

**Autor:** Oriol Baltrons Rosell

**Títol:** Determinació d'hidrocarburs Aromàtics Policíclics (PAHs) en postres de Sòls per Cromatografia de Gasos acoblada a l'Espectrometria de Masses (GC/MS)

**Any d'elaboració:** Setembre 2010

**Directors del treball:** Cristina Palet Ballús i Montserrat López Mesas

**Tipus de treball:** Iniciació a la Recerca i Treball i fi de màster

**Titulació:** Llicenciat en ciències químiques

**Departament:** Departament de Química Analítica.

**Paraules clau:** Hidrocarburs Aromàtics Policíclics (PAHs), Cromatografia de gasos, Espectrometria de masses, Sòls contaminats, Purificació, Extracció Soxhlet

### **Resum explicatiu**

Aquest treball de recerca es basa en la posta a punt d'un mètode d'anàlisi d'Hidrocarburs Aromàtics Policíclics (PAHs) mitjançant la Cromatografia de Gasos acoblada a l'Espectrometria de Masses (GC/MS).

S'exposen els passos a realitzar feta la presa de mostra fins l'expressió final dels resultats. Això comprèn l'extracció Soxhlet inicial dels PAHs, una purificació posterior a partir tant de l'extracció en fase sòlida (SPE) amb una fase C18 com la cromatografia en columna utilitzant gel de sílice. Finalment, s'han determinat els paràmetres influents en la separació, identificació i quantificació amb relació a la cromatografia de gasos i l'espectrometria de masses.

## RESUM

La importància dels Hidrocarburs Aromàtics Policíclics (PAHs) com a contaminants ha estat sempre en debat. Des del moment en què no compleixen els requeriments de persistència, toxicitat i transport a llargues distàncies, no es consideren contaminants orgànics persistents (POPs). En conseqüència, no es troben inclosos dins la llista dels *dirty dozen* de la Convenció d'Estocolm sobre POPs. A més, ja que el seu alliberament no és intencionat, algunes veus han plantejat la possibilitat d'eliminar o reduir la quantitat d'aquests compostos a l'atmosfera i que arriben també, per deposició, al sòl, sediments, aigües, etc. Tanmateix, segons el Protocol firmat pel Comitè Estats Units-Europa (UNECE), els PAHs haurien d'haver estat inclosos a aquesta llista ja que són productes químics les emissions dels quals haurien de ser minimitzades o previngudes.

És per això i l'interès pel medi ambient que dins el projecte *Estudi de la influència de contaminants orgànics (BTEX i PAHs) en la mobilitat de metalls pesants en sòls*, al qual es vol entendre quin és el mecanisme de transport dels metalls pesants en presència d'aquests contaminants, enfocat sobretot als marges de les carreteres per la combustió de gasolines i l'exhaust dels vehicles, que es justifica aquest treball de recerca.

Aquest treball de recerca es basa en la posta a punt d'un mètode d'anàlisi de PAHs mitjançant la Cromatografia de Gasos acoblada a l'Espectrometria de Masses (GC/MS). Cadascun dels mètodes seguits estan reportats a la *Environmental Protection Agency* dels Estats Units (US EPA), però tot i així cal fer la optimització, realitzant o no, lleus modificacions d'aquests per ajustar-nos a les nostres necessitats específiques.

En aquest treball de recerca s'exposen els diferents passos a realitzar un cop feta la presa de mostra fins l'expressió final dels resultats un cop identificats i quantificats els PAHs d'interès presents en una matriu de sòl. Això comprèn la seva extracció inicial mitjançant el Soxhlet, un *cleanup* posterior a partir tant de l'extracció en fase sòlida (SPE) amb una fase C18 com la cromatografia en columna utilitzant gel de sílice com a adsorbent. Finalment, s'han determinat els paràmetres influents en la separació, identificació i quantificació dels PAHs amb relació a la cromatografia de gasos i la seva detecció per espectrometria de masses.

## ÍNDEX

<b>1.- INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.- Propietats físiques i químiques dels PAHs</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2.- Toxicitat</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3.- Fonts d'emissió dels PAHs</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4.- Antecedents</b> .....	<b>5</b>
<b>1.5.- Cromatografia de Gasos acoblada a l'Espectrometria de Masses (GC/MS)</b> .....	<b>6</b>
<b>2.- OBJECTIUS</b> .....	<b>8</b>
<b>3.- PART EXPERIMENTAL</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1.- Reactius i equips</b> .....	<b>9</b>
3.1.1.- Reactius .....	9
3.1.2.- Equips.....	10
<b>3.2.- Preparació dels patrons</b> .....	<b>10</b>
<b>3.3.- Procediment Experimental</b> .....	<b>11</b>
3.3.1.- Extraccions .....	12
3.3.1.1.- <i>Extracció Soxhlet</i> .....	12
3.3.2.- Purificació ( <i>cleanup</i> ).....	14
3.3.2.1.- <i>Cleanup mitjançant cartutxos d'extracció en fase sòlida (SPE)</i> .....	14
3.3.2.2.- <i>Cleanup mitjançant gel de sílice com a adsorbent en columna de vidre</i> .....	15
3.3.3.- Cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses (CG/MS).....	16
<b>4.- RESULTATS I DISCUSSIÓ</b> .....	<b>18</b>
<b>4.1.- Cromatografia de gasos acoblada a la detecció de masses (CG/MS)</b> .....	<b>18</b>
<b>4.2.- Purificació (<i>cleanup</i>)</b> .....	<b>22</b>
4.2.1.- Cleanup mitjançant cartutxos d'extracció en fase sòlida (SPE).....	22
4.2.2.1.- <i>Avaluació de la velocitat de càrrega de la mostra als cartutxos d'extracció en fase sòlida</i> .....	24
4.2.2.- Cleanup mitjançant gel de sílice com a adsorbent en columna de vidre.....	26
<b>4.3.- Extracció Soxhlet i purificació (<i>cleanup</i>)</b> .....	<b>27</b>
<b>5.- CONCLUSIONS</b> .....	<b>29</b>
<b>6.- BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>31</b>
<b>7.- ANNEXOS</b> .....	<b>33</b>

## 1.- INTRODUCCIÓ

Els hidrocarburs aromàtics policíclics, (*Polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAHs) constitueixen un ampli ventall de substàncies carcinògenes i es troben al medi ambient. Són un tipus de compostos orgànics produïts per la combustió incompleta en processos d'altres temperatures o pressions [1].

Estan constituïts, principalment, per tres o més anells de benzè fusionats, contenint només carboni i hidrogen. Les diferències de configuració dels diferents anells és el que confereix les propietats característiques que els diferencia uns dels altres. Es troben presents a l'aire, aigua, sòls i al menjar, i segueix sent un important problema analític la seva identificació i determinació acurades.

Es coneixen amb molts noms diferents: Matèria Orgànica Policíclica (POM), Hidrocarburs Aromàtics Polinuclears, Aromàtics Polinuclears (PNAs) i Hidrocarburs Polinuclears.

De tots ells, la US EPA va identificar una llista de 16 PAHs com a contaminants prioritaris [2] per seguir-ne un control degut als efectes que poden tenir sobre els ésser humans i el medi ambient. No se solen trobar de forma individual sinó com a mesclades de PAHs. Aquests 16 es poden veure a la la Figura.1.

### **1.1.- PROPIETATS FÍSQUES I QUÍMIQUES DELS PAHs**

Les propietats físiques i químiques dels PAHs venen determinades principalment pel sistema electrònic alfa-conjugat que posseeixen, el qual varia força regularment amb el nombre d'anells i la massa molecular. A temperatura ambient, els PAHs són sòlids. Les característiques generals són alts punts de fusió i ebullició, baixa pressió de vapor i molt poca solubilitat en aigua (naturalment lipofílica). Els PAHs són solubles en diferents dissolvents orgànics. La seva solubilitat en aigua disminueix en augmentar la massa molecular [3].

Els PAHs són químicament estables i no es degraden fàcilment per hidròlisi. En presència de llum són susceptibles de patir oxidacions i fotodegradacions. Quan reaccionen, donen lloc a dos tipus de reaccions: substitucions electrofíliques i addicions [4].

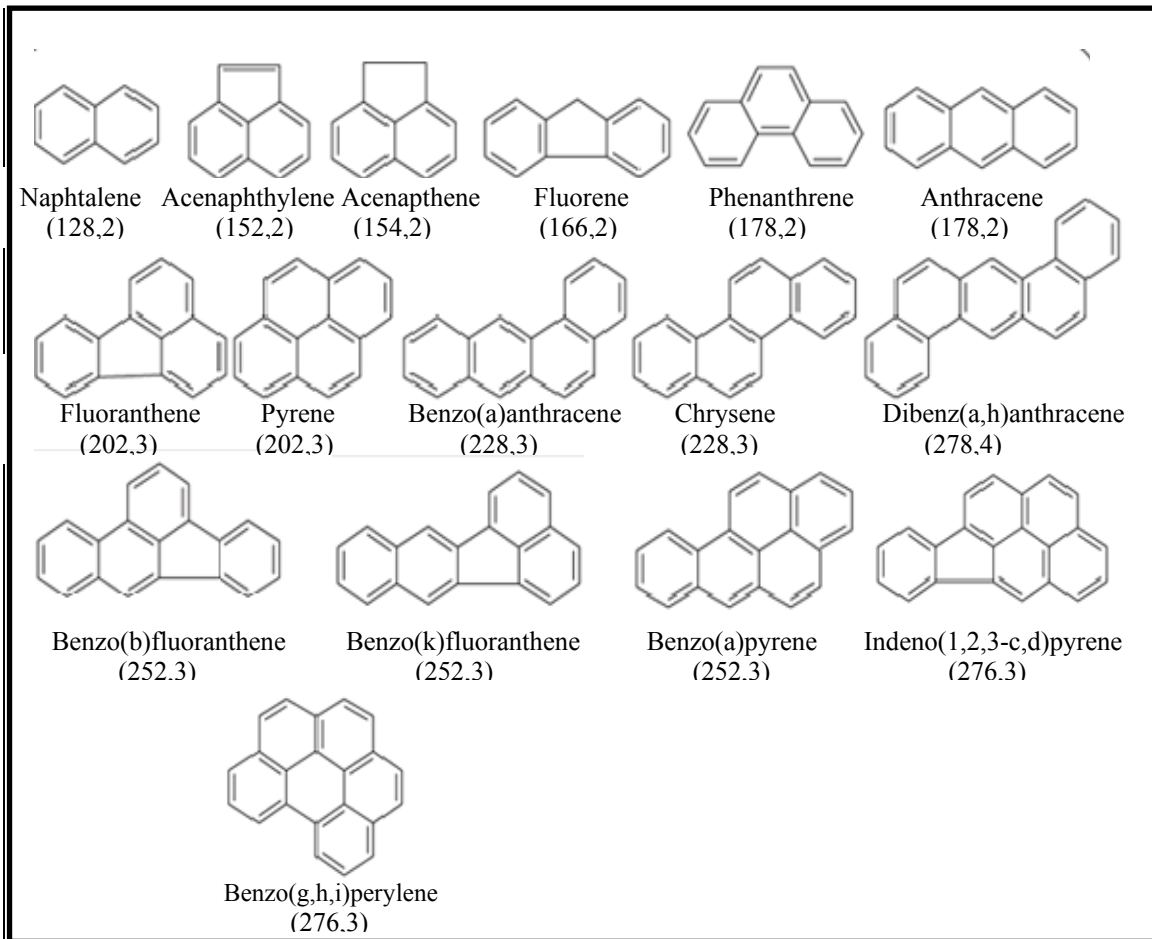


Figura 1. Estructures dels 16 PAHs que la US EPA classifica com a contaminants prioritaris (entre parèntesi s'indica el pes molecular)

Com que aquest darrer tipus de reacció destrueix el caràcter aromàtic de l'anell de benzè afectat, els PAHs tendeixen a formar derivats per la reacció anterior, sovint seguida d'eliminació, resultant en una substitució neta.

