



EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5

Dipòsit Legal: T-1609-2010

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS

Eva Pocurull Aixalà



Facultat de Química de Tarragona

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

0101-17260



**EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ
DE COMPOSTOS FENÒLICS**

Memòria presentada per

EVA POCURULL AIXALÀ

per aspirar al grau de Doctor en Química

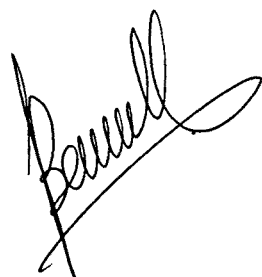
Tarragona, febrer de 1996

Dr. FRANCESC BORRULL BALLARÍN, Professor Titular de Química Analítica de la Universitat Rovira i Virgili, i

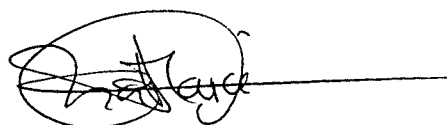
Dra. ROSA MARIA MARCÉ RECASENS, Professora Titular de Química Analítica de la Universitat Rovira i Virgili,

CERTIFIQUEM: Que el present treball, sota el títol: "Extracció en fase sòlida aplicada a la determinació de compostos fenòlics", que presenta Eva Pocurull Aixalà per aspirar al grau de Doctor en Química, ha estat realitzat, sota la nostra direcció, als laboratoris de l'Àrea de Química Analítica de la Facultat de Química de Tarragona, i que tots els resultats obtinguts són fruits dels experiments realitzats per la citada doctoranda.

I, per què consti, expedim el següent certificat a Tarragona, a vint-i-dos de gener de 1996.



Dr. Francesc Borrull Ballarín



Dra. Rosa Maria Marcé Recasens

**Vull expressar l'agraïment més sincer
a totes aquelles persones que, amb el
seu suport, han fet possible la
realització d'aquesta tesi doctoral.**

INDEX

OBJECTIU	1
DESCRIPCIÓ GENERAL	5
CAPÍTOL I - Introducció	17
1.1.- Estudi bibliogràfic de la determinació de compostos fenòlics.	19
1.1.1.- Cromatografia líquida d'alta resolució	22
1.1.1.1.- Tipus de columna	23
1.1.1.2.- Tipus d'elució i solvent	25
1.1.1.3.- Sistemes de detecció	26
1.1.2.- Cromatografia de fluids supercrítics	30
1.1.3.- Electroforesi capil·lar	31
1.2.- Extracció en fase sòlida	33
1.2.1.- Fonaments	35
1.2.2.- Estudi de les variables	42
1.2.2.1.- Tipus de sorbent	42
1.2.2.2.- Tipus de solvent	51
1.2.2.3.- Altres variables	52
1.2.3.- Estudi de l'acoblament en línia	55
1.3.- Bibliografia	59
CAPÍTOL II - Estudi comparatiu de l'extracció en fase sòlida de compostos fenòlics. Influència del parell iònic	65

CAPÍTOL III -	Determinació de compostos fenòlics a nivell de mg l⁻¹ mitjançant extracció en fase sòlida i cromatografia líquida amb detecció de diodes en fila	85
CAPÍTOL IV -	Acoblament en línia de l'extracció en fase sòlida a la cromatografia líquida per a la determinació de compostos fenòlics en aigües	105
CAPÍTOL V -	Determinació de compostos fenòlics en aigües mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució i detecció electroquímica emprant un sistema automatitzat de preconcentració acoblat en línia	125
CAPÍTOL VI -	Millora del procés d'extracció en fase sòlida per a la determinació de compostos fenòlics en aigües . . .	147
CAPÍTOL VII -	Determinació de compostos fenòlics en aigües per cromatografia líquida i preconcentració en línia amb detecció ultraviolada i electroquímica	167
CAPÍTOL VIII -	Acoblament en línia de l'extracció en fase sòlida a la cromatografia de fluids supercrítics per la determinació de fenol i nitrofenols en aigües	191
CAPÍTOL IX -	Separació dels onze fenols prioritari per electroforesi capil·lar de zona i detecció d'absorbància ultraviolada	211
CONCLUSIONS	231
ANNEX	237

OBJECTIU

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

L'objectiu de la present tesi doctoral consisteix en aprofundir en l'estudi de l'aplicació de l'extracció en fase sòlida a la determinació de compostos fenòlics en aigües, amb especial èmfasi en l'acoblament d'aquesta tècnica a la cromatografia líquida d'alta resolució.

També és objectiu d'aquesta tesi, l'estudi de les possibilitats d'altres tècniques analítiques com l'electroforesi capil·lar i la cromatografia de fluids supercrítics per a la determinació dels compostos esmentats.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.
Eva Pocurull Aixalà
ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010



DESCRIPCIÓ GENERAL

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

En els darrers anys, dins de l'Àrea de Química Analítica de la Facultat de Química de Tarragona, s'està treballant en el desenvolupament de mètodes cromatogràfics per a la determinació de diferents contaminants mediambientals.

Així doncs, mitjançant aquests estudis s'han desenvolupat mètodes per a la determinació de plaguicides [1,2], hidrocarburs aromàtics policíclics [3], fenols [4,5], etc, tots ells en mostres aquoses.

La present tesi doctoral representa una contribució a la tasca que es porta a terme dins d'aquest grup de recerca, i s'ha centrat en l'estudi dels sistemes d'extracció en fase sòlida per a la determinació de diferents compostos fenòlics en aigües mitjançant diferents tècniques de separació, principalment la cromatografia líquida d'alta resolució.

Els compostos fenòlics són un grup de compostos orgànics formats bàsicament per un anell benzènic sobre el qual es troben directament enllaçats un o més grups hidroxil. De vegades, alguns hidrògens benzènics se substitueixen per àtoms de clor, grups metil o nitro, etc.

La presència de fenols a les aigües és deguda principalment a dues fonts. La primera d'elles és d'origen natural i té com a font la descomposició de productes tan diversos com la lignina de la fusta, diferents pigments colorejats de les flors, certs antibiòtics i alguns alcaloides [6,7]. La segona, la qual té lloc de manera més puntual, està constituïda per les aigües residuals industrials ja que moltes indústries empen els fenols com a matèries primeres o com a productes intermedis en el procés de manufacturització. Així, per exemple, el fenol s'utilitza en la fabricació de reïnes, nylon, plastificants, additius, drogues, etc. [8]. Entre els derivats fenòlics més importants, els clorofenols s'utilitzen en la manufactura d'herbicides, biocides, insecticides, i concretament el pentaclorofenol, un dels derivats clorats més tòxics, s'utilitza com a fungicida tant en la indústria tèxtil com paperera [7], etc...; els nitrofenols s'empen majoritàriament com a intermedis en la producció de tints, pigments, explosius, fàrmacs [9] i els derivats metilats en la fabricació d'aïllants i conservants [10].

En general, els fenols se solen trobar a les aigües en quantitats petites però quan se sobrepassen certs nivells de concentració poden ser tòxics per als organismes marins així com per a l'home. El fenol, per exemple, és tòxic per als peixos quan es troba a una concentració de 1 mg l⁻¹ i a concentracions

inferiors ho és per a altres organismes marins [11]. El principal problema que ocasionen els fenols és que en el procés de cloració de les aigües potables reaccionen amb el clor i es transformen en els corresponents derivats clorats, els quals tenen uns llindars d'olor i sabor molt baixos. Pels mono i diclorofenols aquest llindar és de $1 \mu\text{g l}^{-1}$ [6]. Per tal d'evitar aquest problema és aconsellable eliminar els fenols de l'aigua abans del procés de cloració, per la qual cosa s'empren processos d'oxidació (ozó, diòxid de clor), tractaments biològics (pseudomonas), tractaments mecànics o adsorció sobre carbó actiu [7].

Degut a les característiques toxicològiques que presenten els fenols, la seva presència a les aigües està regulada. Com que és difícil determinar el grau de toxicitat de cadascun dels compostos fenòlics, no existeix una uniformitat entre les legislacions de cadascun dels països a l'hora d'establir les concentracions màximes admissibles. Així, per exemple, la Directiva de la Unió Europea (U.E.) estableix com a concentració màxima admissible de fenols totals en aigua de beguda $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$, exclouent els fenols que no reaccionen amb el clor, i fixa com a concentració màxima individual el valor de $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ [12]. La legislació espanyola, degut a l'adhesió d'Espanya a la Comunitat Europea, s'ha adequat a les disposicions comunitàries segons queda reflectit en el B.O.E. del 20-IX-1990. La *World Health Organization* (W.H.O.) recentment ha indicat valors guia per alguns compostos fenòlics [13] essent la concentració màxima admissible pel 2,4,6-triclorofenol de $200 \mu\text{g l}^{-1}$, pel pentaclorofenol de $9 \mu\text{g l}^{-1}$, pel 2-clorofenol de $10 \mu\text{g l}^{-1}$ i pel 2,4-diclorofenol de $40 \mu\text{g l}^{-1}$.

Per tal de poder portar a terme el control del nivell de concentració de fenols a les aigües s'han desenvolupat diferents mètodes, els quals han anat evolucionant cap a una millora de la selectivitat i una disminució dels límits de detecció. Entre els primers es troben els que empren l'espectrofotometria, els quals presenten com a principal inconvenient el no poder diferenciar entre els diferents compostos fenòlics. Dins d'aquest grup, el mètode colorimètric per reacció amb la 4-amino-antipirina a pH bàsic forma part dels mètodes de referència de la U.E. [7] i també està descrit per les normes A.S.T.M. [14].

Per tal de poder realitzar una quantificació individual per a cada fenol s'han desenvolupat alguns mètodes mitjançant la cromatografia de gasos. El mètode que recullen les normes A.S.T.M. [15] consisteix en l'injecció directa de la mostra aquosa emprant com a detector el d'ionització de flama. D'altres

mètodes desenvolupats inclouen una etapa prèvia de derivatització de la mostra. Un exemple és el mètode recomanat per la E.P.A. [16] el qual emprava com a reactiu derivatitzant el bromur de pentafluorobenzil i com a detector el de captura electrònica. Aquests mètodes permeten arribar a límits de detecció inferiors als d'injecció directa però tenen els inconvenients inherents al procés de derivatització de mostres.

Un altre grup de mètodes desenvolupats per a la determinació de compostos fenòlics són els que empen la cromatografia líquida d'alta resolució. Generalment s'utilitza la cromatografia líquida en fase inversa amb el detector d'absorbància UV-visible o bé el detector electroquímic. Aquests mètodes presenten, com a principal avantatge respecte els desenvolupats mitjançant la cromatografia de gasos, que no necessiten una etapa prèvia a l'anàlisi per a la derivatització de la mostra.

Cap de les tècniques esmentades permeten la determinació dels compostos en estudi dintre dels límits recomenats per les normatives europees, ja que els valors recomenats són molt inferiors als límits de detecció dels mètodes desenvolupats. És doncs necessari, emprar un sistema de preconcentració de la mostra previ a la determinació cromatogràfica.

Els dos sistemes de preconcentració més emprats són l'extracció líquid-líquid i l'extracció en fase sòlida.

L'extracció líquid-líquid s'ha aplicat tant en mètodes desenvolupats mitjançant l'espectrofotometria [17] com les tècniques cromatogràfiques (C.G. [18,19] i HPLC [20,21]).

Degut als inconvenients que presenta aquest sistema de preconcentració (formació d'emulsions, gran manipulació de la mostra, utilització de volums grans de solvents orgànics, etc.), l'extracció en fase sòlida està essent una de les tècniques més estudiades actualment per tal de substituir aquesta darrera en molts camps d'aplicació.

Hom pot trobar a la bibliografia aplicacions de l'extracció en fase sòlida tant a la cromatografia de gasos [22-28] com a la cromatografia líquida [29-35] per a la determinació de compostos fenòlics.

La present tesi doctoral pretén ser una contribució a aquests estudis, analitzant els avantatges i inconvenients d'aquesta tècnica, emprant diferents tipus de sorbents, així com la problemàtica de l'acoblament a diferents tècniques de separació. La tesi s'ha centrat bàsicament en l'estudi de la determinació dels compostos fenòlics llistats per la *Environmental Protection Agency* (E.P.A.) com a contaminants prioritari [36,37]. A la Taula I es recull un llistat dels compostos estudiats i l'abreviació emprada, així com el corresponent valor de pK_a .

Taula I.- Compostos fenòlics estudiats. (* Pertanyen al grup de contaminants prioritari segons la E.P.A.)

COMPOSTOS FENÒLICS	ABREVIACIÓ	pK_a
Fenol*	Ph	9.9
2-nitrofenol*	2-NP	7.2
4-nitrofenol*	4-NP	7.1
2,4-dinitrofenol*	2,4-DNP	4.0
2-metilfenol	2-MP	10.2
4-metilfenol	4-MP	10.1
2,4-dimetilfenol*	2,4-DMP	10.4
2,6-dimetilfenol	2,6-DMP	10.5
2,4,6-trimetilfenol	2,4,6-TMP	10.7
2-clorofenol*	2-CP	8.1
4-clorofenol	4-CP	9.2
2,4-diclorofenol*	2,4-DCP	7.6
2,6-diclorofenol	2,6-DCP	6.8
2,4,6-triclorofenol*	2,4,6-TCP	7.4
Pentaclorofenol*	PCP	4.9
4-cloro-3-metilfenol*	4-C-3-MP	9.6
2-metil-4,6-dinitrofenol*	2-M-4,6-DNP	4.3

La tesi doctoral es pot dividir en dues parts, la primera de les quals correspon al capítol I, on es porta a terme, en primer lloc, una revisió bibliogràfica de les diferents tècniques més emprades per a la determinació d'aquests compostos, amb especial atenció a la HPLC ja que és la més utilitzada. En segon lloc, l'introducció se centra en la part fonamental d'aquesta tesi, el sistema de preconcentració. Tot i que es fa un breu repàs als sistemes d'extracció líquid-líquid, és l'extracció en fase sòlida la tècnica que es descriu més àmpliament. Així, primer es descriuen alguns aspectes teòrics, com són el fonament i les variables que afecten el procés d'extracció, i posteriorment, es descriu l'acoblament dels sistemes d'extracció en fase sòlida a tècniques de separació, principalment a la HPLC.

A la segona part, formada pels capítols següents, es descriu la part experimental portada a terme en la present tesi doctoral, incloent els diferents treballs que n'han sorgit, la majoria dels quals han estat publicats a diferents revistes internacionals i d'altres estan pendents de publicació.

En el capítol segon es realitza la determinació de diferents compostos fenòlics per HPLC amb detector de díodes en fila i es porta a terme un estudi del sistema *off-line* d'extracció en fase sòlida emprant comparativament diferents sorbents: C₁₈, ciclehexil i PLRP-S. A més a més de comparar les recuperacions i la selectivitat que proporciona cada tipus de fase sòlida, també es porta a terme l'estudi de la formació de parells iònics entre els analits i una sal d'amoni quaternària amb l'objectiu d'augmentar la retenció dels analits en el sorbent i per tant, els volums de ruptura.

En el capítol tercer es porta a terme un estudi similar al del capítol anterior, però emprant sorbents amb més capacitat de retenció dels fenols, segons la bibliografia, per tal d'intentar augmentar els volums de ruptura, principalment dels compostos més polars els quals queden poc retinguts en els sorbents emprats en el capítol II. Els sorbents triats per a portar a terme aquest estudi són el carbó i un copolímer d'estirè-divinilbenzè altament entrecreuat.

Per tal d'automatitzar el procés de preconcentració i intentar arribar a límits de detecció més baixos, en el capítol quart es porta a terme l'estudi de l'acoblament en línia del sistema de preconcentració a la HPLC amb detector de díodes en fila, emprant com a sorbents C₁₈ i PLRP-S. També s'utilitza l'addició d'un reactiu a la mostra per a la formació d'un parell iònic, el qual incrementa les recuperacions per a la majoria de compostos estudiats.

Per tal de millorar la sensibilitat del mètode es porta a terme un estudi emprant el detector electroquímic. En aquest estudi, descrit al capítol cinquè, s'empra el sistema de preconcentració que més bons resultats ha donat en l'estudi anterior: precolumna de PLRP-S i formació dels parells iònics. Degut a la utilització d'un sistema d'elució isocràtic es fa necessari emprar dues fases mòbils amb diferent força elutròpica (una pel 2,4,6-TCP i PCP i una altra per a la resta de fenols estudiats).

L'acoblament en línia de l'extracció en fase sòlida a la HPLC, quan s'empen sorbents amb una elevada capacitat de retenció dels fenols, pot implicar un aixamplament dels pics cromatogràfics, que depèn principalment del tipus de sorbent emprat en la precolumna i del tipus de fase estacionària emprada en la columna analítica. Per tal de minimitzar aquest inconvenient, en el capítol sisè s'estudia la possibilitat de modificar el disseny de l'equip respecte el convencional. Aquesta modificació permet eluir els analits només amb el solvent orgànic emprat, ja que la mescla dels solvents que formen la fase mòbil es realitza després de l'elució. Els resultats es comparen, emprant C₁₈ i PLRP-S com a sorbents, amb els obtinguts emprant un disseny d'equip convencional. El nou disseny permet l'acoblament del copolímer d'estirè-divinilbenzè altament entrecreuat al sistema cromatogràfic, acoblament que presenta importants limitacions amb el disseny comercial.

En el capítol setè s'estudia la determinació dels compostos fenòlics emprant les millors condicions trobades en els treballs anteriors. Així, es realitza un estudi comparatiu de preconcentració en línia amb PLRP-S i el copolímer d'estirè-divinilbenzè altament entrecreuat emprant la formació del parell iònic. L'equip de HPLC emprat és el que presenta una modificació en el disseny i com a detectors s'utilitzen el d'absorbància UV-visible i l'electroquímic connectats en sèrie. D'aquesta manera, els nitrofenols són detectats pel detector ultraviolat ja que l'electroquímic és poc sensible per aquests compostos al potencial de treball. La resta de fenols estudiats es detecten amb l'electroquímic ja que presenta més bona sensibilitat per a aquests compostos.

En el capítol vuitè, s'estudia l'acoblament de l'extracció en fase sòlida a la cromatografia de fluids supercrítics amb detector de diodes en fila. Els sorbents emprats són C₁₈, PLRP-S i el copolímer d'estirè-divinilbenzè altament entrecreuat. També s'empra el parell iònic per tal d'augmentar els volums de ruptura, principalment pel fenol. S'estudien totes les variables que afecten a la separació cromatogràfica, així com les que afecten a l'acoblament de

l'extracció en fase sòlida a la cromatografia de fluids supercrítics. Cal indicar que l'acoblament de l'extracció en fase sòlida es pot portar a terme tan sols addicionant, respecte el mètode emprat en l'acoblament a la cromatografia líquida d'alta resolució, una etapa de secat del sorbent de la precolumna.

En el capítol novè s'estudia la determinació dels fenols mitjançant una altra tècnica de separació de més recent desenvolupament, com és l'electroforesi capil·lar de zona, essent el detector emprat el d'absorbància UV-visible. S'estudien els avantatges i limitacions d'aquesta tècnica en la determinació dels compostos esmentats i s'aplica un sistema *off-line* d'extracció en fase sòlida com a procés de concentració de la mostra.

En cadascun dels treballs, es porta a terme la validació del mètode desenvolupat en mostres reals, i generalment s'empra aigua de subministrament urbà de la ciutat de Tarragona i aigua del riu Ebre.

BIBLIOGRAFIA

- [1] C. Crespo, R.M. Marcé, F. Borrull, J. Chromatogr. A, **670** (1994) 135.
- [2] R.M. Marcé, H. Prosen, C. Crespo, M. Calull, F. Borrull, U.A.Th. Brinkman, J. Chromatogr. A, **696** (1995) 63.
- [3] R. Al Harrak, M. Calull, R.M. Marcé, F. Borrull, Inter. J. Environ. Anal. Chem., (1996) (pendent publicació).
- [4] O. Busto, J.C. Olucha, F. Borrull, Chromatographia, **32** (1991) 566.
- [5] O. Busto, J.C. Olucha, F. Borrull, Chromatographia, **32** (1991) 423.
- [6] Asociación Española de Abastecimiento de Agua y Saneamiento, XI Jornadas Técnicas, 1990.
- [7] M.C. Gordó, D.M. González, M. Santos, "Análisis de fenoles en el agua de abastecimiento por HPLC". XI Jornadas Técnicas de la Asociación Española de Abastecimiento de Agua y Saneamiento, 1990.
- [8] Encyclopedia of Science & Technology, Vol. 10, Ed. Mc Graw-Hill, 5th. Ed., 1982.
- [9] J.W. Moore, S. Ramamoorthy, "Organic Chemical in Natural Waters. Applied Monitoring and Impact Assessment", Ed. Springer-Verlag, Nova York, 1984.
- [10] Weininger-Stermitz, "Química Orgànica", Ed. Reverté, 1988.
- [11] Consorci d'aigües de Tarragona, Manual sobre els fenols.
- [12] Drinking Water Directive 80/778/EEC, Comission of the European Communities, Brussels, 1980.
- [13] Guidelines for drinking-water quality, Vol. WHO 2nd Ed. Geneve, 1993.
- [14] Annual Book of ASTM Standards (1987). Water and Environmental Technology. Designation D 1783-87.
- [15] Annual Book of ASTM standards (1983). Water and Environmental Technology. Designation D 2580-83^{e1}.
- [16] Environmental Protection Agency, Federal Register (U.S.) 233, n°44, Dec. 3°, 69464.
- [17] B.K. Afghan, P.E. Belliveau, R.H. Larose, J.F. Ryan, Anal. Chim. Acta, **71** (1974) 355.
- [18] V.T. Kaplin, L.V. Semencheno, N.G. Fesenko, Hidrokim. Mater., **41** (1966) 42.
- [19] H.W. Briedenbach, J.T. Lichtenberg, C.F. Heink, D.J. Smith, J.W. Eichelberg, U.S. Dept. of Interior Pub., WP-22, November (1966).
- [20] P.A. Realini, J. Chromatogr. Sci., **19** (1981) 124.

- [21] P.J.M. Kwakman, D.A. Kamminga, U.A.Th. Brinkman, G.J. De Jong, J. Chromatogr., **553** (1991) 345.
- [22] E. Chladek, R.S. Marano, J. Chromatogr. Sci., **22** (1984) 313.
- [23] R. Infante, C. Gutiérrez, C. Pérez, Water Sci. Technol., **26** (1992) 2583.
- [24] E. Durhan, M. Lukasewycz, S. Baker, J. Chromatogr., **629** (1993) 67.
- [25] P. Mussmann, K. Levsen, W. Radeck, Fresenius Anal. Chem., **348** (1994) 654.
- [26] A. Tateda, J.S. Fritz, J. Chromatogr., **132** (1978) 329.
- [27] N. López-Avila, J. Milanés, N.S. Dodhiwala, W.F. Beckert, J. Chromatogr. Sci., **27** (1989) 209.
- [28] A. Gelencsér, G. Kiss, Z. Krivácsy, Z. Varga-Puchony, J. Hlavay, J. Chromatogr. A, **693** (1995) 227.
- [29] J.J. Sun, J.S. Fritz, J. Chromatogr., **590** (1992) 197.
- [30] B. Gawdzic, J. Gawdzic, U. Czerwinska-Bil, J. Chromatogr., **509** (1990) 136.
- [31] J. Ruana, I. Urbe, F. Borrull, J. Chromatogr. A, **655** (1993) 217.
- [32] U.A.Th. Brinkman, J. Chromatogr. A, **665** (1994) 217.
- [33] E.R. Brouwer, H. Lingeman, U.A.Th. Brinkman, Chromatographia, **29** (1990) 415.
- [34] M.T. Galcerán, O. Jáuregui, Anal. Chim. Acta, **304** (1995) 75.
- [35] D. Puig, D. Barceló, Chromatographia, **40** (1995) 435.
- [36] EPA method 604. Phenols in "Federal Register, October 26, 1984, Environmental Protection Agency, Part VIII, 40 CFR Part 136", p. 58.
- [37] EPA method 625. Base/neutral and acids in "Federal Register, October 26, 1984, Environmental Protection Agency, Part VIII, 40 CFR Part 136", p. 153.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

CAPÍTOL I. INTRODUCCIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

I.1.- ESTUDI BIBLIOGRÀFIC DE LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS

Des del punt de vista medi ambiental tal i com s'ha fet referència anteriorment, el nivell de concentració de fenols a les aigües ha esdevingut un paràmetre molt important a controlar ja que la majoria d'aquests compostos presenten propietats toxicològiques.

Per aquest motiu, s'han emprat diferents tècniques analítiques en el desenvolupament de mètodes que permetin la quantificació dels compostos fenòlics. Degut a que els nivells de concentració permesos per les diferents legislacions són nivells de traça, els mètodes desenvolupats han tingut una tendència clara cap a la millora dels límits de detecció.

Una de les primeres tècniques emprades fou l'espectrofotometria, tot i que actualment són les tècniques cromatogràfiques, cromatografia de gasos i cromatografia líquida d'alta resolució, les que han anat desplaçant a aquestes. També s'han utilitzat, encara que de forma més reduïda, altres tècniques que actualment s'estan desenvolupant, com la cromatografia de fluids supercrítics i l'electroforesi capil.lar. Alguns mètodes desenvolupats empen tècniques més complexes com l'espectroscòpia Raman [1], l'espectroscòpia ultraviolada utilitzant dues làmpares de diferents característiques [2] o els mètodes electroquimioluminiscent [3], però la falta de reproductibilitat ha fet que no s'emprin com a mètodes habituals d'anàlisi.

Els mètodes espectrofotomètrics desenvolupats es basen en la reacció dels derivats fenòlics amb diferents agents cromogènics. Com a reactius se solen emprar p-nitroanilina, mescla de mercuri i àcid nítric, o bé 4-aminoantipirina [4]. Entre els mètodes desenvolupats es troba el mètode de referència de la U.E. [5], el qual també està recollit per les normes A.S.T.M. [6]. Aquest mètode es fonamenta en la reacció dels fenols amb la 4-aminoantipirina a pH bàsic en presència de ferrocianur potàssic com agent oxidant. Com la resta de mètodes espectrofotomètrics desenvolupats, només permet la determinació de la concentració total de fenols, i a més, no detecta els derivats para-substituïts.

Altres mètodes espectrofotomètrics desenvolupats empen l'espectrometria infraroja [4], i només es poden aplicar a la determinació de compostos fenòlics

susceptibles de bromar-se en posició orto respectant els grups hidroxil, la qual cosa exclou la determinació de compostos fenòlics substituïts.

El fet que la utilització de les tècniques espectrofotomètriques tan sols permetin determinar la concentració total de fenols, ha impulsat el desenvolupament de diferents mètodes emprant les tècniques cromatogràfiques, les quals permeten la separació dels diferents compostos fenòlics així com la quantificació de cadascun d'ells.

Dins de les tècniques cromatogràfiques, s'han desenvolupat mètodes que empren la cromatografia de paper i la de capa fina [7-9]. Aquests mètodes solen extraure els derivats fenòlics de l'aigua mitjançant solvents orgànics o bé carbó actiu i després es determinen per capa fina o cromatografia de paper. En general, són mètodes amb poca reproductibilitat i escassa exactitud, per la qual cosa se solen emprar majoritàriament en l'anàlisi qualitativa.

Quant a la cromatografia de gasos, es troben a la bibliografia moltes més aplicacions que no pas per a les tècniques cromatogràfiques acabades d'esmentar. Són pocs els autors que empren la cromatografia de gasos amb injecció directa de la mostra degut principalment als elevats límits de detecció que aquest mètodes permeten i a la falta de reproductibilitat. Així, per exemple, alguns autors [5] realitzen la determinació de diferents compostos fenòlics per injecció directa de la mostra utilitzant com a detector el d'ionització de flama. Aquests mètodes només són aplicables a mostres en les quals la concentració de fenols és superior a 1 mg l^{-1} i degut a que l'elevada polaritat dels compostos provoca l'aparició de pics amb cues, la reproductibilitat és escassa.

Els mètodes descrits empren principalment el detector d'ionització de flama [10-15] i en alguns casos el de captura electrònica [16-18]. Alguns autors [12,19] utilitzen l'espectròmetre de masses acoblat al cromatògraf de gasos per realitzar l'identificació dels pics cromatogràfics ja que amb la resta de detectors emprats l'assignació tan sols es pot fer per comparació dels temps de retenció.

Per tal de disminuir la polaritat dels fenols i així solventar el problema de l'aparició de pics amb cues, alguns autors utilitzen un procés de derivatització de la mostra previ a l'anàlisi, essent els més emprats l'alquilació, l'acilació i la silanització.

L. V. Semenchenko et al. [10] formen els derivats metilats i després els separen i quantifiquen emprant com a detector el d'ionització de flama. Els límits de detecció que permet aquest mètode oscil·len al voltant dels pocs $\mu\text{g l}^{-1}$.

