	<1000	n.d.	2230	n.d.	1330	n.d.	1870	350	n.d.	n.d.	2048	n.d.
STP REUS												
β -E ₂	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	150	<1000	n.d.
α -E ₂	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	360	<2000	833
E ₁	260	n.d.	<100	n.d.	<100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1732	42
DES	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	217	n.d.
EE ₂	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Diuron	<100	30	n.d.	60	<100	20	200	50	n.d.	10	<100	54
PCP	n.d.	10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,4-DCP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BPA	100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	30	n.d.	n.d.	280	50	102	64
4-t-BP	<1000	370	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4-t-OP	n.d.	1300	210	1520	n.d.	1410	2160	1400	n.d.	1880	<200	670
4-NP	n.d.	n.d.	<1000	n.d.	<1000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8016	n.d.

n.d.: not detected

Limits of detection (LODs) for effluent STPs water samples (in ng l⁻¹): DES: 1; BPA, E₁ and diuron: 2; PCP: 4; 4-t-OP: 8; β -E₂, EE₂, 4-t-BP and 4-NP: 30; α -E₂: 60; 2,4-DCP: 300; 2,4-DCP: 300.

LODs for influent STPs water samples (in ng l⁻¹): DES: 10; BPA, E₁ and diuron: 20; PCP: 40; 4-t-OP: 80; EE₂ and 4-NP: 300; β -E₂ and 4-t-BP: 400; α -E₂: 600; 2,4-DCP: 3000; 2,4-DCP: 3000.

CONCLUSIONS

For the cases studied, the occurrence of several EDs in influent and effluent water samples ranged between 10 and 8000 ng l⁻¹. Their presence in effluent water samples means that they are subsequently distributed in environmental waters.

The natural steroids estrogens mainly found in Reus and Tarragona STP water samples were E₂ and E₁ and their levels were higher than the levels found in other STPs.

In general, the presence of estrogens and alkylphenols in Tarragona STP water samples was higher than in Reus STP water samples, except for 4-*t*-OP.

4-*t*-OP was found at higher levels in effluent than influent water samples. This may be due to the degradation of octylphenol ethoxylates used in detergents. Both STPs efficiently removed 4-NP. The high levels usually found in influent water samples from Tarragona are because the Tarragona STP receives more discharges from industrial activity than the Reus STP. This is confirmed by the presence of BPA, which was more frequently found in water samples in the Tarragona STP.

Diuron was found in most of the water samples and these STPs generally presented an efficient removal rate for this compound.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the *Ministerio de Ciencia y Tecnología* (projects AMB1999-0875, PPQ2001-1805-CO3 and PPQ2002-01276).

REFERENCES

- [1] Communication from the Commission to the Council and the European Parliament, *Application of the Community Strategy for Endocrine Disruptors: a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife*. Brussels. COM (2001) 262.,
- [2] M. Solé, M.J. López de Alda, M. Castillo, C. Porte, K. Ladegaard-Pedersen, D. Barceló, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 5076.
- [3] C Baronti, R. Curini, G d'Ascenzo, A. di Corcia, A. Gentili, R. Samperi, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 5059.
- [4] A. Mouatassim-Souali, S.L. Tamisier-Karolak, D. Perdiz, M. Cargouet, Y. Levi, *J. Sep. Sci* 26 (2003) 105.
- [5] E.J. Routledge, D. Sheahan, C. Desbrow, G.C. Brighty, M. Waldock, J.P. Sumpter, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 1559.
- [6] W. Körner, U. Bolz, W. Sübmuth, G. Hiller, W. Schuller, V. Hanf, H. Hagenmaier, *Chemosphere* 40 (2000) 1131.
- [7] E.J. Routledge, D. Sheahan, C. Desbrow, G.C. Brighty, M. Waldock, J.P. Sumpter, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 1559.
- [8] D.W. Kolpin, E.T. Furlong, M.T.