La fotodescomposició en presència d'aire i llum del sol forma diferents productes oxidats, incloent quinones i endoperòxids. Els PAHs reaccionen amb òxids de nitrogen i àcid nítric per formar nitroderivats; també amb òxids de sofre i àcid sulfúric (en solució) per formar àcids sulfínic i sulfònic. Hi ha poca informació sobre les reaccions dels PAHs en aliments. En ser compostos estables, s'assumeix que també ho són en les diferents matrius dels aliments [5].

Alguns autors creuen que la interacció entre el pla molecular dels PAHs i la fase estacionària quan es parla de cromatografia pot entendre's com una acció de fricció o adsorció, relacionat amb la superfície molecular [6]. Segons el mecanisme d'interacció dels PAHs en columnes capil·lars en cromatografia de gasos, com més gran és el pla molecular,

més forta és la interacció i més gran el temps de retenció. De fet, es coneix que l'estructura molecular dels PAHs és gairebé plana, tancada i formant un sistema  $\pi$ -conjugat. Tanmateix, no tots els plans influeixen a la retenció en cromatografia. Alguns autors creuen que només tenen influència sobre la retenció la part principal de la molècula que actua amb el pla de la fase estacionària, aquesta superfície l'anomenen superfície del sistema pseudo-conjugat, utilitzant-la, amb resultats interessants per predir el comportament en l'elució dels PAHs [6].

## 1.2.- TOXICITAT

Els efectes sobre la salut dels PAHs s'han estudiat intensament durant els darrers anys. Tanmateix, no es coneix exactament quin és l'efecte de cadascun d'ells ja que un sol compost pot tenir diferents efectes a la salut. D'entre tots els PAHs, sobre el que s'ha focalitzat més atenció ha estat el *Benzo(a)pyrene*. [7].

Tant els humans com la vida animal no es veuran mai exposats a un sol PAH sinó a una mescla d'ells. Els estudis en animals han demostrat que els PAHs poden causar efectes nocius a la pell, fluids corporals i al sistema immunitari després d'una exposició prolongada, sobretot a mescles complexes d'aromàtics, alquil PAHs, benzens i alquilbenzens, derivant finalment en càncer [7]. Els PAHs es transformen en tots els teixits del cos en diferents substàncies. Algunes d'aquestes són més nocives i d'altres menys que el PAH original.

Per altra banda, alguns estudis epidemiològics han detectat un augment en càncer de pulmó en humans després d'haver estat exposats a emissions dels forns industrials i al fum del tabac, on suposadament hi ha grans quantitats de PAHs [8]. En conseqüència, el *Benzo(a)pyrene* ha estat classificat com a probable carcinogen humà (Grup B2) per la USEPA (2002). A part d'aquest, uns altres 6 PAHs han estat considerats també carcinògens. A la Taula 1 es pot veure una classificació segons toxicitat de la *International Agency for Research on Cancer* (IARC) [9] juntament amb els límits d'emissió permesos a Espanya segons el *Real Decreto Español 9/2005*.

Taula 1. Toxicitat (classificació de la IARC) i límits d'emissió (pel Real Decreto 9/2005) dels 16 PAHs que la US EPA considera com a contaminants prioritaris

Hidrocarbur	Grup*	Límits d'emissió Real Decreto 9/2005 (mg/kg pes sec)[10]
<i>Naphtalene</i>	2B	1
<i>Acenaphthylene</i>	3	No especificat
<i>Acenaphthene</i>	4	6
<i>Fluorene</i>	3	5
<i>Phenanthrene</i>	3	No especificat
<i>Anthracene</i>	3	45
<i>Fluoranthene</i>	3	8
<i>Pyrene</i>	3	6
<i>Chrysene</i>	3	20
<i>Benzo(a)anthracene</i>	2A	0,2
<i>Benzo(k)fluoranthene</i>	2B	2
<i>Benzo(b)fluoranthene</i>	2B	0,2
<i>Benzo(a)pyrene</i>	2A	0,02
<i>Indeno(1,2,3-c,d)pyrene</i>	2B	0,3
<i>Dibenz(a,h)anthracene</i>	2A	0,03
<i>Benzo(g,h,i)perylene</i>	3	No especificat

1: Carcinogen pels humans; 2A: probablement carcinogen pels humans; 2B: Possible carcinogen pels humans; 3: No classificable com a carcinogen pels humans; 4: Probablement no carcinogen pels humans.

### 1.3.- FONTS D'EMISSIÓ DELS PAHs

Els PAH es formen com a subproductes de processos de combustió incompleta. Al medi ambient, l'exposició més probable als PAHs és a través dels seus vapors o bé es troben units a la pols i d'altres partícules a l'aire. A l'aire hi arriben principalment pels incendis forestals i els volcans, encara que últimament han guanyat terreny les contribucions antropogèniques [11]. Fins i tot, la crema de carbó en barbacoes s'ha vist que és la font més important d'emissió de *Benzo(a)pyrene* a l'atmosfera. D'altres fonts antropogèniques són el fum del tabac, els escapaments dels vehicles, l'asfalt de la carretera, crema d'agricultures, incineracions municipals i zones d'abocament de residus perillosos [2].

Al sòl i en aigües hi arriben per la deposició atmosfèrica, tot i que els efluent de les refineries i l'escapament dels vehicles també hi contribueix. De fet, les fonts mòbils són aproximadament el 20 % del total dels PAHs alliberats a l'atmosfera, i els principals contribuïdors són els escapaments dels vehicles [12], podent per tant penetrar a l'organisme a través dels pulmons en respirar l'aire que en conté [13].

Els PAHs també es poden trobar en aliments tals com cereals, gra, pa, vegetals, fruita, carn, llet de vaca contaminada, etc. Cuinar carn o altres menjars a altes temperatures, per exemple, rostint a la graella, incrementa la quantitat de PAHs al menjar [12].

#### 1.4.- ANTECEDENTS

Les primeres publicacions sobre PAHs van ser realitzades per Percival Pott el 1775, basades en estudis dels productes de combustió com ara el sutge. La primera identificació d'un carcinogen específic va ser realitzada per Kennaway i Hieger el 1930, identificant el *dibenz(a,h)anthracene* com el primer compost químic amb activitat carcinògena reconeguda [3]. Les mostres reals contenen una mescla extremadament complexa de molts PAHs diferents, incloent isòmers, i formes alquilades i no alquilades.

A partir d'aquestes primeres identificacions, s'han realitzat una gran quantitat important d'estudis sobre com determinar la presència d'aquests compostos en matrius més o menys complexes, en medis com l'aigua [14] (residuals, superficials, subterrànies, de consum), l'aire [15] (exteriors, interiors i interiors amb presència de fum del tabac), sòls [16] (rural, urbà, carreteres), entre d'altres, conclouent la majoria de treballs que on es troba més presència d'aquests contaminants és, sens dubte, als marges de les carreteres.

A l'hora de voler determinar aquest tipus d'analit, així com en qualsevol altre procediment de determinació analítica, hi ha una sèrie de passos: el mostreig, l'avaluació de les diferents etapes del procés a seguir (percentatges de recuperació de cada etapa, paràmetres com el límit de detecció, quantificació, rang lineal, etc.) i finalment la interpretació i expressió dels resultats obtinguts.

Els PAHs en mostres sòlides com ara partícules en l'aire, sòls, sediments i menjar, s'han extret de la matriu tradicionalment mitjançant l'extracció Soxhlet, utilitzant gran varietat de solvents orgànics com ara diclorometà, acetona, hexà, toluè, etc. L'inconvenient principal és que requereix grans volums de solvents (250 – 400 mL) i molt de temps (8 – 24 hores) i, a més, de vegades, no s'aconsegueix la recuperació completa dels PAHs, sobretot dels de pes molecular més elevat. Per això hi ha d'altres mètodes que també s'utilitzen per tal finalitat com ara l'extracció mitjançant ultrasons [17,18], l'extracció amb fluids supercrítics (SFE)



[19], l'extracció accelerada per solvent (ASE) [20,21] i l'extracció assistida per microones (MAE). Aquests mètodes redueixen el temps d'extracció i la quantitat de solvent a emprar . Els PAHs de mostres aquoses tradicionalment es recuperaven mitjançant l'extracció líquid-líquid (LLE) amb solvents orgànics com hexà, diclorometà, cloroform, etc.) [22].

Com que les mostres ambientals solen contenir interferents i tan sols traces dels PAHs d'interès, és necessari dur a terme procediments de concentració i *cleanup* abans de fer l'anàlisi cromatogràfica, com ara la cromatografia en columna utilitzant alúmina, gel de sílice [23], Florisil® [24], com a adsorbents, o també l'extracció en fase sòlida amb fase C8 o C18 [25,26,27]. En la gran majoria de casos, el pretractament de mostra és el pas crític a l'hora d'obtenir resultats quantitius rellevants.

Finalment la forma més habitual per a la seva determinació ha estat la Cromatografia de gasos amb detecció d'ionització de flama (GC/FID) així com acoblat a l'espectrometria de masses (GC/MS) [28], o la cromatografia de líquids amb detecció de fluorescència (LC) [29].

### **1.5.- CROMATOGRAFIA DE GASOS ACOBLADA A L'ESPECTROMETRIA DE MASSES (GC/MS)**

La cromatografia de gasos i l'espectrometria de masses són realment dues tècniques combinades per formar un sol mètode d'anàlisi de mescles de compostos químics. La cromatografia de gasos (GC) separa els components de la mescla segons la seva volatilitat, o segons la facilitat que tenen per evaporar-se i l'espectrometria de masses (MS) caracteritza cadascun d'ells de manera individual a partir de la seva estructura química. La combinació d'aquestes dues tècniques permet estudiar una solució amb diferents components de manera qualitativa i quantitativa [30].

Les aplicacions de la GC/MS són variis. S'utilitza àmpliament en medicina, farmacologia, medi ambient, etc.

Com podem veure a la Figura 2, la mostra és introduïda (injectada) a la fase mòbil (gas portador) que pot ser heli, nitrogen, hidrogen. Aquest condueix la mostra a través de la columna cromatogràfica la qual conté l'anomenada fase estacionària, que sol ser un/s compost/s que interacciona selectivament amb els components de la mescla [31].

La columna es troba dins un forn que pot ésser programat per augmentar la temperatura de forma gradual (rampes de temperatura). Això facilita la separació. A mesura que la temperatura augmenta, aquells compostos amb punts d'ebullició més baixos elueixen abans que els que tenen punts d'ebullició més alts.

Si les condicions del mètode d'anàlisi (temperatura del forn, tipus de columna, etc.) són les mateixes, un compost concret sempre eluirà al voltant del mateix temps de retenció. Això ens pot servir per identificar els diferents compostos en una matriu complexa (anàlisi qualitativa). De totes maneres, cal tenir en compte que els compostos amb propietats similars sovint tenen temps de retenció molt similars. Per això cal més informació per poder fer la descripció d'una mostra desconeguda [32].

A mesura que els components elueixen de la columna, entren al detector de masses on pateixen una ionització. Són bombardejats per un feix d'electrons que els fragmenta en moltes unitats de diferents mides de la molècula original. Aquests fragments són ions carregats amb una massa concreta. Com que la majoria de fragments tenen càrrega +1, la relació massa/càrrega ( $m/z$ ) representa normalment el pes molecular del fragment. El senyal, proporcional a la concentració de la mostra, és processat per un ordinador. El temps entre el moment de la injecció i el moment de l'elució s'anomena temps de retenció.