Altres autors com *J. Folke et al.* [16] i *K. Abrahamsson et al.* [17] determinen clorofenols formant prèviament a l'anàlisi per cromatografia de gasos els corresponents derivats acilats. Els primers empraven com a reactiu per a la reacció de derivatització el clorur de pentafluorobenzoil, comprovant que degut a efectes estèrics l'acilació no es produeix amb tots els clorofenols estudiats. L'anàlisi cromatogràfica es realitza emprant el detector de captura electrònica i, l'espectròmetre de masses per tal de corroborar les identifications. Els segons, que també empraven el detector de captura electrònica, realitzen un estudi comparatiu del procés de derivatització emprant com a reactiu l'acètic anhidre o el clorur de pentafluorobenzoil. Les conclusions a les quals arriben és que l'acètic és, dels dos reactius estudiats, el que causa menys soroll de fons i el que permet separar millor els isòmers.

Com exemple de la utilització dels derivats silanitzats, es pot citar a *D.A.J. Murray* [11] el qual forma els derivats trimetilsilats i els determina emprant dues columnes empaquetades i dos detectors d'ionització de flama. Els límits de detecció que permet aquest mètode oscil·len entre els 25 i 100 $\mu\text{g l}^{-1}$.

La majoria de mètodes desenvolupats mitjançant la cromatografia de gasos empraven un sistema de preconcentració de la mostra (extracció líquid-líquid [20,21] o extracció en fase sòlida [12-15,22,23]), per tal de disminuir els límits de detecció respecte als mètodes desenvolupats per injecció directa de la mostra.

La cromatografia líquida d'alta resolució que presenta com a principal avantatge sobre la cromatografia de gasos no necessitar una etapa de derivatització de la mostra prèvia a l'anàlisi, és la tècnica més emprada actualment per a la determinació de compostos fenòlics en aigua. Degut a les característiques que presenten aquests compostos la majoria d'autors empraven la cromatografia líquida de fase inversa.

En els darrers anys, alguns autors han estudiat l'acoblament de biosensors a la cromatografia líquida [26] per a la determinació de compostos fenòlics. Aquest tipus de detectors es fonamenten en la reacció enzimàtica entre els fenols i l'enzim tirosinasa i posterior detecció electroquímica dels compostos

formats. La principal problemàtica dels biosensors és l'estabilitat, però tenen l'avantatge de ser molt selectius. Altres treballs estudien l'acoblament dels biosensors a un sistema d'extracció en fase sòlida [25], o bé es centren en l'estudi de les variables que afecten al propi detector [24].

També es troben a la bibliografia alguns estudis emprant la cromatografia de fluids supercrítics i l'electroforesi capil·lar. Ambdues tècniques de separació són relativament noves, per la qual cosa la bibliografia trobada no és extensa, i se centra bàsicament en l'optimització de les condicions de separació. El principal avantatge que presenten respecte la CG o la HPLC és el curt temps d'anàlisi.

De les tècniques esmentades, la present tesi s'ha centrat bàsicament en la determinació de compostos fenòlics per cromatografia líquida d'alta resolució, emprant també la cromatografia de fluids supercrítics i l'electroforesi capil·lar, per la qual cosa a continuació ens centrarem en la bibliografia que hi ha referent a l'aplicació d'aquestes tècniques a la determinació de compostos fenòlics.

1.1.1.- CROMATOGRAFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ

Existeix una àmplia bibliografia sobre la determinació de compostos fenòlics emprant la HPLC. Els primers mètodes desenvolupats estudien les diferents variables que afecten la separació cromatogràfica, però degut a que l'anàlisi de fenols per injecció directa de la mostra no permet arribar als límits marcats per la legislació, aquests mètodes han anat evolucionant cap a l'utilització d'un procés de preconcentració, el qual es descriurà detalladament en l'apartat 1.2 d'aquest capítol, prèvi a l'anàlisi per HPLC.

Els mètodes trobats a la bibliografia es diferencien bàsicament en el tipus de columna i de detector, i en el sistema d'elució i tipus de solvent emprat en aquest procés. A continuació es tractaran cadascuna d'aquestes variables per separat.

1.1.1.1.- Tipus de columna

La determinació dels compostos fenòlics per HPLC es porta a terme mitjançant la fase inversa ja que aquests compostos són solubles en solvents polars.

Les fases estacionàries més emprades són les de base sílica enllaçades amb hidrocarburs lineals, essent C_{18} el més utilitzat [12,27-59] encara que també s'empra C_8 [65,66]. La principal limitació d'aquest tipus de fase estacionària és l'interval de pH de treball el qual oscil·la entre 2 i 7. A pH inferiors a 2 no és possible treballar ja que es produeix l'hidròlisi del grup éter format entre el suport i el grup funcional, i a pH superiors a 7 tampoc és possible ja que es dissol la sílica. Els compostos fenòlics estan tots protonats a pH igual o inferior a 3.

Un altre tipus de fases estacionàries que també s'ha emprat en alguns treballs per a la determinació dels fenols són les columnes polimèriques, concretament les d'estirè-divinilbenzè [58-64]. Aquest tipus de fase estacionària presenta com a propietat diferent respecte les de base sílica, que té un interval de pH de treball més ampli. En alguns treballs, com el de *C. Elvira-Cozar et al.* [36], s'empra una fase estacionària d'estirè-divinilbenzè que té enllaçats grups d'amoni quaternari. En aquest cas però, el mecanisme de retenció no s'explica per interaccions iòniques ja que en treballar amb una fase mòbil a pH 2 s'assegura la protonació de tots els fenols estudiats. Els autors expliquen que les interaccions es produeixen entre els anells aromàtics del polímer i els dels fenols.

En el treball de *G. Marko-Varga et al.* [59] s'estudia la determinació de 29 compostos fenòlics emprant comparativament quatre tipus diferents de fases estacionàries: C_{18} de base sílica, C_{18} de base polimèrica, estirè-divinilbenzè i carbó. Els autors conclouen que la millor separació s'obté amb la fase estacionària de base sílica enllaçada amb C_{18} degut possiblement als mecanismes mixtes d'interacció que tenen lloc entre els analits i la fase estacionària esmentada; així, per un costat es produeixen interaccions hidrofòbiques amb les cadenes de C_{18} i per altra banda tenen lloc interaccions polars amb els grups silanol.

D'altres autors com *E. Forgacs et al.* [30] també estudien la determinació de diferents compostos fenòlics emprant comparativament una columna de base sílica enllaçada amb C_{18} i una de carbó. Els resultats corroboren els obtinguts

per *G. Marko-Varga et al.* Així, es confirma que amb C_{18} els mecanismes d'interacció són mixtes mentre que amb el carbó, la retenció dels analits està governada principalment pels paràmetres estèrics dels substituents.

W. Golkiewicz et al. [67] observen, en estudiar comparativament la retenció de diferents compostos polars (entre ells alguns fenols) sobre una columna de C_{18} i una de carbó, que mentre que augmenta la polaritat del solut disminueix ràpidament la retenció sobre C_{18} , amb carbó aquesta disminució és molt més lenta. A partir d'aquests resultats els autors conclouen que pels compostos més polars el carbó té més afinitat que no pas el C_{18} .

En el treball de *K. Ugland et al.* [68] s'estudia la determinació de fenols mono-, di-, tri- i tetraclorats emprant comparativament una columna de sílica, una aminoalquil i una de C_{18} . La columna de C_{18} permet una millor separació que la resta de columnes estudiades, tant pel que fa a la separació dels grups com entre els isòmers. També és la que presenta una major estabilitat i rapidesa d'anàlisi.

El mecanisme d'interacció dels fenols sobre les fases estacionàries polimèriques també és estudiat per alguns autors com *C.E. Werkhoven et al.* [61]. En aquest treball s'estudia la determinació de diferents mono- i diclorofenols, i fenol, sobre una columna d'estirè-divinilbenzè. Les interaccions $\pi - \pi$ entre l'anell aromàtic dels fenols i el del farciment de la columna són les que expliquen el mecanisme de retenció. D'altra banda els autors observen que la retenció depèn del pH, de tal manera que si el pH de treball és més gran que el pK_a de l'analit la retenció disminueix ja que el fenolat presenta poca afinitat per l'estirè-divinilbenzè.

Quant a les dimensions de les columnes emprades es pot concloure, segons la bibliografia consultada, que la llargària oscil·la entre 10 i 50 cm essent les més usuals les de 20 o 25 cm. El diàmetre intern sol ser 4.0 o 4.6 mm encara que alguns autors empen columnes de diàmetres més petits, al voltant de 2 mm, anomenades *narrow-bore* [69,70].

En el treball de *A. Gratzfeld et al.* [69] es realitza un estudi comparatiu de la determinació de fenols amb una columna convencional de C_{18} i una altra amb 2.1 mm de diàmetre intern. Amb la columna convencional, de 4.0 mm de diàmetre intern, la quantitat mínima detectable és de 2.5 pg mentre que amb la de 2.1 mm és de 0.6 pg. En el treball de *R. Schuster et al.* [70], en el qual

també es compara una columna convencional de C_{18} amb una *narrow-bore* per a la determinació de clorofenols i fenol, s'obté una senyal 5 vegades més gran emprant la columna *narrow-bore*.

Junt amb l'avantatge de disminuir la difusió dels soluts al seu pas per la columna cromatogràfica, les columnes *narrow-bore* redueixen el consum de solvents ja que al tenir un diàmetre intern petit treballen a fluxes més baixos que les columnes convencionals. Així, mentre una columna convencional sol treballar a fluxes de fins 1-1.5 ml/min, les columnes *narrow-bore* treballen a fluxes de fins uns 0.3 ml/min. Tot i aquests avantatges, aquest tipus de columnes no solen ser emprades àmpliament degut als inconvenients que presenten. El seu petit diàmetre intern fa que els volums de mostra que s'injecten siguin més petits que en el cas de les columnes convencionals, són difícils d'aplicar a sistemes on-line, són molt sensibles a canvis bruscos de pressió, per la qual cosa solen tenir una vida més curta que les de diàmetre més gran, i necessiten una instrumentació adequada com per exemple que la cel.la del detector tingui un volum petit.

1.1.1.2.- Tipus d'elució i solvent

Els primers estudis trobats a la bibliografia, se centren en la possibilitat d'emprar l'elució isocràtica [27-30,71,72] degut als avantatges que presenta respecte la de gradient, però les diferents polaritats que presenten els fenols no permet obtenir una bona separació amb un temps d'anàlisi raonable. Així, per exemple *H.K. Lee et al.* [27] realitzen la separació cromatogràfica isocràtica dels 11 fenols considerats com a contaminants prioritaris segons la E.P.A. en 25 minuts, quedant alguns pics solapats i essent els darrers pics eluïts (2,4,6-TCP i PCP) bastant amples. Per tal de millorar l'eficàcia, d'altres autors com *N.G. Buckman et al.* [28] opten per emprar dues fases mòbils diferents, una pels més polars i una altra pels menys polars. D'aquesta manera l'eficàcia dels pics millora però el temps d'anàlisi no disminueix, per la qual cosa la majoria d'autors empen l'elució en gradient [26,31,51,59,69,71-73].

Com a fase mòbil se sol emprar aigua i un solvent orgànic, principalment metanol o acetonitril i en alguns casos tetrahidrofurà. El pH de la fase mòbil sol ser àcid i es regula en la majoria dels casos amb àcid acètic i de vegades amb tampó acetat. En el treball de *E. Nieminen et al.* [60] s'empra una fase mòbil a pH bàsic, però els autors observen que el control del pH ha de ser molt

rigurós ja que petites variacions respecte el valor òptim provoquen una disminució de la retenció o bé la falta de retenció. En el cas de l'elució isocràtica se solen emprar fases mòbils ternàries formades generalment per una barreja d'acetonitril, metanol, aigua i un percentatge d'àcid acètic [27-29] als quals de vegades també s'hi addiciona tetrahidrofurà [71]. En el cas de l'elució amb gradient la fase mòbil generalment està formada per un dels solvents orgànics citats i aigua a pH àcid.

En alguns estudis s'addiciona a la fase mòbil un reactiu de parell iònic. Un exemple és el treball de *N. Nomura et al.* [72], en el qual s'estudia la determinació d'alquilfenols per cromatografia de parells iònics emprant diferents columnes de base sílica i el detector d'absorbància ultraviolada-visible. La fase mòbil utilitzada és metanol/aigua amb un percentatge de bromur de tetraetilamoni o bé fosfat de tetrabutilamoni com a reactius per a la formació del parell iònic. Els autors conclouen que la separació és millor quan s'empra el parell iònic.

També hi ha alguns estudis teòrics per a l'optimització de la composició de la fase mòbil mitjançant tècniques quimiomètriques d'optimització [29,30,71,74,75].

1.1.1.3.- Sistemes de detecció

L'elecció del sistema de detecció és un paràmetre molt important a l'hora de desenvolupar un mètode analític ja que cada detector proporciona una sensibilitat i selectivitat determinades segons siguin els analits i les matrius de les mostres.

Els primers mètodes desenvolupats per a la determinació de fenols empenen el detector d'absorbància UV-visible, el qual continua essent actualment un dels més emprats degut a la seva gran estabilitat [12,27-34,52-57,60-64,67-70,76]. Tot i que té un ampli camp d'aplicació, ja que un gran nombre de compostos poden absorbir radiació electromagnètica dins de l'interval de longituds d'ona de treball, no presenta una sensibilitat adequada per tal de determinar els compostos fenòlics als nivells exigits per les normatives, per la qual cosa els mètodes desenvolupats emprant aquest detector solen incloure una etapa de preconcentració de la mostra.

Un dels primers treballs que aplica el detector d'absorbància UV-visible per a la determinació dels 11 fenols contaminants prioritaris segons la E.P.A. és el de *P.A. Realini et al.* [31]. Els autors empren, prèviament a l'anàlisi per HPLC, un sistema d'extracció líquid-líquid per tal de preconcentrar la mostra i per tant disminuir els límits de detecció.

La principal limitació que presenta aquest tipus de detector és la necessitat de treballar a una única longitud d'ona a la qual absorbeixin tots els compostos. Evidentment això causa una pèrdua de sensibilitat ja que la longitud d'ona de treball pot no ésser l'òptima per a tots els compostos analitzats. Aquest inconvenient se solventa amb la utilització del detector de diodes en fila (DAD) [35-37,39-42,54,58,64,70] el qual es caracteritza per la possibilitat d'adquirir l'espectre de cada compost en un mateix cromatograma i per tant, es pot determinar cada fenol a la longitud d'ona a la qual presenta una absorbància màxima. D'altra banda el detector de diodes en fila és una eina útil a l'hora d'identificar els pics cromatogràfics ja que permet comparar els espectres dels pics de la mostra problema amb els espectres dels patrons.

Un exemple d'aplicació del detector de diodes en fila per a la determinació de compostos fenòlics es pot veure en el treball de *M.W.F. Nielen et al.* [37], en el qual es determinen 29 compostos contaminants de les aigües, entre ells alguns fenols, emprant un sistema de preconcentració en fase sòlida acoblat a la HPLC. En l'aplicació a l'anàlisi de mostres d'aigües residuals, la comparació d'espectres permet identificar cinc dels compostos contaminants estudiats. En altres treballs més recents, com el de *E.R. Brouwer et al.* [39] també s'utilitza el detector de diodes en fila per a la determinació de diferents compostos fenòlics mitjançant un sistema de preconcentració en fase sòlida acoblat al cromatògraf líquid. En aquest cas, la comparació dels espectres dels pics d'una mostra d'aigua de riu amb els de la llibreria permet identificar un dels compostos.

Per tal de solventar l'inconvenient referent a la baixa sensibilitat que presenta el detector d'absorbància UV-visible respecte els compostos fenòlics, alguns autors empren el detector electroquímic. Aquest detector té una elevada sensibilitat pels compostos orgànics fàcilment oxidables o reduïbles com són els fenols. Es troben diferents tipus de detectors electroquímics, entre els quals els més emprats per a la determinació de fenols són els amperomètrics [45-50,56,57,60,61,69].

En el treball de *E. Nieminen et al.* [60] s'estudia la determinació del fenol, cresols i xilenols mitjançant HPLC emprant comparativament un detector d'absorbància UV-visible i un electroquímic. La longitud d'ona de treball escollida quan s'utilitza el detector UV és de 280 nm i el potencial de treball triat per treballar amb l'electroquímic és de 1.0 V, condicions en les quals s'obté una millor resposta per al conjunt de fenols estudiats. Sota aquestes condicions es comprova que la sensibilitat del detector electroquímic és unes 20 vegades superior a la de l'ultraviolat.

No obstant aquesta elevada sensibilitat, en el cas de treballar amb mostres reals poden aparèixer també altres pics deguts a substàncies interferents que són capaces d'oxidar-se o reduir-se en el potencial de treball, la qual cosa pot dificultar la identificació i/o quantificació dels pics d'interès. En aquests casos, se sol treballar, quan és possible, a un altre potencial en el qual les interferències no donin senyal mentre que els analits sí, tot i que pot representar una pèrdua de sensibilitat deguda a l'augment del soroll de fons. D'altres vegades, es busca per a cada compost la relació d'àrees per a dos valors de potencial diferents [46], valor que ajuda a la identificació de l'analit.

La majoria de treballs empen un sistema d'elució isocràtic per tal d'evitar la distorsió de la línia base causada per un canvi en la força iònica de la fase mòbil. Això implica, com en el cas del treball realitzat per *D.A. Baldwin et al.* [56], emprar dues fases mòbils per tal de no allargar el temps d'anàlisi, la qual cosa provocaria una pèrdua de sensibilitat dels últims pics eluïts. En aquest treball s'empra una fase per a l'elució de tots els fenols prioritaris segons la E.P.A. excepte els més apolars (2,4,6-TCP i PCP), i una altra amb més força elutroica per eluir el parell de compostos més apolars citats.

La determinació de compostos fenòlics per HPLC i detector electroquímic també sol anar acompanyada d'un sistema de preconcentració [45-49,58,61] ja que la sensibilitat d'aquest tipus de detector no és tan elevada com per arribar als límits de detecció que marquen les normatives.

La principal problemàtica que comporta la utilització de detectors electroquímics amb elèctrodes sòlids és una manca de reproductibilitat quan es produeix la contaminació de la superfície de l'elèctrode [77]. Això implica que periòdicament s'hagi de fer una neteja exhaustiva d'aquesta superfície, per a la qual se solen emprar substàncies polidores. Aquest procés de neteja porta implícit la parada de tot el sistema cromatogràfic i la posterior posta en marxa,

amb la consegüent espera d'un temps fins que es torna a assolir l'estabilitat del corrent de fons. Aquest procés és evidentment engorros i llarg, per la qual cosa alguns autors [78,79] recomanen emprar escombrats cíclics de potencial repetides vegades per tal d'eliminar els compostos que puguin haver quedat dipositats a la superfície de l'elèctrode. D'altres autors [77] proposen realitzar un pretractament electroquímic a l'elèctrode per tal d'allargar la seva estabilitat.

L'inconvenient més important d'aquest tipus de detector sobre la determinació de compostos fenòlics és el fet de la detecció dels nitroderivats juntament amb altres fenols. Tal i com es mostra en el treball realitzat per *J. Ruana et al.* [46], quan es determinen els fenols prioritaris segons la E.P.A. entre els quals hi ha alguns nitroderivats, la sensibilitat del detector electroquímic és baixa per aquests derivats al potencial de treball (1.0 V), el qual és adequat per a la resta de compostos. En aquest cas, el detector ultraviolat presenta millor sensibilitat pels nitrofenols que no pas l'electroquímic.

Així doncs, les característiques comentades pels detectors electroquímic i d'absorbància UV-visible fan que siguin els més emprats per a la determinació de fenols en aigües mitjançant HPLC.

Un altre tipus de detector que també s'ha emprat en alguns treballs per a la determinació de fenols és el detector de fluorescència. Aquest tipus de detector és en general més selectiu que no pas els dos anteriorment citats, però presenta l'inconvenient de que és necessari derivatitzar la mostra ja que la majoria de compostos fenòlics no són fluorescents. Per aquest motiu, el detector de fluorescència no se sol aplicar de forma generalitzada a la determinació de fenols, fet que ho demostra que en la bibliografia tan sols es trobin de forma puntual alguns treballs referits a aquest tema [43-45,51,61,80]. Generalment el procés de derivatització de la mostra, el qual implica allargar el temps d'anàlisi, consisteix en la formació del derivat dansilat el qual presenta una bona fluorescència, encara que alguns autors empen reaccions menys habituals com és el cas de *G. Lamprecht et al.* [43] els quals fan reaccionar els fenols amb Ce(IV) obtenint Ce(III) que és l'espècie fluorescent.

En el treball de *C.E. Werkhoven-Goewie et al.* [61] s'estudia la determinació de diferents derivats clorats juntament amb el fenol per HPLC emprant un sistema de preconcentració *on-line* i utilitzant comparativament el detector

d'absorbància UV-visible, l'electroquímic i el de fluorescència. En el cas de la utilització del detector de fluorescència s'estudien totes les variables que afecten el procés de detecció i com a conclusions més importants s'obtenen que la fluorescència disminueix a l'augmentar el grau de cloració dels fenols així com en augmentar el % d'aigua respecte el % de solvent orgànic que conté la mostra, i que la desoxigenació continua de la mostra provoca un augment de la senyal ja que evita la descomposició del fenol en presència d'oxigen. D'altra banda els autors conclouen que la utilització de cadascun dels tres tipus de detectors citats depèn del tipus d'aplicació. Així, quan analitzen aigua de riu obtenen bons resultats emprant el detector electroquímic, mentre que en el cas de treballar amb mostres més complexes com pot ser una mostra d'urina, el detector de fluorescència proporciona una millor selectivitat.

En altres treballs, com el de *M.-C. Hennion et al.* [45] on s'analitzen per HPLC diferents compostos orgànics entre els quals hi ha alguns fenols, el sistema de detecció està format pel detector d'absorbància UV-visible, el de fluorescència i l'electroquímic connectats en sèrie segons l'ordre citat. D'aquesta manera es poden determinar un ampli grup de compostos orgànics en una única injecció quantificant cada analit segons el senyal proporcionat pel tipus de detector que permet una millor sensibilitat.

L'acoblament de l'espectròmetre de masses a la HPLC amb diferents interfases per a la determinació d'alguns dels compostos fenòlics en aigües ha estat estudiat per alguns autors [81,82], però presenta importants limitacions de sensibilitat.

I.1.2.- CROMATOGRAFIA DE FLUIDS SUPERCRÍTICS

El desenvolupament més important que ha sofert aquesta tècnica ha estat en els darrers anys, per la qual cosa no es troba una bibliografia massa extensa.

L'interès per la cromatografia de fluids supercrítics, i per tant el seu desenvolupament, es deu a les propietats úniques que presenten els fluids supercrítics: tenen densitats similars a la dels líquids i posseeixen viscositats comparables a la dels gasos, per la qual cosa permeten analitzar un ampli rang de compostos amb una elevada eficàcia i ràpida velocitat de separació [83-85].

L'aplicació d'aquesta tècnica a la determinació de compostos fenòlics ha estat estudiada per alguns autors [86-89] els quals es centren principalment en l'optimització de les condicions cromatogràfiques per tal d'obtenir una bona separació cromatogràfica. Tots aquest treballs presenten com a tret comú el sistema de detecció el qual està format per un detector d'absorbància UV-visible.

Les variables estudiades per a l'optimització de la separació són: tipus de columna, tipus de fase mòbil i modificador, ús d'additius, temperatura i pressió.

El tipus de columna emprat és en alguns treballs una columna capil.lar de sílicé fosa [86-88], encara que alguns autors empen columnes convencionals de cromatografia líquida. Així, per exemple *T.A. Berger et al.* [89] realitzen un estudi comparatiu emprant diferents columnes de cromatografia líquida, com són una columna diol, una cianopropil i una amino, essent la columna diol la que proporciona la millor separació per als fenols estudiats.

Quant a la fase mòbil generalment s'utilitza CO_2 , i clorodifluorometà com a modificador, encara que actualment es tendeix a substituir-lo per metanol.

L'ús d'un additiu a la fase mòbil ha estat, segons alguns autors [89], un paràmetre que ha influenciat en la millora de la forma dels pics cromatogràfics.

En general aquesta tècnica presenta límits de detecció elevats respecte els nivells mínims acceptables dictats per les diferents normatives, per la qual cosa és necessari emprar un sistema de preconcentració.

1.1.3.- ELECTROFORESI CAPIL.LAR

A l'igual que la tècnica de separació anteriorment esmentada, l'electroforesi capil.lar és una tècnica relativament nova, per la qual cosa la bibliografia referent a la determinació de compostos fenòlics és reduïda.

La majoria d'aplicacions descrites per l'electroforesi capil.lar se centren en demostrar el gran poder de resolució que té aquesta tècnica per a diferents

analits dins del camp biomèdic, però hi ha poques aplicacions sobre la determinació de contaminants, entre ells els compostos fenòlics, en mostres reals. Quant als treballs aplicats a la determinació de fenols, es troben alguns que estudien la separació dels onze fenols contaminants prioritaris segons la E.P.A. mitjançant la cromatografia electrocinètica miscel·lar [90,91], emprant com a reactiu per a formar la miscel·la el dodecil sulfat sòdic o dodecil sulfat potàssic i com a detector el d'absorbància UV-visible.

La majoria de treballs, però, se centren en l'electroforesi capil·lar de zona [94-98] emprant generalment com a tampó electroforètic el borat sòdic o l'àcid ciclohexilaminoetansulfònic els quals proporcionen un pH bàsic. En aquest cas, el tipus de detector emprat sol ser el d'absorbància UV-visible encara que alguns autors empen el detector electroquímic [94,95] o el detector de fluorescència [96]. En alguns treballs, es troben aplicacions a mostres reals, concretament a aigües residuals industrials [94,95].

Altres estudien la separació de clorofenols mitjançant la isotacoforesi emprant com a additiu per a modificar les mobilitats efectives de cada compost estudiat, i per tant per aconseguir la separació, el β -ciclodextrin [92] o el polietilenglicol [93]. En ambdós treballs el detector emprat és el de conductivitat.

1.2.- EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA

Tal i com s'ha mencionat anteriorment, els compostos fenòlics estan presents a les aigües a nivells traça la qual cosa dificulta la seva determinació mitjançant una mesura instrumental directa. D'altra banda, els nivells màxims de concentració que permeten les diferents legislacions també són molt baixos per la qual cosa és necessari emprar un sistema de tractament de la mostra, prèviament a l'anàlisi instrumental, per tal de disminuir els límits de detecció i minimitzar les possibles interferències provinents de la matriu.

Un dels sistemes de tractament de mostra més emprat és l'extracció líquid-líquid [16,17,31,42,43,51,70,99,100], la qual es fonamenta en la partició dels fenols entre l'aigua i el solvent orgànic extraient.

La majoria de mètodes descrits a la bibliografia per portar a terme el procés d'extracció consisteixen en una acidificació de la mostra generalment a pH 2 - 2.5 i posterior extracció emprant un solvent orgànic com pot ser l'acetat de n-butí [99], el clorur de metilè [31] i l'hexà [17], o bé per mescles de solvents orgànics com hexà-dietil éter [16], entre d'altres. Alguns mètodes descrits empen la cromatografia de gasos per a l'anàlisi dels fenols [16,17] després del procés d'extracció. En aquells casos en els que s'empra la HPLC, un cop realitzada l'extracció se sol evaporar el solvent orgànic fins a sequetat i després es redissol la mostra amb un solvent adequat per a portar a terme la determinació per fase inversa [31,43,51,70].

Un altra estratègia seguida en l'extracció líquid-líquid consisteix en la utilització de parells iònics [31,51,100]. En aquests casos, el pH de la mostra es regula fins a valors bàsics i posteriorment s'hi addiciona el reactiu, que sol ser una sal d'amoni quaternari com ara tetrabutilamoni, que actua com a parell iònic. El pH de la mostra ha de ser el suficientment bàsic per a que tots els fenols estiguin en forma de fenolats ja que en cas contrari no es forma el parell iònic. Seguidament es realitza l'extracció tal i com s'ha comentat en el cas d'emprar un pH àcid.

Tot i que l'extracció líquid-líquid presenta l'avantatge de no necessitar un equip complex per a realitzar-se, presenta alguns inconvenients els quals han fet disminuir la seva aplicació com a sistema de tractament de mostra en l'anàlisi de fenols. Aquests inconvenients són la formació d'emulsions, la necessitat

d'utilitzar grans volums de solvents orgànics molt purs els quals degut a la seva toxicitat suposen un perill per al medi ambient i per a la salut humana, gran manipulació de la mostra, que comporta problemes de contaminació, augment del temps d'anàlisi i impossibilitat d'automatitzar el procés [101,102].

Així doncs, l'aparició de l'extracció en fase sòlida (SPE) està desplaçant l'extracció líquid-líquid. L'extracció en fase sòlida es fonamenta en la retenció selectiva que presenta la fase estacionària sobre els analits i de la qual són eluïts mitjançant un solvent adequat.

Aquest tipus de sistema de preconcentració de mostra s'està convertint en el més emprat degut a que, encara que té alguns inconvenients que després analitzarem, minimitza els inconvenients citats anteriorment per a l'extracció líquid-líquid i proporciona millors resultats tal i com queda reflectit, per exemple, en el treball de *F.P. Bigley et al.* [42]. Els autors estudien la determinació de 10 compostos fenòlics per HPLC-DAD emprant comparativament un sistema d'extracció líquid-líquid amb cloroform i un sistema d'extracció en fase sòlida amb ciclehexil com a sorbent. Les recuperacions són millors emprant la SPE.