- Meyer, E.M. Thurman, S.T. Zaugg, L.B. Barber, H.T. Buxton, Environ. Sci. Technol. 36 (2002) 1202.
- [9] L. Brossa, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, Chromatographia 59 (2004) 419.
- [10] T. Isobe, H. Shiraishi, M. Yasuda, A. Shinoda, H. Suzuki, M. Morita, J. Chromatogr. A 984 (2003) 195.
- [11] A. Laganà, A. Bacaloni, I. de Leva, A. Faberi, G. Fago, A. Marino, Anal. Chim. Acta 501 (2004) 79.
- [12] M. Cargouët, D. Perdiz, A. Mouatassim-Souali, S. Tamisier-Karolak, Y. Levi, Sci. Total Environ. 324 (2004) 55.
- [13] H. Andersen, H. Siegrist, B. Halling-Sorensen, T.A. Ternes, Environ. Sci. Technol. 37 (2003) 4021.
- [14] M. Petrovic, S. González, D. Barceló, Trends Anal. Chem. 22 (2003) 685.

CAPÍTOL III

CONCLUSIONS

Dels treballs realitzats en la present Tesi Doctoral es poden extreure les següents conclusions :

1. Tot i que darrerament s'està dedicant molta atenció a les conseqüències de la contaminació provocada pels anomenats EDs, és molt difícil fer una avaluació dels riscos futurs i per tant elaborar una normativa que els reguli. El principal problema que apareix és el fet de que no es coneix amb exactitud quines substàncies són les que més contribueixen a produir aquests efectes sobre el sistema endocrí, de quina manera actuen i si tenen efectes additius. Per això, una part de la investigació actual s'ha de centrar en desenvolupar assaigs bioquímics per tal de determinar quins compostos són EDs, quin grau de toxicitat tenen i si existeix alguna relació entre la seva estructura i la seva acció disruptora. I per una altra banda, és important també el desenvolupament de mètodes analítics per la determinació d'aquests contaminants en mostres aquoses ambientals i així controlar la seva distribució en el medi ambient i el nivell d'exposició d'aquests contaminants en els éssers vius.
2. Tant la GC com l'HPLC, utilitzant com a sistema de preconcentració la SPE, són tècniques molt adequades per a la determinació de tots els contaminants amb propietats alteradores del sistema endocrí en mostres aquoses mediambientals.
3. S'ha demostrat que la utilització de la SBSE, en combinació amb la GC i utilitzant tècniques d'injecció de grans volums, també és una tècnica de preconcentració que permet la determinació d'EDs en mostres aquoses a nivells traça.
4. Les tècniques d'injecció de grans volums a la GC que s'han aplicat han mostrat la seva capacitat per a la determinació d'EDs a nivells traça a través de l'acoblament en línia de la GC a la SPE.

5. L'aplicació de la interfase *on-column* ha permès la introducció de 100 µl de solvent orgànic al cromatògraf, de manera que tot l'eluat de la SPE s'ha introduït al sistema cromatogràfic. Utilitzant aquesta interfase per l'acoblament SPE-GC-MS i el mode d'aquisició de dades *full-scan* del espectromètre, s'han pogut quantificar i identificar tots els EDs estudiats simultàniament preconcentrant només 15 ml de mostra, obtenint límits de detecció entre 0.1-20 ng l⁻¹.
6. La introducció de 3 fraccions de 100 µl de solvent orgànic es va aconseguir utilitzant la interfase PTV. El mètode SPE-PTV-GC-MS va permetre quantificar i identificar tots els EDs estudiats a nivells similars que utilitzant el mètode SPE-*on-column*-GC-MS, però la interfase PTV ha resultat ser més robusta per a l'anàlisi de mostres aquoses amb un alt contingut en sal, com són les mostres d'aigua de mar.
7. Degut a la hidrofobicitat i la tendència de quedar absorbits en el sistema d'alguns dels EDs determinats pels mètodes basats en la SPE-GC-MS, ha estat necessària l'addició de metanol a la mostra abans de la seva preconcentració per tal d'augmentar la solubilitat dels compostos. D'aquesta manera s'han obtingut unes recuperacions acceptables per a tots els compostos.
8. La utilització de la SBSE amb desorció líquida junt amb la injecció de grans volums a la GC-MS és una bona alternativa a la desorció tèrmica. El mètode desenvolupat permet la determinació d'un grup de EDs format per plaguicides a nivells de pocs µg l⁻¹.
9. L'acoblament en línia de la SPE a la HPLC junt amb l'àmpliament utilitzat detector UV-visible, ha permès el desenvolupament d'un mètode ràpid i de senzilla aplicació com a mètode de rutina per a la determinació d'alquilfenols i bisfenol A en mostres aquoses mediambientals.