Un grup de 4 electroimants anomenat quadrupol orienta els fragments a través d'una obertura cap al detector. El quadrupol està programat de manera que només una certa massa passi a través d'aquesta obertura i la resta col·lisiona contra les parets.

Finalment, el detector fa el recompte del nombre d'ions d'una massa específica. Aquesta informació s'envia a un ordinador per tal d'obtenir l'espectre de masses [31,32].

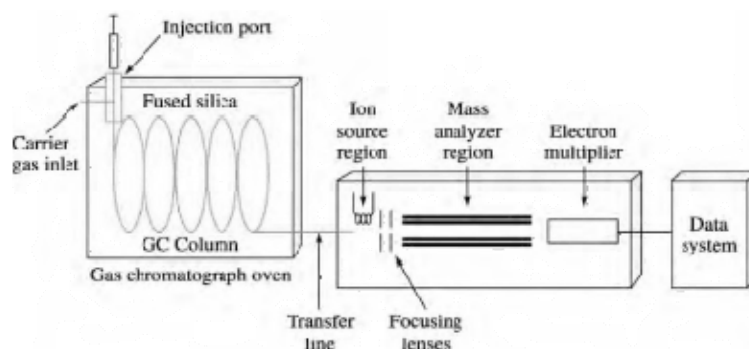


Figura 2. Representació del sistema de GC/MS

## **2.- OBJECTIUS**

L'objectiu principal del treball és la posta a punt d'un mètode adequat per a la determinació dels PAHs en mostres de sòls mitjançant la cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses. Això es podrà aconseguir a partir dels següents objectius específics:

- Coneixement de tècniques de preparació i tractament de mostres sòlides, així com aprofundiment en tècniques d'anàlisi cromatogràfiques (tan cromatografia en columna, com de gasos acoblada a diferents tipus de detectors).
- Avaluació de les diferents etapes del pretractament de la mostra abans de la seva anàlisi cromatogràfica: extracció i purificació (*cleanup*). Determinar el percentatge de recuperació de cada etapa i seleccionar el pretractament més apropiat.
- Optimització d'un mètode de separació i identificació dels PAHs en mostres de sòls contaminats, a través de la tècnica GC/MS.
- Aprofundiment en l'avaluació dels resultats obtinguts mitjançant l'anàlisi estadística (per exemple, determinació dels paràmetres de la recta de calibrat com el rang lineal, límit de detecció, límit de quantificació, etc.).

### **3.- PART EXPERIMENTAL**

#### **3.1.- REACTIUS I EQUIPS**

##### **3.1.1.- Reactius**

Els PAHs que s'estudiaran són 6 dels 16 que la US EPA considera com a contaminants prioritaris. Aquests 6 són els següents: *Phenanthrene* (Phe), *Fluoranthene* (Fluo), *Pyrene* (Pyr), *Benz[a]anthracene* (BaA), *Chrysene* (Chry), *Benzo[b]fluoranthene* (BbF). S'han adquirit els patrons sòlids a Sigma Aldrich, Madrid (Espanya).

S'ha fet la selecció d'aquests 6 tenint en compte:

- Toxicitat: aquells que es consideren més tòxics
- Presència a les mostres reals (a partir de la bibliografia recopilada): els PAHs que s'han trobat en concentracions més altes en estudis de mostres de sòls.
- Límits d'emissió permesos pel *Real Decreto 9/2005* [10]: elecció dels més restringits.
- Preu dels patrons individuals: tenint en compte els anteriors punts, ha estat un compromís entre el que ens interessava i el preu dels mateixos.

Com a patró intern es va comprar el *Phenanthrene-d10* també a Sigma Aldrich, Madrid (Espanya).

Per a la validació dels mètodes d'extracció i purificació de mostres sòlides, s'ha fet servir un material de referència certificat (CRM), comprat a LGC Standards, *PAH in soil: Semi-VOAs in Soil CRM 115-100 Lot No: JC115* amb la composició de la Taula 2.

Els dissolvents emprats són: acetona (J.T. Baker, 99,5 %), aigua milliQ, benzè (SDS, 99,8 %), ciclohexà (Alfa Aesar, ACS 99+ %), diclorometà (Alfa Aesar, ACS 99,5 %), hexà (Alfa Aesar, *Environmental grade*, 99,5+ %), metanol (J.T. Baker, 99,8 %), pentà (Alfa Aesar, *HPLC Grade*, 99 % min) i 2-propanol (Sigma Aldrich, 99,8%).

Altres reactius utilitzats han estat la sílica gel 60 (PANREAC, 63-200 micres, per a cromatografia en columna), cartutxos de SPE C18 (Varian Bond Elut C18), sorra de platja

rentada (Panreac, Barcelona, Espanya), sulfat de sodi anhidre (Panreac, Barcelona, Espanya 99,0 %) i Heli BIP (puresa 99.9997 %, Carburos Metàlics S.A., Barcelona, Espanya).

Taula 2. Composició del CRM utilitzat com a mostra de sòl contaminat

<b>Compost</b>	<b>Valor referència (ppm)</b>	<b>S.D.</b>	<b>Interval de confiança</b>
<i>Anthracene</i>	[0,04]		
<i>Acenaphthene</i>	4,60	1,08	4,06 - 5,15
<i>Benzo(a)anthracene*</i>	12,10	2,67	10,8 - 13,3
<i>Benzo(b)fluoranthene*</i>	0,93	0,25	0,81 - 1,04
<i>Bis(2-ethylhexyl)phthalate</i>	[0,30]		
<i>Chrysene*</i>	16,80	4,96	14,5 - 19,0
<i>Dibenzofuran</i>	10,60	2,53	9,27 - 11,9
<i>Fluoranthene*</i>	22,10	4,75	19,8 - 24,5
<i>Fluorene</i>	13,00	3,65	11,4 - 14,6
<i>Naphthalene</i>	1,34	0,29	1,21 - 1,47
<i>Phenanthrene*</i>	0,08	0,01	0,07 - 0,09
<i>Pyrene*</i>	7,66	1,98	6,78 - 8,54

\* Són els compostos estudiats

### 3.1.2.- Equips

Estufa Memmert UM400, Schwabach (Alemanya)

Balança de precisió, model SBC-21, Scaltec, Heiligenstadt (Alemanya)

Columna de vidre Econocolum 25 cm x 1 cm I.D, Bio-Rad (Espanya)

Rotavapor Büchi R-200 (Suïssa)

Rotavapor Büchi RE111 (Suïssa)

Bomba peristàltica Minipuls 3, Gilson (USA)

Cromatògraf de gasos acoblat a espectrometria de masses de Thermo Fischer Scientific TRACE THERMO (USA)

Vacuum Manifold Vac Elut SPS 24 de VARIAN (USA)

### 3.2.- PREPARACIÓ DELS PATRONS

S'ha preparat un primer patró de 2000 ppm, en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - Benzè (1:1). A partir d'aquests un de 100 ppm en hexà. A partir d'aquest, també en hexà, es preparen els patrons de calibrat: 0,05; 0,1; 0,5; 1; 3; 5; 8; 11; 15; 20; 25 ppm. Això per tots els compostos, excepte pel patró intern (1 ppm en cada solució patró). El *Phenanthrene-d10* emprat com a patró intern es va

dissoldre en disulfur de carboni – acetona (1:4), segons les recomanacions de la US EPA, *Method 8270C: Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography / Mass Spectrometry (GC / MS)*. Aquest ampli rang de concentracions es va preparar per tres motius principalment:

- Intentar cobrir les concentracions més altes i més baixes (*Fluoranthene* i *Phenanthrene*, respectivament) que teòricament hi ha al CRM utilitzat per fer les anàlisis sense haver de fer cap dilució de la mostra.
- Estudiar d'aquesta manera el rang lineal d'una recta de calibrat a partir dels patrons purs dels PAHs.
- Estudiar el límit de detecció i quantificació, i veure si es pot arribar més enllà en la quantificació, que segons el mètode de la US EPA *Method 8270C: Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography / Mass Spectrometry (GC / MS)* és de 660 µg / kg (0,66 ppm en sòls) i així poder relacionar-lo amb els límits de la legislació vigent.

### 3.3.- PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

A la figura 3 s'esquematitzen les etapes del procediment analític associat a la determinació de PAHs en mostres de sòls contaminats, on es pot veure la seqüència analítica des que es fa la presa de mostra, passant per l'extracció dels PAHs (extracció Soxhlet), seguida de la purificació i, finalment, la determinació analítica mitjançant GC-MS.

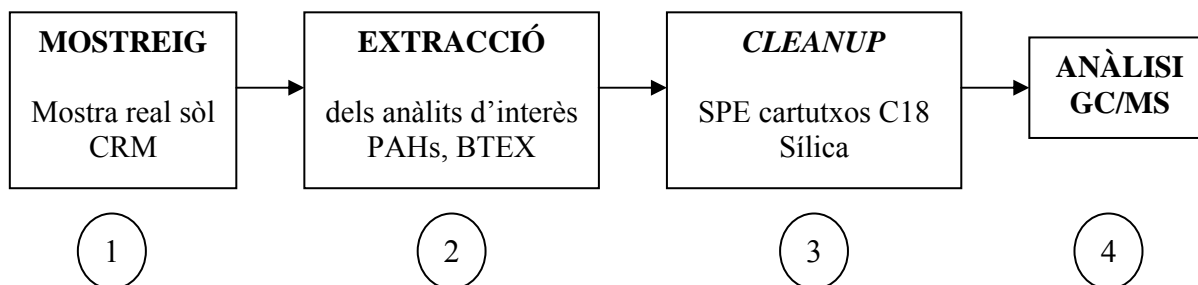


Figura 3. Esquematització de les diferents etapes del procediment analític per a l'anàlisi de PAHs en sòls contaminats.

### 3.3.1.- Extraccions

Per a poder determinar el contingut de PAHs en una mostra sòlida contaminada, és necessària l'extracció dels compostos de la seva matriu, prèviament al seu anàlisi quantitatiu mitjançant l'anàlisi per cromatografia de gasos acoblada a detecció de masses (GC/MS), En aquest cas, del CRM, que es presenta com una mostra de sòl contaminat de referència.

En aquest treball s'optà per l'extracció Soxhlet que, tot i tenir algun inconvenient com ara el gran consum de dissolvent, llarg temps d'operació i necessitat de tècnica addicional per tal de minimitzar el volum de mostra i eliminar part del dissolvent (rotavapor o destil·lació), es tracta d'una tècnica senzilla de dur a terme que, en general, presenta uns bons percentatges d'extracció i està molt estesa a molts laboratoris de recerca i d'anàlisi.

#### 3.3.1.1- Extracció Soxhlet

L'extracció Soxhlet permet extreure components d'una matriu sòlida, deixant enrere impureses insolubles. És el mateix dir que si un component en una mescla sòlida té una alta solubilitat en alguna matriu líquida, es pot utilitzar una extracció Soxhlet per aïllar-lo a aquesta nova matriu.

El muntatge d'un sistema Soxhlet es pot veure a la Figura 4. Dins del cos del Soxhlet (2) es col·loca una càpsula de cel·lulosa on s'introdueix la mostra sòlida (7). El solvent s'escalfa des del matràs de fons rodó (3). A mesura que bull, el condensador (1) el retorna en forma de degoteig cap al cos del Soxhlet. Això permet l'extracció dels components solubles de la mostra.