Alguns dels treballs que porten a terme la determinació dels compostos fenòlics per HPLC emprant l'extracció en fase sòlida, realitzen en primer lloc la preconcentració de la mostra i després n'injecten, en el cromatògraf, una alíquota [12-15,32-36,46-48,103,04]. Per tal d'automatitzar el procés i disminuir el grau de manipulació de la mostra, d'altres autors estudien l'acoblament en línia de la SPE al sistema cromatogràfic [37-39,61,67,105-108]. En el primer cas l'automatització també és possible, però és menys senzilla ja que és necessari emprar robots [106].

En els darrers anys, s'està desenvolupant la microextracció en fase sòlida, la qual es caracteritza en que el sorbent es troba sobre un suport format per microfibrilles i l'elució es porta a terme tèrmicament, amb la qual cosa s'evita la utilització de sorbents orgànics. Degut a que és una tècnica relativament nova, no es troben molts treballs aplicats a la determinació de fenols [109].

En els apartats següents ens centrarem en l'extracció en fase sòlida ja que és la tècnica de preconcentració més emprada actualment, i és la que s'ha estudiat en aquesta tesi.

1.2.1.- FONAMENTS

L'extracció en fase sòlida es fonamenta en un procés físic basat en la diferent afinitat que experimenten els soluts entre dues fases, una fase estacionària i una fase mòbil. La mostra, que conté en solució els analits d'interès, es fa passar mitjançant un sistema de buit o de pressió a través de la fase estacionària o sorbent. La selectivitat del sorbent triat ha de ser tal que, en el cas ideal, només interaccioni amb els analits d'interès. Finalment es fa passar a través de la fase estacionària el volum mínim necessari d'un solvent amb una força elutròpica adequada per interaccionar amb els analits més fortament que el sorbent amb la qual cosa es produeix la desorció.

Els mecanismes principals que tenen lloc en la retenció dels analits sobre el sorbent són l'adsorció, la partició i les interaccions iòniques [102,107]. La capacitat d'adsorció depèn en part de les condicions en les que s'ha portat a terme el procés de manufacturació.

Encara que el principal objectiu de l'extracció en fase sòlida és preconcentrar la mostra, també en té d'altres entre els quals el més important és el d'eliminar els compostos interferents [102,110]. Així, segons sigui la selectivitat del sorbent retindrà tan sols els analits o bé els analits juntament amb les substàncies interferents. Quan la selectivitat del sorbent no és bona, és a dir, reté els analits i d'altres substàncies que no són d'interès, s'intenta buscar la selectivitat del procés en el solvent emprat en l'elució. Així, idealment aquest solvent ha d'eluir els analits i no els components interferents o viceversa. També en alguns casos s'inclou una etapa d'eliminació d'interferències. D'altres objectius per als quals de vegades s'utilitza l'extracció en fase sòlida són el fraccionament de la mostra en aquells casos en els quals a més de l'anàlisi de fenols interessa analitzar altres compostos orgànics presents en les aigües [45], l'emmagatzematge dels analits [35] i la derivatització entre els grups reactius de l'analit i els de la superfície del sorbent.

Una seqüència típica d'extracció en fase sòlida inclou els següents passos: activació i condicionament del sorbent, aplicació de la mostra, eliminació de les interferències, elució dels analits i regeneració del sorbent.

L'activació i condicionament del sorbent té com a finalitat assegurar el màxim contacte entre els analits i els grups funcionals del sorbent així com netejar la superfície del sorbent de substàncies provinents de mostres prèvies, sobretot en el cas de preconcentrar mostres reals. Quan es preconcentren mostres que contenen fenols, aquest procés se sol realitzar, en el cas d'usar sorbents hidrofòbics, fent fluir a través del sorbent uns mililitres d'un solvent orgànic i seguidament uns mililitres d'aigua. La funció del solvent orgànic és la de netejar el sorbent i activar els grups funcionals. Els solvents més emprats són metanol [12,54,65,66,104], acetonitril [64] o acetat d'etil [15] i de vegades mescles [46,103]. Els volums habitualment emprats oscil·len entre 1 i 10 ml. La funció de l'aigua és la d'eliminar l'excés de solvent orgànic per la qual cosa s'usen volums similars o inferiors als d'aquest. Sovint l'aigua s'acidifica [15,32,33,35] per tal de tenir el mateix pH que la mostra, el qual ha de ser àcid si es vol assegurar la completa protonació de tots els fenols per tal de tenir la màxima interacció amb la fase estacionària. En el cas d'emprar sorbents d'intercanvi iònic aquesta etapa del procés de preconcentració es realitza emprant solucions aquoses tamponades [53].

L'aplicació de la mostra es realitza a continuació de l'etapa descrita, sense deixar assecar el sorbent [12,15,22,103,104] ja que d'aquesta manera s'assegura un bon contacte entre els analits i els grups funcionals de la fase sòlida. Quan el sorbent és hidrofòbic, la mostra se sol acidificar [12,34,66] per evitar que algun fenol estigui en forma de fenolat, la qual no té tanta afinitat per aquests tipus de sorbents. En aquest pas s'eliminen totes les interferències presents a la mostra que no tenen afinitat pel sorbent i s'augmenta així la selectivitat del mètode.

La neteja de la mostra, la qual només s'empra en casos concrets, té com objectiu eluir del sorbent les substàncies interferents, les quals podrien dificultar la detecció dels analits d'interès. Quan el sorbent és hidrofòbic, la neteja es porta a terme emprant uns pocs mililitres d'aigua [12,32,54,103,104] o bé d'aigua acidificada [12,35,46]. Si el sorbent és d'intercanvi iònic, s'utilitza un solvent orgànic el qual elueix les molècules neutres [53].

L'elució dels analits es realitza emprant el volum i tipus de solvent adequats. El solvent adequat és el que elueix quantitativament els fenols però no la resta de compostos i, generalment interessa que el volum necessari sigui el mínim possible per tal de no provocar la dilució de la mostra. Els solvents més

emprats són metanol i acetonitril [32,36,46,104], excepte en el cas de realitzar l'anàlisi per cromatografia de gasos amb la qual cosa s'empren principalment hexà, acetat d'etil, etc. [13,15,22,33].

En alguns treballs [12,13,15,54,103,104], s'asseca el sorbent prèviament a l'elució per tal d'assegurar un contacte màxim entre el solvent i els analits. El procés d'assecat se sol realitzar amb una corrent d'aire [12,13,54,103,104] o de nitrogen [15].

Finalment es realitza l'etapa de regeneració del sorbent la qual coincideix generalment amb la d'activació i condicionament.

El sorbent pot estar contingut en cartutxos o discos. Els cartutxos són, en general de vidre [46] o de plàstic [12,14,15,53,65,103], essent un dels dissenys emprats el que es mostra a la figura 1. El sorbent es col·loca dins d'una xeringa entre dos fritats els quals fan de parets poroses protectores, ja que al seu través poden passar els solvents i les solucions de les mostres però no el sorbent. La part superior de la xeringa té com a funció fer de dipòsit dels solvents o solucions que es fan passar a través del sorbent mitjançant una pressió positiva (èmbol) o negativa (buit).

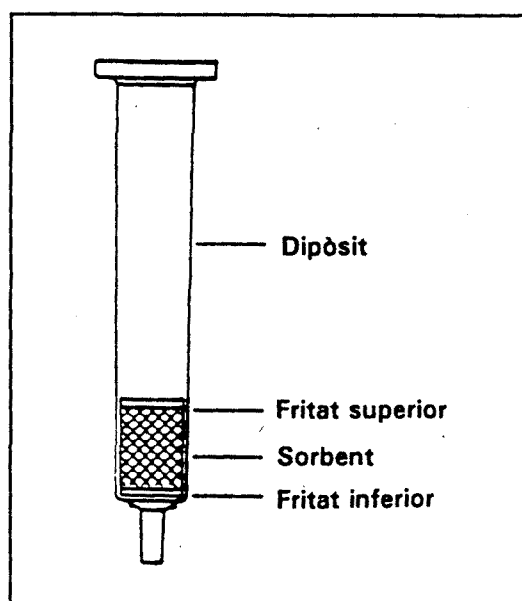
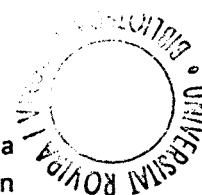


Figura 1.- Esquema d'un cartutx per SPE.

Els discos estan formats per una matriu de politetrafluoroetilè sobre la qual es troben els grups funcionals. Les dimensions més usals solen ser entre 25-47 mm de diàmetre i 0.5 mm de grossor. Degut a aquestes dimensions, permeten passar grans volums de mostra a velocitats superiors a la dels cartutxos. Generalment s'empren juntament amb un equip convencional de filtració [34,48]. Un exemple d'aplicació es troba en el treball de *M.T. Galcerán et al.* [48] en el qual s'empren cartutxos i discos de C_{18} per a la determinació de clorofenols i fenol en aigua de mar mitjançant HPLC i detector electroquímic. Emprant els cartutxos la mostra es fa passar a través del sorbent a una velocitat de 3-4 ml/min, mentre que amb els discos la velocitat augmenta fins a 20-25 ml/min. Les recuperacions que s'obtenen preconcentrant 250 ml d'aigua de mar amb una addició estàndard de $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ de cadascun dels fenols estudiats amb cartutxos de C_{18} , oscil·len al voltant del 100% per a la majoria de fenols. Emprant 1 disc de C_{18} oscil·len majoritàriament entre 70-85% i emprant 2 discos de C_{18} entre 75-90%. Evidentment, la recuperació per al fenol és en tots els casos baixa. D'altra banda, els autors observen que emprant discos apareixen més pics interferents cap a la zona d'elució del fenol que no pas emprant cartutxos.

Darrerament, s'estan desenvolupant els discos de microfibras [111], els quals són discos de microfibras de vidre impregnades amb sílica modificada. La principal característica d'aquests discos és que tenen unes masses de farciment efectives molt petites (des de 1.5 mg fins a 30 mg vs des de 100 mg fins a 500 mg els cartutxos i discos convencionals). Aquesta característica redueix o elimina el procés d'acondicament i redueix el nombre de passos de rentat i el temps necessari per a realitzar-los, així com el volum de reactiu necessari. El principal inconvenient és que els volums de mostra que s'utilitzen són petits per la qual cosa de vegades no es pot arribar als nivells de preconcentració necessaris.

Per tal d'automatitzar el procés de preconcentració es tendeix a l'acoblament en línia del sistema d'extracció i el sistema cromatogràfic. En aquests casos, els sorbents s'empaqueten en precolumnes. Les precolumnes són petites columnes, generalment d'acer inoxidable o de plàstic. Solen tenir unes dimensions que oscil·len entre 2 i 10 mm de llargària i entre 2 i 4,6 mm de diàmetre intern, essent les més emprades les de dimensions més reduïdes [108]. En el treball de *C.E. Goewie et al.* [55] s'estudia l'optimització de les dimensions de diferents precolumnes farcides amb C_{18} per a la determinació de 3,5-diclorofenol per HPLC amb detector d'absorbància UV-visible. Els autors



conclouen que la precisió és més bona quan el diàmetre intern de la precolumna és de 2 mm o superior ja que diàmetres més petits impedeixen realitzar l'empaquetament amb eficàcia. D'altra banda l'augment de la llargària provoca una disminució de l'eficàcia per la qual cosa recomanen emprar precolumnes de pocs centímetres.

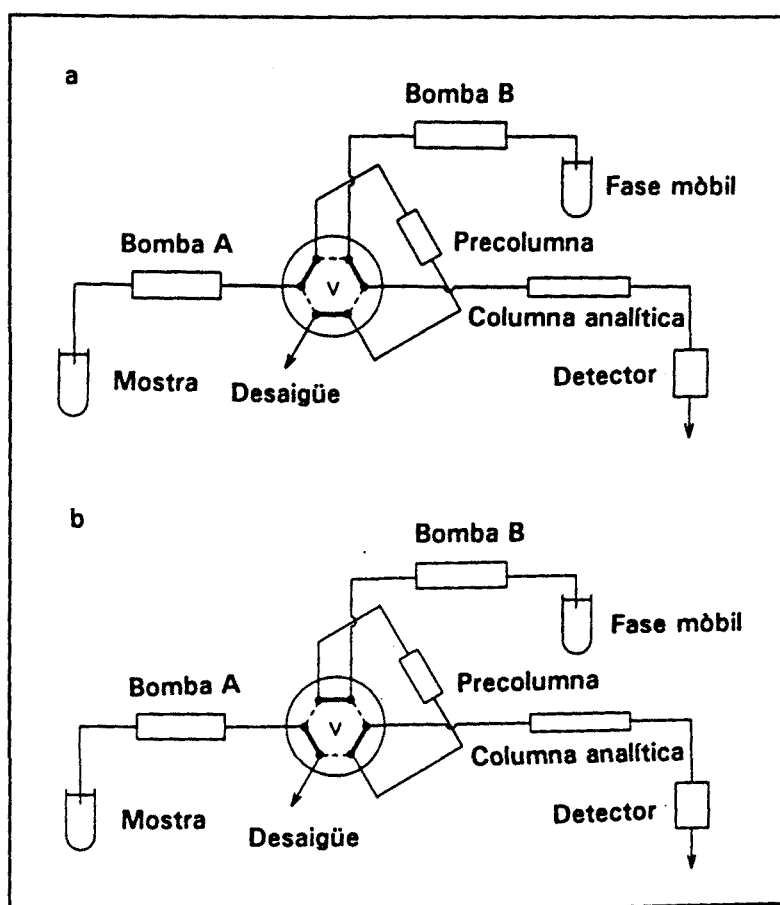


Figura 2.- Esquema d'un sistema en línia d'extracció en fase sòlida.
a) Posició de càrrega.
b) Posició d'injecció.

En el cas d'emprar discos, aquests tenen un diàmetre més petit que els emprats en els sistemes *off-line*, generalment uns 5 mm i, s'empaqueten en un dispositiu especial que permet contenir-ne un nombre variable. En el treball de *E.R. Brouwer et al.* [62] es descriu un disseny per l'acoblament de discos i s'estudia la determinació de diferents compostos orgànics en aigües emprant comparativament un sistema de preconcentració en línia amb una precolumna de C_{18} i un amb discos del mateix tipus de sorbent. Els autors comproven que els volums de ruptura trobats per a la precolumna de 10x2 mm D.I. són equivalents als que es troben emprant 3 discos.

Per tal de poder realitzar l'acoblament s'utilitzen vàlvules de 6 vies en les quals se situa la precolumna o el dispositiu que conté els discos. El sistema més senzill de preconcentració en línia consisteix en tenir una única vàlvula de 6 vies tal i com es mostra a la figura 2. La vàlvula té dues posicions de tal manera que quan està a la posició de càrrega (Figura 2a) es realitza la preconcentració dels analits i quan està a la posició d'injecció (Figura 2b) es realitza l'elució cap al sistema cromatogràfic. Segons es facin les connexions, l'elució dels analits es pot fer en el mateix sentit en el que es realitza la preconcentració o en sentit contrari.

A partir de l'estudi bibliogràfic es pot veure que, l'extracció en fase sòlida és actualment el sistema més emprat per a la preconcentració de compostos fenòlics en mostres aquoses degut als avantatges que presenta sobre el sistema anteriorment usat, l'extracció líquid-líquid. Aquests avantatges es poden resumir en:

- * Minimització del volum de solvent orgànic emprat.
La diferència de volums de solvents orgànics emprats en l'extracció líquid-líquid i l'extracció en fase sòlida és considerable. Així, en la SPE tan sols se n'empren un pocs mil·lilitres en l'etapa d'activació i acondicionament i en la d'elució. Això no tan sols implica un estalvi econòmic sinó també una disminució de la perillositat sobre la salut humana i una minimització de la contaminació del medi ambient.
- * Facilitat d'automatització.
La SPE és una tècnica senzilla d'automatitzar mitjançant la utilització d'electrovàlvules. Això minimitza els problemes que generalment comporta la manipulació de la mostra i fa que l'anàlisi sigui més ràpid i segur.

- * **No es formen emulsions.**
Les emulsions són el principal inconvenient en els sistemes d'extracció líquid-líquid, però en el sistemes d'extracció en fase sòlida s'eliminen completament.
- * **Flexibilitat.**
Mentre que l'extracció líquid-líquid tan sols permet emprar solvents que siguin immiscibles amb l'aigua, l'extracció en fase sòlida permet modificar la selectivitat del procés variant el tipus de sorbent, dels quals existeixen en el mercat una gran varietat, o bé el tipus de solvent.

Pel contrari, la SPE també presenta una sèrie d'inconvenients dels quals els més importants són:

- * **Interferències.**
Aquestes solen ser el principal inconvenient que presenta l'extracció en fase sòlida. Les interferències es produeixen quan diferents components que formen part del cartutx o disc, com poden ser els ftalats, són eluïts juntament amb els analits [34].
- * **Capacitat limitada del sorbent.**
Quan la capacitat del sorbent no és suficient es produeix la seva sobrecàrrega. En general les concentracions de fenols en les aigües solen estar a nivells traça, per la qual cosa la sobrecàrrega es produeix per altres components de la matriu de la mostra que queden retinguts en el sorbent.
- * **Disminució del nombre de centres actius.**
Si la matriu de la mostra conté una gran concentració d'altres substàncies de què són objecte d'estudi, aquestes poden ocupar els centres actius dels sorbent disminuint-ne la capacitat per retenir els analits d'interès. En general però, aquesta no és una problemàtica important en les matrius aquoses que s'analitzen, a excepció de mostres molt contaminades.

I.2.2.- ESTUDI DE LES VARIABLES

A l'hora de portar a terme un procés d'extracció en fase sòlida s'han d'optimitzar una sèrie de variables les quals es poden classificar en dos grans grups: les que són pròpies del sorbent i les que ho són del solvent. Les variables més importants que estan relacionades amb el sorbent són el tipus i quantitat. Amb el solvent són el tipus, volum i flux.

I.2.2.1.- Tipus de sorbent

L'elecció adequada del tipus de sorbent implica obtenir bones recuperacions i bona selectivitat. Això fa que l'elecció s'hagi de fer acuradament tenint en compte una sèrie de consideracions físico-químiques [110].

Una de les principals consideracions a tenir en compte és la naturalesa dels grups funcionals dels analits i la del sorbent. La naturalesa dels grups funcionals determina l'afinitat del solut pel sorbent i viceversa, per la qual cosa s'han de considerar tant la polaritat com l'acidesa d'aquests grups.

També s'han de tenir en compte les energies de les interaccions, les quals es recullen a la taula I. Com que el procés d'extracció és una combinació del de retenció i el d'elució, una energia d'interacció forta no sempre implica obtenir millors resultats. Si mirem la taula I es pot veure que l'enllaç covalent és el que proporciona una retenció més forta, però no és el més adequat en un procés d'extracció en fase sòlida ja que dificulta moltíssim el procés d'elució.

Per últim també s'han de tenir en compte les possibles interaccions produïdes entre el sorbent i els components de la matriu de la mostra, la qual cosa implica una disminució de la selectivitat. En general és molt difícil trobar un sorbent que proporcioni a la vegada la millor selectivitat i poder de retenció dels analits, per la qual cosa a l'hora de triar el sorbent s'ha d'arribar a un compromís entre aquestes dues variables.

Taula I.- Energies de diferents interaccions.

INTERACCIÓ	ENERGIA (kJ/MOL)
Dispersió	5-20
Dipol-dipol induït	8-25
Dipol-dipol	25-40
Pont d'hidrogen	25-40
Iònica	250-1050
Covalent	670-3360

Les característiques que diferencien els sorbents són [105]: funcionalitat, tamany de partícula i forma, àrea superficial i tamany de porus.

La funcionalitat és el tret principal que diferencia els sorbents i és el que expressa l'afinitat per un determinat tipus d'analit. Les interaccions analit-sorbent no tan sols depenen del tipus de grup funcional sinó també de la seva orientació.

El tamany i forma de les partícules estan relacionats amb el valor de l'àrea superficial. Així, quan més petit sigui el tamany de partícula més gran és l'àrea superficial i per tant el sorbent té més poder de retenció.

El valor de l'àrea superficial està íntimament lligat amb el nombre de centres actius. Els sorbents amb una gran àrea superficial per unitat de massa tenen més centres actius i per tant més capacitat de retenció dels analits. L'àrea superficial es pot incrementar mitjançant una estructura porosa del sorbent o per la pròpia orientació estèrica dels grups funcionals enllaçats.

D'altra banda, la característica comuna que ha de tenir qualsevol tipus de sorbent és ser químicament inert. Un canvi en la qualitat de la superfície del sorbent influeix en la reproductibilitat del procés de retenció. Les propietats catalítiques dels centres actius podrien provocar un canvi en els analits originals i per tant podrien donar falses identificacions. Per reduir les propietats catalítiques, és recomanable emprar materials homogenis. Per evitar altres possibles variacions, és recomanable no variar dràsticament les condicions (pH, pressió, temperatura, etc.) ni sobrepassar els límits de pH i temperatura.

Entre els diferents tipus de sorbents que existeixen en el mercat per a la preconcentració de fenols en mostres aquoses s'han emprat principalment sorbents de base sílica amb diferents grups químicament enllaçats o bé sorbents polimèrics, tot i que en alguns treballs també s'ha emprat carbó i de vegades intercanviadors iònics. A continuació es descriuran detalladament les aplicacions de cadascun d'aquests tipus de sorbents.

Síliques enllaçades

Les síliques enllaçades amb diferents grups funcionals constitueixen els sorbents més emprats dels sistemes d'extracció en fase sòlida ja que presenten una bona afinitat per a la majoria de compostos orgànics. Així, actualment s'utilitzen tant en sistemes *off-line* [12,13,23,46,47,65,66] com *on-line* [49,55,56] per a la preconcentració de compostos fenòlics.

Aquest grup de sorbents estan formats per un suport de sílica sobre el qual s'hi troben enllaçats grups alquil o aril. Entre els grups alquilics més emprats per a la preconcentració de fenols destaca el grup octadecil (C_{18}) [13,23,46,47,49,55,56,65,62], degut possiblement a la seva gran capacitat comparada amb altres síliques enllaçades. Així, per exemple en el treball de *E. Chladek et al.* [12] on s'estudia la determinació de diferents contaminants, entre ells els 11 fenols contaminants prioritaris segons la E.P.A., emprant comparativament un sistema d'extracció en fase sòlida, es mostra com amb C_{18} les recuperacions obtingudes són més bones que no pas amb C_2 , C_4 o C_8 .

Les síliques enllaçades amb grups C_{18} no tan sols s'empren en cartutxos o precolumnes, sinó que també s'usen com a discos d'extracció [48,62].

Entre els grups arílics enllaçats a la sílica el més estudiat és el ciclehexil. Segons alguns autors [12], el ciclehexil presenta millors recuperacions pels compostos més polars que la resta de síliques enllaçades. Així, en aquest treball es comparen diferents sorbents de base sílica per a la determinació de fenol. La recuperació més alta és l'obtinguda emprant ciclehexil (37%) mentre que la més baixa s'obté amb C_4 (<10%). Per a la resta de fenols les recuperacions emprant ciclehexil o C_{18} són similars [66].

El mecanisme que té lloc durant la retenció dels analits sobre els sorbents de base sílica encara no es coneix totalment, però alguns autors [59] apunten que

es tracta d'un mecanisme mixte. Per un costat l'analit sofreix interaccions hidrofòbiques amb les cadenes carbonades, essent aquest el mecanisme principal i d'altra banda, sofreix altres mecanismes secundaris.

Aquest fet explica que els sorbents de base sílica no presentin la mateixa afinitat per a tots els compostos fenòlics ja que aquests tenen un ampli interval de polaritat. Així, tal i com es pot comprovar en el treball de *J. Ruana et al.* [46] l'afinitat és molt bona pels fenols més apolars i va disminuint com més polar és l'analit. En aquest treball, on es determinen diferents fenols, entre els quals es troben els 11 prioritaris segons la E.P.A., realitzant una preconcentració amb cartutxos de C_{18} i posterior anàlisi per HPLC amb detector d'absorbància UV-Visible o electroquímic, les recuperacions preconcentrant 25 ml de mostra de 50 ppb són del 19% pel fenol (és el més polar), al voltant d'un 72% pel 4-NP i 79% pel 2-MP (ambdós de polaritat mitja) i sobre un 80-100% pel 2,4,6-TCP i 2,4-DCP (més apolars).

El principal inconvenient que presenten aquest tipus de fases sòlides és la seva poca selectivitat, per la qual cosa es poden produir interferències en l'anàlisi tal i com han demostrat alguns autors com *A. Gelencser et al.* [84]. En aquest treball es realitza un estudi teòric per a predir les recuperacions i mínimes quantitats que es poden quantificar de diferents fenols emprant un sistema de preconcentració en fase sòlida amb C_{18} i posterior anàlisi per GC/MS.

Polímers

Juntament amb les síliques enllaçades, aquests materials són els sorbents més emprats per a la preconcentració de composts orgànics. La seva característica més remarcable és que posseeixen una estructura molt homogènia per la qual cosa s'obté una bona reproductibilitat en l'anàlisi de traces.

Entre els diferents tipus de sorbents polimèrics els més emprats són els del copolímer d'estirè-divinilbenzè [22,39,48,58,61,63,106]. El mecanisme pel qual es produeix la retenció dels compostos fenòlics és mitjançant interaccions $\pi-\pi$ entre els anells aromàtics dels analits i els del sorbent [39]. En general la retenció és més forta quan més alt és el pes molecular de l'analit.

C.E. Werkhoven-Goewie et al. [61] estudien la determinació de fenol i derivats clorats emprant un sistema de preconcentració en línia amb un sorbent

polimèric d'estirè-divinilbenzè (PRP1) i posterior anàlisi per HPLC. Els autors conclouen que un dels factors que afecta a la retenció dels compostos estudiats és el pH de la mostra. Així, si el pH és més gran que el pK_a dels analits, llavors la retenció disminueix ja que l'ió fenolat té poca afinitat sobre el sorbent d'estirè-divinilbenzè.

Igual que en el cas del C_{18} , l'estirè-divinilbenzè s'utilitza tant en els sistemes *off-line* com en els *on-line* i alguns autors l'empren en forma de discos d'extracció [34,48].

L'afinitat d'aquest tipus de sorbent respecte als compostos fenòlics sol ser molt bona per als de polaritat mitja i va decreixent a mesura que el compost és més polar.

Degut a que l'estirè-divinilbenzè i el C_{18} són els dos sorbents més emprats per a la preconcentració de fenols, es troben a la bibliografia diferents treballs que els estudien de manera comparativa [22,104]. *P. Mussmann et al.* [22] determinen 27 fenols essent el fenol el que presenta una recuperació més baixa tant en un sorbent com en l'altre, però s'observa que amb el cartutx d'estirè-divinilbenzè la recuperació pel fenol és una mica més gran que amb C_{18} . *Liska et al.* [38] determinen diferents compostos orgànics entre els quals hi ha el 2-nitrofenol. Els autors conclouen que el volum de ruptura per aquest fenol és superior emprant PLRP-S que C_{18} ja que és un compost amb característiques polars.

Per tal d'augmentar les recuperacions quan es preconcentren fenols amb característiques polars, alguns autors empren sorbents d'estirè-divinilbenzè modificat. Un dels sorbents modificats és el 1,4-di(metacrilòloximetil)naftalendivinilbenzè (1,4-DMN-DVB). *B. Gawdzic et al.* [54] l'empren com a sorbent per a la preconcentració dels 11 fenols prioritari segons la E.P.A. els quals posteriorment són analitzats per HPLC. Els resultats es comparen amb els obtinguts emprant XAD-4 (sorbent polimèric d'estirè-divinilbenzè sense modificar). Els autors observen que el XAD-4 té més centres actius ja que posseeix un àrea superficial més gran, però d'altra banda el 1,4-DMN-DVB interacciona més fortament amb els fenols més polars ja que els grups éster que conté en la seva estructura li donen un caràcter polar feble.

Un altre tipus de modificació consisteix en acetilar o hidroximetilar l'estirè-divinilbenzè. *J.J. Sun et al.* [103] empren aquests tipus de sorbents polimèrics

per a la preconcentració de diferents fenols i comparen les recuperacions amb les que s'obtenen emprant estirè-divinilbenzè sense modificar. Pel fenol, que és el més polar, els polímers modificats donen millors recuperacions que el polímer sense modificar, essent el polímer acetilat el que proporciona una recuperació més gran. D'altra banda, els autors observen que els polímers derivatitzats presenten una gran afinitat per l'aigua amb la qual cosa no és tan essencial realitzar el procés d'activació del sorbent.

En el mercat existeixen altres tipus d'estirè-divinilbenzè, que es caracteritzen per tenir un alt grau d'entrecruament, sota noms comercials com Lichrolut [15], ENVI-Chrom P [39] o Hysphere 1 [106]. Tots ells es caracteritzen per retenir millor els fenols més polars que no pas l'estirè-divinilbenzè sense modificar. Són materials amb una excel·lent estabilitat química i mecànica.

Carbó

El carbó fou el primer mitjà emprat per a la retenció de compostos orgànics en mostres aquoses. Els principals avantatges que presenta el carbó són una gran capacitat d'adsorció i una gran estabilitat tèrmica. Pel contrari, la seva naturalesa heterogènia és la causant de diversos problemes com són les adsorcions irreversibles, l'afinitat per només un grup determinat de compostos o l'activitat catalítica a la seva superfície [111].