10. L'acoblament de la HPLC a la MS a través de la interfase de ESI ha permès el desenvolupament d'un mètode analític per a la determinació d'un grup d'EDs format per estrògens, alquilfenols, el bisfenol A i algun plaguicida en mostres reals.
11. L'aplicabilitat del mètode SPE-GC-MS utilitzant una interfase *on-column* ha permès portar a terme una monitorització de vint-i-sis EDs format per plaguicides, dièsters d'ftalat i un PAH en mostres aquoses de riu, mar i un canal d'irrigació de la zona del Tarragonès.
12. Els resultats d'aquesta monitorització mostren que les aigües mediambientals analitzades tenen una important presència de dièsters d'ftalat i adipat i del plaguicida p,p'-DDE (metabolit persistent del DDT). Tot i així, les mostres d'aigua de riu analitzades no contenen un nivell dels plaguicides amb activitat estrogènica superior al nivell total de plaguicides permès en aigua potable ($0.5 \mu\text{g l}^{-1}$).
13. El mètode desenvolupat per a la determinació d'EDs a través de la HPLC acoblada a la MS i utilitzant la SPE off-line, ha permès avaluar la presència d'aquests compostos en mostres d'entrada i sortida d'aigua procedents de depuradores d'aigües residuals.
14. Els estrògens que es van determinar en les aigües de depuradora analitzades han estat principalment l'estradiol i l'estrone a uns nivells superiors als que s'han trobat en altres depuradores. El 4-NP i el 4-t-OP també s'han trobat puntualment en algunes de les mostres analitzades. Tot i així, no es pot establir una distribució de la contaminació d'aquests compostos en funció de l'època de l'any.

ANNEXOS

ANNEX I: Sistemes hormonals afectats i principals utilitzacions d'alguns EDs.

Compost	Típus de substància	Sistema hormonal afectat	Usos principals	Lista de Colborn [16]	Lista de l'EPA [22]	Lista de l'EU [23]
---------	---------------------	--------------------------	-----------------	-----------------------	---------------------	--------------------

Esteroids sexuals naturals i sintètics

Dietilestilbestrol	Estrogen exogen no esteroïdal.	Estrògens	Utilitzat per prevenir els avortaments espontanis (1940-1971). També per tractar la menopausa, desordres menstruals,...	-	Reconegut	-
17 β -estradiol	Esteroid endogen (hormona femenina).	Estrògens	En medicina humana i veterinària per teràpies estrogèniques hormonals. En animals també s'usa en el menjar com a promotor del creixement.	-	-	UE3
17 β -estradiol-17-acetat	Esteroid conjugat.	Estrògens	En tractaments de la menopausa, distròfies de la vulva,...També en preparacions cosmètiques.	-	-	-
Estriol	Esteroid endogen.	Estrògens	Per tractar deficiències en estrògens, com són l'atrofia genital de la postmenopausa i la incontinència urinària.	-	-	-
Estrona	Esteroid endogen. Metabòlit del 17 β -estradiol.	Estrògens	En tractaments de càncer de mama, menopausa, osteoporosis. També en contraceptius orals combinat amb progestàgens i en cosmètics pel tractament hormonal de la pell.	-	-	-
17 α -etinilestradiol	Estrogen exogen.	Estrògens	Principalment utilitzat com contraceptiu oral. També pels desordres de la menopausa,...	-	-	-
Mestranol	Esteroid exogen	Estrògens	El més àmpliament usat en contraceptius orals. També es pot usar combinat amb altres estrògens.	-	-	-

Alquilfenols

4- <i>tert</i> -butilfenol	Compost fenòlic	Estrògens	En la síntesis dels alquilfenol etoxilats. Intermediari en la manufactura de vernissos i resines de laca. Antioxidants en sabons i additius en olis de motor.	Sí	Sospitós	UE3
4- <i>tert</i> -octilfenol	Compost fenòlic	Estrògens	En la producció d'octilfenol etoxilats i resines fenòliques. Additius de polímers.	Sí	Probable	UE4
4-nonilfenol	Compost fenòlic	Estrògens	En la producció de surfactants no iònics i en la producció del tris(4-nonilfenil)fosfat (TNPP). També com antioxidants en polímers de poliestirè i de clorur de polivinil (PVC).	Sí	Reconegut	UE3