A mesura que el solvent va omplint el recipient, també es va omplint el sífo lateral (4) fins que vessa. És en aquest moment en què es dona el buidat del solvent (6) juntament amb l'extracte fins arribar al matràs de fons rodó de partida. Aquest cicle es repeteix a mesura que el solvent va bullint gràcies a la font de calor aportada mitjançant una manta elèctrica o bé una placa escalfadora (8).

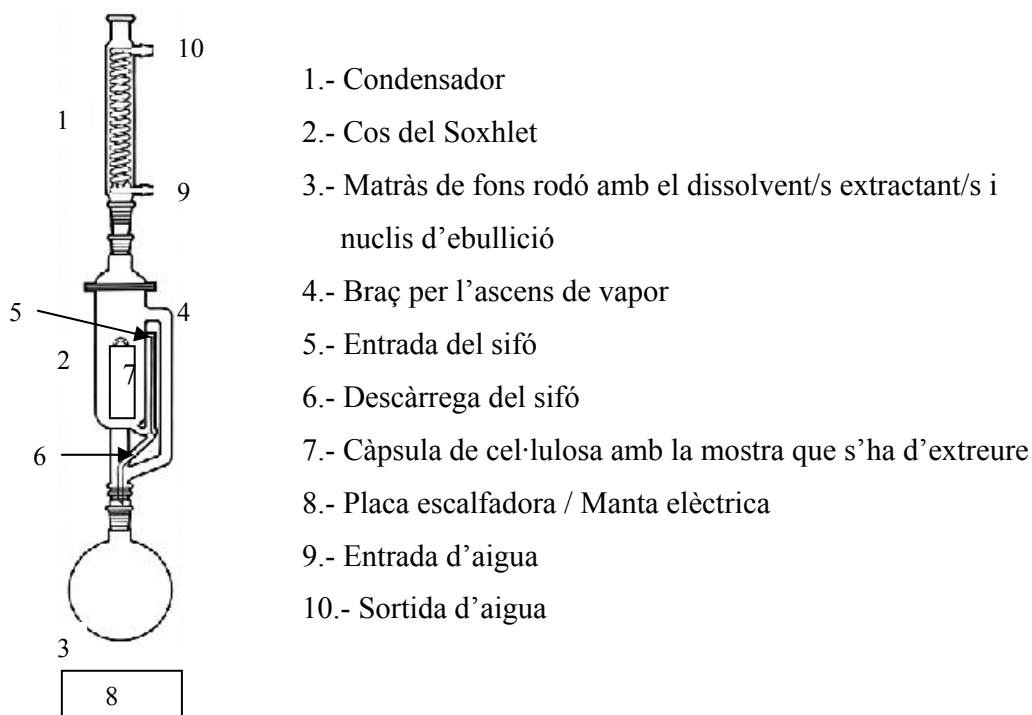


Figura 4. Muntatge experimental d'una extracció Soxhlet

L'extracció Soxhlet s'ha fet en les següents condicions seguint el mètode de la US EPA *Method 3540C: Soxhlet extraction*.

- Temps d'extracció entre 16 - 24 hores
- Mescla extractant: 200 mL hexà- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1)
- 2 replicats
- 4 – 5 cicles / hora

Preparació de la mostra dins del muntatge Soxhlet: En una càpsula de cel·lulosa prèviament tarada es pesen 2 grams de mostra (CRM) amb precisió analítica. Es cobreix la càpsula amb paper de filtre per tal d'evitar que es perdi la mostra en entrar en contacte amb el dissolvent de forma brusca. Així, enlloc de fer-ho de forma directa, aquest penetra a través de la càpsula de cel·lulosa, mullant i extraient els compostos solubles a la barreja de dissolvents emprada de la matriu complexa. Per tant es poden extreure no només els compostos d'interès sinó també altres compostos presents en la matriu que poden no ser del nostre interès, altrament dit impureses.

Un cop s'ha fet l'extracció durant el temps necessari es concentra l'extracte obtingut amb el rotavapor fins a un volum final d'entre 2 – 4 mL, els quals s'enrasen a 5 mL i es guarden a la nevera a 5 – 6 °C.



### 3.3.2.- Purificació (*cleanup*)

Tal i com s'ha comentat anteriorment, les mostres provinents de l'extracció Soxhlet, poden contenir, a part dels anàlits d'interès, altres compostos que no ens interessin i que poden interferir en l'anàlisi per GC-MS o fins i tot embrutar la columna de gasos. És per això que cal una etapa de purificació de la mostra extreta o etapa de *cleanup*.

Segons resultats satisfactoris trobats a la bibliografia i per disponibilitat al laboratori, s'han triat dos mètodes: els cartutxos d'extracció en fase sòlida (SPE C18) i gel de sílice per fer cromatografia en columna.

#### 3.3.2.1.- *Cleanup* mitjançant cartutxos d'extracció en fase sòlida (SPE C18)

El *cleanup* per SPE C18 s'ha dut a terme amb l'aparell *Vacuum Manifold* Vac Elut SPS 24 de VARIAN i amb els cartutxos d'extracció en fase sòlida VARIAN Bond Elut C18, de 500 mg.

El buit al qual s'ha sotmès el cartutx per tal de fer avançar la fase mòbil és de 5 in Hg ( $17 \times 10^3$  Pa). L'acondicionament dels cartutxos de SPE C18 s'ha fet amb 1 x 3 ml de metanol, seguit de 2 x 3 ml d'una solució mixta d'aigua i 2-propanol (9:1). A continuació s'ha carregat la mostra al cartutx (3 mL) i es deixa assecar la columna uns 5 minuts a un buit suau, entre 1 – 5 in Hg. D'aquesta manera es pretén aconseguir que els compostos quedin més fàcilment retinguts a la fase estacionària. Es renta amb 1 x 3 mL metanol - aigua (1:1) i es deixa assecar 5 minuts més a buit suau [23]. L'elució es fa amb 2 x 1,5 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -hexà (1:1) (variació no descrita al mètode, el qual estava pensat per l'anàlisi amb HPLC). S'ha triat aquesta fase ja que els PAHs són força apolars, sobretot a mesura que augmenta el seu pes molecular i, en aquest cas, com a fase apolar tenim l'hexà. El diclorometà ajuda a l'extracció com a dissolvent més polar. Finalment es fa una darrera etapa per eluir-rentar amb 2 x 1,5 mL d'hexà. Aquesta variant del mètode l'anomenem M1.

A la Figura 5 apareix esquematitzada la variant del mètode de *cleanup* M1 mitjançant els cartutxos SPE C18, amb rentat inclòs. En primer lloc, després de l'acondicionament del cartutx i de la càrrega de la mostra al cartutx, es recull la fracció que s'elueix en aquesta darrera càrrega (3), a continuació la del rentat (5) i seguidament la fracció corresponent a l'elució de la mostra (6), per tal d'avaluar les possibles pèrdues en les diferents etapes a

seguir. Finalment, com ja s'ha indicat al paràgraf anterior, ha estat introduïda una darrera etapa d'elució-reatat amb hexà, perquè en el suposat cas que la fase d'elució  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -hexà (1:1) a la qual haurien d'eluir els nostres compostos no fos adequada per als PAHs de pes molecular més elevat, així acabar d'eluir els PAHs que hagin pogut quedar més retinguts al cartutx donada la seva naturalesa més apolar, la qual cosa ens permetrà comprovar si la mescla de dissolvents que s'ha seleccionat és l'adequada.

També serà interessant saber si finalment queda algun PAH retingut a la fase estacionària, per la qual cosa no s'eluirà en cap de les dues etapes o fases finals (de diclorometà-hexà o d'hexà).

S'ha seguit també una altra variant del mètode de *cleanup* (anomenat M2), reportada a la bibliografia [17]. S'acondiciona amb 5 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -hexà (1:1). Es deixa assecat uns 5 minuts a buit suau i a continuació s'afegeix la mostra que cal purificar (3 mL). L'elució es fa amb 2 x 2,5 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -hexà (1:1), seguit de 2 x 2,5 mL d'hexà. És una variació d'un mètode descrit utilitzant cartutxos de gel de sílice. Les dues darreres fraccions es recullen al mateix vial i es concentren al rotavapor a menys de 5 mL.

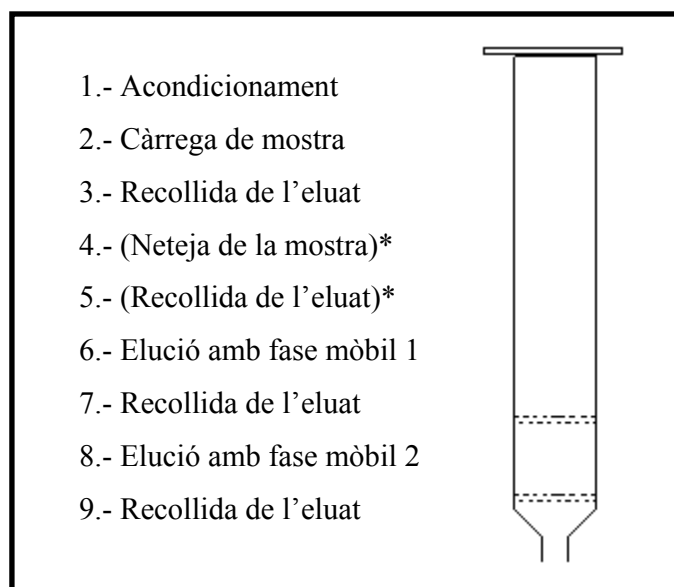


Figura 5. Passos a seguir al *cleanup*  
 \*Entre parèntesi els passos opcionals i  
 diferencials entre els mètodes M1 i M2

Les diferents fraccions recollides en els dos mètodes s'enrasen a 5 mL amb hexà, i es conserven en vials de vidre a la nevera a 5 – 6 °C. Les mostres s'han analitzat per GC-MS, com a molt tard, una setmana després de fer les extraccions.

### 3.3.2.2- Cleanup mitjançant gel de sílice com a adsorbent en columna de vidre

El procediment seguit és el descrit al mètode *US EPA Method 3630C: Silica Gel Cleanup*. Consisteix en preparar una columna de vidre *Econocolum* 25 cm x 1 cm I.D. amb gel de sílice 60, de 63-200 micres, activada prèviament durant 16 h a 130 °C a l'estufa.

Es prepara una suspensió de 10 g de gel de sílice en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  i s'introdueix a la columna. S'afegeix 1-2 cm de sorra de platja rentada i sulfat de sodi anhidre per a absorbir la humitat. A continuació s'acondiciona la columna fent passar 40 mL de pentà, a uns 2 mL / min controlant el flux amb una bomba peristàltica. Després, sense deixar que la capa de sorra entri en contacte amb l'aire, es transfereixen 2 mL de mostra ajudat de 2 mL d'hexà per completar la transferència. Abans de que la capa de sorra entri en contacte amb l'aire, s'afegeixen 25 mL de pentà i es continua l'elució de la columna. Es descarta aquest eluat perquè és una fase de rentat però el conservarem per comprovar que no hi hagi hagut pèrdues dels nostres compostos.

A continuació s'elueix la columna amb 25 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  – pentà (2:3). Finalment, es concentra la fracció recollida i s'enrasa a 5 ml amb hexà. En teoria, a aquesta darrera fracció s'elueixen els compostos d'interès.

### 3.3.3.- Cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses (GC/MS)

El cromatògraf de gasos d'alta resolució amb detector de masses (GC/MS) de la Marca Thermo Elemental es troba constituït de tres unitats principals: el cromatògraf de gasos TRACE GC ULTRA, el detector de masses DSQ II (quadropol) i l'automostrejador TRIPLUS AS.