Per tal de minimitzar aquests inconvenients s'han preparat suports de carbó amb estructures més homogènies que els carbons clàssics. Aquest és el cas del carbó negre grafititzat el qual ha estat emprat per a la concentració de compostos fenòlics [14,32,33,35,67]. El carbó negre grafititzat s'obté calentant el carbó negre a 2700-3000°C en una atmosfera inert. El material que s'obté és no específic, no porós i amb una àrea superficial que oscil·la entre 8 i 100 m²/g [32,112].

El mecanisme pel qual el carbó negre grafititzat reté els compostos fenòlics no és clar. Alguns autors [32] afirmen que en l'estructura del carbó existeixen algunes heterogeneïtats contaminants formades per complexos d'oxigen provinents del residu obtingut en sotmetre el carbó a elevada temperatura durant el procés de grafitització. En presència d'aigua aquests grups contaminants es reorganitzen formant l'ió benzipirilium. La presència de grups

carregats positivament sobre la superfície del carbó fa que aquest material actuï tant com un intercanviador aniònic com un sorbent no específic.

Un exemple de l'aplicació d'aquest sorbent a la concentració de compostos fenòlics es mostra en el treball de *W. Golkiewicz et al.* [67], on s'estudia la preconcentració de diferents compostos polars en aigua mitjançant carbó i posterior anàlisi per HPLC. El carbó presenta una bona afinitat per als compostos polars especialment per aquells que contenen grups polaritzables com poden ser els clorurs o els grups nitro o fenil. Tot i que en augmentar la polaritat del solut la retenció disminueix, aquesta disminució és molt menys acusada que en el cas dels sorbents de base sílica.

Un exemple de l'aplicació del carbó negre grafititzat per a la preconcentració dels 11 fenols contaminants prioritaris segons la E.P.A. es mostra en el treball de *A. Di Corcia et al.* [35]. Els autors empen un cartutx reversible farcit amb 1 g de sorbent de tal manera que l'elució es fa en contracorrent, amb la qual cosa els compostos que presenten una baixa mobilitat al llarg del sorbent, es poden eluir amb un volum de solvent més petit. La separació i quantificació es porta a terme per HPLC amb detector de díodes en fila. El mètode desenvolupat s'aplica a la determinació dels fenols citats en aigua de beguda i en aigua de riu. La preconcentració fins a 2 l d'aigua de beguda i fins a 1.5 l d'aigua de riu implica bones recuperacions per a tots els compostos estudiats. Si es preconcentren volums superiors es produeixen pèrdues de fenol ja que és el compost més polar dels estudiats.

A la bibliografia es troben alguns treballs que comparen el carbó amb l'estirè-divinilbenzè. En concret, en el treball de *A. Tateda et al.* [14] s'estudia la determinació de diferents contaminants orgànics, entre ells alguns fenols, mitjançant GC/FID emprant un sistema de preconcentració en fase sòlida. Aquest sistema es desenvolupa comparativament utilitzant XAD-4 o bé carbó. En el treball es mostra com el carbó proporciona millors recuperacions que el XAD-4 pels compostos polars de baix pes molecular mentre que per a la resta de compostos estudiats les recuperacions són comparables.

Intercanviadors aniònics

Els intercanviadors iònics s'empen per a la preconcentració selectiva de compostos dissociables en aigua.

Per a la preconcentració de fenols degut a les seves característiques, alguns autors utilitzen intercanviadors aniònics [33,53], els quals estan formats per un suport de sílica o de polímer sobre el qual s'enllacen els grups funcionals com l'amoni quaternari o les amines terciàries o secundàries.

Per facilitar la retenció dels analits en aquests tipus de sorbents és molt important tenir una baixa força iònica i un pH adequat. És per això que el pH de la mostra se sol regular emprant una solució aquosa tamponada. L'elució es realitza amb aigua o amb una mescla de solvent orgànic/aigua amb una elevada força iònica i/o un pH adequat.

Un exemple d'utilització d'aquest tipus de sorbent se recull en el treball de *P. Alarcón et al.* [53], els quals estudien la determinació dels 11 fenols contaminants prioritaris segons la E.P.A. emprant la cromatografia líquida d'alta resolució amb detector d'absorbància ultraviolada-visible. La preconcentració es realitza mitjançant un cartutx d'intercanvi aniònic. El pH de la mostra es regula fins a un valor de 11 per tal d'assegurar la total desprotonació de tots els fenols. Després de passar la mostra a través del cartutx, els autors empen una etapa de neteja amb uns mililitres de metanol, aigua i àcid clorhídric. Per últim l'elució es porta a terme amb una mescla de metanol:àcid clorhídric (9:1). Seguint aquest mètode i preconcentrant 500 ml de mostra les recuperacions que s'obtenen oscil·len entre el 79% per al 4-NP i el 2,4-DCP i el 100% per al 2,4-DNP i 4-C-3-MP.

De l'estudi bibliogràfic s'observa que cada tipus de sorbent emprat per a la preconcentració dels compostos fenòlics presenta una afinitat més gran cap a un determinat grup de fenols. Així, els fenols més polars són atrets més fortament pel carbó, els de polaritat mitja per l'estirè-divinilbenzè i els no polars pel C_{18} . Els sorbents d'intercanvi aniònic retenen els fenols que estan ionitzats. Per tal d'aprofitar les característiques diferents de cada tipus de sorbent, a la bibliografia es troben alguns articles que empen diferents sorbents conjuntament.

Un exemple és el treball de *A. Di Corcia et al.* [33] en el qual s'empen dos cartutxos en sèrie, el primer de carbó i el segon d'intercanvi aniònic, per a la preconcentració de diferents compostos fenòlics. Posteriorment l'anàlisi es realitza per HPLC amb detector d'absorbància UV-visible. L'activació dels

cartutxos es realitza per separat i després es connecten en sèrie per preconcentrar la mostra. L'elució dels analits es realitza també en sèrie amb una mescla d'àcid fòrmic i clorur de metilè. Els fenols més àcids queden retinguts majoritàriament en l'intercanviador iònic mentre que els poc o no àcids ho fan en el carbó. El mètode s'aplica a aigua de l'aixeta, de tal manera que si la mostra conté una concentració elevada d'àcids fúlvics i húmics el volum màxim que es pot preconcentrar, per determinar acuradament tots els fenols en petites concentracions, és de 0.5 l.

P. Subra et al. [44] utilitzen dues precolumnes, una de C_{18} i una de PRP1, per a la preconcentració de diferents compostos orgànics entre els quals hi ha alguns fenols. La mostra es fa passar per les dues precolumnes connectades en sèrie mentre que l'elució es realitza per separat cap una columna de C_{18} . Així, per exemple el 2-NP que té un volum de ruptura molt petit amb C_{18} , amb PRP1 es poden preconcentrar fins a uns 75 ml de mostra.

Per a la determinació de 29 contaminants, entre els quals s'inclouen alguns fenols, en aigües residuals, *M.W.F. Nielsen et al.* [37] empen com a sistema de preconcentració 3 precolumnes connectades en sèrie: C_{18} , PRP1 i intercanvi catiònic. L'elució dels analits atrapats en cada precolumna es realitza separatament cap una columna analítica de C_{18} . A la precolumna de C_{18} queden retinguts majoritàriament el contaminants no polars, a la de PRP1 els moderadament polars i a la d'intercanvi catiònic els més polars.

En el treball de *E.R. Brouwer et al.* [39] s'empen en sèrie una precolumna de PLRP-S i una de ENVI-Chrom P. L'activació de les precolumnes es realitza en sèrie, mentre que la mostra es preconcentra fent passar 45 ml per la precolumna de PLRP-S i 5 ml per a les dues precolumnes connectades en sèrie. L'elució es fa separatament. De la columna de ENVI-Chrom P tan sols es quantifica el fenol, per la qual cosa a través d'aquesta precolumna només es passen 5 ml de mostra per evitar pèrdues d'aquest analit degudes al volum de ruptura. La resta de compostos, que són menys polars que el fenol, es retenen amb la precolumna de PLRP-S.

En els sistemes de preconcentració en fase sòlida, un cop fixats el tipus i quantitat de sorbent, queda fixada la capacitat d'aquest. La capacitat es defineix com la massa total d'analit que pot ser retinguda per una determinada massa de sorbent en condicions òptimes. Així, els sorbents d'intercanvi iònic

solen presentar capacitats de 0.5-1.5 meq/g, mentre que pels restants sorbents la capacitat varia entre 10 i 50 mg/g.

1.2.2.2.- Tipus de solvent

El tipus de solvent emprat en el procés de condicionament i activació del sorbent així com en el procés d'elució depèn del tipus de fase estacionària i de les característiques dels analits. Quan el sorbent és de base polimèrica o de base sílica els solvents més emprats solen ser metanol, acetonitril o mescles d'aquests solvents [46,54,65,104]. Si el sorbent és carbó es sol emprar sulfur de carboni, diclorometà o mescles d'algun d'aquests solvents amb metanol [13,14,103]. Per últim quan el sorbent és d'intercanvi aniònic es sol emprar un tampó amb el pH adequat per tal de neutralitzar la càrrega de la fase sòlida o bé la de l'analit [53].

Una vegada triat el tipus de solvent més adequat per a portar a terme la preconcentració, un dels paràmetres a optimitzar és el volum necessari per al procés d'elució. Aquest volum ha de ser el suficient per eluir tots els analits quantitativament, però no excessiu per a no diluir la mostra. Generalment, quan s'empen cartutxos entre 1 i 5 ml [12,46,54,104] són suficients encara que quan s'utilitzen fases sòlides de carbó aquest volum pot ser superior [14] degut a la gran capacitat de retenció que presenta aquest sorbent sobre els fenols. En el cas d'emprar discos, els volums necessaris són superiors als citats.

En aquells casos en els quals el sistema de preconcentració no permet preconcentrar la mostra fins als nivells desitjats, un cop s'ha fet l'elució dels analits s'empra un sistema que permeti evaporar part o la totalitat del solvent. El més emprat és l'evaporació mitjançant un rotavapor [65,103] encara que de vegades s'utilitza una corrent de nitrogen [15,22].

Aquest procediments d'evaporació del solvent de la mostra també s'empen quan el solvent emprat en el sistema de preconcentració no és compatible amb el de la fase mòbil. En aquests casos l'evaporació és total i posteriorment es tornen a solubilitzar els analits amb el mínim volum possible del solvent emprat a la fase mòbil [32].

Una altra variable referent al solvent és el flux emprat per a fer-lo fluir a través de la fase sòlida. Aquest flux ha de ser l'adequat per a permetre un bon contacte entre els analits i el solvent i a la vegada no allargar massa el temps d'anàlisi. El flux depèn del volum de mostra a preconcentrar i de si el sorbent està contingut en un cartutx o en discos. Tal i com s'ha descrit anteriorment els discos permeten fluxes més elevats que els cartutxos. Quan el volum de mostra a preconcentrar és petit se solen emprar fluxes entre 2 i 5 ml/min [12,22,54,104].

1.2.2.3.- Altres variables

En la preconcentració de compostos orgànics, degut a que tenen polaritats bastant diferents, és difícil trobar un sorbent amb una bona capacitat de retenció per a tots els compostos. Emprant més quantitat de sorbent s'aconsegueix augmentar la retenció dels analits, però a la vegada es fa necessari augmentar el volum de solvent per a l'elució. Per tal d'augmentar la retenció sense causar un augment del volum de solvent, alguns autors han estudiat l'efecte de l'addició de sal a la mostra o la utilització de parells iònics.

Hi ha diferents articles que estudien l'efecte de l'addició de clorur sòdic a la mostra per tal d'augmentar principalment les recuperacions dels fenols més polars [12,22,34,66]. A la majoria d'aquests articles els sorbents que s'empren són de base sílica (C₁₈ o ciclehexil) i els polimèrics (estirè-divinilbenzè).

Com exemple, en el treball de *E. Chladek et al.* [12] s'estudia l'addició de diferents concentracions de clorur sòdic sobre una mostra aquosa amb fenol per veure l'efecte sobre la recuperació quan s'utilitza un cartutx de ciclehexil. S'observa que preconcentrant 100 ml de mostra amb una addició estàndard de 1 mg l⁻¹ de fenol la recuperació és del 37% si no s'addiciona clorur sòdic, d'un 72% quan s'hi addiciona un 10% (p/v) de clorur sòdic i d'un 95% quan s'addiciona un 25% (p/v) de clorur sòdic.

J. Slobodnik et al. [58] realitzen un estudi similar al descrit per a la preconcentració de diferents contaminants, entre els quals es troben alguns fenols, emprant una precolumna d'estirè-divinilbenzè. En aquest cas però no s'observa una millora substancial en les recuperacions quan s'addiciona clorur sòdic a la mostra.

La utilització de parells iònics és un paràmetre que s'ha estudiat principalment en l'extracció líquid-líquid. Un exemple es troba en el treball de *P.A. Realini et al.* [31]. Els autors realitzen dues extraccions consecutives (una a pH àcid i l'altra a pH bàsic) per tal de preconcentrar els onze compostos fenòlics prioritari segons la E.P.A., els quals es determinen per HPLC amb detector d'absorbància UV-visible. Les extraccions es realitzen comparativament amb i sense la formació del parell iònic. En el cas de l'extracció a pH àcid, no s'observen excessives diferències excepte pel fenol. Les diferències més notables s'observen a l'extracció a pH bàsic.

El reactiu emprat per a la formació d'un parell iònic sol ser una molècula voluminosa de càrrega contrària a la de l'analit, de tal manera que amb aquesta interacció es forma una molècula més gran (el parell iònic) la qual pot interaccionar més fortament amb el sorbent. Per a la correcta formació del parell iònic la variable més important a controlar és el pH per tal de que l'analit i l'ió voluminós estiguin en forma iònica a la solució de la mostra.

Els treballs que es troben a la bibliografia sobre l'aplicació dels parells iònics a l'extracció en fase sòlida empen el parell iònic sobre el propi sorbent. Un exemple és el treball de *E.R. Brouwer et al.* [63], on s'estudia la preconcentració de diferents contaminants polars, entre ells alguns fenols, emprant dues precolumnes de PLRP-S en sèrie, la segona de les quals es carrega amb dodecil sulfat sòdic (reactiu de parell iònic). D'aquesta manera la primera precolumna reté els compostos neutres i els àcids no ionitzables, mentre que la precolumna carregada amb el reactiu de parell iònic reté els analits bàsics, que en aquest cas són els que tenen càrrega.

Un cop fixades totes les variables que afecten al procés de preconcentració de la mostra, s'han de determinar els volums de ruptura. El volum de ruptura és el volum màxim de mostra que es pot preconcentrar sense que es produeixin pèrdues dels analits per elució. El que interessa és que els volums de ruptura siguin el més grans possible ja que així augmenta el volum de mostra que es pot preconcentrar i per tant es poden arribar a límits de detecció més baixos.

Existeixen diferents mètodes per a determinar els volums de ruptura. Un dels mètodes emprats [54] consisteix en preconcentrar diferents volums de mostra que contenen una determinada addició de cadascun dels analits de tal manera

que la concentració teòrica final sempre és la mateixa. Un cop realitzada l'anàlisi cromatogràfica es calculen les recuperacions per a cada analit. Per últim, es dibuixa per a cada compost la gràfica corresponent al volum de mostra preconcentrada respecte el percentatge de recuperació. D'aquesta manera s'obté com a gràfica una línia horitzontal que en un cert punt sofreix una davallada brusca. El volum de mostra preconcentrada corresponent a aquest punt és el que es considera el volum de ruptura.

Un altre mètode emprat però tan sols en sistemes en línia consisteix en determinar l'anomenada corba de ruptura [110]. A la figura 3 es recull un esquema d'un exemple d'aquest tipus de corba.

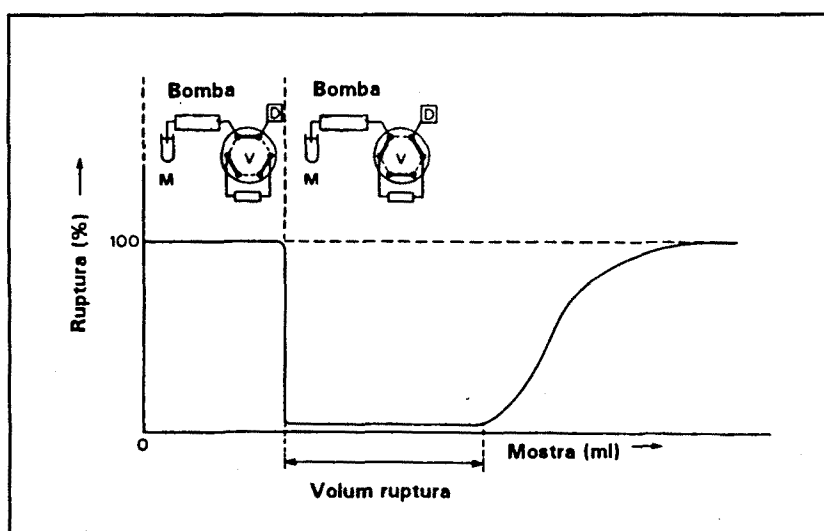


Figura 3.- Esquema d'una corba de ruptura.
M = mostra, V = vàlvula, D = detector.

A l'inici, la vàlvula de sis vies està a la posició amb la qual la mostra, que només conté l'analit del qual es vol determinar el volum de ruptura, passa directament cap al detector amb la qual cosa s'obté una línia horitzontal per sobre de zero a una alçada que depèn del senyal proporcionat pel detector per a l'analit emprat. Després d'un temps preseleccionat es gira la vàlvula per a

que la mostra passi a través de la precolumna i s'observa una disminució brusca del senyal degut a que l'analit és retingut pel sorbent. Quan el propi volum de mostra provoca l'elució de l'analit (punt de ruptura), el senyal que proporciona el detector torna a augmentar progressivament. D'aquesta manera s'obté per a cada analit una corba sobre la qual és senzill trobar el volum de ruptura.

El volum de ruptura és constant per a cada analit, tipus i quantitat de sorbent. De tal manera que si es varia una de les tres variables varia el valor del volum de ruptura. Determinat el volum de ruptura de cada analit queda determinat el volum màxim de mostra que es pot preconcentrar per tal d'obtenir bones recuperacions per a tots els compostos analitzats.

1.2.3.- ESTUDI DE L'ACOBLEMENT EN LÍNIA

Com s'ha comentat anteriorment, l'acoblament en línia de l'extracció en fase sòlida al sistema cromatogràfic es porta a terme mitjançant electrovàlvules. La precolumna, que és el dispositiu que conté el sorbent, es connecta a una electrovàlvula, la qual permet realitzar tot el procés de preconcentració de manera automàtica. Així, un cop els analits estan retinguts en el sorbent, un canvi de posició de l'electrovàlvula permet que la fase mòbil passi a través de la precolumna i elueixi els analits cap al sistema cromatogràfic. D'aquesta manera es disminueix la manipulació de la mostra, s'augmenta el grau d'automatització del procés i s'introdueix en la columna analítica tots els analits presents a la mostra preconcentrada.

En aquest apartat ens referirem a la problemàtica que existeix a l'acoblament en línia de l'extracció en fase sòlida a la HPLC i a la cromatografia de fluids supercrítics (SFC), ja que ambdues tècniques han estat emprades a la tesi.

La principal problemàtica observada en l'acoblament en línia SPE-HPLC és l'aixamplament dels pics cromatogràfics, la qual cosa pot ocasionar una pèrdua de resolució i sensibilitat, entre d'altres. El factor que més influència té sobre aquest fet és el tipus de fase sòlida emprada en la precolumna i el tipus de fase estacionària emprada en la columna analítica. En general, quan més diferents siguin aquests sorbents, més important és la pèrdua d'eficàcia.

Aquest és un problema important en l'anàlisi de fenols, ja que per un costat interessa emprar precolumnes amb sorbents que interaccionin fort amb els analits, i per l'altre costat interessa emprar com a columna analítica una de C_{18} ja que és de les que proporciona una millor separació. Com exemple, en el treball de *I. Liska et al.* [38] s'estudia la preconcentració en línia de diferents compostos polars, entre ells alguns fenols, emprant comparativament diferents fases sòlides. La columna analítica emprada és de C_{18} i el detector d'absorbància UV-visible. Emprant per a tots els sorbents una precolumna de 10 mm de llargària i 2.0 mm de diàmetre intern s'observa que l'aixamplament dels pics cromatogràfics és menor emprant precolumnes farcides de síliques enllaçades, i va augmentant quan s'empren sorbents polimèrics i encara més quan el sorbent és carbó. Aquest ordre és a l'inrevés quan el que es determina són els volums de ruptura. Així, els volums de ruptura més grans per als compostos analitzats es troben emprant carbó, són una mica inferiors emprant sorbents polimèrics i decreixen encara més emprant síliques enllaçades.

Altres factors que també tenen influència sobre l'aixamplament dels pics cromatogràfics en l'acoblament SPE-HPLC són les dimensions de la precolumna, el tamany de partícula del sorbent i la composició de la fase mòbil.

En general quan més gran és la precolumna més grans són els volums de ruptura però pel contrari disminueix l'eficàcia dels pics cromatogràfics, ja que augmenten els fenòmens de difusió [55]. Per minimitzar aquest inconvenient s'utilitzen precolumnes de petites dimensions. Depenent de si els analits queden o no retinguts a cap de precolumna, l'elució es pot portar a terme en el mateix sentit que la preconcentració o en sentit contrari per tal de minimitzar la pèrdua d'eficàcia. Generalment quan els analits queden retinguts a cap de precolumna es sol emprar l'elució en contracorrent ja que així els analits no han de passar a través de tot el sorbent i per tant, es minimitzen els processos de difusió. L'elució en contracorrent presenta l'inconvenient respecte l'elució en el mateix sentit que la preconcentració, que es solen eluir més quantitat de compostos que formen part de la matriu de la mostra i que han quedat retinguts en el sorbent.

El tamany de partícula també afecta l'eficàcia de tal manera que, com més gran és, més amples són els pics. L'avantatge d'emprar un tamany de partícula gran és que es poden emprar fluxes més alts per a la preconcentració de la mostra [110].

Quant a la composició de la fase mòbil, un percentatge elevat de solvent orgànic provoca una disminució del temps d'elució i per tant, minimitza la pèrdua d'eficàcia observada en l'acoblament. A la vegada però, causa una disminució dels temps de retenció. Si aquesta disminució comporta una elució ràpida dels compostos fenòlics més polars, aquests poden eluir juntament amb la banda inicial que s'observa al *preconcentrar mostres reals*, i per tant es fa més difícil la seva determinació.

L'acoblament SPE-HPLC malgrat les limitacions que presenta és senzill, mentre que l'acoblament SPE-GC i SPE-SFC precisa d'una sèrie d'etapes addicionals.

L'acoblament SPE-SFC per a la determinació de compostos fenòlics se sol realitzar de manera similar al descrit per a la HPLC però, és necessari incloure una etapa addicional de secat del sorbent prèviament a l'elució dels analits. Degut a la diferent solubilitat entre l'aigua i la fase mòbil (generalment CO₂) respecte els fenols, un secat insuficient de la precolumna provoca una pèrdua d'eficàcia. El temps de secat és característic de cada tipus i quantitat de sorbent i és un paràmetre que cal optimitzar.

Així doncs, la present tesi doctoral s'ha centrat en la determinació de compostos fenòlics emprant la cromatografia líquida d'alta resolució ja que, segons el recull bibliogràfic realitzat, és la tècnica més emprada actualment. Les diferents variables que afecten al procés cromatogràfic han estat triades tenint en compte els diferents treballs consultats. Així, s'ha utilitzat una columna analítica de base sílica enllaçada amb grups C₁₈, la separació s'ha portat a terme en general emprant un gradient binari degut a la diferent polaritat dels compostos estudiats i, els detectors emprats han estat el d'absorbància UV-visible, el de díodes en fila i l'electroquímic. Degut a la impossibilitat d'arribar als nivells de concentració exigits per les normatives mitjançant la injecció directa de la mostra, ha estat necessari emprar un sistema de preconcentració. La tècnica escollida ha estat l'extracció en fase sòlida degut als avantatges que presenta sobre l'extracció líquid-líquid, els quals han estat anteriorment comentats. En primer lloc s'ha portat a terme un estudi *off-line* de l'extracció en fase sòlida emprant diferents sorbents, per tal d'estudiar la seva selectivitat i capacitat de retenció dels fenols. Per tal d'augmentar els volums de ruptura i per tant, disminuir els límits de detecció, l'estudi *off-line* s'ha complementat analitzant la influència de la utilització de

parells iònics sobre la retenció. Seguidament i, per tal d'augmentar el grau d'automatització del procés i a la vegada disminuir els límits de detecció s'ha portat a terme l'estudi de l'acoblament en línia SPE-HPLC intentant minimitzar els inconvenients citats en el corresponent apartat del capítol I. Finalment s'ha estudiat la determinació dels compostos fenòlics mitjançant altres tècniques analítiques de desenvolupament més recent com són la cromatografia de fluids supercrítics i l'electroforesi capil·lar. En ambdues tècniques s'ha emprat un sistema d'extracció en fase sòlida, essent aquest acoblat en línia a la cromatografia de fluids supercrítics mentre que en el cas de l'electroforesi capil·lar s'ha emprat un sistema *off-line*.

I.3.- BIBLIOGRAFIA

- [1] L.V. Haverbeke, M.A. Herman, *Anal. Chem.*, **51** (1979) 932.
- [2] J.E. Fountaine, P.B. Joshipura, P.N. Keliher, J.D. Johnson, *Anal. Chem.*, **46** (1974) 62.
- [3] G.A. Dallakyan, V.A. Veselovski, B.N. Tarusov, S.I. Pegosyan, *Hydrobiol. J.*, **14** (1978) 90.
- [4] J. Rodier, "Análisis de las aguas", Ed. Omega (1981).
- [5] M.C. Gordó, D.M. González, M. Santos, "Análisis de fenoles en el agua de abastecimiento por HPLC". XI Jornadas Técnicas de la Asociación Española de Abastecimiento de Agua y Saneamiento, (1990).
- [6] *Annual Book of ASTM Standards* (1987). Water and Environmental Technology. Designation D 1783-87.
- [7] H. Thielemann, *Pharmazie*, **25** (1970) 365.
- [8] E. Ragazzi, V. Giovanni, *J. Chromatogr.*, **77** (1973) 369.
- [9] H. Thielemann, *Mikrochim. Acta*, **5** (1972) 669.
- [10] L.V. Semenchenko, V.T. Kaplin, *Zhur. Anat. Khim.*, **23** (1968) 1257.
- [11] D.A.J. Murray, *J. Fish Res. Bd. Can.*, **32** (1975) 292.
- [12] E. Chladek, R.S. Marano, *J. Chromatogr. Sci.*, **22** (1984) 313.
- [13] R. Infante, C. Gutiérrez, C. Pérez, *Wat. Sci. Tech.*, **26** (1992) 2583.
- [14] A. Tateda, J.S. Fritz, *J. Chromatogr.*, **132** (1978) 329.
- [15] Merck, Lichrolut Application (1994).
- [16] J. Folke, U. Lund, *J. Chromatogr.*, **279** (1983) 189.
- [17] K. Abrahamsson, T.M. Xie, *J. Chromatogr.*, **279** (1983) 199.
- [18] V. López-Avila, J. Milanes, N.S. Dodhiwala, W.F. Beckert, *J. Chromatogr. Sci.*, **27** (1989) 209.
- [19] E. Durhan, M. Lukasewycz, S. Baker, *J. Chromatogr.*, **629** (1993) 67.
- [20] V.T. Kaplin, L.V. Semenchenko, N.G. Fesenko, *Gidrokim. Mater.*, **41** (1966) 42.
- [21] H.W. Briedenbach, J.T. Lichtenberg, C.F. Heink, D.J. Smith, J.W. Eichelberg, U.S. Dept. of Interior Pub., WP-22, November (1966).
- [22] P. Mussmann, K. Levsen, W. Radeck, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **348** (1994) 654.
- [23] A. Gelencsér, G. Kiss, Z. Krivácsy, Z. Varga-Puchony, J. Hlavay, *J. Chromatogr. A*, **693** (1995) 227.
- [24] F.Liu, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón, J. Wang, *Talanta*, **41** (1994) 455.