Plaguicides

Aldrin	Organoclorat	Estrògens	Insecticida.	Sí	Probable	UE3
Atrazina	Triazina	Pituitària-neuroendocrina, Testosterona.	Herbícida.	Sí	Reconegut	UE3
<i>p, p'</i> -DDE	Organoclorat	Andrògens	Un dels principals productes de degradació del DDT.	Sí	Reconegut	UE4
DDT	Organoclorat	Estrògens	Insecticida.	Sí	Reconegut	UE3
2,4-diclorofenol	Fenol clorat	Estrògens	Intermediari en la síntesi d'herbicides organoclorats. També s'usa com herbícida.	-	Sospitós	UE2
Dieldrin	Organoclorat	Estrògens	Insecticida, producte de degradació.	Sí	Reconegut	UE3

Endosulfan	Organoclorat	Estrògens	Insecticida.	Sí	Reconegut	UE3
Endrín	Organoclorat	-	Insecticida, avicida.	-	Probable	UE3
Fenitrotió	Organofosforat	Antiandrògens	Insecticida.	Sí	-	UE4
Heptachlor	Organoclorat	Tiroides	Insecticida.	Sí	Probable	UE3
Hexaclorobenzè	Organoclorat	-	Microbiocida, fungicida i insecticida.	-	Probable	UE3
Lindà	Organoclorat	Estrògens/Andrògens	Insecticida, rodenticida.	Sí	Reconegut	UE3
Malatió	Organofosforat	Tiroides	Insecticida.	Sí	Sospitós	UE3
Pentaclorofenol	Fenol clorat	Tiroides	Insecticida pel control de les termites i protecció de la fusta.	Sí	Probable	UE4
Simazina	Triazina	-	Herbicida.	-	-	UE3
Vinclozolin	Dicarboximida	Androgen	Fungicida.	Sí	Probable	UE3

Industrial Chemicals

Adipat de bis(2-etilhexil)	Adipat	-	Plastificant en productes flexibles de PVC. També en lubricants i cosmètics.	-	Sospitós	UE4
Benzo(a)antracè	Hidrocarbur aromàtic policíclic	-	Subproducte de combustió en les petroquímiques.	-	-	UE4
Benzo(a)pirè	Hidrocarbur aromàtic policíclic	Andrògens	Subproducte de combustió en les petroquímiques.	Sí	Sospitós	UE4

Bisfenol A	Compost fenòlic	Estrògens	En la síntesis de plàstics policarbonats i reïnes epòxides, utilitzades en recobriments dentals i en envasos (principalment aliments en llauna).	Sí	Probable	UE3
Ftalat de benzilbutil	Ftalat ramificat	Estrògens	Plastificant pel polivinil i les reïnes de cel·lulosa.	Sí	Sospitós	UE3
Ftalat de di-n-butil	Ftalat lineal	Estrògens/ Andrògens	En plàstics (principalment en juguets), en cosmètics i en insecticides, entre d'altres.	Sí	Sospitós	UE3
Ftalat de dietil	Ftalat lineal	Estrògens	Plastificant en diversos productes com parts dels automòbils, joguines, plàstics per empaquetar aliments,... També com insecticides i en cosmètics (per fixar els perfums,...).	Sí	-	UE4
Ftalat de bis(2-etilhexil)	Ftalat ramificat	Estrògens/ Andrògens	Plastificant pel PVC, especialment en la fabricació de material mèdic.	Sí	Probable	UE3
Ftalat de di-n-pentil	Ftalat lineal	-	Plastificant en la nitrocel·lulosa i en laques de reïnes.	-	Sospitós	UE4