S'ha seguit el mètode de la *US EPA Method 8270C: Semivolatile organic compounds by gas chromatography / mass spectrometry (GC/MS)*, amb alguna variació per tal d'optimitzar les condicions de separació i anàlisi que s'especificaran entre parèntesi.

El mètode de ionització emprat és per impacte electrònic. La separació es portà a terme amb una columna TRMS-5 30 m x 0,25 mm I.D., 0,25  $\mu\text{m}$  de gruix de film (Thermo Fisher Scientific, Barcelona, Espanya), 5 % fenil polisilfenilensiloxà, connectada a una pre-

columna de sílice fosa desactivada, 2 m x 0,32 mm I.D. a través d'un connector de quars universal. La programació del forn comença a 60 °C de temperatura durant 5 min, i s'augmenta fins a 290 °C amb una rampa de 8 °C / min, a on es manté durant 2 min (al mètode de la US EPA 8270 C s'utilitza una programació del forn començant per una temperatura inicial de 40 °C (4 min) amb una rampa de 10 °C / min fins a 270 °C, aguantada fins l'elució de l'últim PAH, que no separava eficientment els nostres PAHs, de manera que es va modificar lleugerament de forma adient). La injecció de 1µL es fa en mode *splitless*, amb la vàvula split tancada durant 1 min. El flux de gas portador, Heli BIP, es manté constant a 1,5 mL / min. La temperatura de l'injector, *transfer line* i la font d'ionització són de 275 °C, 300 °C i 225 °C respectivament. L'adquisició del cromatograma es va fer utilitzant *Full Scan* pels patrons purs en un rang de 45 a 450 uma, a un ritme de 2 *scan* / s i en mode *Single Ion Monitoring* (SIM), utilitzant les masses i l'ordre d'elució de referència de la Taula 3 .

Taula 3. Ions característics dels PAHs d'estudi

<b>Compost</b>	<b>Ordre d'elució</b>	<b>Ió primari</b>	<b>Ió(ns) Secundari(s)</b>
<i>Phenanthrene-d10 IS</i>	1	188	94, 80
<i>Phenanthrene</i>	2	178	179, 176
<i>Fluoranthene</i>	3	202	101, 203
<i>Pyrene</i>	4	202	200, 203
<i>Benz[a]anthracene</i>	5	228	229, 226
<i>Chrysene</i>	6	228	226, 229
<i>Benz[b]fluoranthene</i>	7	252	253, 125

La detecció i integració dels pics es va fer utilitzant el programa *Xcalibur Thermo Scientific*. mitjançant un calibrat tant amb patró intern com amb patró extern.

## **4.- RESULTATS I DISCUSSIÓ**

Tot i que quan procedim a realitzar un anàlisi de mostres de sòls contaminats seguirem l'esquema del procediment experimental de la Figura 3 comentat al punt 3.3- *Procediment experimental*, a l'hora de posar a punt el procés global de determinació dels PAHs cal començar per la darrera etapa, i seguir l'ordre invers: GC/MS, purificació i, finalment, extracció.

Així doncs, primerament cal posar a punt el mètode de determinació dels anàlits d'interès; els PAHs seleccionats. La tècnica instrumental més adient per aquest tipus de compostos és la cromatografia de gasos, que acoblada a un espectròmetre de masses ens permet una bona identificació, resolució i quantificació dels PAHs. Per tant, caldrà optimitzar paràmetres tals com el programa de temperatura del cromatògraf per separar els compostos, el cabal de gas portador, les condicions del l'injector i les condicions del detector de masses.

Amb el GC-MS a punt, es procedeix a optimitzar l'etapa del pretractament de la mostra, la qual consisteix en l'extracció dels PAHs que es troben en certs tipus de sòls contaminats. Per fer-ho s'empra el material de referència ja indicat. Per extreure'n els PAHs en aquest cas s'utilitza el mètode d'extracció Soxhlet. L'extracte obtingut s'ha de purificar (fer un *cleanup*), i després la mostra ja estarà apunt pel seu anàlisi per GC-MS.

Avaluarem bàsicament els percentatges de recuperació en cadascuna de les dues etapes, tant de l'extracció com del *cleanup* i, per tant, podrem determinar directa o indirectament les pèrdues associades a cadascuna d'elles.

### **4.1.- CROMATOGRAFIA DE GASOS ACOBLADA A L'ESPECTROMETRIA DE MASSES (GC/MS).**

La identificació dels PAHs es va fer tant per temps de retenció com pel seu espectre de masses, segons el mètode descrit a la part experimental. La seva quantificació es va realitzar mitjançant calibrat amb patrons externs, ja que s'intentà fer una calibrat amb patró intern (es va escollir el *phenantrene-d10*) però no fou possible separar-lo adequadament del *phenanthrene*, sobretot a baixes concentracions (< 0,5 ppm) i a altes (> 11 ppm), ja que apareixien a temps de retenció molt propers amb solapament pràcticament absolut (veure els cromatogrames corresponents a l'Annex I).

Per tal d'avaluar els paràmetres analítics de la recta de calibrat, límit de detecció (LOD) i quantificació (LOQ), es va seleccionar i preparar 8 patrons al voltant de 0,660 ppm pels PAHs estudiats en sediments, que és el LOQ del mètode de la US EPA *Method 8270 C: Semivolatile organic compounds by gas chromatography mass spectrometry (GCMS)*. Així doncs, 3 patrons de la recta són per sota d'aquest valor, a concentracions de 0,05; 0,1 i 0,5 ppm. Es pot comprovar a la Taula 5 que amb el mètode emprat s'aconseguí reduir el LOQ fins a uns 0,200-0,300 ppm, respecte del mètode de referència US EPA esmentat.

Per determinar el rang lineal de treball, s'emprà el calibrat entre 0,05 i 25 ppm, tot i que el LOD obtingut és superior a la concentració del patró més diluït (0,05 ppm), sent en el pitjor dels casos de 0,1 ppm (veure Taula 5).

Segons el mètode de la US EPA *Method 8000B: Determinative chromatographic separations*, el factor de calibrat (CF) es pot utilitzar com a paràmetre de validació. El CF es defineix com la relació entre la resposta del detector i la quantitat (en massa) de l'analit de cada patró. Es pot emprar una variant de l'equació, que és la que s'ha utilitzat en aquest treball on, al denominador, enlloc de la massa apareix la concentració:

$$CF = \frac{\text{Àrea del pic del compost al patró}}{\text{Concentració (ppm)}}$$

En calcular els factors de calibrat d'aquesta manera, esdevenen una mesura del pendent del calibrat tot assumint que la corba passa per l'origen de coordenades. Sota condicions ideals, els factors de calibrat no varien amb la concentració del patró que és injectat a l'equip, tot i que a la pràctica s'espera alguna variació. Tanmateix, quan aquesta variació, mesurada com la desviació estàndard relativa (RSD), és menor o igual al 20 %, l'ús del model lineal és generalment apropiat i es pot assumir que la corba de calibrat és lineal i que passa per l'origen de coordenades (veure els valors de CF, SD i RSD recollits a la Taula 4, on comprovem que tenim desviacions relatives per sota del 20 % i, per tant, aconseguim bones corbes de calibrat lineals per tots els PAHs).

Observació: La linealitat a través del zero és una assumpció estadística i no una eina per justificar ni per aportar resultats per sota del rang de quantificació del calibrat, demostrat per l'anàlisi dels estàndards.

Taula 4. Càlcul dels factors de calibrat (CF), desviació estàndard (SD) i desviació estàndard relativa (RSD).

<b>Phe</b>	<b>Fluo</b>	<b>Pyr</b>	<b>BaA</b>	<b>Chry</b>	<b>BbF</b>
<b>Mitjana CF</b>	<b>Mitjana CF</b>	<b>Mitjana CF</b>	<b>Mitjana CF</b>	<b>Mitjana CF</b>	<b>Mitjana CF</b>
11,7·10 <sup>6</sup>	19,4·10 <sup>6</sup>	18,6·10 <sup>6</sup>	15,8·10 <sup>6</sup>	15,9·10 <sup>6</sup>	13,7·10 <sup>6</sup>
<b>SD</b>	<b>SD</b>	<b>SD</b>	<b>SD</b>	<b>SD</b>	<b>SD</b>
16,9·10 <sup>5</sup>	18,8·10 <sup>5</sup>	24,8·10 <sup>5</sup>	16,1·10 <sup>5</sup>	21,8·10 <sup>5</sup>	18,6·10 <sup>5</sup>
<b>RSD</b>	<b>RSD</b>	<b>RSD</b>	<b>RSD</b>	<b>RSD</b>	<b>RSD</b>
14,5	9,7	13,3	10,2	13,7	13,5

Després d'haver fet els càlculs entre 0,05 i 25 ppm, s'ha observat que la linealitat es troba en un rang de concentracions més estret, entre 0,1 i 8 ppm tal com es pot veure a la Taula 5. A la Figura 6 es mostren les rectes de calibrat dins del rang lineal, per cada compost. La recta s'ha representat a partir de les mitjanes dels diferents replicats a cada nivell de concentració i s'ha comparat el valor de la seva desviació estàndard amb la desviació estàndard de la recta construïda mitjançant tots els punts de forma individual. Això s'ha fet a través d'un test F de comparació de desviacions estàndard per veure si les diferències eren estadísticament significatives o no (veure Annex II).

A part de l'estudi dels paràmetres del calibrat, es pot observar al cromatograma de la Figura 7 que s'aconsegueix una bona separació dels compostos d'estudi amb una bona resolució, amplada de banda i amb un temps d'anàlisi total d'uns 35 minuts (veure càlcul de la resolució a l'annex IV).

Taula 5. Paràmetres de regressió de la recta de calibrat.

<b>Compost</b>	<b>Rang estudiat (ppm)</b>	<b>Rang lineal (ppm)</b>	<b>y = ax + b*</b>		<b>r<sup>2</sup></b>	<b>LOD **</b>	<b>LOQ ***</b>
			<b>a ± SD (x 10<sup>-6</sup>)</b>	<b>b ± SD (x 10<sup>-5</sup>)</b>			
Phe	0,05 – 25	0,1 – 8	10,7 ± 0,5	-3,2 ± 2,0 x10 <sup>1</sup>	0,991	0,095	0,303
Fluo	0,05 – 25	0,1 – 8	20,1 ± 0,6	-14,4 ± 22,4	0,997	0,103	0,327
Pyr	0,05 – 25	0,1 – 8	17,2 ± 0,3	12,9 ± 13,0	0,999	0,045	0,144
BaA	0,05 – 25	0,1 – 8	15,0 ± 0,2	6,8 ± 9,7	0,997	0,072	0,228
Chry	0,05 – 25	0,1 – 8	14,6 ± 0,4	12,2 ± 15,4	0,999	0,085	0,270
BbF	0,05 – 25	0,1 – 8	12,5 ± 0,3	7,4 ± 1,1x10 <sup>1</sup>	0,998	0,086	0,274

\*Correlació lineal entre l'àrea del pic i la concentració. \*\*Determinat segons  $LOD = t_{(99\%, n-1)} \cdot S$ , ja que el blanc el corregeix automàticament el software de l'equip. \*\*\* Determinat segons  $LOQ = 10 \cdot S$