- [25] E. Burestedt, J. Ennéus, L. Gorton, G. Marko-Varga, E. Domínguez, F. Ortega, A. Narváez, H. Irth, M. Lutz, D. Puig, D. Barceló, *Chromatographia*, **41** (1995) 207.
- [26] F. Ortega, E. Domínguez, E. Burestedt, J. Ennéus, L. Gorton, G. Marko-Varga, *J. Chromatogr. A*, **675** (1994) 65.
- [27] H.K. Lee, S.F.Y. Li, Y.H. Tay, *J. Chromatogr.*, **438** (1988) 429.
- [28] N.G. Buckman, J.O. Hill, R.J. Magee, M.J. McCormick, *J. Chromatogr.*, **284** (1984) 441.
- [29] S.F.Y. Li, H.K. Lee, *Chromatographia*, **25** (1988) 515.
- [30] E. Forgacs, T. Cserhati, B. Bordas, *Chromatographia*, **36** (1993) 19.
- [31] P.A. Realini, *J. Chromatogr. Sci.*, **19** (1981) 124.
- [32] A. Di Corcia, S. Marchese, R. Samperi, *J. Chromatogr.*, **642** (1993) 163.
- [33] A. Di Corcia, S. Marchese, R. Samperi, *J. Chromatogr.*, **642** (1993) 175.
- [34] L. Schmidt, J.J. Sun, J.S. Fritz, D.F. Hagen, C.G. Markell, E.E. Wisted, *J. Chromatogr.*, **641** (1993) 57.
- [35] A. Di Corcia, S. Marchese, R. Samperi, G. Ceccgini, L. Cirilli, *J. A.O.A.C. Int.*, **77** (1994) 446.
- [36] C. Elvira-Cozar, P. Cano-Faura, L.V. Pérez-Arribas, M.E. León-González, L.M. Polo-Díez, *Chromatographia*, **40** (1995) 91.
- [37] M.W.F. Nielen, U.A.Th. Brinkman, R.W. Frei, *Anal. Chem.*, **57** (1985) 806.
- [38] I. Liska, E.R. Brouwer, H. Lingeman, U.A.Th. Brinkman, *Chromatographia*, **37** (1993) 13.
- [39] E.R. Brouwer, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, **678** (1994) 223.
- [40] R. Cela, M. Lores, C.M. García, *J. Chromatogr.*, **626** (1992) 117.
- [41] B. Bartolomé, M.L. Bengoechea, M.C. Gálvez, F.J. Pérez-Illzarbe, T. Hernández, I. Estrella, C. Gómez-Cordovés, *J. Chromatogr. A*, **655** (1993) 119.
- [42] F.P. Bigley, R.L. Grob, *J. Chromatogr.*, **350** (1985) 407.
- [43] G. Lamprecht, J.F.K. Huber, *J. Chromatogr. A*, **667** (1994) 47.
- [44] P. Subra, M.-C. Hennion, R. Rosset, R.W. Frei, *J. Chromatogr.*, **456** (1988) 121.
- [45] M.-C. Hennion, P. Subra, R. Rosset, M. Grimaud, M. Callibotte, *J. Water SRT-Aqua*, **40** (1991) 35.
- [46] J. Ruana, I. Urbe, F. Borruall, *J. Chromatogr. A*, **655** (1993) 217.
- [47] C. Webster, M. Smith, P. Wilson, M. Cooke, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **16** (1993) 549.

- [48] M.T. Galcerán, O. Jáuregui, *Anal. Chim. Acta*, **304** (1995) 75.
- [49] J. Lehotay, M. Baloghova, S. Hatrik, *J. Liq. Chromatogr.*, **16** (1993) 999.
- [50] R.E. Shoup, G.S. Mayer, *Anal. Chem.*, **54** (1982) 1164.
- [51] P.J.M. Kwakman, D.A. Kamminga, U.A.Th. Brinkman, G.J. de Jong, *J. Chromatogr.*, **553** (1991) 345.
- [52] S. Hussain, M. Kifayatulla, *J. Chromatogr.*, **168** (1979) 517.
- [53] P. Alarcón, A. Bustos, B. Cañas, M.D. Andrés, L.M. Polo, *Chromatographia*, **24** (1987) 613.
- [54] B. Gawdzic, J. Gawdzic, U. Czerwinska-Bil, *J. Chromatogr.*, **509** (1990) 136.
- [55] C.E. Goewie, M.W.F. Nielen, R.W. Frei, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr.*, **301** (1984) 325.
- [56] D.A. Baldwin, J.K. Debowski, *Chromatographia*, **26** (1988) 186.
- [57] D.N. Armentrout, J.D. Mclean, M.W. Long, *Anal. Chem.*, **51** (1979) 1039.
- [58] J. Slobodnik, E.R. Brouwer, R.B. Geerdink, W.H. Mulder, H. Lingeman, U.A.Th. Brinkman, *Anal. Chim. Acta*, **268** (1992) 55.
- [59] G. Marko-Varga, D. Barceló, *Chromatographia*, **34** (1992) 146.
- [60] E. Nieminen, P. Heikkila, *J. Chromatogr.*, **464** (1989) 271.
- [61] C.E. Werkhoven-Goewie, W.M. Boon, A.J.J. Boon, A.J.J. Praat, R.W. Frei, U.A.Th. Brinkman, C.J. Little, *Chromatographia*, **16** (1982) 53.
- [62] E.R. Brouwer, H. Lingeman, U.A.Th. Brinkman, *Chromatographia*, **29** (1990) 415.
- [63] E.R. Brouwer, I. Liska, R.B. Geerdink, P.C.M. Frintrop, W.H. Mulder, H. Lingeman, U.A.Th. Brinkman, *Chromatographia*, **32** (1991) 445.
- [64] E.R. Brouwer, D.J. Van Iperen, I. Liska, H. Lingeman, U.A.Th. Brinkman, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **47** (1992) 257.
- [65] J.C. Hoffsommer, D.J. Glover, C.Y. Hazzard, *J. Chromatogr.*, **195** (1980) 435.
- [66] Analytichem International Research & Development. 02/17/86A1.
- [67] W. Golkiewicz, C.E. Werkhoven-Goewie, U.A.Th. Brinkman, R.W. Frei, H. Colin, G. Guiochon, *J. Chromatogr. Sci.*, **21** (1983) 27.
- [68] K. Ugland, E. Lundanes, T. Greibrokk, A. Bjorseth, *J. Chromatogr.*, **213** (1981) 83.
- [69] A. Gratzfeld, R. Schuster, Application Note, Hewlett Packard, 1990.
- [70] R. Schuster, Application Note, Hewlett-Packard HPLC.
- [71] C.P. Ong, H.K. Lee, S.F.Y. Li, *J. Chromatogr.*, **464** (1989) 405.
- [72] N. Nomura, R. Kaneko, M. Hara, *J. Liq. Chromatogr.*, **15** (1992) 885.

- [73] C. de Ruiter, J.F. Bohle, G.J. de Jong, U.A.Th. Brinkman, R.W. Frei, *Anal. Chem.*, **60** (1988) 666.
- [74] O. Busto, J.C. Olucha, F. Borrull, *Chromatographia*, **32** (1991) 566.
- [75] O. Busto, J.C. Olucha, F. Borrull, *Chromatographia*, **32** (1991) 423.
- [76] D. Puig, D. Barceló, *Chromatographia*, **40** (1995) 435.
- [77] J. Wang, P. Tuzhi, *Anal. Chem.*, **58** (1986) 1787.
- [78] D.C. Johnson, W.R. LaCourse, *Anal. Chem.*, **62** (1990) 589.
- [79] A.G. Huesgen, R. Schuster, Application Note, Hewlett-Packard.
- [80] C. de Ruiter, R.R. Otten, U.A.Th. Brinkman, R.W. Frei, *J. Chromatogr.*, **436** (1988) 429.
- [81] R.A. Hites, *Advances in Chromatography*, Ed. J.C. Giddings, Nueva York, (1977).
- [82] A. Apffel, M.L. Perry, *J. Chromatogr.*, **554** (1991) 103.
- [83] T.L. Chester, J.D. Pinkston, *Anal. Chem.*, **62** (1990) 394.
- [84] J.J. Suárez, J.L. Bueno, I. Medina, *Quím. Anal.*, **12** (1993) 192.
- [85] T.L. Chester, J.D. Pinkston, D.E. Raynie, *Anal. Chem.*, **66** (1994) 106.
- [86] C.P. Ong, H.K. Lee, S.F.Y. Li, *Anal. Chem.*, **62** (1990) 1389.
- [87] S.K. Yeo, C.P. Ong, H.K. Lee, S.F.Y. Li, *Environ. Monitor. and Ass.*, **19** (1991) 47.
- [88] C.P. Ong, H.K. Lee, S.F.Y. Li, *J. Chromatogr. Sci.*, **30** (1992) 319.
- [89] T.A. Berger, J.F. Deye, *J. Chromatogr. Sci.*, **29** (1991) 54.
- [90] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.*, **56** (1984) 113.
- [91] C.P. Ong, C.L. Ng, N.C. Chong, H.K. Lee, S.F.Y. Li, *J. Chromatogr.*, **516** (1990) 263.
- [92] P. Praus, V. Dombek, *Anal. Chim. Acta*, **281** (1993) 397.
- [93] P. Praus, V. Dombek, *Anal. Chim. Acta*, **283** (1993) 917.
- [94] I-C. Chen, C.-W. Whang, *J. Chin. Chem. Soc.*, **41** (1994) 419.
- [95] C.D. Gaitonde, P.V. Pathak, *J. Chromatogr.*, **514** (1990) 389.
- [96] Y.-C. Chao, C.-W. Whang, *J. Chromatogr. A*, **663** (1994) 229.
- [97] K. Bachmann, B. Gottlicher, I. Haag, W. Hensel, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **350** (1994) 716.
- [98] M. Aguilar, A. Farran, V. Martí, *Sci. Total Environ.*, **132** (1993) 133.
- [99] B.K. Afghan, P.E. Belliveau, R.H. Larose, J.F. Ryan, *Anal. Chim. Acta*, **71** (1974) 355.
- [100] M.E. León-González, L.V. Pérez-Arribas, M.J. Santos-Delgado, L.M. Polo-Díez, *Anal. Chim. Acta*, **258** (1992) 269.
- [101] M.C. Hennion, *Trends Anal. Chem.*, **10** (1991) 317.
- [102] L.A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente, *Chromatographia*, **40** (1995) 474.

- [103] J.J. Sun, J.S. Fritz, *J. Chromatogr.*, **590** (1992) 197.
- [104] J. Gawdzic, B. Gawdzic, U. Czerwinska-Bil, *Chromatographia*, **25** (1988) 504.
- [105] I. Liska, J. Krupcik, P.A. Leclerq, *J. High Resol. Chromatogr.*, **12** (1989) 577.
- [106] K. Kerkdijk, O. Halming, J.A. Ooms, nota de Spark Holland.
- [107] G. Font, J. Mañes, J.C. Moltó, Y. Picó, *J. Chromatogr.*, **642** (1993) 135.
- [108] U.A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, **665** (1994) 217.
- [109] K.D. Buchholz, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, **66** (1994) 160.
- [110] N.W.F. Nielen, Tesi, "Selective on-line precolumn sample handling and trace enrichment in liquid chromatography", (1987) Free University, Amsterdam.
- [111] G.M. Hearne, D.O. Hall, American Laboratory, (1993).
- [112] F. Bruner, G. Crescentini, F. Mangani, *Chromatographia*, **30** (1990) 565.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

**CAPÍTOL II. ESTUDI COMPARATIU DE L'EXTRACCIÓ EN
FASE SÒLIDA DE COMPOSTOS FENÒLICS.
INFLUÈNCIA DEL PARELL IÒNIC.**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

La part experimental desenvolupada s'ha iniciat amb l'estudi de la capacitat de retenció i selectivitat de diferents sorbents per ser emprats en un sistema *off-line* d'extracció en fase sòlida per a la preconcentració dels compostos fenòlics estudiats.

L'equip emprat per a dur a terme la separació i determinació dels analits ha estat un cromatògraf líquid HP 1090 equipat amb un detector de diodes en fila, el qual permet comparar els espectres dels pics de la mostra amb els d'una llibreria per tal de confirmar la presència d'un compost. La columna seleccionada, en funció de l'estudi bibliogràfic, ha estat una C₁₈ de base sílica.

En primer lloc s'ha dut a terme l'optimització de la separació cromatogràfica emprant un gradient d'elució, així com la determinació de l'interval de linealitat i els límits de detecció del mètode cromatogràfic.

Els sorbents emprats pel sistema d'extracció en fase sòlida han estat C₁₈ i PLRP-S, també s'ha utilitzat ciclehexil ja que en algunes cites bibliogràfiques es comenta la major retenció d'aquest sorbent pels fenols més polars. La quantitat de sorbent emprada ha estat en tots els casos de 500 mg, continguts en cartutxos comercials excepte els de PLRP-S, els quals s'han preparat manualment al laboratori. Per tal de portar a terme el procés d'extracció s'ha emprat un sistema comercial acoblat a un sistema de buit, el qual permet l'extracció de fins a dotze cartutxos simultàniament.

Per tal de seleccionar el millor sorbent, en primer lloc s'han optimitzat les diferents variables que afecten al procés de preconcentració, com són el tipus i volum de solvent emprat en l'elució i el pH de la mostra entre d'altres. Per a la selecció del solvent, s'han concentrat petits volums de mostra, per tal d'evitar pèrdues dels analits per elució, i s'han estudiat diferents solvents. És recomenable triar el que permeti l'elució de tots els compostos amb un mínim volum per tal d'evitar la dilució dels analits i per tant una pèrdua de sensibilitat. L'addició de clorur sòdic a la mostra també ha estat estudiada per tal d'afavorir el procés d'extracció, ja que segons alguns estudis bibliogràfics les recuperacions són més altes quan s'empra una força iònica elevada. Un cop fixades totes les variables s'han determinat els volums de ruptura per tal de conèixer els volums de mostra que es poden preconcentrar en cada tipus de sorbent sense pèrdua dels analits.

Posteriorment s'ha estudiat l'efecte de l'addició de parells iònics a la mostra sobre les recuperacions, per tal de poder augmentar el volum de mostra a preconcentrar, i així, disminuir els límits de detecció. Les variables optimitzades han estat el tipus de reactiu emprat per a la formació del parell iònic, la concentració d'aquest i el pH de la mostra. Seguidament, sota les condicions òptimes trobades, s'han calculat els volums de ruptura per a cada analit en cadascun dels sorbents emprats. D'aquesta manera ha quedat fixat el volum màxim de mostra que es pot preconcentrar sense que es produeixin pèrdues de cap dels fenols estudiats.

Finalment s'ha validat el mètode desenvolupat emprant mostres reals, concretament aigua de subministrament urbà de la ciutat de Tarragona i del riu Ebre.

Els resultats obtinguts es recullen en el següent treball.

COMPARATIVE STUDY OF SOLID-PHASE EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS. INFLUENCE OF THE ION PAIR REAGENT.

SUMMARY

A comparative study of the solid phase extraction of phenolic compounds in water was carried out. Three different sorbents, C₁₈, CH and PLRP-S, were tested for the preconcentration process in order to determine phenolic compounds in water at $\mu\text{g l}^{-1}$ levels by reversed-phase LC separation and diode-array detection. The addition of an ion-pair reagent in the extraction process was also studied in order to increase the breakthrough volume of some compounds. Using the optimized conditions the limit of detection was less than $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$, the maximum admissible concentration (MAC) in drinking water. The method was applied to determine phenolic compounds in Ebro river water however no phenols were found within the detection limits of the method.

INTRODUCTION

The presence of phenol and substituted phenols is not significant in natural water because they occur only as a result of some types of vegetables decomposition. Any increase is normally caused by incorrect treatment of waste water in industrial or mineral processes where phenol and substituted phenols are used [1].

Only traces of phenolic compounds are needed for significant detriment to water quality, being toxic to fish and aquatic life in general, but, even at very low concentrations (less than 1 ng ml^{-1} phenol, normally nontoxic), the taste and odour of water and fish are affected. The disinfection process with chlorine increases the effect of odour and taste because of the formation of chlorinated phenolic compounds [2-4].

Several HPLC methods using mass spectrometry [5], precolumn derivatization with chemiluminescence detection [6], micellar electrokinetic chromatography [7], electrochemical detection [4,8,9,15] and UV detection [10-15] have been developed and the related technique capillary zone electrophoresis has also been applied [16]. Otherwise the most used technique is HPLC with UV detection because of its robustness and the presence of fewer interfering peaks in the chromatogram of real samples compared with electrochemical detection. In addition, the use of diode-array detector allows provisional identification of one compound by comparing its UV-spectra with that obtained with the standard and it is also very useful in the identification in co-eluting compounds.

In the present work, the separation of seventeen phenolic compounds was carried out using gradient elution and diode-array detection. A trace enrichment technique was necessary because of the low sensitivity of this method and the low concentration levels allowed in drinking water (E.C. 0.5 $\mu\text{g l}^{-1}$) [17].

Traditional liquid-liquid extraction is widely used as a sample preparation technique for several authors [18], but is tedious, time consuming, costly and needs large volumes of toxic and flammable solvents. Nowadays, solid-phase extraction is a good alternative and is the most used preconcentration technique, the off-line procedure being the preferred method [19,20] but on-line trace enrichment is increasingly being used [21-23] because of its sensitivity and greater automation potential, although it also presents some limitations such as compatibility between the sorbent in the precolumn and that in analytical column and peak broadening.

Several sorbents have been used in the preconcentration of phenolic compounds. Bonded silica is one of the most popular for a wide range of polarity and has been applied to the preconcentration of phenol and chlorophenols [24-26]. Styrene-divinylbenzene copolymers have high efficiency towards non-polar and medium polarity molecules and some phenolics have been preconcentrated such as nitrophenols [27]. Graphitic carbon black has also been used to determine the eleven priority phenolics [20,28]. Other sorbents less used are the copolymers of acrylate [29] and of 1,4-di(methacryloyloxymethyl)naphthalene divinylbenzene [30]. The use of ciclohexyl sorbent has also been demonstrated to have good recoveries for phenol [24]. For the compounds studied, with their different polarities, it is

necessary to use a sorbent with poor selectivity in order to obtain good recovery for all of them. The use of ion-pair reagents in the solid-phase extraction process can increase the recovery of the most ionic compounds. The use of ion-pair reagent in liquid-liquid extraction has been demonstrated [2] to increase the recovery of the eleven priority phenolics.

In the present work, a comparative study of the efficiency of different sorbents (C_{18} , cyclohexyl and PLRP-S) for the solid phase extraction has been carried out to determine seventeen phenolic compounds at $\mu\text{g l}^{-1}$ levels with gradient elution and diode-array detection. The effect of the presence of an ion-pair reagent in the solid-phase extraction is also studied in order to increase the recovery of some of the compounds studied on the three sorbents. The best conditions for each sorbent have been applied to determine these compounds in Ebro river water.

EXPERIMENTAL

Equipment

Chromatography was performed using a Hewlett-Packard 1090, ternary gradient liquid chromatograph with an HP 1040M diode array detector. The separation was carried out using a Spherisorb ODS-2 column (25 x 0.46 cm i.d.), 5 μm particles (Phase Sep-Kromxpek). Chromatographic data were recorded using the HP 79994A Workstation.

Reagents and Standards

The seventeen phenolic compounds studied were from Aldrich Chemie except pentachlorophenol from Janssen Chemie and 4-methylphenol from Ferosa. A standard solution of 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of each compound was prepared in methanol:water (50:50) and stored in a refrigerator. The working solutions were prepared weekly by diluting the standard solutions in water. The phenolics studied and their abbreviations are: phenol (Ph), 2-nitrophenol (2-NP), 4-nitrophenol (4-NP), 2,4-dinitrophenol (2,4-DNP), 2-methylphenol (2-MP), 4-methylphenol (4-MP), 2,4-dimethylphenol (2,4-DMP), 2,6-dimethylphenol

(2,6-DMP), 2,4,6-trimethylphenol (2,4,6-TMP), 2-chlorophenol (2-CP), 4-chlorophenol (4-CP), 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP), 2,6-dichlorophenol (2,6-DCP), 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP), pentachlorophenol (PCP), 4-chloro-3-methylphenol (4-C-3-MP) and 2-methyl-4,6-dinitrophenol (2-M-4,6-DNP). In addition to eleven EPA priority substituted phenols, 2-MP, 4-MP, 2,6-DMP, 2,4,6-TMP, 4-CP and 2,6-DCP were also included.

HPLC-grade methanol (Scharlau) and Milli-Q quality water adjusted at pH 2.8 with acetic acid (Merck) were used for the preparation of the mobile phase. Methanol, tetrahydrofuran, acetonitrile and ethyl acetate HPLC quality (Scharlau) were used for the solid-phase extraction system.

CTA (hexadecyltrimethylammonium bromide) and TBA (tetrabutylammonium bromide) from Aldrich Chemie were used as ion-pair reagents to study the extraction process.

Chromatographic conditions

Chromatographic separation was carried out using as mobile phase: solvent A: water with 1% of acetic acid (pH value 2.8) and solvent B: methanol. The flow-rate was 1 ml min^{-1} and the volume injected $5 \mu\text{l}$. For single wavelength monitoring the detection was set at 280 nm for all the phenolics except for PCP that was set at 302 nm and during recording of the absorbance spectra were measured from 210 to 350 nm. The oven temperature was fixed at 55°C and the gradient profile was at initial conditions 25% B; 8 min., 30% B changed linearly to 55% B at 25 min and then linearly to 100% B at 30 minutes. After 5 minutes at 100% B the mobile phase was returned to initial conditions in 5 minutes.

Extraction process

To study the solid-phase extraction process, C_{18} and CH cartridges of 500 mg (Bond Elut-Varian) and home made cartridges of PLRP-S of 500 mg 100A and $20 \mu\text{m}$ (Polymer Laboratories) were used. The extractions were carried out using the Bond Elut/Vac Elut™ system.

10 ml of methanol and 10 ml of water were passed through the cartridges to condition and dried with air prior to application of the sample. Neither significant differences in recovery nor precision were obtained whether or not the cartridge was dried before sample application, although some authors found significant differences [31].

The sample adjusted to pH 2.8 and with the addition of 1 g l^{-1} NaCl to increase the ionic strength [24] was passed through the cartridge and desorption of the phenolic compounds was with 2 ml methanol. In this process, the cartridge was dried after the sample was applied and before elution with methanol, to increase recovery. In order to decrease the concentration to be determined, the methanol was concentrated under vacuum to $100 \mu\text{l}$ in the same Bond Elut/Vac Elut™ system.

When the ion-pair reagent was used in the extraction process, the conditioning process consisted of 10 ml methanol, 10 ml water and 2 ml of a solution of TBA 5 mM. The cartridges were dried prior to sample application. The sample was adjusted to pH 9 with 1M NaOH and different volumes of TBA were added to adjust the final concentration at 5 mM. The sample was passed through the cartridge and eluted with 2 ml methanol, as in the previous method without ion-pairing, but in this case, the methanol was acidified with 1% acetic acid to decrease the effect of the ion-pair.

RESULTS AND DISCUSSION

A gradient separation was optimized in order to separate the seventeen phenolic compounds studied. The chromatogram obtained under optimum conditions is shown in Figure 1. Good resolution for all peaks can be observed except for the 2-MP and 4-MP. These compounds can be separated at a lower temperature but in this case 2,4-DCP and 2,4,6-TMP are poorly resolved. The temperature of 55°C was chosen because a better resolution for EPA compounds was preferred. On the other hand, the increase in temperature implied a decrease in retention time of the rest of the compounds with similar resolution values. The use of diode array detection permits detection of each compound at its maximum absorbance, but no important differences in these wavelengths were obtained for all compounds studied except for PCP. For this

reason PCP was detected at 302 nm and the rest of the phenolic compounds at 280 nm.

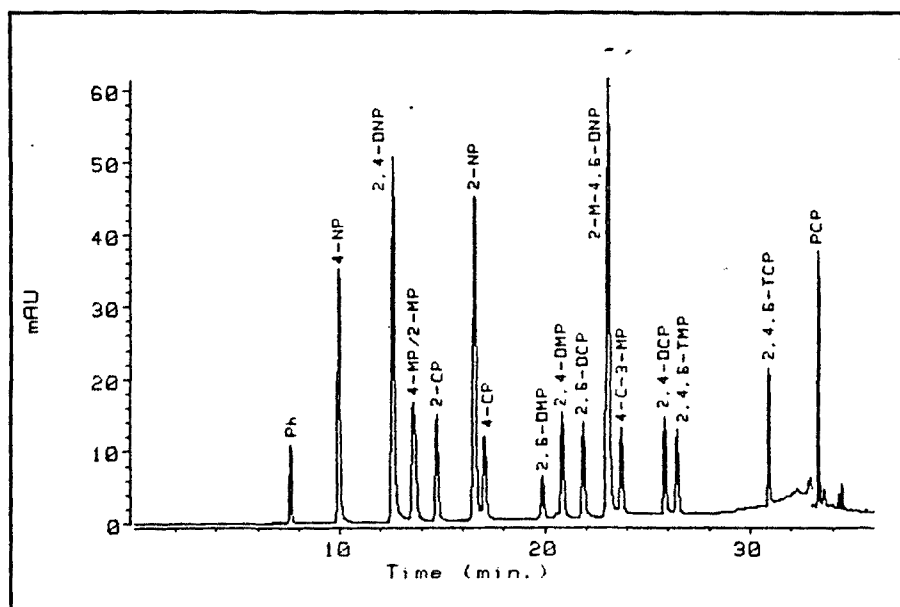


Figure 1.- Chromatogram of standard solution of $20 \mu\text{g ml}^{-1}$. (Conditions, see text).

The range of linearity of response in the chromatographic method was studied between $5.0 \mu\text{g ml}^{-1}$ and $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ with good regression coefficients in all cases and the detection limits obtained were between $0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$ for 2-NP and $2.4 \mu\text{g ml}^{-1}$ for 2,6-DMP.

To lower the detection limits a preconcentration process was necessary. A comparative study using three sorbents (octadecyl (C_{18}), cyclohexyl (CH) and styrene-divinylbenzene (PLRP-S)), with different selectivities was performed. Some authors have already demonstrated that PLRP-S provides generally better recoveries than C_{18} or CH for phenolic compounds but, the effect of the ion-pair reagent in solid phase extraction for the different sorbents has not been studied.

To assess the recovery of each compound, two main points must be taken into account: the capacity of the cartridge and the breakthrough volume. The

capacity of the cartridges was tested by measuring the recovery of samples at different concentrations, and as expected, the capacity of the cartridge was sufficient for the concentration studied and for real samples.

To determine the volume of sample that can be concentrated with good recovery for all compounds studied, it is necessary to know the breakthrough volumes as they may be quite different due to their different characteristics. For this, different volumes of a standard solution (with 1 g l^{-1} NaCl to increase the ionic strength and 1 % acetic acid for acidic pH) were passed through the cartridge, eluted with 2 ml methanol and concentrated at $100 \mu\text{l}$ under vacuum. The final theoretical concentration of each compound was $20 \mu\text{g ml}^{-1}$.

In Table I the results obtained for the recovery for several volumes of sample and the repeatability are shown. When a C_{18} cartridge was used, it can be deduced that a volume 25 ml implies elution of the most polar compounds (from 4-NP to 4-CP) with the exception of phenol which has a lower breakthrough volume, in this case lower than 10 ml. Additional experiments showed that the breakthrough volume for some compounds was 250 ml. The breakthrough volumes obtained with CH are lower in general than with C_{18} and selectivity was similar.

When PLRP-S was used, breakthrough volumes were higher than for the other two sorbents, as already demonstrated by some authors [31] but the elution times of 2,4,6-TCP and PCP are less than for the two other sorbents. The breakthrough volume increased for all compounds studied and good recoveries were obtained for phenol at 100 ml and for the rest of compounds at 250 ml. For the less polar compounds (from 2,6-DMP to 2,4,6-TMP), in additional experiments, breakthrough volumes 1000 ml were obtained.

To improve the recovery of phenol and increase the breakthrough volume - which would make it possible to preconcentrate a larger volume of sample and therefore obtain lower detection limits - ion-pair extraction was tested. Firstly, CTA and TBA were checked as ion-pair reagents but TBA was chosen because better recoveries were obtained.

For this study, after activation of the cartridge, different volumes of standard solution (with 1 g l^{-1} of NaCl, 5 mM TBA and pH 9) were passed through the cartridges, dried under vacuum and eluted with 2 ml methanol acidified with

1 % acetic acid and concentrated under vacuum with the Bond Elut/Vac Elut™ system to 100 μ l. The theoretical final concentration for the compounds analyzed was about 20 μ g ml⁻¹.

The recoveries found using TBA ion pair reagent in the different cartridges (C₁₈, CH and PLRP-S) are included in Tables II and III. If the results are compared with those in Table I it can be seen that using C₁₈ and CH cartridges recovery values increased and it was possible to obtain good recoveries when 50 ml sample were preconcentrated - with the exception of phenol whose breakthrough volume increased but poor recovery was obtained for volumes higher than 10 ml. The increased recovery was not only due to ion-pair formation as may be deduced from pK_a values, not all compounds can form ion-pairs at pH 9.

On the other hand, when PLRP-S was used, good recoveries were obtained even for 500 ml samples, except for phenol, whose breakthrough volume was 100 ml. The recoveries for 100, 250 and 500 ml are included in Table III. Phenol has a recovery of 18% for 500 ml, whereas the other phenolic compounds have recoveries between 80-96 %, except 2,4,6-TCP and PCP which imply recoveries 60 %, even the repetitivity was quite good.

It can be deduced from these results that the use of TBA in the extraction process increased the breakthrough volume of some compounds and allowed preconcentration of 50 ml of sample using C₁₈ or CH and 500 ml of the sample using PLRP-S, with better results than those obtained when no ion-pair reagent was used. With these volumes of sample no good recoveries for phenol were obtained. The analytical method was applied to determine phenolic compounds in Ebro river water.