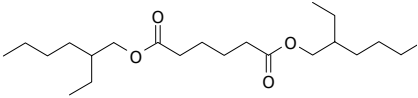
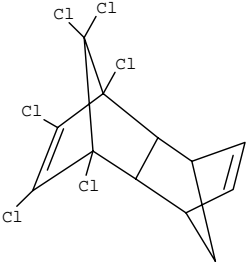
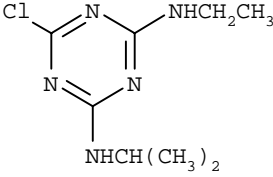
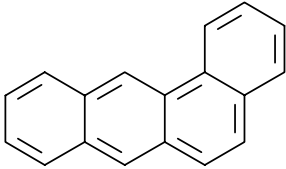
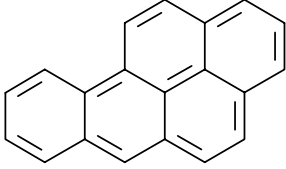
UE2: Taula 2 de l'Estratègia Comunitària (2001), substàncies amb evidència de ser ED, les quals no estan regulades ni a punt de ser incloses en la legislació Comunitària vigent.

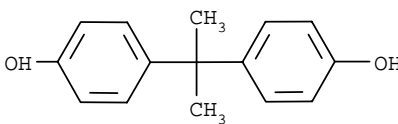
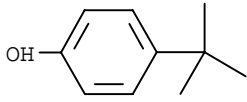
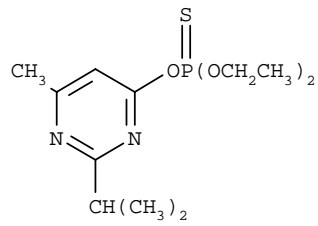
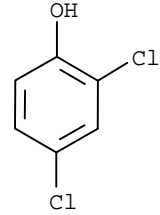
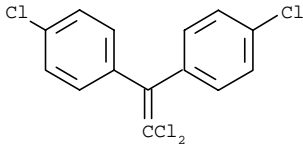
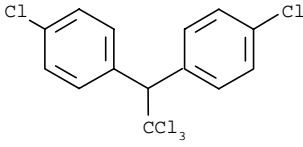
UE3: Taula 3 de l'Estratègia Comunitària (2001), substàncies amb evidència de ser ED o evidència potencial de ser ED, regulades o a punt de ser incloses en la legislació vigent.

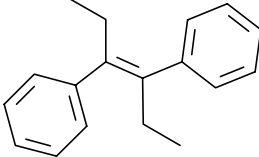
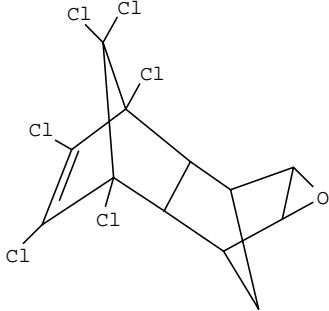
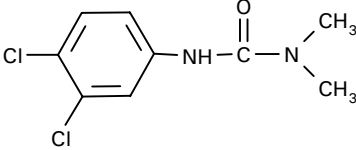
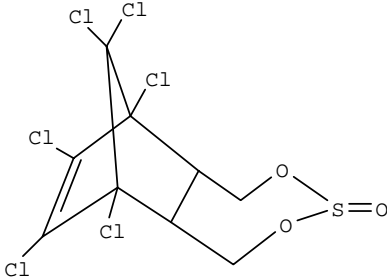
UE4: Taula 4 de l'Estratègia Comunitària (2001), substàncies de les quals no es tenen suficients dades.

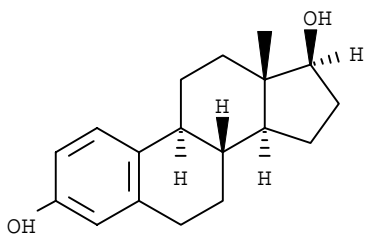
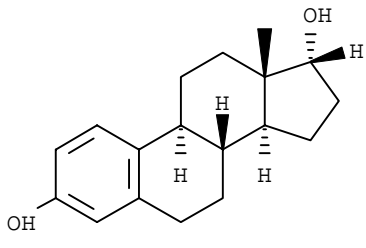
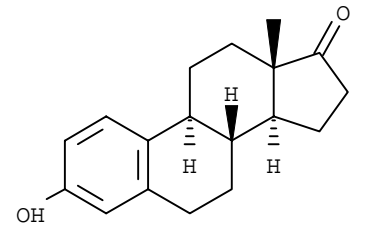
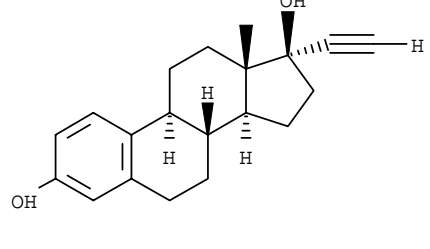
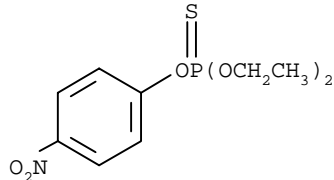
ANNEX II