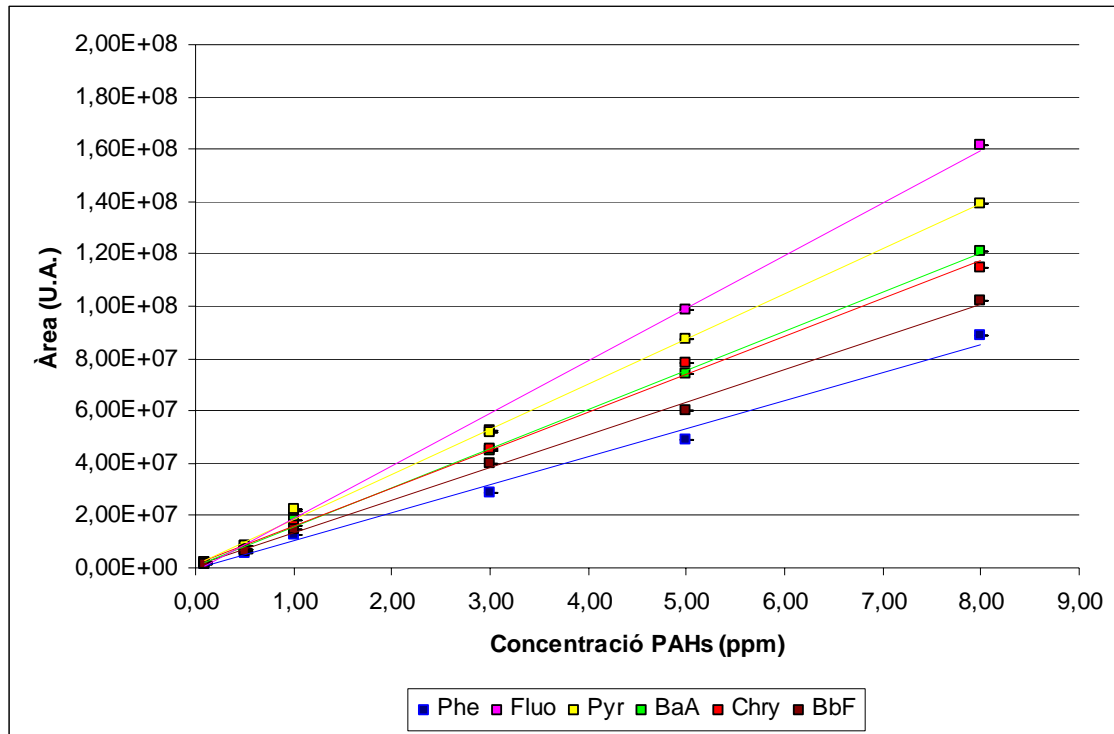


Figura 6. Recta de calibrat pels PAHs entre 0,1 i 8 ppm. Cada punt experimental surt de fer la mitjana de dos replicats.

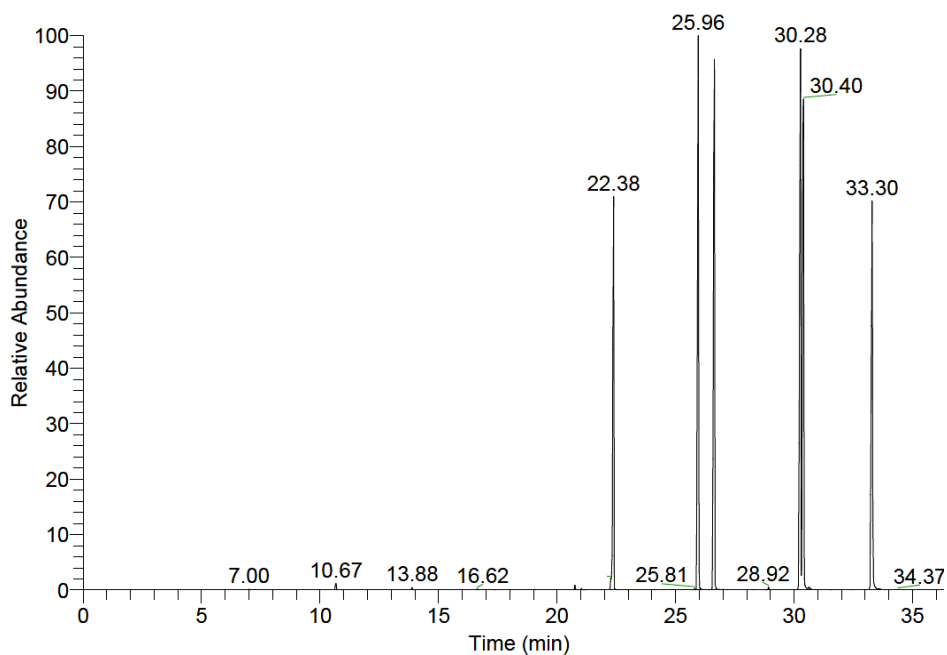


Figura 7. Cromatograma dels 6 PAHs estudiats. En minuts, Phe (22,38); Fluo (25,96); Pyr (26,62); BaA (30,28); Chry (30,40); BbF (33,30)



## 4.2 PURIFICACIÓ (*CLEANUP*)

Un cop es realitza l'extracció per Soxhlet, l'extracte ha de passar per un sistema de purificació, anomenat *cleanup*, per tal d'eliminar possibles interferències que podrien bé malmetre l'equip de detecció de masses, bé embrutar la columna del cromatògraf de gasos, o bé reduir la sensibilitat de l'anàlisi. Per tant, el sistema d'extracció Soxhlet no pot ser avaluat independentment quan s'aplica a una matriu sòlida com la nostra, ja que sempre hi pot haver components d'aquesta matriu que s'extreguin juntament amb els PAHs, els quals puguin interferir en la determinació per GC-MS. Per tant, cal primer optimitzar aquesta etapa de *cleanup*.

S'han seleccionat dos mètodes diferents per fer la purificació o *cleanup* de la mostra, bé mitjançant un cartutx SPE C18 o bé mitjançant gel de sílice com a adsorbent en columna de vidre. La mostra emprada per a l'optimització d'aquesta etapa és una mescla patró de 5 ppm de cada PAH triat, que correspon aproximadament a la zona intermèdia de la recta de calibrat del GC-MS.

### 4.2.1.- *Cleanup* mitjançant cartutxos d'extracció en fase sòlida (SPE)

S'han avaluat dues variants del mètode d'extracció-cleanup amb SPE, anomenats M1 i M2, amb els seus replicats corresponents A i B, els quals es diferencien en l'etapa de l'acondicionament previ del cartutx. A la variant del mètode M1 hi ha un pas de rentat del cartutx un cop introduïda la mostra i en canvi el M2 no (veure l'apartat 3.3.2.1 on s'expliquen els detalls de cada mètode).

Es considera que hi pot haver pèrdua de PAHs tant en les fases de càrrega com a la de neteja, on no s'hauria d'eluir cap compost perquè els PAHs han de quedar retinguts a la fase sòlida del cartutx de SPE. En canvi, a l'etapa d'elució és on es recuperen els PAHs. Per poder avaluar tant la pèrdua com la recuperació analitzarem cadascuna de les fases recollides per GC-MS.

Dels resultats obtinguts i recollits a la Figura 8, respecte la variant M1 del mètode amb SPE, es pot comprovar que en recollir la fracció emergent del cartutx SPE durant l'etapa de la càrrega (amb la solució de l'extracte de la mostra), es perd en tots els casos entre un 65 i un 85 % del que hem afegit, per tant, no queda retingut cap PAHs al cartutx de SPE com era d'esperar. D'altra banda, durant l'etapa del rentat (just després de la càrrega) a la figura 8

podem veure que no hi ha pèrdues significatives (el poc que s'ha retingut, no es perd en rentar el cartutx de SPE). Tampoc s'observa recuperació dels analits a la darrera etapa que correspondria a l'elució amb hexà, que resulta ser una etapa més de rentat que no pas d'elució. Els PAHs prèviament retinguts en el cartutx SPE durant la càrrega, es recuperen, com era d'esperar, a l'etapa d'elució amb hexà-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1).

Podem concloure que, per ara, l'etapa de la càrrega no ha funcionat correctament, doncs la pèrdua de PAHs s'ha vist que és molt elevada (65-80 %). D'altra banda, del balanç de massa total de cada PAH mostrat a la Figura 8, comprovem que s'ha pogut seguir la traçabilitat dels PAHs introduïts al sistema, i que es recuperen entre el 80 i el 105 % dels compostos presents a la mostra sòlida de CRM original. Per tant, l'etapa de l'extracció sembla ser força adequada per la variant del mètode M1.

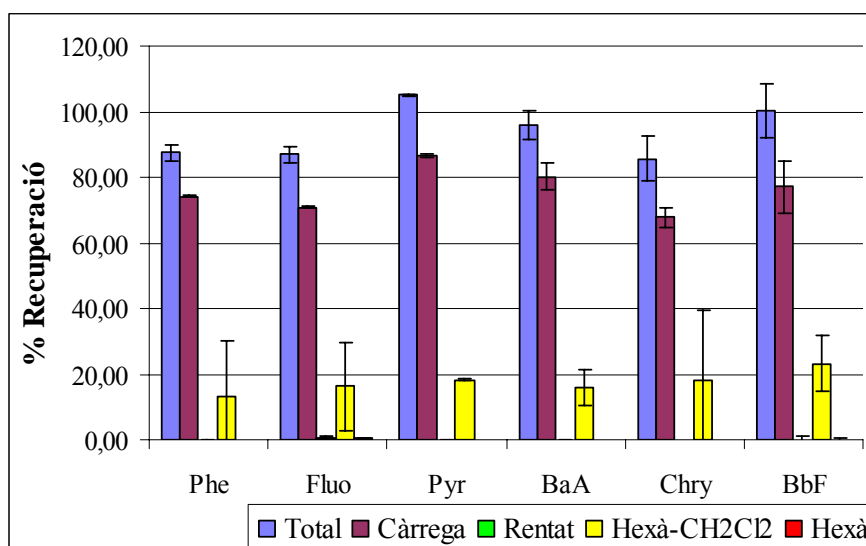


Figura 8. Pèrdua dels PAHs durant las fases de càrrega de la mostra i recuperació en la fase d'elució amb hexà-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i hexà mitjançant cartutxos SPE C18 segons la variant del mètode M2

Respecte a la variant M2 del mètode amb SPE, tal i com es veuen recollits els resultats a la Figura 9, el comportament del sistema és molt similar al de la variant M1 del mateix mètode, de manera que no hi ha diferències importants en la determinació dels PAHs per GC-MS en absència de l'etapa de rentat posterior a la càrrega. Els resultats numèrics es troben recollits a l'Annex III.

Com que aquest mètode de *cleanup* s'ha dut a terme amb presència de buit mitjançant l'equip comentat a l'apartat 3.4.2.1., s'ha pensat que donat que el cartutx és de tan sols 0,5 g de fase C18 podria ser que la retenció es vegi impossibilitada per la falta de temps perquè

els compostos puguin entrar en contacte amb la fase sòlida del cartutx i, per tant, que no puguin interaccionar efectivament amb la fase C18. Tot això, probablement degut a que es treballa sota condicions de buit, la qual cosa força els compostos presents a la solució de càrrega a avançar a una velocitat, potser, massa alta.

Per això, hem decidit fer un segon estudi sense utilitzar l'aplicació del buit. Així, s'avalua l'efecte de la velocitat de càrrega dels nostres compostos, tenint en compte només que avanci per efecte de la força de la gravetat.