No significant differences between C₁₈ and CH were obtained when 50 ml of river water were analyzed and the recoveries in real samples were similar to those with standard solutions and MilliQ-water. The chromatogram obtained when 50 ml of river sample were concentrated with TBA and the same sample spiked with 25 ng ml⁻¹ Ph and 5 ng ml⁻¹ of the others phenolics using C₁₈ is shown in Figure 2 . In the sample without standard addition, two peaks with retention times similar to 2,6-DMP and PCP appeared, but comparison of their spectra with those of the standards did not allow positive identification. A similar study was carried out using CH cartridges, with similar results and selectivity.

Table I.- Recoveries obtained with C₁₈, CH and PLRP-S using different volumes of standard solution. Values are mean of three determinations and expressed as percent recovery and relative standard deviation (RSD). For all conditions, see text.

COMPOUNDS	25 ml						50 ml						100 ml					
	C ₁₈		CH		PLRP-S		C ₁₈		CH		PLRP-S		C ₁₈		CH		PLRP-S	
	%R	RSD %R	%R	RSD %R	%R	RSD %R	%R	RSD %R	%R	RSD %R	%R	RSD %R	%R	RSD %R	%R	RSD %R	%R	RSD %R
Ph	49	3.5	29	3.0	107	0.3	29	7.3	16	6.5	102	1.6	15	8.4	9	7.7	81	5.9
4-NP	83	2.1	62	2.5	91	0.4	46	8.5	37	8.0	92	3.7	29	7.9	18	8.6	91	1.7
2,4-DNP	93	3.7	63	2.9	79	2.8	77	8.7	36	7.7	77	5.6	52	7.8	18	8.8	79	6.7
4-MP/2-MP	100	0.6	91	0.7	102	0.2	82	5.2	53	6.8	102	2.1	49	4.6	27	5.7	100	2.8
2-CP	87	2.3	86	2.7	90	1.3	76	3.7	52	4.7	89	2.8	48	4.7	27	5.6	87	2.0
2-NP	96	4.0	88	3.9	86	3.2	86	4.9	58	5.0	84	3.8	68	3.9	28	5.2	84	3.6
4-CP	92	4.7	91	4.6	87	5.2	85	3.9	64	4.2	84	2.1	62	4.8	31	5.0	83	3.9
2,6-DMP	108	1.5	107	0.9	106	1.3	108	1.7	107	0.9	105	1.3	106	1.2	69	3.1	106	1.2
2,4-DNP	102	0.9	104	1.0	100	1.7	102	2.0	104	1.8	99	3.9	100	1.9	79	4.0	99	1.1
2,6-DCP	98	4.0	99	3.8	94	3.6	98	2.6	98	3.0	94	2.9	96	2.2	83	3.9	94	1.8
2-M-4,6-DNP	90	0.2	97	1.2	88	1.1	91	3.1	95	4.1	86	4.9	90	3.3	87	4.2	85	3.2
4-C-3-MP	91	5.6	100	3.3	86	4.8	90	5.8	100	3.5	86	4.7	90	3.1	96	4.2	87	4.1
2,4-DCP	103	2.3	96	2.7	84	1.9	101	2.6	93	1.9	83	2.1	101	2.0	89	3.8	81	4.3
2,4,6-TMP	99	0.9	110	1.0	99	0.9	99	1.7	108	2.2	98	1.3	99	2.7	103	1.2	98	3.4
2,4,6-TCP	65	5.3	67	6.0	59	5.4	65	5.0	65	5.8	59	4.9	61	4.7	65	5.3	54	3.2
PCP	47	4.9	60	5.1	46	4.4	48	4.8	60	4.4	47	5.0	47	4.1	59	5.2	43	5.9

Table II- Recoveries obtained with TBA using C₁₈ and CH cartridges and different volumes of standard solution. All values are mean of three determinations. For all conditions, see text.

COMPOUNDS	25 ml				50 ml				100 ml			
	C18		CH		C18		CH		C18		CH	
	%R	RSD	%R	RSD	%R	RSD	%R	RSD	%R	RSD	%R	RSD
Ph	79	7.2	66	8.4	51	6.5	30	7.6	19	7.7	12	7.5
4-NP	101	1.0	112	1.6	100	1.8	99	1.4	71	2.6	69	2.4
2,4-DNP	89	1.5	92	2.5	87	2.7	80	2.6	87	2.5	80	2.7
4-MP/2-MP	106	1.4	107	0.9	103	2.4	81	3.6	66	3.6	39	2.7
2-CP	90	0.8	106	1.4	91	2.5	87	3.9	74	3.5	44	4.6
2-NP	90	3.1	107	2.3	91	2.5	84	3.6	78	2.9	37	3.7
4-CP	90	2.1	101	1.6	91	3.7	91	2.8	82	2.5	55	2.8
2,6-DMP	109	3.7	109	2.0	110	3.9	101	1.9	110	2.7	75	3.8
2,4-DMP	99	4.6	101	1.7	99	2.7	99	2.2	91	3.8	90	2.9
2,6-DCP	97	3.8	109	1.7	95	4.2	94	3.9	89	3.7	92	2.0
2-M-4,6-DNP	93	3.3	104	1.4	93	4.0	90	2.8	86	4.5	89	3.1
4-C-3-MP	89	4.7	108	1.8	90	3.6	94	2.6	90	4.0	93	2.9
2,4-DCP	96	3.4	100	1.0	94	3.5	87	3.9	94	3.9	84	3.1
2,4,6-TMP	91	5.1	105	1.8	91	2.9	103	3.7	90	3.7	102	2.6
2,4,6-TCP	58	5.8	69	4.8	59	5.9	69	5.0	59	4.6	69	5.4
PCP	58	4.9	68	5.1	57	5.6	61	4.3	56	6.0	60	5.7

Table III- Recoveries obtained using PLRP-S cartridges with different volumes of standard solution using TBA ion-pair reagent. All values are mean of three determinations. For all conditions, see text.

COMPOUNDS	100 ml		250 ml		500 ml	
	%R	RSD	%R	RSD	%R	RSD
Ph	90	3.6	43	5.3	18	6.5
4-NP	101	1.0	91	2.1	69	5.4
2,4-DNP	86	2.5	82	3.0	81	3.6
4-MP/2-MP	100	1.4	99	1.9	94	2.8
2-CP	89	3.1	88	2.7	87	3.5
2-NP	90	2.6	86	3.5	84	3.7
4-CP	93	3.7	87	2.6	85	3.3
2,6-DMP	112	2.6	110	1.8	109	2.4
2,4-DMP	103	1.7	99	1.4	96	2.7
2,6-DCP	98	2.0	95	3.0	91	3.1
2-M-4,6-DNP	89	3.2	85	3.2	85	2.8
4-C-3-MP	91	3.7	86	3.8	84	3.0
2,4-DCP	89	3.1	81	3.7	81	3.4
2,4,6-TMP	102	3.7	96	2.9	95	3.9
2,4,6-TCP	58	4.7	58	4.6	57	4.3
PCP	45	4.9	43	4.0	43	4.5

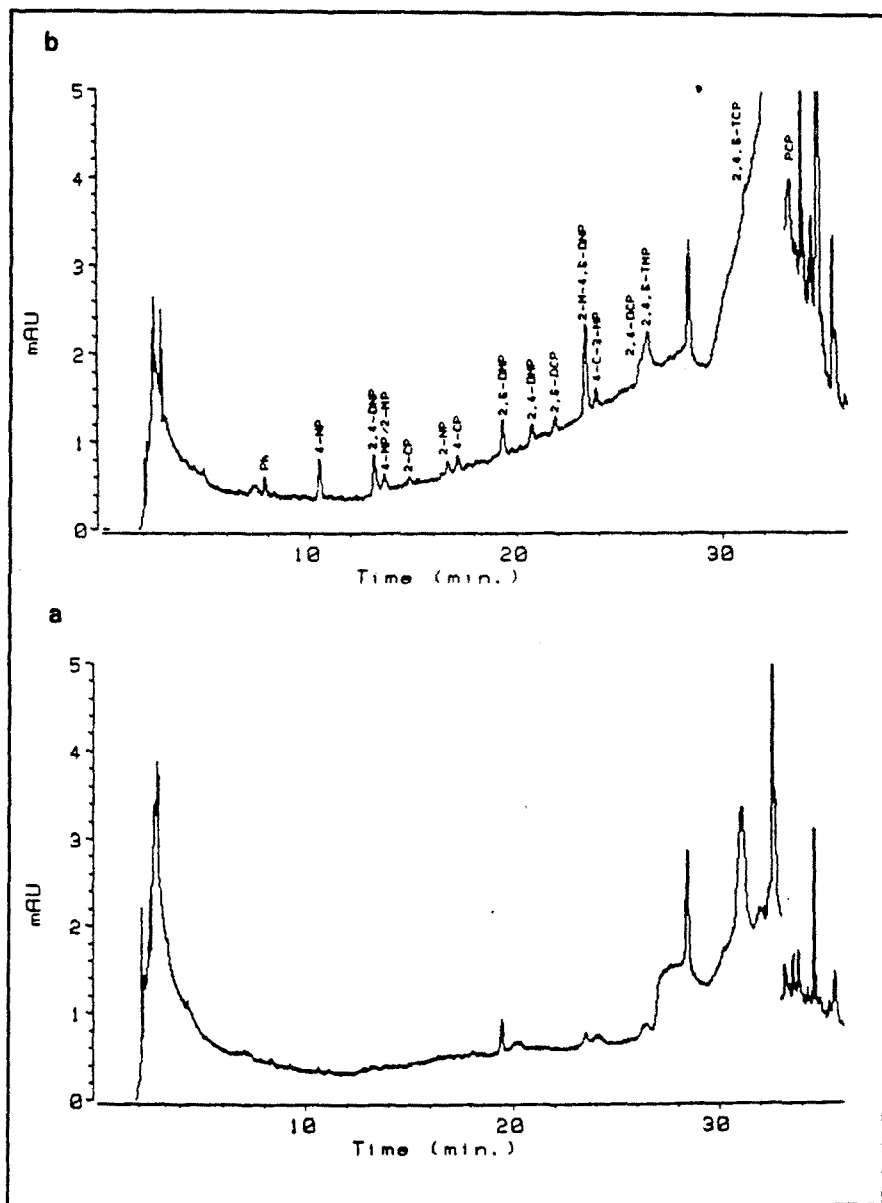


Figure 2.- Chromatograms obtained after ion-pair extraction with C_{18} cartridge of: a) 50 ml Ebro river water; b) 50 ml Ebro river water spiked with 25 ng ml^{-1} phenol and 5 ng ml^{-1} other compounds. Conditions, see text.

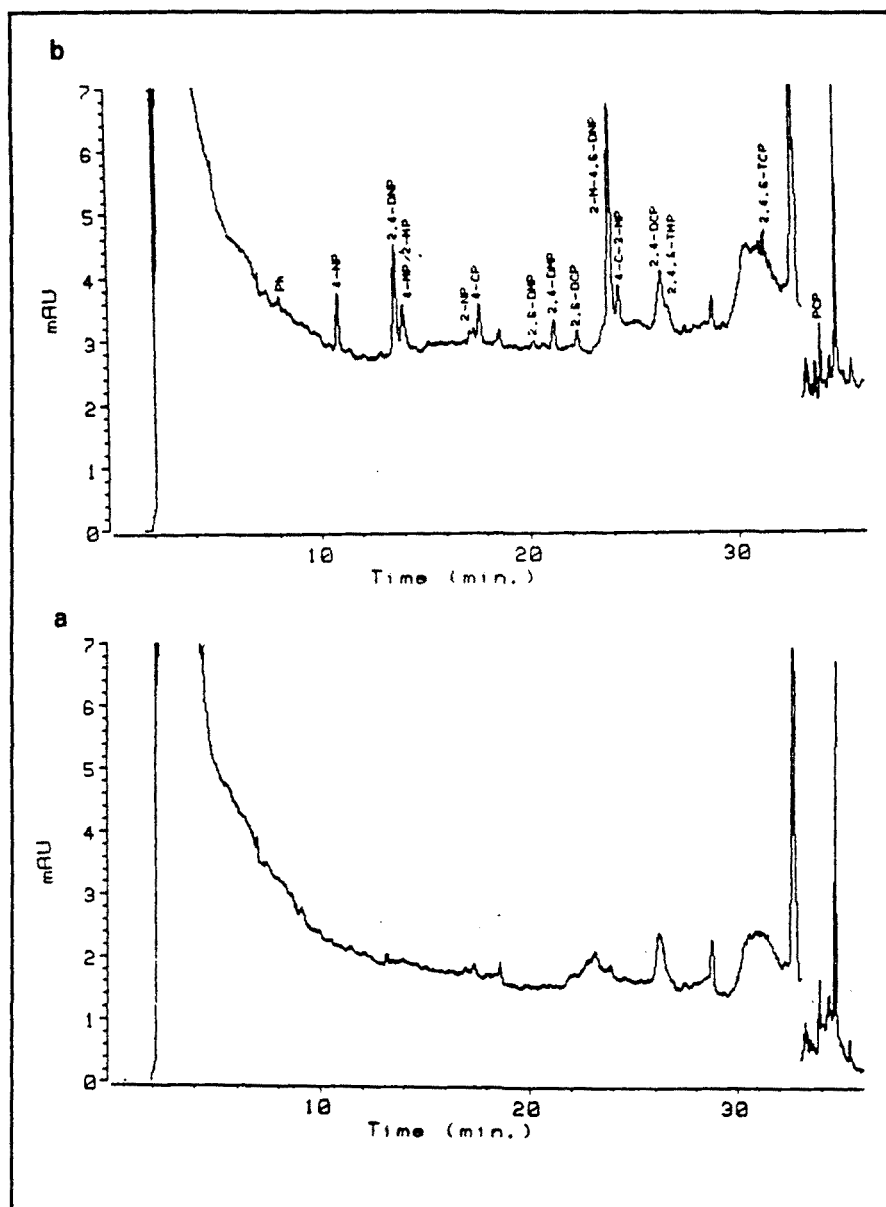


Figure 3.- Chromatogram obtained after ion-pair extraction with PLRP-S of:
a) 500 ml Ebro river water; b) 500 ml Ebro river water spiked with
2.5 ng ml⁻¹ phenol and 0.5 ng ml⁻¹ other compounds.

In Figure 3, chromatograms obtained when 500 ml of the river sample were concentrated using PLRP-S and TBA and the same sample spiked with 2.5 ng ml⁻¹ of Ph and 0.5 ng ml⁻¹ for the rest of compounds can be seen. A higher background compared to chromatograms obtained with C₁₈ and CH is obtained, caused by increase of the sample size and the lower selectivity of PLRP-S compared to C₁₈ and CH, but the different phenolics can be determined without interference. Some peaks in the chromatogram of the river water sample, eluted with the same retention time as some phenols. Comparison of their spectra with those obtained from standard showed that no peak corresponded to a phenol.

The precision of the method for real samples was tested and the relative standard deviation (n=4) was lower than 10 % for all compounds. The recoveries with real samples were also similar to those obtained with MilliQ water and the limit of detection (S/N =3) of the complete series in river water was between 0.1 ng ml⁻¹ for 2-M-4,6-DNP and 2.5 ng ml⁻¹ for phenol.

CONCLUSIONS

A comparison of the recovery and selectivity of different sorbents was carried out and PLRP-S was the most efficient for the preconcentration of phenolic compounds. The addition of an ion-pair reagent, TBA, to the extraction process increased the recovery of some of the compounds studied and this effect was observed in general for the three sorbents.

The ion-pair, solid phase extraction method with PLRP-S allowed the determination of most phenolics at 0.5 ng ml⁻¹ in river water with good recoveries and precision.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank D.G.I.C.Y.T. (project PB90/0453) for financial support and acknowledge the "Consorti d'Aigües de Tarragona" and in particular J.F. Ruana for supporting this work.

REFERENCES

- [1] C.P. Ong, H.K. Lee, S.F.Y. Li, *J. Chromatogr.*, **464** (1989) 405.
- [2] P.A. Realini, *J. Chromatogr. Sci.*, **13** (1981) 124.
- [3] J.D. le Roux, *Municipal Engineer*, July, **19** (1988).
- [4] D.A. Baldwin, J.K. Debowski, *Chromatographia*, **26** (1988) 186.
- [5] D.F. Hunt, J. Shabanowitz, T.M. Harvey, M. Coates, *Anal. Chem.*, **57** (1985) 525.
- [6] P.J.M. Kwakman, D.A. Kamminga, U.A.Th. Brinkman, G.J. de Jong, *J. Chromatogr.*, **553** (1991) 345.
- [7] C.P. Ong, C.L. Ng, H.C. Chong, H.K. Lee, S.F.Y. Li, *J. Chromatogr.*, **516** (1990) 263.
- [8] A. Meyer, P. Henze, *Fresenius'Z Anal. Chem.*, **332** (1989) 898.
- [9] E. Nieminen, P. Heikkila, *J. Chromatogr.*, **360** (1986) 271.
- [10] P.D. Goulden, "Environmental Pollution Analysis", Heyden, London, 1978.
- [11] "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" American Public Health Association, Washington, 14th ed., 1976.
- [12] M.K. Lee, S.F.Y. Li, Y.H. Tay, *J. Chromatogr.*, **438** (1988) 429.
- [13] O. Busto, J.C. Olucha, F. Borrull, *Chromatographia*, **32** (1991) 423.
- [14] O. Busto, J.C. Olucha, F. Borrull, *Chromatographia*, **32** (1991) 566.
- [15] J. Ruana, I. Urbe, F. Borrull, *J. Chromatogr. A*, **655** (1993) 217.
- [16] C.D. Gaitonde, P.V. Pathak, *J. Chromatogr.*, **514** (1990) 389.
- [17] *Drinking Water Directive 80/778/EEC Proposals for Modification Views of Eureau*, Eureau. Brussels 1991.
- [18] I. Liska, J. Krupcik, P.A. Leclercp, *J. High Resol. Chromatogr.*, **12** (1989) 577.
- [19] I. Liska, A. Kuthan, J. Krupcik, *J. Chromatogr.*, **509** (1990) 123.

- [20] C. Borra, A. Di Corcia, M. Marchetti, R. Samperi, *Anal. Chem.*, **58** (1986) 2048.
- [21] C.E. Werkhoven-Goewie, W.M. Boon, A.J.J. Praat, R.W. Frei, U.A.Th. Brinkman, *Chromatographia*, **16** (1982) 53.
- [22] M.W. Nielen, U.A.Th. Brinkman, R.W. Frei, *Anal. Chem.*, **57** (1985) 806.
- [23] M.C. Hennion, P. Subra, R. Rosset, M. Grimaud, M. Callibotte, *J. Water SRT-Aqua*, **40** (1991) 35.
- [24] E. Chladek, R.S. Marano, *J. Chromatogr. Sci.*, **22** (1984) 313.
- [25] C.E. Rostad, W.E. Pereira, S.M. Rarcliff, *Anal. Chem.*, **56** (1984) 2856.
- [26] C.E. Werkhoven-Goewie, U.A.Th. Brinkman, R.W. Frei, *Anal. Chem.*, **53** (1981) 2072.
- [27] J.J. Richard, G.A. Junk, *Anal. Chem.*, **58** (1986) 723.
- [28] Di Corcia, M. Marchetti, *Anal. Chem.*, **63** (1991) 508.
- [29] A. K. Burnhem, G.V. Calder, J.S. Fritz, G.A. Junk, H.J. Svec, R. Willis, *Anal. Chem.*, **44** (1972) 139.
- [30] B. Gawdzik, J. Gawdzic, U. Czerwinska-bil, *J. Chromatogr.*, **509** (1990) 135.
- [31] J.J. Sun, J.S. Fritz, *J. Chromatogr.*, **590** (1992) 197.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

CAPÍTOL III. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS A NIVELL DE mg l^{-1} MITJANÇANT EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA I CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA AMB DETECCIÓ DE DIODES EN FILA.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

Si bé la utilització d'un cartutx de 500 mg farcit amb PLRP-S permet la preconcentració de fins a 500 ml de mostra quan s'empra parell iònic amb uns valors de recuperació superiors al 70% menys pel fenol que és del 18%, els límits de detecció assolits, al voltant dels $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$, no permeten determinar els fenols estudiats als nivells de concentració recomenats per les normatives, per la qual cosa s'ha considerat la possibilitat d'emprar sorbents amb més capacitat de retenció, tot i que això pugui suposar una pèrdua de selectivitat.

Així doncs, el següent treball s'ha orientat en l'estudi de la utilització de carbó i un copolímer d'estirè-divinilbenzè altament entrecreuat (ENVI-Chrom P) de recent aparició ja que ambdós sorbents tenen més capacitat per retenir els fenols estudiats i en especial els compostos més polars, com és el fenol.

L'equip emprat ha estat el mateix que l'utilitzat en l'estudi portat a terme en el capítol anterior. El gradient d'elució emprat també ha estat similar, tot i que s'ha modificat per tal d'obtenir una millor resolució entre tots els compostos fenòlics estudiats.

Com en el treball anterior, en primer lloc s'han optimitzat les diferents variables que afecten el procés d'extracció emprant o no la formació del parell iònic. En el cas d'emprar com a sorbent carbó, una de les variables que també s'ha optimitzat ha estat la quantitat de sorbent per tal d'obtenir una bona retenció per a tots els compostos i a la vegada no necessitar emprar un volum excessiu de solvent en l'elució.

Fixades totes les variables, s'han calculat els volums de ruptura tant en el cas de preconcentrar la mostra a pH àcid, com en el cas de preconcentrar-la a pH bàsic per afavorir la formació del parell iònic.

Finalment, s'ha portat a terme la validació del mètode analític desenvolupat emprant mostres reals.

En el treball que es mostra a continuació es recullen els resultats obtinguts.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

DETERMINATION OF PHENOLIC COMPOUNDS AT LOW $\mu\text{g l}^{-1}$ LEVELS BY VARIOUS SOLID-PHASE EXTRACTIONS FOLLOWED BY LIQUID CHROMATOGRAPHY AND DIODE ARRAY DETECTION.

SUMMARY

An off-line solid-phase extraction was carried out to determine thirteen phenolic compounds, which included eleven EPA priority phenols, using reversed-phase liquid chromatography and diode-array detection. Two different sorbents, carbon and a highly cross-linked styrene-divinylbenzene copolymer, were compared for the preconcentration process. To increase the retention of the most polar compounds, mainly phenol, tetrabutylammonium bromide was used as an ion-pair reagent in the extraction system. Better recoveries were obtained for the copolymer sorbent and the performance of the method was tested with tap and Ebro river water. Recoveries higher than 90% were obtained for all compounds when a 500-ml sample was preconcentrated using the optimum conditions found with the copolymer sorbent. The R.S.D. for a river water sample spiked at $1 \mu\text{g l}^{-1}$ was lower than 10% ($n=4$) and the detection limits were between 65 and 100 ng l^{-1} .

INTRODUCTION

RPLC is the most commonly used technique to determine phenolic compounds in water [1-4]. The use of electrochemical detection allows the detection of these compounds at lower concentrations but UV-visible detection is most often used because of its robustness. However, in both cases, it is necessary to apply a preconcentration step prior to the injection in order to reach the levels of these compounds allowed in drinking water. At present, the use of solid-phase extraction is increasing because of its advantages over liquid-liquid extraction [5,6].

Although on-line solid-phase extraction involves some very important advantages [7-9], the incompatibility between the preconcentration precolumn sorbent and the analytical column often makes on-line combination difficult. Hence the off-line procedure is still the most often used technique as it also requires simple instrumentation.

In order to determine phenolic compounds, which differ widely in polarity, with an off-line preconcentration system, several sorbents have been used. Cañas et al. [10] used anion-exchange cartridges to preconcentrate the eleven priority phenolic compounds in pure water. Good recoveries were obtained but a low volume of sample could be preconcentrated, which did not allow one to reach low limits of detection using UV detector. However, the most often used sorbents are C₁₈ to trap the non-polar phenols and PLRP-S or PRP-1 to trap medium-polarity phenols. Ruana et al. [11] used glass microcolumns filled with C₁₈ with UV and electrochemical detection to determine 21 phenolic compounds. Preconcentrating only 10 ml of sample, detection limits at low $\mu\text{g l}^{-1}$ levels were obtained with the electrochemical detector, whereas with UV detection a higher sample volume had to be preconcentrated, which implied an important decrease in the recovery of the most polar phenols, mainly phenol. Similar results were obtained by Hoffsommer et al. [12] using C₁₈ cartridges to determine nine nitrophenols.

Gawdzik et al. [13] used styrene-divinylbenzene copolymer cartridges for the preconcentration of EPA phenols but no better results were obtained because less than 100 ml of sample should be preconcentrated in order to obtain good recoveries for all compounds. Mußmann et al. [14] found noticeable differences among three C₁₈ sorbents from different suppliers. Brouwer et al. [15] developed an on-line set-up with two precolumns in series, an ENVI-Chrom P precolumn to trap the phenol and a PLRP-S to trap the rest of the phenolic compounds.

Other sorbents which have also been used for the preconcentration of phenolic compounds include carbon [3,16] and cyclohexyl [17]. Borra et al. [16] applied graphitized carbon black to the determination of priority pollutant phenols with two different desorbing mixtures. A sample volume of 2 l gave good recoveries for all compounds except phenol, whose breakthrough volume was 200 ml. In a further study [18], a larger amount of carbon in a reversible cartridge allowed them to increase the recovery of phenolic compounds. In a previous paper [19], the breakthrough volumes obtained of phenolic compounds with

cyclohexyl were low. Better results were obtained with the previously mentioned PLRP-S [19], although volumes larger than 100 ml gave lower recoveries of the most polar compounds. A highly cross-linked styrene-divinylbenzene copolymer [20] could improve the breakthrough volumes obtained with conventional PLRP-S.

The effect of an ion-pair reagent in the solid-phase extraction of phenolic compounds has been studied using C₁₈, cyclohexyl and PLRP-S [19], and it strikingly improved the breakthrough volumes of the most polar compounds.

In this work, off-line solid-phase extraction was studied to determine thirteen phenolic compounds in water using RPLC and UV detection. The aim was to develop a solid-phase extraction procedure which allows the preconcentration of the volume of sample necessary to determine phenolic compounds at levels as low $\mu\text{g l}^{-1}$ by RPLC with diode-array detection (DAD). Ion-pair extraction with carbon and a highly cross-linked styrene-divinylbenzene copolymer was studied in order to increase the retention of the most polar compounds, mainly phenol.

EXPERIMENTAL

Reagents and standards

The phenolic compounds studied and their abbreviations were as follows: phenol (Ph), 4-nitrophenol (4-NP), 2,4-dinitrophenol (2,4-DNP), 2-chlorophenol (2-CP), 2-nitrophenol (2-NP), 2,6-dimethylphenol (2,6-DMP), 2,4-dimethylphenol (2,4-DMP), 2-methyl-4,6-dinitrophenol (2-M-4,6-DNP), 4-chloro-3-methylphenol (4-C-3-MP), 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP), 2,4,6-trimethylphenol (2,4,6-TMP), 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP) and pentachlorophenol (PCP). In addition to the eleven EPA priority substituted phenols, two methyl phenolic compounds, 2,6-DMP and 2,4,6-TMP, were also included. All of them were obtained from Aldrich Chemie (Beerse, Belgium) except PCP, which was obtained from Jansen Chemie (Geel, Belgium).

A stock standard solution of 2000 mg l⁻¹ of each compound was prepared in methanol-water (50:50) and stored in a refrigerator. Working standard

solutions were prepared weekly or daily depending on their concentration by diluting the stock standard solution with water obtained from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, USA).

HPLC-gradient grade methanol (Scharlau, Barcelona, Spain) and Milli-Q quality water adjusted to pH 2.8 with acetic acid (Merck, Darmstadt, Germany) were used for the preparation of mobile phase. TBA (tetrabutylammonium bromide) (Aldrich) was used as the ion pair-reagent in the extraction process. NaOH (Merck) and acetic acid (Merck) were used for pH adjustment and Na₂SO₃ (Merck) was added to remove the residual chlorine in tap water samples before the standard addition.

Dichloromethane, hexane (Riedel-de Haën, Seelze, Germany), ethyl acetate, carbon disulfide (Panreac, Barcelona, Spain), acetonitrile, and tetrahydrofuran (Scharlau) were tested as solvents in the extraction process.

Instrumentation

Chromatographic experiments were performed using a Hewlett-Packard (Waldbronn, Germany) Model 1090 ternary gradient liquid chromatograph with an HP 1040M diode-array detector. The system was controlled by an HP 79994A workstation, which also performed data acquisition from DAD. Separation was carried out using an HP stainless-steel analytical column (250x4 mm I.D.) containing 5- μ m Spherisorb ODS-2. A loop of 5 or 20 μ l was used depending on the solvent used in the solid-phase extraction process.

Chromatographic conditions and detection

The chromatographic separation was carried out using a gradient of methanol-1% acetic acid (pH = 2.8) from 25:75 to 40:60 in 25 minutes; 100% methanol at 30 min and, after 2 minutes of isocratic elution with 100% methanol, the initial conditions were reached in 2 minutes. The flow-rate of the eluent was 1 ml min⁻¹ and the column temperature was 65°C. The volume of the sample injected was 5 μ l when carbon was used in the preconcentration step and 20 μ l when highly cross-linked styrene-divinylbenzene copolymer was used.