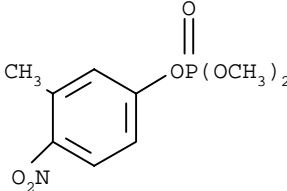
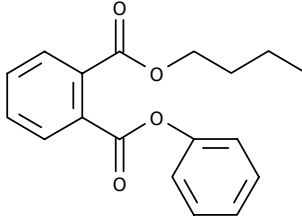
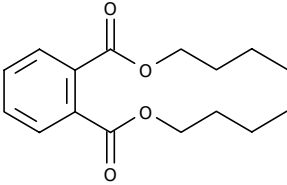
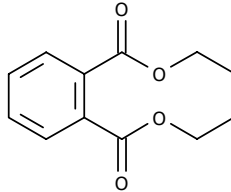
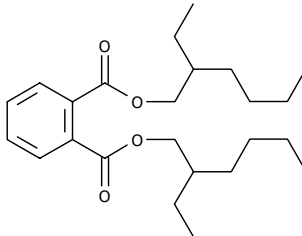
Estructura química dels compostos analitzats:

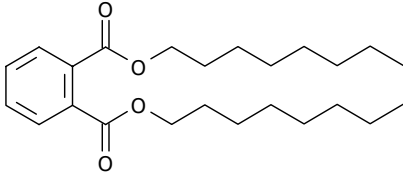
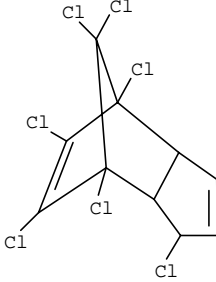
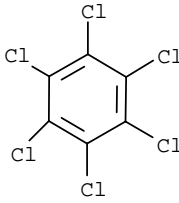
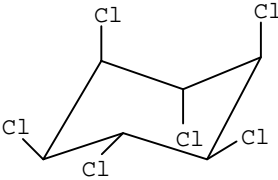
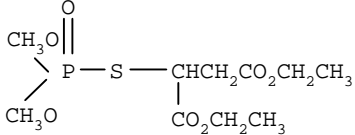
Nom	Família	Estructura
Adipat de bis(2-ethylhexil)	Adipat (plastificants)	
Aldrin	Plaguicida organoclorat	
Atrazina	Triazina	
Benzo[a]antracè	Hidrocarbur aromàtic policíclic	
Benzo[a]pirè	Hidrocarbur aromàtic policíclic	

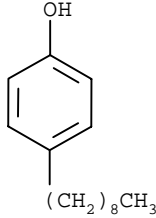
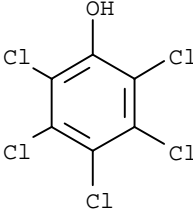
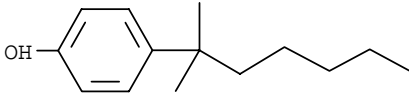
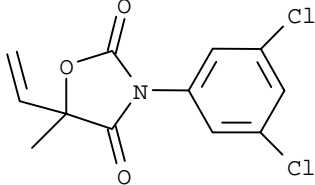
Nom	Família	Estructura
Bisfenol A	Compost fenòlic	
4- <i>tert</i> -butilfenol	Compost fenòlic	
Diazinó	Plaguicida organofosforat	
2,4-diclorofenol	Compost fenòlic	
<i>p,p'</i> -DDE	Plaguicida organoclorat	
<i>P,p'</i> -DDT	Plaguicida organoclorat	

Nom	Família	Estructura
Dietilestilbestrol (DES)	Esteroid	
Dieldrin	Plaguicida organoclorat	
Diuron	Triazina	
α -endosulfan	Plaguicida organoclorat	

Nom	Família	Estructura
17 α -estradiol	Esteroid	
17 β -estradiol	Esteroid	
Estrona	Esteroid	
17 α -etinilestradiol	Esteroid	
Etil-paratió	Plaguicida organofosforat	