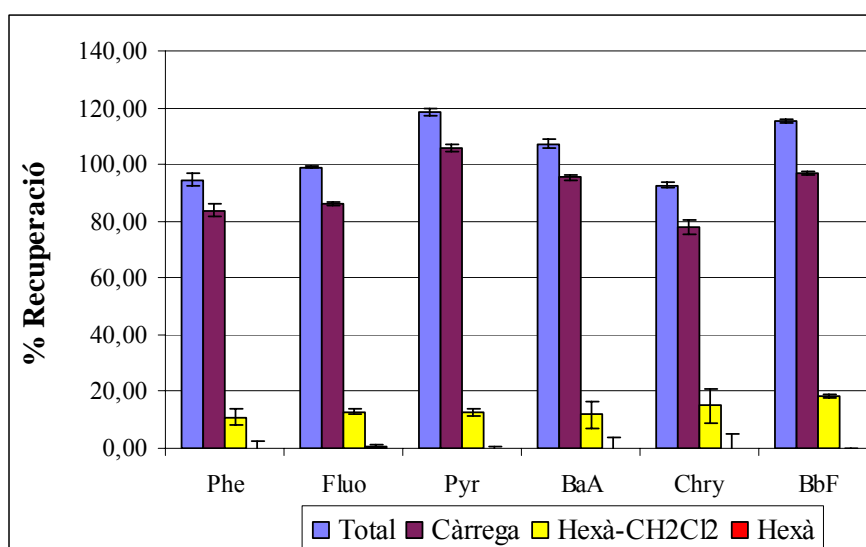


Figura 9. Pèrdua dels PAHs durant las fases de càrrega de la mostra i recuperació en la fase d'elució amb hexà-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i hexà mitjançant cartutxos SPE C18 segons la variant del mètode M2

#### 4.2.1.1.- Avaluació de la velocitat de càrrega de la mostra als cartutxos d'extracció en fase sòlida

D'acord amb els resultats ja comentats a l'apartat 4.2.1, es preparen uns assajos per tal de comprovar si la pèrdua dels analits a l'etapa de la càrrega al cartutx fos deguda a l'ús del *Vacuum Manifold* que, en fer el buit, s'ha pensat que potser no deixa prou temps a la mostra perquè interaccioni de forma efectiva amb l'adsorbent i, per tant, els compostos elueixen directament durant el mateix moment de la càrrega.

Per tant, es procedeix de la mateixa manera que anteriorment (com s'ha explicat a l'apartat 3.4.2.1), però treballant ara per gravetat, és a dir, sense ús del *Vacuum Manifold*. Evidentment, el procés dura molt més temps, però volem comprovar si d'aquesta manera en

l'etapa de la càrrega no s'elueixen els nostres compostos, i veure si queden retinguts com és d'esperar.

En aquest cas, es decideix fer aquesta avaluació sobre la variant del mètode 2 (M2), ja que ja hem comprovat que el pas de rentat no aporta millores significatives en la resolució dels pics ni a l'eliminació d'interferències, ni a la determinació quantitativa dels PAHs. Per tant, estalviem així temps i dissolvent, entre d'altres.

A la Figura 10 podem veure que també hi ha pèrdues en l'etapa de la càrrega del cartutx de SPE, malgrat no treballem sota el buit, de manera que tampoc hi ha pràcticament retenció dels compostos a la columna. Tot i això sí que s'observa que es perd menys quantitat de PAHs, amb el consegüent augment en la recuperació dels analits d'interès en l'elució hexà-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1), sent gairebé del 50 % en el replicat B (Els resultats numèrics es troben recollits a l'Annex III). Tot i així, una recuperació al voltant del 50 % segueix sent massa baixa, ja que implica molta pèrdua dels analits i, en alguns casos, és crític recuperar el màxim possible per poder dur a terme la correcta quantificació de la mostra (donades les baixes concentracions de PAHs en la mostra de sòl contaminat original).

Així doncs, podem dir que els cartutxos SPE C18 comercials no ens han donat bons resultats ja que els percentatges de recuperació són molt baixos pels nostres interessos, probablement degut a la seva extremadament baixa polaritat i, per tant, baixa afinitat pels PAHs.

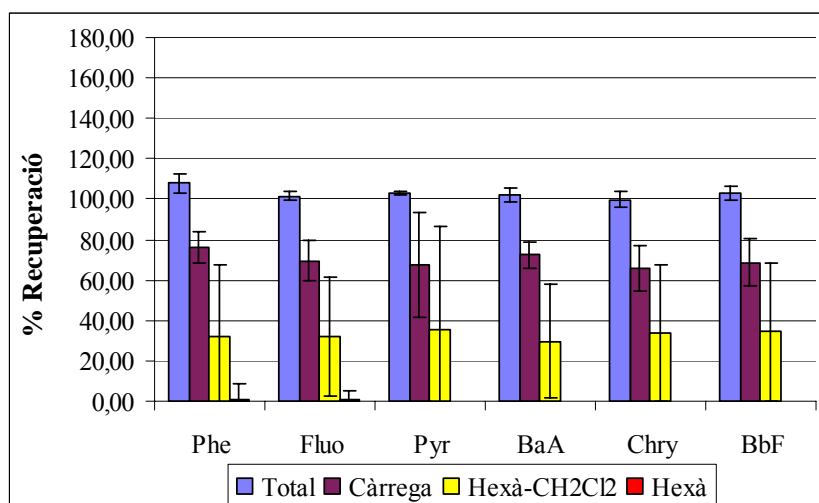


Figura 10. Pèrdua dels PAHs durant las fases de càrrega de la mostra i recuperació en la fase d'elució amb hexà-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i hexà mitjançant cartutxos SPE C18 segons la variant del mètode M2

#### 4.2.2.- Cleanup mitjançant gel de sílice com a adsorbent en columna de vidre

Un cop descartats els cartutxos SPE C18, donada la seva baixa afinitat pels PAHs, es decideix buscar una fase més afí als PAHs (més polar) per a fer el *cleanup* de les mostres d'estudi, com és emprant una columna de gel de sílice. En aquest cas, el procediment seguit, inclou les etapes de càrrega, rentat, i elució, descrites a l'apartat 3.3.2.2. Cal destacar que es canvia la fase d'hexà per pentà en canviar el cartutx SPE C18 per la columna de gel de sílice.

Com s'observa a la Figura 11, la recuperació, en general, ha millorat de manera important. Cal comentar que pels PAHs de menor pes molecular i, per tant, més polars s'aprecia una major recuperació, sobretot pel Phe, Fluo i Pyr, obtenint-se valors entre el 90 i el 100 %. Passa el contrari amb els PAHs de pes molecular més elevat, BaA, Chry i BbB, amb els quals el percentatge de recuperació oscil·la entre el 70 i 85 %.

En aquest cas, en fer el balanç de massa total es veu com la major part dels PAHs es recupera al moment de l'elució amb  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -pentà (2:3), tal i com ens interessa que succeeixi. En aquest ocasió, no s'observa una pèrdua important a l'etapa de la càrrega (a la figura 11, correspon a la fracció en marró, 4 mL M+ H), de manera que la majoria dels PAHs que es troben a la fase líquida provinent de l'etapa de l'extracció Soxhlet queden retinguts a la columna de *cleanup*. Quan se segueix amb el rentat amb pentà, podem veure que no hi ha pèrdues importants dels PAHs, els quals segueixen retinguts a la columna. Per tant, el pentà resulta ser un bon dissolvent de rentat. Els resultats numèrics es troben recollits a l'Annex III.

Així doncs, en cas d'haver de triar un d'aquests tipus de *cleanup* a partir dels resultats obtinguts, sembla més adient el *cleanup* amb gel de sílice en columna de vidre.

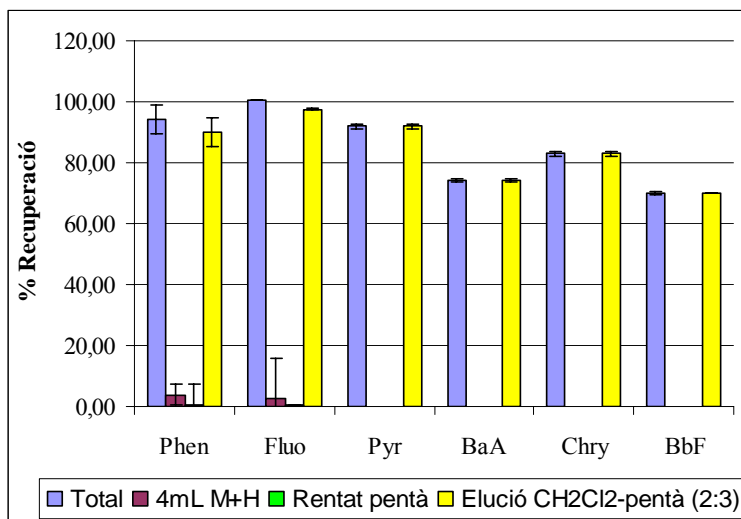


Figura 11. Recuperació dels PAHs en el *cleanup* mitjançant gel de sílice com a adsorbent en columna de vidre

### 4.3.- EXTRACCIÓ SOXHLET I PURIFICACIÓ (*CLEANUP*)

Es procedeix a l'extracció dels PAHs de mostres de sòls contaminats, tot emprant el sistema d'extracció Soxhlet que segueix el mètode indicat a l'apartat 3.3.1.1. Un cop avaluada l'etapa del *cleanup* (apartat 4.2), es pot ara estudiar el conjunt de les etapes d'extracció Soxhlet-*cleanup*, tenint en compte el màxim rendiment de l'etapa de *cleanup*. Seguirem treballant amb el material de referència CRM anteriorment especificat.

A la Taula 6 es presenten els resultats obtinguts en l'aplicació de l'extracció Soxhlet seguida de l'etapa de purificació de la mostra extreta (el *cleanup*) mitjançant gel de sílice com a adsorbent en columna de vidre. Podem observar que, després de les dues etapes, els percentatges de recuperació global dels PAHs presents al CRM oscil·len entre el 49 % i el 72 %. En els casos del Phe i BbF no va ser possible fer la determinació ja que, en l'etapa de la recuperació es trobaven per sota del límit de quantificació.

Taula 6. Percentatges de recuperació en l'extracció Soxhlet seguida del *cleanup* mitjançant gel de sílice en columna de vidre

	<b>Phe</b>	<b>Fluo</b>	<b>Pyr</b>	<b>BaA</b>	<b>Chry</b>	<b>BbF</b>
Valor de referència del CRM (ppm)*	0,080	22,100	7,660	12,100	16,800	0,930
ppm <u>teòrics</u> després <i>cleanup</i> columna gel de sílice (2 mL extracte Soxhlet en 5 mL volum final)	0,013	3,536	1,226	1,936	2,688	0,149
ppm <u>experimentals</u> després <i>cleanup</i> columna gel de sílice (quantificació GC/MS)	<LOQ**	2,121	0,877	0,955	1,505	<LOQ
<b>% Recuperació extracció Soxhlet-<i>cleanup</i>***</b>	<b>ND</b>	<b>60,0 ± 9,1</b>	<b>71,5 ± 4,2</b>	<b>49,3 ± 9,0</b>	<b>56,0 ± 6,7</b>	<b>ND</b>
% Recuperació segons US EPA****	83,9 ± 5,4	87,7 ± 6,9	102,0 ± 0,8	73,4 ± 3,8	76,2 ± 4,4	82,7 ± 5,0

\* Valor de referència de la Taula 2. \*\* Límits de Quantificació (LOQ) determinats a l'apartat 4.1. \*\*\* ND: No determinat \*\*\*\* Valors per el Soxtec (*Automated Soxhlet extraction*). Pel Soxhlet manual no han estudiat a fons quina és la recuperació de cada PAH.

Els percentatges de recuperació assolits es troben per sota del rang entre 70 i 100 % esperat, segons el reportat per la US EPA (Taula 6). Majoritàriament, aquests baixos rendiments de recuperació obtinguts s'observa que son deguts a l'etapa de l'extracció Soxhlet, ja que amb el mètode de *cleanup* amb gel de sílice ja s'ha vist que s'aconsegueixen recuperacions per sobre del 90 % en la majoria dels casos.