For single-wavelength monitoring, the detection was set at 280 nm for all phenolic compounds except PCP (302 nm). For comparison of the spectra, data were recorded from 210 to 350 nm.

Extraction process

Off-line trace enrichment was carried out using two different cartridges: laboratory-made cartridges of carbon black (Carbopack B 120/400; Supelco, Bellefonte, PA, USA) of 300 mg and highly cross-linked styrene-divinylbenzene copolymer cartridges (ENVI Chrom P; Supelco) (80-160 μm particle size) of 500 mg. The extractions were carried out using the Bond Elut-Vac Elut system (Varian, Harbor City, USA).

When carbon was used in the preconcentration process, the phenolic compounds were eluted with 5 ml of dichloromethane, and when copolymer was used, 5 ml of methanol were required. In both instances the solvent was concentrated with a rotatory evaporator to a volume of 500 μl .

In the solid-phase extraction process, the addition of TBA as ion-pair reagent was studied in order to increase the recovery of the extraction process, mainly for the most polar compounds. When TBA was used, the conditioning process consisted of rinsing the cartridge with 10 ml of solvent (methanol or dichloromethane), 10 ml of water and 2 ml of a 5 mM TBA solution. The cartridges were dried before sample application. Prior to elution of sample, the sample pH was adjusted at 9 with 1 M NaOH and different volumes of TBA were added to adjust the final concentration to 5 mM. The sample was passed through the cartridge and eluted with 5 ml of solvent (methanol or dichloromethane) acidified with 1% of acetic acid to decrease the effect of the ion pair and solvent was removed under vacuum with rotary evaporator (Büchi, Flawil, Switzerland) to give a volume of 1 ml.

Tap and river samples were filtered through a 0.45 μm filter (MSI, Westboro, MA, USA) before preconcentration.

RESULTS AND DISCUSSION

The gradient elution profile was optimized in order to obtain good resolution between peaks. The linearity of the response of the chromatographic method was checked by injecting 20 μl of a solution of phenolic compounds at levels between 1 and 30 mg l^{-1} and for some compounds the last point was considered an outlier by a statistical criterion [21], hence the linearity range was between 1 and 20 mg l^{-1} . The detection limits of the chromatographic method ($S/N=3$) were between 30 $\mu\text{g l}^{-1}$ for 4-NP, 2,4-DNP and PCP and 0.1 mg l^{-1} for 2,4,6-TCP. In Table I, the range of linearity studied for each compound, correlation coefficients (R^2) and the detection limits of the method without preconcentration process are given.

In order to increase the sensitivity of the method, a solid-phase extraction process was chosen. In a previous study [19], sorbents such as octadecyl, cyclohexyl and styrene-divinylbenzene copolymer were tested and the effect of the addition of TBA as ion-pair reagent was studied. In this study, the positive effect of TBA on the recovery of the most polar compounds, mainly phenol, was shown. The best results involved the use of PLRP-S but only 100 ml of sample could be preconcentrated in order to obtain good recoveries for all compounds. In order to increase the volume to be preconcentrated and thus to decrease the limit of detection of the global method, two sorbents were evaluated, carbon black and a highly cross-linked styrene-divinylbenzene copolymer.

The effect of the addition of an ion-pair reagent on the retention of phenol, whose breakthrough volume is very low, was evaluated. To establish the optimum conditions of the extraction process, several variables were optimized. First, different solvents were tested for the elution of the compounds retained in each type of cartridge. Using carbon cartridges of 100 mg, 10 ml of a standard solution of 5 mg l^{-1} were passed through the cartridge and eluted with 5 ml of dichloromethane, ethyl acetate, hexane, carbon disulfide or dichloromethane-methanol (1:1). The acidification of the solvent did not improve the recovery, as other workers [18] have found. The best recoveries for all phenolic compounds were obtained using dichloromethane. However, when dichloromethane was used, a solvent peak appeared at the same retention time of 4-NP, which made it impossible to determine this peak and the use of this solvent involved the injection of only 5 μl of sample

Table I.- Study of the linearity of the response and detection limits of the methods.

Compound	Linearity range (mg l ⁻¹)	R ²	Detection limit	
			Direct injection, 5- μ l loop (μ g l ⁻¹)	Polymer cartridge, 500 ml + TBA, 20- μ l loop (ng l ⁻¹)
Ph	1.1-33.2	0.9999	75	100
4-NP	1.0-30.7	0.9976	30	65
2,4-DNP	1.0-30.6	0.9995	30	60
2-CP	1.0-29.9	0.9981	70	95
2-NP	1.0-30.3	0.9998	45	65
2,6-DMP	1.0-20.5	0.9988	100	90
2,4-DMP	1.0-19.9	0.9969	70	70
2-M-4,6-DNP	1.0-30.4	0.9956	40	65
4-C-3-MP	1.1-32.2	0.9960	80	95
2,4-DCP	1.0-31.1	0.9958	75	90
2,4,6-TMP	1.0-20.2	0.9991	75	90
2,4,6-TCP	1.1-21.2	0.9927	100	90
PCP	0.9-27.6	0.9970	30	70

because substantial peak broadening appeared caused by the different solvent strengths between dichloromethane and the mobile phase.

In the next step, the mass of carbon used in the laboratory-made cartridges was studied. A mass of 300 mg was chosen because the larger the amount of carbon, the larger was the volume of solvent needed to desorb the compounds, and with this mass the recoveries were good for all compounds studied when they were eluted with 5 ml of solvent. A larger amount of carbon implied a larger volume of elution solvent and the use of a reversible cartridge [18]; although this could partially solve this problem, it was not possible with our design.

In order to determine the volume of sample that can be concentrated with good recoveries for all the compounds studied, different volumes (25, 50 and 100 ml) of a solution of phenolic compounds at the 0.1 mg l^{-1} level in Milli-Q-purified water were passed through the cartridge, eluted with 5 ml of dichloromethane and the eluate was concentrated to a final volume of 1 ml. The recovery of phenolic compounds for the different volumes was checked with and without the addition of TBA and the results obtained are given in Table II. The addition of TBA increased the recovery of phenol, but the volume of sample that could be preconcentrated with good recoveries was low. Although for the other compounds good recoveries were obtained even when 100 ml of sample were preconcentrated, no higher sample volumes were tested because of the low recovery of phenol.

As regards the highly cross-linked styrene-divinylbenzene copolymer, better recoveries than those obtained with the conventional styrene-divinylbenzene copolymer were expected according to the literature [15,20], which would allow the preconcentration of larger sample volumes.

To select the best solvent to elute the compounds retained, 10 ml of a standard solution of 5 mg l^{-1} were passed through the cartridge and eluted with 5 ml of methanol, acetonitrile or tetrahydrofuran. No significant differences were obtained and methanol was chosen as this is the eluent of chromatographic system.

The recoveries obtained when different volumes of a standard solution of phenolic compounds at the $10 \mu\text{g l}^{-1}$ level in Milli-Q-purified water adjusted at acidic pH (1% acetic acid) were preconcentrated are given in Table III. Better

Table II.- Mean recoveries and relative standard deviations ($n = 3$), of solid-phase extraction with carbon for different volumes of a solution of 0.1 mg l^{-1} of phenolic compounds in Milli-Q-purified water.

PHENOLIC COMPOUNDS	CARBON											
	25 ml				50 ml				100 ml			
	without TBA %R	RSD	with TBA %R	RSD	without TBA %R	RSD	with TBA %R	RSD	without TBA %R	RSD	with TBA %R	RSD
Ph	49	8.2	75	7.6	35	8.4	58	8	29	8.7	54	8.2
4-NP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,4-DNP	83	7.4	89	6.9	82	7.4	83	7.3	80	7.6	82	7.5
2-CP	94	5.2	98	4.9	94	5.3	96	5	90	5.7	90	5.7
2-NP	91	4	95	3.8	90	4.2	91	4	88	4.5	91	4.1
2,6-DMP	101	3.8	103	3.7	98	4	100	3.8	93	4.4	95	4.6
2,4-DMP	97	4.1	100	4	95	4.5	97	4.2	89	5	92	4.8
2-M-4,6-DNP	85	6.6	91	5.7	80	6.8	85	6.5	78	6.4	80	6.7
4-C-3-MP	99	7.3	101	7.1	97	7.6	98	7.4	92	7.9	92	7.8
2,4-DCP	103	3.2	102	3.3	100	3.5	99	3.7	96	3.9	97	4
2,4,6-TMP	98	3.8	99	3.8	97	4.1	99	3.9	96	4	98	3.9
2,4,6-TCP	98	5.9	100	5.7	95	6.4	98	6	95	6.5	96	6.5
PCP	75	8	76	7.8	75	8	75	7.9	74	8.1	75	8.1

Table III. Mean recoveries and relative standard deviations ($n = 3$), of the solid-phase extraction with the highly cross-linked styrene-divinylbenzene copolymer for different volumes of a solution of $10 \mu\text{g l}^{-1}$ of phenolic compounds in Milli-Q-purified water.

PHENOLIC COMPOUNDS	ENVI CHROM P											
	250 ml				500 ml				1000 ml			
	without TBA %R	TBA RSD	with TBA %R	TBA RSD	without TBA %R	TBA RSD	with TBA %R	TBA RSD	without TBA %R	TBA RSD	with TBA %R	TBA RSD
Ph	76	8.4	97	4.1	44	8.3	90	4.3	17	8.7	54	8.2
4-NP	100	3.8	101	3.8	100	3.9	100	3.8	83	6.5	98	4.3
2,4-DNP	98	3.3	100	3.2	97	3.5	98	3.4	100	3.5	98	3.6
2-CP	99	4.9	102	4.7	96	5.1	98	5	97	5.1	96	5.2
2-NP	97	3.9	99	3.6	98	3.8	97	4	100	3.8	101	3.7
2,6-DMP	102	4.3	102	4.2	98	4.7	98	4.6	98	4.7	98	4.9
2,4-DMP	98	4.6	100	4.6	101	4.5	98	4.6	99	4.5	96	4.6
2-M,4,6-DNP	97	6	98	6	97	6.2	97	6.1	99	6.2	99	6.3
4-C-3-MP	102	7	103	6.9	99	7.3	96	7.5	100	7.3	99	7.5
2,4-DCP	100	5.8	102	5.7	93	6.4	96	6.1	92	6.4	100	6
2,4,6-TMP	96	3.5	99	3.9	100	3.8	101	3.7	100	3.8	102	3.9
2,4,6-TCP	95	6.5	100	6.2	90	6.7	93	6.4	90	6.7	91	6.7
PCP	76	8	76	7.9	76	8	77	7.9	75	8	76	8

recoveries than those obtained with carbon were achieved but at volumes larger than 250 ml the recovery of phenol decreased considerably. However, for the other compounds, good recoveries were obtained even at a sample volume of 1000 ml.

To increase the recovery of phenol, ion-pair formation using TBA was tested and the recoveries obtained with different volumes of a standard solution of phenolic compounds at the $10 \mu\text{g l}^{-1}$ level in Milli-Q-purified water are also given in Table III. As can be seen, the addition of TBA to the sample allowed the preconcentration of 500 ml of sample with good recoveries for all compounds, including phenol.

The detection limits obtained when 100 ml of standard solution with TBA was preconcentrated using carbon cartridges and when 500 ml of the same standard solution were preconcentrated with the copolymer cartridge are given in Table I. When carbon cartridges were used the detection limits of the method were between 2 and $6 \mu\text{g l}^{-1}$ and when polymeric cartridges were used and a loop of $20 \mu\text{L}$ the detection limits were between 60 and 100 ng l^{-1} .

The performance of the method was tested on tap and Ebro river water. The samples were filtered through a $0.45\text{-}\mu\text{m}$ filter and $300 \mu\text{l}$ of 10% Na_2SO_3 solution were added for each 100 ml of tap water to eliminate free chlorine, which could react with phenols and produce chlorophenols.

As a first step, the recovery of the compounds in real samples was checked and the values obtained were as good as those with Milli-Q-purified water. The capacity of the cartridges was also tested with real samples and recoveries at different levels of phenolic compounds in 500 ml of river water sample were checked up to 0.2 mg l^{-1} . The recoveries were similar, which meant that the capacity of the cartridges was sufficient at these levels of phenolic compounds. The repeatability of the method with real samples was tested with 500 ml of river water spiked at $1 \mu\text{g l}^{-1}$ and the relative standard deviations ($n=4$) were between 4.3 and 8.6%.

The chromatogram obtained when 500 ml of tap water were preconcentrated by using the copolymer cartridges is shown in Figure 1a and that the same sample spiked with a standard solution of phenolic compounds at the $1 \mu\text{g l}^{-1}$ level in Figure 1b. Both samples were adjusted to pH 9 with NaOH and 5 mM TBA was added. Na_2SO_3 was also added to the sample as mentioned

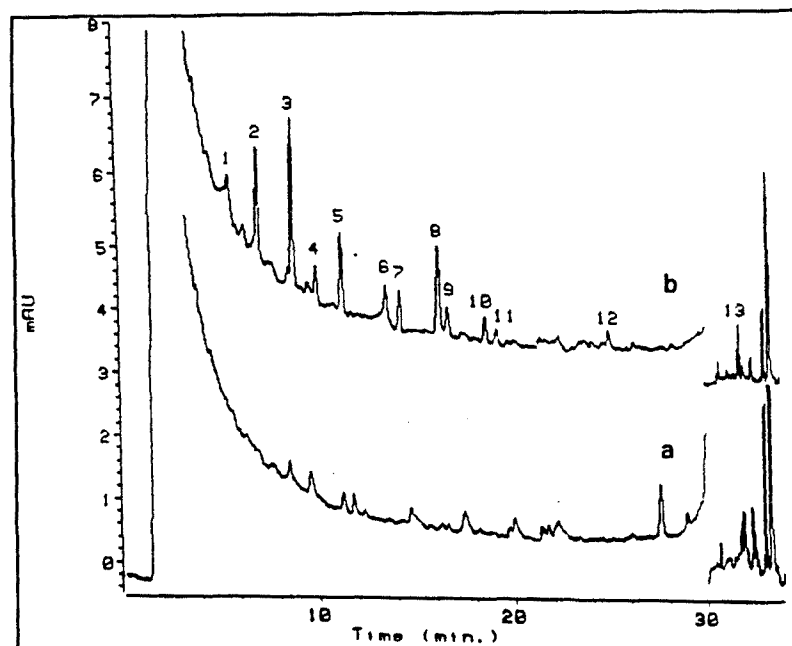


Figure 1.- Chromatograms obtained after ion-pair extraction with copolymer cartridge of (a) 500 ml of tap water and (b) 500 ml of tap water (with Na_2SO_3) spiked with a standard solution of phenolic compounds at the $1 \mu\text{g l}^{-1}$ level. Peaks: 1 = phenol; 2 = 4-nitrophenol; 3 = 2,4-dinitrophenol; 4 = 2-chlorophenol; 5 = 2-nitrophenol; 6 = 2,6-dimethylphenol; 7 = 2,4-dimethylphenol; 8 = 2-methyl-4,6-dinitrophenol; 9 = 4-chloro-3-methylphenol; 10 = 2,4-dichlorophenol; 11 = 2,4,6-trimethylphenol; 12 = 2,4,6-trichlorophenol; 13 = pentachlorophenol. For conditions, see text.

previously. The phenolic compounds retained in the cartridges were eluted with 5 ml of methanol. Prior to the injection of $20 \mu\text{l}$ of sample, solvent was removed under vacuum until a volume of 1 ml was reached.

As can be seen, all compounds can be determined without interferences and a peak that could be assigned to 2-NP appeared in the chromatogram of the tap water sample. From the comparison of the spectra, it could not be assigned to 2-NP.



The same analysis was carried out with river water. 500-ml volume of Ebro river water and the same sample spiked with $1 \mu\text{g l}^{-1}$ of a standard solution of phenolic compounds were analyzed using the same method and the chromatograms obtained are shown in Figure 2. It should be pointed out that, although there was a higher retention of the most polar compounds, the band at the beginning of the chromatogram did not prevent us from detecting phenol.

On the chromatogram, two small peaks with the same retention time that 2-NP and 2-M-4,6-DNP appeared, but the low signal did not allow comparison of the spectra.

If these results are compared with those obtained in a previous study [19] in which conventional PLRP-S was used and only 100 ml could be preconcentrated in order to obtain good recoveries, this highly cross-linked styrene-divinylbenzene copolymer seems to be much more suitable for the preconcentration of phenolic compounds.

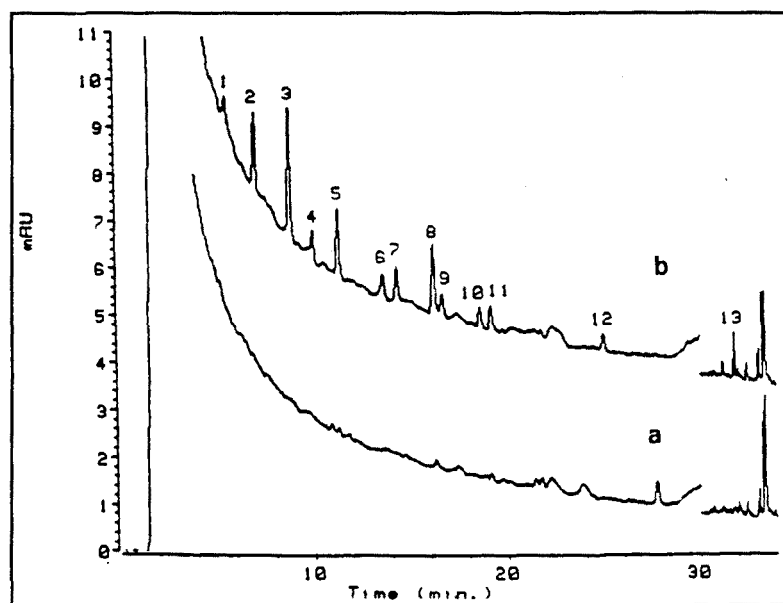


Figure 2.- Chromatograms obtained after ion-pair extraction with copolymer cartridges of (a) 500 ml of river water and (b) 500 ml of river water spiked with a standard solution of phenolic compounds at the $1 \mu\text{g l}^{-1}$ level. Peaks as in Fig. 1. For conditions, see text.

CONCLUSIONS

The use of the highly cross-linked styrene-dinivylbenzene copolymer sorbent for the preconcentration of phenolic compounds in water gave better results than those obtained with carbon, as it allowed a higher volume of sample to be preconcentrated without breakthrough. The addition of TBA to the sample implied, in both sorbents, an increase in the breakthrough volumes, especially that corresponding to phenol, which was the most polar compound studied. The preconcentration of 500 ml of river or tap water sample allowed the determination of these compounds at $\mu\text{g l}^{-1}$ level. Recoveries obtained were higher than 90% and the R.S.D.s ($n = 3$) of the method for real samples were lower than 10%.

REFERENCES

- [1] O. Busto, J.C. Olucha, F. Borrull, *Chromatographia*, **32** (1991) 566.
- [2] G. Marko-Varga, D. Barceló, *Chromatographia*, **34** (1992) 156.
- [3] A. Di Corcia, S. Marchese, R. Samperi, *J. Chromatogr.*, **642** (1993) 175.
- [4] E.R. Brouwer, I. Liska, R.B. Geerdink, P.C.M. Frintrop, W.H. Mulder, H. Lingeman, U.A.Th. Brinkman, *Chromatographia*, **32** (1991) 445.
- [5] G. Font, J. Mañes, J.C. Moltó, Y. Picó, *J. Chromatogr.*, **642** (1993) 135.
- [6] M.C. Hennion, *Trends Anal. Chem.*, **10** (1991) 317.
- [7] J. Slobodnik, E.R. Brouwer, R.B. Geerdink, W.H. Mulder, H. Lingeman, U.A.Th. Brinkman, *Anal. Chim. Acta*, **268** (1992) 55.
- [8] U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, **665** (1994) 217.
- [9] E. Pocurull, G. Sánchez, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A* **696** (1995) 31.
- [10] B. Cañas, M.D. Andres, L.M. Polo, *Chromatographia*, **24** (1987) 613.
- [11] J. Ruana, I. Urbe, F. Borrull, *J. Chromatogr. A*, **655** (1993) 217.
- [12] J.C. Hoffsommer, D.F. Glover, C.Y. Hazzard, *J. Chromatogr.*, **195** (1980) 435.
- [13] B. Gawdzik, J. Gawdzik, V. Czerwinska-Bill, *J. Chromatogr.*, **509** (1990) 136.

- [14] P. Mußmann, R Levsen, W. Radeck, *Fresen. J. Anal. Chem.*, **348** (1994) 654.
- [15] E.R. Brouwer, U.A.Th. Brinkman, *J.Chromatogr. A*, **678** (1994) 223.
- [16] C. Borra, A.Di Corcia, M. Marchetti, R. Samperi, *Anal. Chem.*, **58** (1986) 2048.
- [17] E. Chladek, R.S. Marano, *J. Chromatogr. Sci.*, **22** (1984) 313.
- [18] A.Di Corcia, S. Marchese, R. Samperi, G. Cecchini, L. Cerilli, *J. of A.O.A.C.*, **77** (1994) 446
- [19] E. Pocurull, M. Calull, R.M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia*, **38** (1994) 579.
- [20] L. Nolan, *Supelco Reporter*, **12** (1993) 10.
- [21] R. Boqué, F.X. Rius, *J. Chem. Ed.*, **70** (1993) 230.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

**CAPÍTOL IV. ACOBLAMENT EN LÍNIA DE L'EXTRACCIÓ EN
FASE SÒLIDA A LA CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA
PER A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS
FENÒLICS EN AIGÜES.**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

Si bé emprant cartutxos de 500 mg farcits amb el copolímer d'estirè-divinilbenzè altament entrecreuat junt amb la formació del parell iònic i preconcentrant 500 ml de mostra s'obtenen bones recuperacions per a tots els fenols incloent el fenol, el qual té una recuperació del 90%, i s'assoleixen límits de detecció propers als recomenats per la normativa, per tal de disminuir més aquests límits i automatitzar tant com sigui possible el procés, s'ha acoblat en línia el sistema d'extracció en fase sòlida amb el sistema cromatogràfic.

Tot i que el copolímer d'estirè-divinilbenzè ha presentat millors resultats que la resta de sorbents emprats en els capítols anteriors, no és possible el seu acoblament directe al sistema cromatogràfic degut a la incompatibilitat entre aquest sorbent i el C₁₈ emprat a la columna analítica, ja que un acoblament amb aquestes característiques comporta una desorció lenta dels analits i per tant un notable aixamplament dels pics cromatogràfics. Per això, els sorbents emprats per a portar a terme l'acoblament han estat C₁₈ i PLRP-S. El ciclehexil no s'ha emprat ja que en el estudis *off-line* s'ha comprovat que no comporta cap millora substancial respecte els altres.

L'equip cromatogràfic emprat ha estat el mateix que el corresponent als estudis anteriors. Per tal de poder realitzar l'acoblament s'ha utilitzat una vàlvula de sis vies connectada al cromatògraf líquid i una bomba per impulsar els solvents i la mostra cap a la precolumna, la qual també s'ha connectat a la vàlvula de sis vies.

El primer pas ha estat optimitzar el gradient d'elució per tal de compensar la pèrdua d'eficàcia que s'observa en l'acoblament, però sense disminuir significativament els temps de retenció dels compostos més polars ja que aquests podrien solapar-se amb la banda inicial que s'observa al preconcentrar mostres reals.

Després, i segons els resultats obtinguts en l'estudi *off-line*, s'han optimitzat les variables per portar a terme el procés de preconcentració. Degut a que en aquests estudis previs, la utilització de la formació de parells iònics entre els analits i un reactiu ha implicat un augment de les recuperacions, també s'ha emprat en aquest treball.

El següent pas ha estat la determinació dels volums de ruptura mitjançant l'obtenció de les corbes de ruptura. D'aquesta manera s'ha establert el volum de mostra a preconcentrar sobre cada tipus de sorbent.

Determinat el volum de mostra a analitzar, s'ha establert l'interval de linealitat i els límits de detecció emprant patrons preparats amb aigua Milli-Q, i finalment s'ha validat el mètode desenvolupat preconcentrant mostres d'aigua dels mateixos orígens que els especificats en els capítols anteriors.

Els resultats obtinguts es recullen en el treball que es mostra a continuació.

LIQUID CHROMATOGRAPHY OF PHENOLIC COMPOUNDS IN NATURAL WATER USING ON-LINE TRACE ENRICHMENT

SUMMARY

Two packing material, C_{18} and PLRP-S, are studied for on-line trace enrichment of phenolic compounds in water. Various precolumns of different internal diameter are also tested and the addition of an ion-pair reagent to increase retention and thus, breakthrough volumes of phenolic compounds, is studied. Best results are obtained when a PLRP-S precolumn is coupled on-line with a C_{18} analytical column and DAD detector. Addition of TBA considerably increases breakthrough volumes. In contrast, when a C_{18} precolumn is used, breakthrough volumes are lower and it is impossible to determine TCP and PCP, under the experimental conditions used, because of interference of other non-polar compounds in the samples. The performance of the system is evaluated with river and tap water and the preconcentration of 10 ml of sample in a PLRP-S precolumn involves a linear range between $1 \mu\text{g l}^{-1}$ and $20 \mu\text{g l}^{-1}$ and limits of determination between $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ and $1 \mu\text{g l}^{-1}$ are obtained.

INTRODUCTION

Phenol and substituted phenols are determined in tap and surface water because they can be toxic to most aquatic organisms. Even at concentrations lower than $1 \mu\text{g l}^{-1}$, a nontoxic concentration, phenols affect the taste and odour of water and fish. Furthermore, with chlorine enhances the odour and taste of water [1-4].

At present, the maximum total concentration of phenols allowed in tap water is $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ according to EC [5], but this is being revised [6] and recent recommendations by the World Health Organization [7] consider only some phenolic compounds and they suggest a concentration lower than $200 \mu\text{g l}^{-1}$ for 2,4,6-trichlorophenol and $9 \mu\text{g l}^{-1}$ for pentachlorophenol as a guide level,

taking into account that this phenolic compound is used as a pesticide. They also recommend a maximum concentration of $10 \mu\text{g l}^{-1}$ for 2-chlorophenol and $40 \mu\text{g l}^{-1}$ for 2,4-dichlorophenol, basing these latter values on taste and odour.

This level of phenolic compounds can be easily detected by an electrochemical detector but UV-visible or even diode array detectors are more common in laboratories. However, when using RPLC-DAD to determine phenolics, low concentration cannot be detected and a preconcentration step is always required.

Solid-phase extraction has been widely used for preconcentration of phenolics [8-10]. In a previous study [11] the off-line, solid-phase extraction method for these compounds was studied and different sorbents were tested as well as the influence of adding an ion-pair reagent to the sample. In order to obtain lower limits of detection and better reproducibility as well as to automate the system, on-line trace enrichment is described in the present paper.

Several authors [12-16] have demonstrated the performance of this system for the preconcentration and determination of different pollutants by HPLC in environmental waters. Thus, Brouwer et al. [12] used two precolumns in series packed with PLRP-S (styrene-divinylbenzene copolymer) and the other with PLRP-S loaded with sodium dodecyl sulphate to preconcentrate some polar compounds including three phenolic compounds. Some other phenolics, in addition to several pesticides, were determined by preconcentrating them in two different precolumns (C_{18} and PLRP-S) in series. Some authors [13] used a PRP1 precolumn to determine some mono- and dichlorophenols using photochemical reaction and fluorescence detection. Other authors [14] included carbon as a packing material for the preconcentration of some pollutants, including nitrophenol, because it enable higher breakthrough volumes, but significant peak broadening was observed.

In the present paper an on-line trace enrichment HPLC-DAD method was developed to determine phenolics in environmental waters. Different packing materials have been studied in order to obtain higher retention and breakthrough volumes, taking into account the different polarity of phenol and pentachlorophenol, both included in this study. The addition of TBA which acts as an ion-pair reagent and which increases the breakthrough volumes of most acidic compounds was also studied.

The performance of the system at optimum conditions was evaluated with tap and Ebre river waters.

EXPERIMENTAL

Equipment

Chromatographic experiments were performed using a Hewlett-Packard 1090 (Waldbronn, Germany) ternary gradient liquid chromatograph with an HP 1040M diode array detector. Chromatographic data was recorded using the HP 79994A Workstation. Separation was carried out using an HP stainless-steel 250x4 mm i.d. 5 μm ODS-2 analytical column.

The trace-enrichment experiments were performed using an M45 Waters pump (Mildford, MA, USA) to deliver the aqueous sample (2 ml min^{-1}) and to wet the precolumns, and a six-port injection valve. Stainless-steel precolumns (10x2 mm and 10x3 mm I.D.) (Free University, Amsterdam, The Netherlands) were packed with 10 μm Spherisorb ODS-2 purchased from Teknokroma (Barcelona, Spain) and a 10x2 mm I.D. precolumn packed with 15-25 μm PLRP-S which was from Spark Holland (Emmen, The Netherlands).