Nom	Família	Estructura
Fenitrotió	Plaguicida organofosforat	
Ftalat de benzilbutil (BBP)	Ftalats (plastificants)	
Ftalat de di-n-butil (DnBP)	Ftalats (plastificants)	
Ftalat de dietil (DEP)	Ftalats (plastificants)	
Ftalat de bis(2-etilhexil) (DEHP)	Ftalats (plastificants)	

Nom	Família	Estructura
Ftalat de di-n-octil (DnOP)	Ftalats (plastificants)	
Heptaclor	Plaguicida organoclorat	
Hexaclorobenzè	Plaguicida organoclorat	
Lindà	Plaguicida organoclorat	
Malatió	Plaguicida organofosforat	

Nom	Família	Estructura
4-nonilfenol	Compost fenòlic	
Pentaclorofenol	Plaguicida organoclorat	
4- <i>tert</i> -octilfenol	Compost fenòlic	
Vinclozolin	Plaguicida organoclorat	

ANNEX III

Abreviatures utilitzades en la present tesi:

AED:	Detector d'emissió atòmica
APCI:	Ionització química a pressió atmosfèrica
AP ₁ EC:	Àcid alquilfenoxiacètic o Alquilfenol monocarboxilat
AP ₂ EC:	Àcid alquilfenoxietoxiacètic o Alquilfenol dicarboxilat
APEOs:	Alquilfenols etoxilats
API:	Ionització a pressió atmosfèrica
APs:	Alquilfenols
BBP:	Ftalat de butilbenzil
4- <i>t</i> -BP:	4- <i>tert</i> -butilfenol
BPA:	Bisfenol A
BSTFA:	N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CE:	Electroforesi capil·lar
CI:	Ionització química
CID:	Dissociació induïda per col·lisió
CLLE:	Extracció líquid-líquid en continu
CWX-DVB:	Carbowax-divinilbenzè
CZE:	Electroforesi capil·lar per zones
DAD:	Detector de diodes en fila
DnBP:	Ftalat de di-n-butil
DEHP:	Ftalat de bis(2-etilhexil)
DES:	Dietilestilbestrol
DEP:	Ftalat de dietil
DI-SPME:	Microextracció en fase sòlida per immersió directa
DMP:	Ftalat de dimetil
DnOP:	Ftalat de di-n-octil
ECD:	Detector de captura electrònica
EDs:	Alteradors endocrins
EDARs:	Estacions depuradores d'aigües residuals
EDCs:	Compostos alteradors del sistema endocrí

EDSP:	Programa d'Investigació d'alteradors endocrins
EDSTAC:	Comitè <i>Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory</i>
EEDs:	Alteradors Endocrins Mediambientals
EI:	Impacte electrònic
ELISA:	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELRA:	<i>Enzyme-linked receptor assay</i>
EPA:	Agència de Protecció Ambiental
ER:	Receptor estrogènic
ESI:	Ionització per electroesprai
EU:	Unió Europea
FCSE:	Evaporació parcial del solvent
FD:	Detector fluorimètric
FIA:	Anàlisi per injecció de flux
FID:	Detector d'ionització de flama
FPD:	Detector fotomètric de flama
FQPA:	<i>Food Quality Protection Act</i>
GC:	Cromatografia de gasos
GCB:	Carbó negre grafititzat
HFB:	Àcid heptafluorobutíric
HPLC:	Cromatografia de líquids d'alta resolució
HS-SPME:	Microextracció en fase sòlida d'espai de cap
LD:	Desorció líquida
LLE:	Extracció líquid-líquid
LLME:	Microextracció líquid-líquid
LPME:	Microextracció en fase líquida
LOD:	Límit de detecció
LOEL:	<i>Low Observed Effect Levels</i>
LVI:	Injecció de grans volums
MAC:	Concentració màxima permesa
MEEKC:	Cromatografia capil·lar micel·lar de microemulsió electrocinètica
MEKC:	Cromatografia capil·lar micel·lar electrocinètica
MIPs:	Polímers d'empremta molecular