Així, havent anteriorment avaluat l'etapa del *cleanup*, es determina ara l'eficàcia de l'extracció Soxhlet individualment. Tenint en compte el percentatge de recuperació dels PAHs durant el *cleanup*, es pot obtenir per diferència el percentatge de pèrdua d'aquesta purificació i aplicar-lo al conjunt Soxhlet-*cleanup*. Això permet avaluar l'extracció Soxhlet independentment del *cleanup* (les dades que ho expliquen es troben recollides a la Taula 7).

Taula 7. Percentatges de recuperació en l'extracció Soxhlet individualment

	<b>Phe</b>	<b>Fluo</b>	<b>Pyr</b>	<b>BaA</b>	<b>Chry</b>	<b>BbF</b>
% Recuperació extracció Soxhlet- <i>cleanup</i>	ND	60,0 ± 9,1	71,5 ± 4,2	49,3 ± 9,0	56,0 ± 6,7	ND
% Recuperació en <i>cleanup</i> columna gel de sílice *	90,00	97,50	92,04	74,30	83,12	69,97
% Pèrdua en <i>cleanup</i> columna gel de sílice	10,00	2,50	7,96	25,70	16,88	30,03
<b>% Recuperació extracció Soxhlet**</b>	<b>ND</b>	<b>61,5 ± 9,3</b>	<b>77,2 ± 4,5</b>	<b>62,0 ± 11,3</b>	<b>65,5 ± 7,8</b>	<b>ND</b>
% Recuperació segons US EPA	83,9 ± 5,4	87,7 ± 6,9	102,0 ± 0,8	73,4 ± 3,8	76,2 ± 4,4	82,7 ± 5,0

\* Resultats a la Taula de l'apartat 4.2.2. \*\*Calculat assumint que la pèrdua en el *cleanup* en columna és reproducible a partir dels experiments fets al punt 4.2.2

Després d'aquests càlculs, podem observar que tot i que l'eficiència del Soxhlet ha augmentat, sobretot pel que fa als PAHs BaA, Chry i BbF, els quals durant el *cleanup* no recuperàvem amb percentatges tan alts com pel cas del Phe, Fluo i Pyr, seguim tenint en alguns casos una diferència important respecte del que publica la US EPA en els seus informes sobre extracció Soxhlet. Tot i això, cal remarcar que els resultats de la US EPA són per al Soxtec, que és una variant optimitzada i automatizada del Soxhlet.

Així, donat els percentatges de recuperació obtinguts podem afirmar que cal seguir amb l'optimització de l'etapa de l'extracció Soxhlet per tal d'aconseguir una recuperació superior. Es podria pensar en diverses possibilitats de millora, per exemple concentrar l'extracte final a un volum més petit, i així poder fer l'anàlisi quantitativa amb major precisió, procurar de minimitzar les possibles pèrdues per volatilització, per exemple a l'hora de concentrar amb el rotavapor, així com provar mètodes d'extracció alternatius com l'extracció assistida per microones, l'extracció mitjançant fluids supercrítics, etc.

## 5.- CONCLUSIONS

A partir dels resultats obtinguts durant la posta a punt del mètode d'anàlisi dels PAHs seleccionats en mostres de sòls contaminats, les conclusions més importants que es poden extreure es detallen a continuació:

1.- Pel que fa a l'anàlisi per cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses (GC/MS):

- El mètode d'anàlisi permet la separació, identificació i quantificació dels PAHs seleccionats de manera efectiva.
- El límit de detecció al qual podem arribar oscil·la entre 0,05 i 0,1 ppm i el límit de quantificació es troba entre 0,1 i 0,3 ppm en funció del compost. Aquests són valors millorats del que es pot trobar descrit al mètode oficial de la *Environmental Protection Agency dels Estats Units* (US EPA), de 0,660 ppm de LOQ.

2.- Amb referència al procés de *cleanup* de l'extracte:

- El *cleanup* en fase sòlida (SPE) utilitzant els cartutxos C18 no ha estat un mètode de *cleanup* satisfactori pel nostre sistema ja que es produeix una pèrdua del voltant del 80 % dels analits en el moment de la càrrega dels nostres compostos al cartutx abans de poder fer les diferents etapes de rentat. L'avaluació de la velocitat de càrrega utilitzant o no la presència de buit ens ha demostrat que té una importància relativa en aquest primer pas, seguint tenint pèrdues altes (superior al 50 %) quan es fa el procés sense el buit (per gravetat). Probablement els dos factors determinants són que tenim un material amb poca afinitat pels nostres PAHs (matriu C18 massa apolar pels nostres PAHs), a més de tenir-ne poca quantitat en els cartutxos comercials emprats (0,5 g).
- El *cleanup* mitjançant columna de vidre utilitzant gel de sílice com a adsorbent ha demostrat ser un mètode prou eficient amb percentatges de recuperació força bons, entre el 70 % i el 100 %. És un material més polar i utilitzem 10 g de fase (molt superior als 0,5 dels cartutxos de SPE).

3.- Sobre l'extracció dels compostos orgànics d'interès de la mostra de sòl:

- La metodologia d'extracció Soxhlet és una tècnica assequible i senzilla encara que poc resolutive. D'altra banda, davant d'altres tècniques força més avançades avui



dia, l'extracció Soxhlet presenta l'inconvenient principal d'un alt consum de dissolvent i d'un llarg temps d'operació.

- L'etapa de l'extracció Soxhlet implica possibles pèrdues dels nostres compostos donada la seva naturalesa semi-volàtil característica. Aquestes pèrdues es produeixen durant el període de l'extracció en calent, la recollida de l'extracte i la concentració d'aquest al rotavapor.
- Els percentatges de recuperació obtinguts, entre el 61 i el 78 % es troben per sota dels que aporta la *Environmental Protection Agency dels Estats Units* (US EPA).

**6.- BIBLIOGRAFIA**

- 
- [1] ATSDR Agency for Toxic Substances & Disease Registry. *Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): What are Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)?*. <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/pah/pah.html> (consulta 16/07/10)
- [2 ] USEPA United States Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov/lawsregs/> (primera consulta 17/03/2010)
- [3] D.Benford, A. Agudo, C. Carrington, T. Hambridge, R. van Leeuwen, M. Rao, W. Slob, M.C. Figueiredo Toledo i R. Walker. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons:Evaluation of certain food contaminants*. JECFA meeting 2005.
- [4] Tox Probe. *Benzo(a)Pyrene and other Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Ten Carcinogens in Toronto (2000).
- [5] Yasmin W. F. Tham, Kazuhiko Takeda and Hiroshi Sakugawa. *Water, Air, & Soil Pollution*, 194 (2008) 1-4, 5-12
- [6 ] Jijun Kang, Chenzhong Cao, Zhiliang Li, *J. Chromatogr. A*, 799 (1998) 361-367.
- [7] M. Nadal, *Human health risk assessment of exposure to environmental pollutants in the chemical / petrochemical industrial area of Tarragona (Catalonia, Spain)*. European PhD Thesis (2005).
- [ 8 ] Armstrong B, Hutchinson E, Fletcher T, Unwin. *J. Environmental Health Perspectives* 112 (2004) 970-978.
- [9 ] IARC International Agency for Research on Cancer. *IARC Monographs Database on Carcinogenic Risks to Human*. <http://www.iarc.fr/> (consulta 10/08/10)
- [10] Real Decreto 9/2005 *Anexo V:Listado de contaminantes y niveles genéricos de referencia para protección de la salud humana en función del uso del suelo*. BOE, 15, (2005) 1833-1843.
- [11]GL Brun, OC Vaidya, MG Léger. *Environmental Science and Technology* 38 (2004) 1941-1948.
- [12] Dunbar JC, Lin C-I, Vergucht I, Wong J, Durant JL. *The Science of The Total Environment* 279 (2001) 1-19.
- [12]Committee on Pyrene and Selected Analogues, Board on Toxicology and Environmental Health Hazards. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Evaluation of Sources and Effects* National Academy Press (1983), ISBN-10: 0-309-07758-3
- [14] I.N. Nasr, M.H. Arief, A.1 2 3 H. Abdel-Aleem, 1F.M. Malhat *Journal of Applied Sciences Research*, 6 (2010) 13-21,

- [15] Z. Li, E.N. Pittman, D.A. Trinidad, L.C. Romanoff, J. Mulholland, A. Sjödin *Anal Bioanal Chem.* 396 (2010) 1321-30.
- [16] C. A. Menzie, B. B. Potocki, J. Santodonato, *Environ. Sci. Technol.* 26: 1278 (1992)
- [17] Nuno Ratola, Sílvia Lacorte, Arminda Alves, Damià Barceló, *J. Chromatogr. A*, 1114 (2006) 198-204.
- [18] E. Morillo, A. S. Romero, C. Maqueta, L. Madrid, F. Ajmone - Marsan, H. German, C. M. Davidson, A.S. Hursthouse and J. Villaverde, *J. Environ. Monit.*, 9 (2007) 1001-1008.
- [19] Md. Yeakub Ali · Richard B. Cole *Anal Bioanal Chem* (2002) 374 :923–931
- [20] H. W. Mielke, G. Wang, C. R. Gonzales, B. Le, V. N. Quach, P. W. Mielke, *The Science of the Total Environment* 281 (2001) 217 – 227.
- [21] A. Hubert, P. Popp, K.D. Wenzel, W. Engewald, G. Schüürmann, *Anal Bioanal Chem* 376 (2003) 53-60.
- [22] Heidi K. Bojes, Meter G. Pope, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 47 (2007) 288-295.
- [23] Patryk Oleszczuk, Stanislaw Baran, *Jornal of Hazardous Materials*, B113 (2004) 237-245.
- [24] Christopher D. Simpson, William R. Cullen, Kristine B. Quinlan, Kenneth J. Reimer, *Chemosphere*, Vol. 31, No. 9 (1995) 4143-4155.
- [25] A. Barranco, R. M. Alonso – Salces, A. Bakkali, L. A. Berruelo, B. Gallo, F. Vicente, M. Sarobe, *J. Chromatogr. A*, 988 (2003) 33-40.
- [26] P. R. Krootstra, M. H. C. Straub, G. H. Stil, E. G. van der Velde, W. Hesselink, C. C. J. Land, *J. Chromatogr. A*, 697 (1995) 123-129.
- [27] Habibi, Mohammad Hosein; Hadjmohammadi, Mohammad Reza, Iran. *J. Chem. Chem. Eng.*, Vol. 27, No. 4, 2008.
- [28 ] I. N. Glazkov, I. A. Revelsky, I. P. Efimov, Yu. A. Zolotov. *Chromatographia* 52, 7/8 (2000).
- [29] C. Miège, J. Dugay, and M.-C. Hennion, *J. Chromatogr.A*, 823, 219–230 (1998).
- [30] Dr. Thomas G. Chasteen; Department of Chemistry, Sam Houston State University, Huntsville, Texas. *Coupling Gas Chromatography to Mass Spectrometry*. [http://www.shsu.edu/~chm\\_tgc/primers/gcms.html](http://www.shsu.edu/~chm_tgc/primers/gcms.html) (consulta 05/08/10).
- [31] OSU Oregon State University. *Unsolved Mysteries of Human Health: GC/MS How does it work?* [http://www.unsolvedmysteries.oregonstate.edu/MS\\_05](http://www.unsolvedmysteries.oregonstate.edu/MS_05) (consulta 05/08/10)
- [ 32 ] Frederic Douglas; Scientific Testimony: An online Journal. *GC/MS Analysis*. <http://www.scientific.org/tutorials/articles/gcms.html> (consulta 05/08/10)