MMLLE:	Extracció líquid-líquid amb membrana microporosa
MS:	Espectrometria de masses
MTBSTFA:	N-(<i>tert</i> -butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida
MWNTs:	Nanotubs amb múltiples capes d'àtoms de carboni en les seves parets
NCI:	Ionització química negativa
NI:	Mode negatiu d'ionització
4-NP:	4-nonilfenol
NPD:	Detector de nitrogen-fòsfor
NP ₁ EC:	Nonilfenol monocarboxilat
NP ₁ EO:	Nonifenol monoetoxilat
NP ₂ EO:	Nonifenol dietoxilat
NPEO:	Nonilfenol etoxilat
OCDE:	Organització per la Cooperació i el Desenvolupament Econòmic
4- <i>t</i> -OP:	4- <i>tert</i> -octilfenol
OSPAR:	Comissió del Conveni Oslo-París
PAEs:	Dièster d'ftalat
PAHs:	Hidrocarburs aromàtics policíclics
PAN:	<i>Pesticide Action Network</i>
PB:	Interfase de feix de partícules
PCBs:	Bifenil policlorats
PCI:	Ionització química positiva
PCSE:	Evaporació total del solvent
PDMS:	Polidimetilsiloxà
PDMS-DVB:	Polidimetilsiloxà-divinilbenzè
PI:	Mode positiu d'ionització
PNUMA:	Programa de les Nacions Unides pel Medi Ambient
POPs:	Contaminants orgànics persistents
PS-DVB:	Poliestirè-divinilbenzè
PTV:	Injecteur vaporitzador a temperatura programada
PVC:	Clorur de polivinil
RIA:	<i>Radioimmunoassay</i>

RYA:	<i>Recombinant yeast assay</i>
SARs:	Tests que estudien la relació entre l'estructura i l'activitat
SBSE:	Extracció per sorció amb barres magnètiques agitadores
SCTEE:	<i>Scientific Committee for Toxicity, Ecotoxicity and the Environment</i>
SDWA:	<i>Safe Drinking Water Act</i>
SIM:	Monitorització de l'ió seleccionat
SPE:	Extracció en fase sòlida
SPME:	Microextracció en fase sòlida
TBT:	Tributilestany
TD:	Desorció tèrmica
TEA:	Trietilamina
TFA:	Àcid de trifluoroacetil
TSP:	Interfase de termoesprai
UNECE:	Comissió Econòmica per Europa de les Nacions unides
UV:	Ultravioleta
VTG:	Precursor proteic Vitellogenin
YES:	<i>Yeast recombinant assay</i>

ANNEX IV

Els articles 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:

- L. Brossa, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *Analytical methods for the determination of endocrine disruptors in aqueous environmental samples*, Trends Anal. Chem. (pendent de publicació) (apartat I.2.6).
- L. Brossa, R.M. Marcé, F. Borrull, E. Pocurull, *Application of on-line solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry to the determination of endocrine disruptors in water samples*, J. Chromatogr. A 963 (2002) 287-294 (apartat II.1).
- L. Brossa, R.M. Marcé, F. Borrull, E. Pocurull, *Determination of endocrine-disrupting compounds in water samples by on-line solid-phase extraction-programmed-temperature vapourisation-gas chromatography-mass spectrometry*, J. Chromatogr. A 998 (2003) 41-50 (apartat II.2).
- L. Brossa, R.M. Marcé, F. Borrull, E. Pocurull, *Determination of endocrine disruptors in environmental water samples by stir bar sorptive extraction-liquid desorption-large volume injection-gas chromatography*, Chromatographia (acceptat) (apartat II.3).
- L. Brossa, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *A rapid method for determining phenolic endocrine disruptors in water samples*, Chromatographia 56 (2002) 573-576 (apartat II.4).
- L. Brossa, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *Solid-phase extraction/High-Performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry to determine endocrine disruptors in water samples*, Chromatographia 59 (2004) 419-423 (apartat II.5).
- L. Brossa, R.M. Marcé, F. Borrull, E. Pocurull, *Occurrence of twenty-six endocrine-disrupting compounds in environmental*

water samples from Catalonia, Spain, Environ. Tox. Chem. 24 (2005) (acceptat) (apartat II.6).

- L. Brossa, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *Occurrence of endocrine-disrupting compounds in water samples from sewage treatment plants*, Environ. Tox. Chem. (pendent de publicació) (apartat II.7).