Reagents and Standards

The phenolic compounds studied and their abbreviations are: phenol (Ph), 2-nitrophenol (2-NP), 4-nitrophenol (4-NP), 2,4-dinitrophenol (2,4-DNP), 2,4-dimethylphenol (2,4-DMP), 2,6-dimethylphenol (2,6-DMP), 2,4,6-trimethylphenol (2,4,6-TMP), 2-chlorophenol (2-CP), 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP), 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP), pentachlorophenol (PCP), 4-chloro-3-methylphenol (4-C-3-MP) and 2-methyl-4,6-dinitrophenol (2-M-4,6-DNP). Except for 2,6-DMP and 2,4,6-TMP, these compounds represent the eleven EPA priority phenols. All phenolics studied were from Aldrich Chemie (Beerse, Belgium) except pentachlorophenol, which was supplied by Jansen Chemie (Geel, Belgium). A standard solution (2000 mg l^{-1}) of each compound was prepared in methanol:water (50:50) and stored in a refrigerator. The working

solutions were obtained every day by diluting these solutions with Milli-Q quality water.

HPLC-grade methanol (Scharlau, Barcelona, Spain) and Milli-Q quality water adjusted to pH 2.8 with acetic acid (Merck, Darmstadt, Germany) were used for the preparation of the mobile phase. TBA (tetrabutylammonium bromide) from Aldrich (Beerse, Belgium) was used as the ion-pair reagent in the extraction process.

Chromatographic conditions

Chromatographic separations were carried out using the following as the mobile phase: solvent A: water with 1% acetic acid (pH 2.8) and solvent B: methanol. The flow-rate was 1 ml min^{-1} and the wavelength set at 280 nm for all phenolic compounds except PCP which was set at 302 nm. Spectra were recorded between 210 and 350 nm. When C18 precolumns were used the oven temperature was set at 65°C and the gradient profile was initially 25% B; 47% B after 22 min; 100% B at 24 min and before returning to initial conditions at 30 min, the column was flushed with methanol for 5 min. When PLRP-S precolumn was used the oven temperature was 50°C and the gradient profile was the following: isocratic elution for 10 min at 40% B; gradient elution reaching 60% B at 18 min; 100% B at 24 min; isocratic elution up to 28 min at 100% B and initial conditions (40% B) at 30 min.

On-line trace enrichment

The on-line trace enrichment process was carried out using several precolumns. Before use, all precolumns were conditioned by flushing through 10 ml methanol and 4 ml mobile phase at initial conditions. The sample was then preconcentrated at 2 ml min^{-1} and the analytes trapped on the precolumn were desorbed in the backflush mode and transferred on-line to the analytical column. Sample solutions were prepared by adding NaCl solution to obtain a final concentration of 1 g l^{-1} and thus increase the ionic strength. Samples analyzed without TBA were adjusted to pH 3 with acetic acid, and samples analyzed with the ion-pair reagent, TBA was added to a final concentration of 5 mM and pH was adjusted to 9.0 with 0.1 M NaOH to form the ion-pair. The

effect of the ion-pair reagent has been studied in a previous paper [11] using an off-line enrichment system.

RESULTS AND DISCUSSION

The gradient elution profile was slightly modified from optimized in a previous study [11] in which the preconcentration step was carried out by off-line solid-phase extraction. When on-line solid-phase extraction was coupled to the analytical column, peak broadening appeared due to initial elution with a low solvent strength mobile phase. Thus, the gradient had to be modified in order to avoid overlapping of some pairs of peaks.

Different gradient profiles were optimized taking into account the high polarity of phenol and avoiding a very low retention time for this compound since a peak at the beginning of the chromatogram appears when real samples are analyzed. Thus, for the C₁₈ precolumn a gradient profile was optimized but this had to be changed when a PLRP-S precolumn was connected on-line to the analytical column because of the higher hydrophobicity of this type of sorbent which led to greater peak broadening.

First, a 2 mm I.D. C₁₈ precolumn was tested. To do so, the sample was adjusted to pH 3 and NaCl was added to reach a concentration of 1 g l⁻¹ to increase the ionic strength and, thus, the retention of the analyte on the precolumn due to the well-known salting out effect. Breakthrough volumes were determined according to the method described in literature [16] and volumes of up to 100 ml of solution containing individual compounds at concentrations of 1 mg l⁻¹ were loaded onto the precolumn to determine breakthrough volumes. The results obtained are shown in Table I. Since the breakthrough volumes were in general very low for most compounds studied, a wider precolumn was tested (3 mm I.D.) which contained more sorbent. An increase in the breakthrough volumes, shown in Table I, of about 50% was generally observed as well as an increase in peak broadening.

Using the same precolumn, 3 mm I.D., the effect of adding TBA to form ion-pairs with phenols was studied. The experimental conditions were derived

Table 1.- Breakthrough volumes obtained by loading with 1 mg l⁻¹ each compound in Milli-Q water. Results in ml. Conditions, see text.

COMPOUNDS	C18 (10 mm)		PLRP-S (10 mm)	
	2 mm i.d. without TBA	3 mm i.d. with TBA	2 mm i.d. with TBA	3 mm i.d. with TBA
Ph	0.4	0.9	1.4	3
4-NP	1	2	11	28
2,4-DNP	2	4	35	74
2-CP	2	4	9	20
2-NP	2	5	12	26
2,6-DMP	5	8	5	-
2,4-DMP	5	10	7	28
2-M:4,6-DNP	10	17	72	>100
4-C-3-MP	9	16	17	36
2,4-DCP	9	17	28	88
2,4,6-TMP	17	29	18	-
2,4,6-TCP	34	62	86	>100
PCP	>100	>100	>100	>100

from a previous study [11] in which the different parameters were optimized. For instance, different concentrations of TBA were tested and a concentration of 5 mM implied the best recovery values. pH was also optimized by testing pH values from 4 to 9 and the best results were obtained at pH 9. An amount of NaCl to reach a final concentration of 1 g l^{-1} was also added since the higher the ionic strength the higher the retention of the compounds [11].

The resulting breakthrough volumes are shown in Table I and the values obtained were higher for all compounds except for three methyl-phenolic compounds (2,6-DMP, 2,4-DMP and 2,4,6-TMP) for which the addition of TBA to the sample and adjusting the pH to 9 lead to a decreasing, or similar to (for 4-C-3-MP), breakthrough volumes. Obviously this effect is more important for nitrophenolic compounds because of the lower pK_a of these compounds. Adding TBA to the sample prior to preconcentration did not increase the band broadening of the chromatogram.

Although higher breakthrough volumes were obtained, the values for some compounds (especially phenol) were still very low and not sufficient to allow the determination of phenolic compounds at low $\mu\text{g l}^{-1}$ levels.

Next, a 2 mm I.D. PLRP-S precolumn was tested. As already mentioned, the gradient profile had to be modified from the one used with the C_{18} precolumn and the two phenolic compounds not included in the EPA priority list were not included in this study because of the poor resolution obtained due to the peak broadening. Breakthrough volumes were also calculated and the results are included in Table I. 5mM TBA was also added to the sample since this led to an increase in retention [11]. An important increase was observed for all compounds but the breakthrough volume of phenol was still small.

The different breakthrough curves obtained for C_{18} and PLRP-S must however, be taken into account. In Figure 1 the two different curves obtained with C_{18} and PLRP-S precolumns for 2-chlorophenol are shown. Whereas for C_{18} the analytes trapped are completely eluted in few seconds, for PLRP-S slower desorption was observed due to longer retention of compounds by PLRP-S and the low solvent strength of the eluent. This meant that even though a small breakthrough volume was obtained for some compounds, for instance, phenol a slightly higher volume can be preconcentrated with the PLRP-S precolumn without a substantial decrease in recovery.

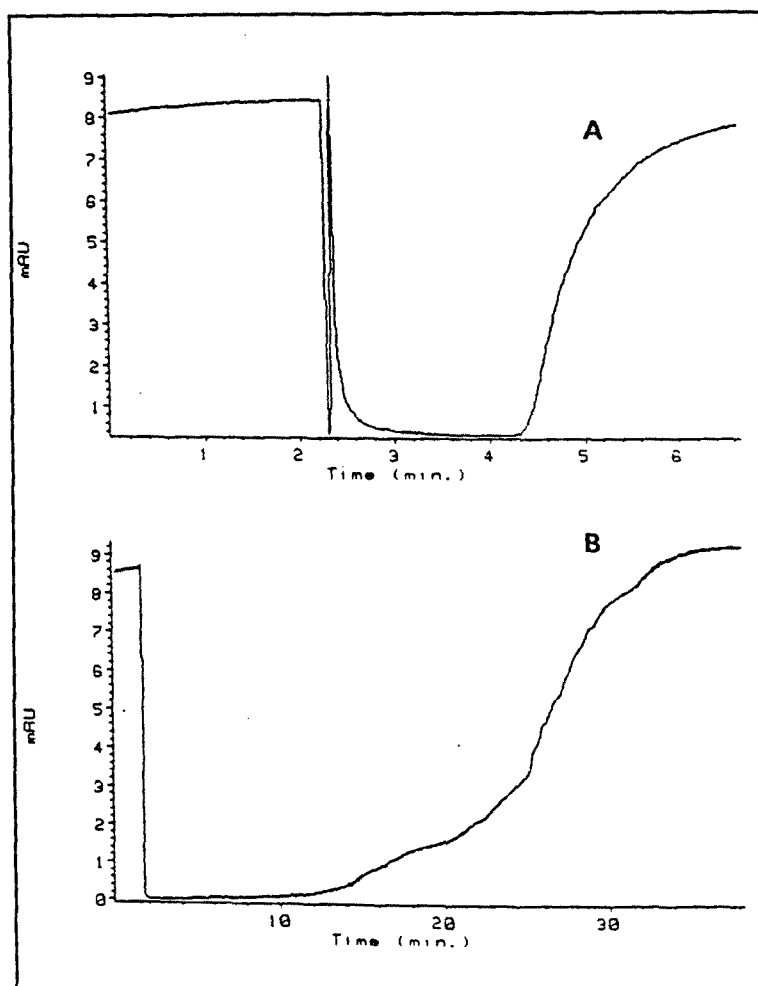


Figure 1.- Breakthrough curves for standard solution of 2-CP with 5 mM TBA pH=9: a) 10x3 mm I.D. C₁₈ precolumn, b) 10x2 mm I.D. PLRP-S precolumn.

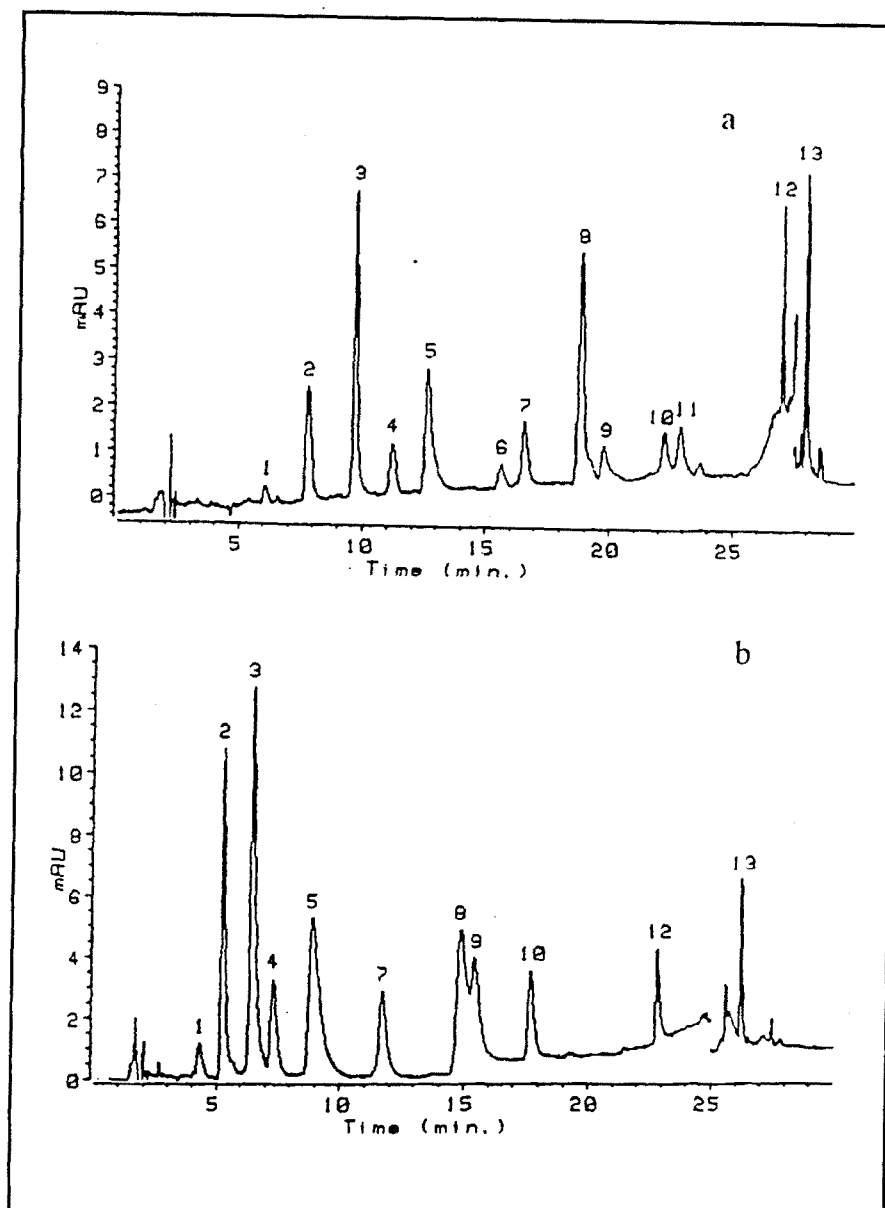


Figure 2.- Chromatogram of standard solution of $400 \mu\text{g l}^{-1}$ Ph, $40 \mu\text{g l}^{-1}$ 2-M4,6-DNP and $10 \mu\text{g l}^{-1}$ rest of compounds using: a) C₁₈ precolumn with 3 mm i.d. b) PLRP-S precolumn with 2 mm i.d. Compounds: (1) Ph, (2) 4-NP, (3) 2,4-DNP, (4) 2-CP, (5) 2-NP, (6) 2,6-DMP, (7) 2,4-DMP, (8) 2-M-4,6-DNP, (9) 4-C-3-MP, (10) 2,4-DCP, (11) 2,4,6-TMP, (12) 2,4,6-TCP and (13) PCP. For conditions, see text.

From the results obtained, volumes of 5 ml and 10 ml were selected for 3 mm I.D. C₁₈ and PLRP-S precolumns respectively. Obviously, low recovery was obtained for phenol with a C₁₈ precolumn whereas for a PLRP-S precolumn, recovery was 89%. The chromatogram corresponding to 5 ml of Milli-Q water spiked with 400 µg l⁻¹ Ph, 40 µg l⁻¹ 2-M-4,6-DNP and 10 µg l⁻¹ of the rest of the compounds preconcentrated with a C₁₈ precolumn is shown in Figure 2a. The chromatogram obtained when 10 ml Milli-Q water spiked with the same standard solution of the compounds studied, preconcentrated on a PLRP-S precolumn is depicted in Figure 2b.

The linearity for Milli-Q water was studied and ranged from 2 µg l⁻¹ - 20 µg l⁻¹ for C₁₈ and from 1 µg l⁻¹ - 20 µg l⁻¹ for PLRP-S. All regression coefficients (R²) were 0.98. Recoveries calculated from the calibration curve for a concentration of 10 µg l⁻¹ were 82% - 96%, except for Ph that was only 15%, for C₁₈ and 89% - 104% for PLRP-S. The low recovery phenol when C₁₈ was used did not allow its quantitation. The detection limits (S/N = 3) found were 0.1 µg l⁻¹ for 2,4-DNP and 0.4 µg l⁻¹ 2,6-DMP with the C₁₈ precolumn and 0.1 µg l⁻¹ for 2,4-DNP and 0.3 µg l⁻¹ for phenol with PLRP-S.

Apart from the breakthrough volumes, in the development of an on-line trace enrichment method the selectivity of the sorbent should also be taken into account owing to different matrix interference. Thus, the analytical performance of the system was tested with tap water and Ebro river water. The chromatogram obtained by preconcentrating 5 ml of Ebro river water with TBA to pH 9 and the same sample spiked with 4 µg l⁻¹ of the thirteen phenolic compounds using the C₁₈ precolumn can be seen in Figure 3.

A big peak which does not allow 2,4,6-TCP and PCP to be quantified can be seen at the end of the chromatogram under the experimental conditions used. Taking into account that these compounds are regarded as the most important according to the recommendations of WHO, the C₁₈ precolumn does not seem to be very suitable for the analysis. Of course, this depends on the type of water, and especially on its organic content.

Several peaks with the same retention time as the compounds studied appeared in the river water chromatogram. For positive identification, the spectrum of each peak was compared with the spectrum of the phenolic compound eluting at the same retention time, but none of them could be positively identified.

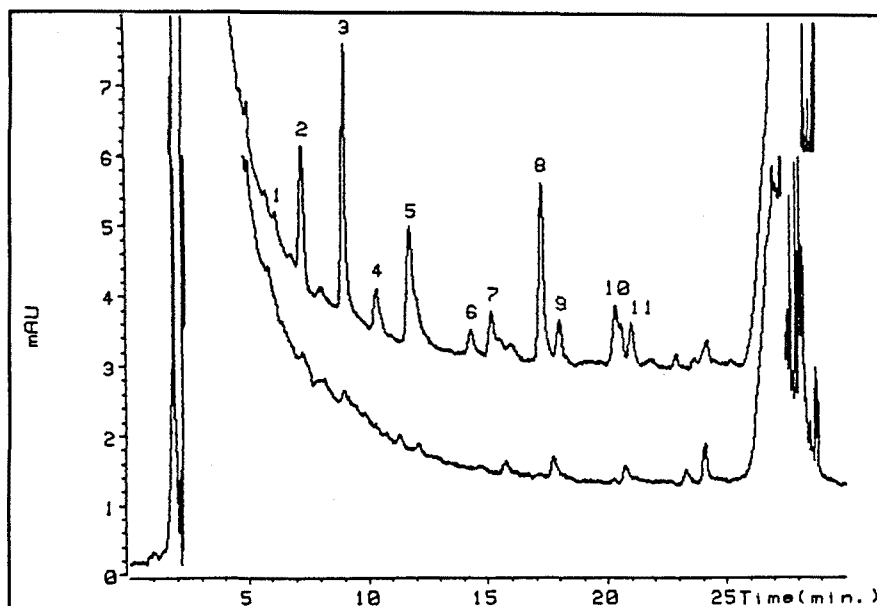


Figure 3.- Chromatograms after preconcentration 5 ml Ebre river water using C_{18} precolumn and ion-pair formation with and without standard addition of $4 \mu\text{g l}^{-1}$ of thirteen phenolic compounds. Peak designation, as Figure 2.

Figure 4 shows the chromatograms obtained using PLRP-S when 10 ml of Ebro river water were preconcentrated with TBA and when the same sample was spiked with $5 \mu\text{g l}^{-1}$ of the eleven EPA phenolics. All phenolics were determined without major interference. There was greater band broadening than using C_{18} but it was possible to quantify most peaks; the quantitation of phenol depended, obviously, on the matrix peak at the beginning of the chromatogram. Significant broadening of the 2-NP peak also occurred which implied lower accuracy. It must be pointed out that 2,4,6-TCP and PCP could be determined in contrast to the C_{18} experiments. It should also be mentioned that even though the volume of sample had been doubled, there was no observable increase in the peak at the beginning of the chromatogram, due to the different selectivity of the sorbents.

The linearity of the method was also checked with river water samples and it was as good as for Milli-Q water. Correlation coefficient (R^2) obtained for the river water calibration curves were between 0.990 and 0.998 for PLRP-S

precolumn. The precision of the method for real samples was calculated with a river sample spiked at $5 \mu\text{g l}^{-1}$ and the relative standard deviations obtained ($n=5$) were lower than 6% for all compounds studied. The detection limits of the method were also calculated and the values obtained were between $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ for 2,4-DNP and $1 \mu\text{g l}^{-1}$ for phenol for the PLRP-S precolumn. However, identification by spectra comparison only was possible at concentration $>5 \mu\text{g l}^{-1}$. Recoveries of real samples were also similar to those obtained with Milli-Q water which means that, as expected, the capacity of the precolumn was high enough.

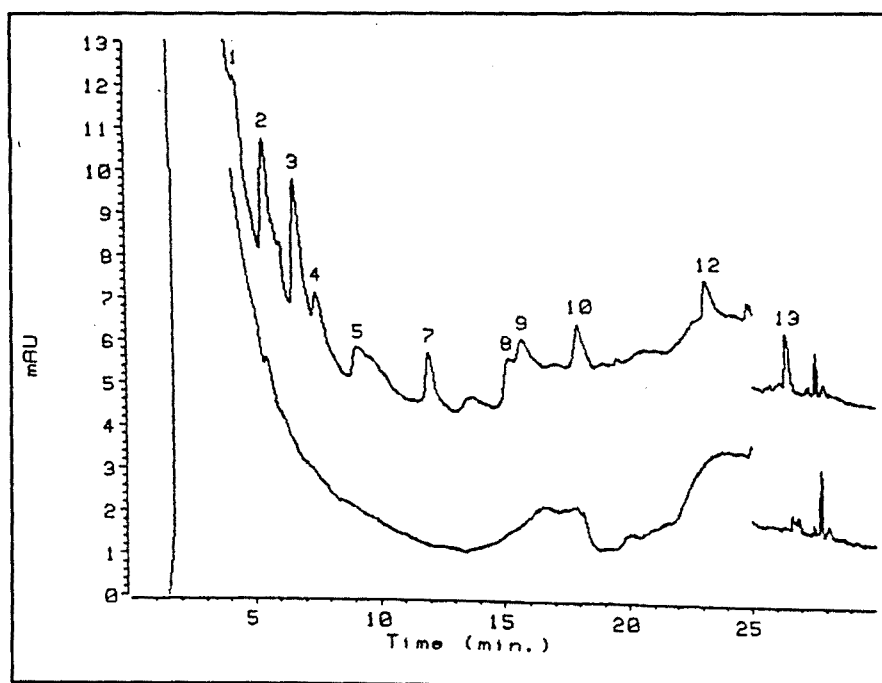


Figure 4.- Chromatograms after preconcentration of 10 ml Ebro river water using PLRP-S precolumn and ion-pair formation with and without standard addition of $5 \mu\text{g l}^{-1}$ of eleven EPA phenolic compounds. Peak designation, as Figure 2.

The performance of the system for tap water samples was also studied even though the limits of detection obtained were not low enough to achieve the values demanded at present by EC rules. However, if we take into account that these values are currently being revised and those recommended by WHO have recently been revised, the method developed allowed these compounds to be determined in tap water at lower levels than those recommended by WHO. It may be borne in mind that WHO only considers a level guide for 2,4,6-TCP and PCP and these values are $200 \mu\text{g l}^{-1}$ and $9 \mu\text{g l}^{-1}$ for PCP and recommends a maximum concentration of $10 \mu\text{g l}^{-1}$ for 2-chlorophenol and $40 \mu\text{g l}^{-1}$ for 2,4-dichlorophenol.

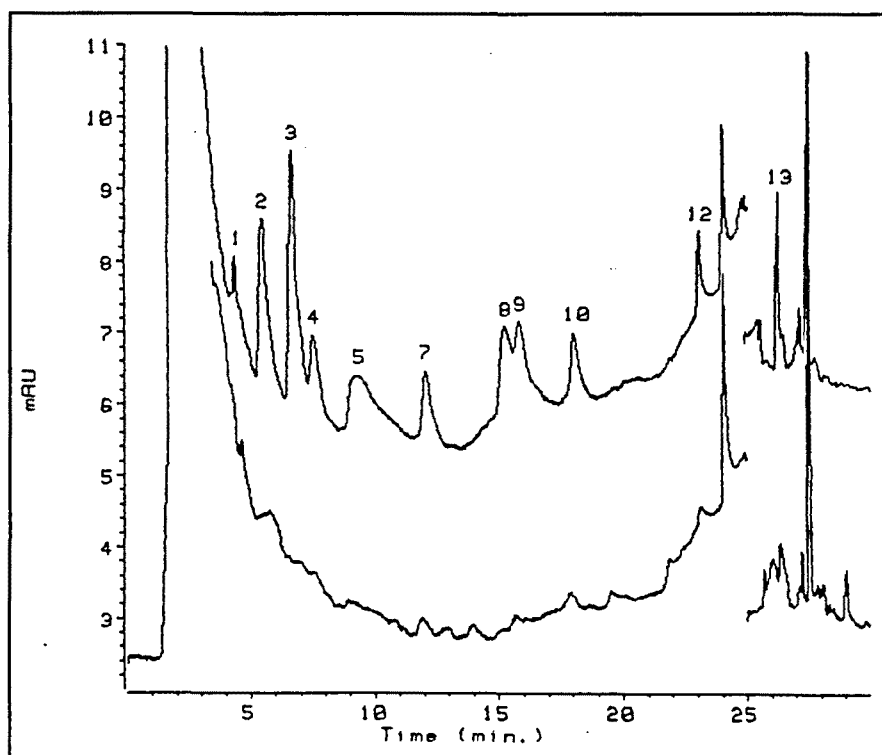


Figure 5.- On-line trace enrichment with PLRP-S precolumn 10 ml tap water with TBA, pH 9, and same spiked with $5 \mu\text{g l}^{-1}$ phenolic, studied. Peak designation, as Figure 2.

The linearity of response with tap water was the same as with Milli-Q water, and the precision and limits of detection were the same as those obtained with river water. In Figure 5a chromatogram corresponding to 10 ml tap water preconcentrated in the PLRP-S precolum and the sample spiked at $5 \mu\text{g l}^{-1}$ of each compound is shown.

CONCLUSIONS

From the various precolumns tested for the preconcentration of phenolic compounds, it can be concluded that the 10x2 mm PLRP-S precolumn is the one which led to higher breakthrough volumes. The addition of TBA as an ion-pair reagent increased breakthrough volumes of most compounds. From the results obtained, the best conditions are the preconcentration of 10 ml in PLRP-S, because, in addition to the better recovery, there was lower matrix interference at the end of the chromatogram and so, TCP and PCP could be determined. The performance of the system was evaluated with river and tap water and good linearity obtained between 1 and $20 \mu\text{g l}^{-1}$ and repeatability was also good (R.S.D. ($n=5$) lower than 6%).

REFERENCES

- [1] P.A. Realini, *J. Chromatogr. Sci.*, **13** (1981) 124.
- [2] J.D. Le Roux, *Municipal Engineer*, July, 19 (1988).
- [3] D.A. Baldwin, J.K. Debowski, *Chromatographia*, **26** (1988) 186.
- [4] C.P. Ong, H.K. Lee, S.F. Y. Li, *J. Chromatogr.*, **464** (1989) 405.
- [5] *Drinking Water Directive 80/778/EEC*, Commission of the European Communities, Brussels, 1980.
- [6] *Updated comments by Eureau on Revision of the Drinking Water Directive 80/778/EEC*. EUREAU. Brussels, 1993.
- [7] *Guidelines for drinking-water quality, Vol. 1*. WHO. 2nd Ed. Geneve, 1993.
- [8] J. Ruana, I. Urbe, F. Borrull, *J. Chromatogr. A*, **655** (1993) 217.
- [9] I. Liska, A. Kuthan, B. Krupcik, *J. Chromatogr.*, **609** (1990) 123.

- [10] C. Borra, A. Di Corcia, M. Marchetti, R. Samperi, *Anal. Chem.*, **58** (1986) 2048.
- [11] E. Pocurull, M. Calull, R.M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia*, **38** (1994) 579.
- [12] E.R. Brouwer, I. Liska, R.B. Geerdink, P.C.M. Frintrop, W.H. Mulder, H. Lingeman, U.A.Th. Brinkman, *Chromatographia*, **32** (1991) 445.
- [13] C.E. Werkhoven-Goewie, W.M. Boon, A.J.J. Praat, R.W. Frei, U.A.Th. Brinkman, C.J. Little, *Chromatographia*, **16** (1982) 53.
- [14] I. Liska, E.R. Brouwer, H. Lingeman, U.A.Th. Brinkman, *Chromatographia*, **37** (1993) 13.
- [15] P. Subra, M.C. Hennion, R. Rosset, R.W. Frei, *J. Chromatogr.*, **456** (1988) 121.
- [16] M.W.F. Nielen, PhD Thesis, "Selective on-line precolumn sample handling and trace enrichment in liquid chromatography", Free University of Amsterdam, 1987.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

**CAPÍTOL V. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS EN
AIGÜES MITJANÇANT CROMATOGRÀFIA
LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ I DETECCIÓ
ELECTROQUÍMICA EMPRANT UN SISTEMA
AUTOMATITZAT DE PRECONCENTRACIÓ
ACOBLAT EN LÍNIA.**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

Tot i que emprant una precolumna de PLRP-S els límits de detecció que s'obtenen són més baixos que emprant una precolumna de C₁₈, no són suficients per arribar als nivells de concentració que recomanen les normatives europees. D'altra banda, en ambdós casos s'observa una banda ampla al principi del cromatograma quan es preconcentren mostres reals, degut a components de la matriu de la mostra. Aquest efecte és més pronunciat quan s'empra el sorbent PLRP-S.

Per tal d'intentar disminuir els límits de detecció i modificar la selectivitat del mètode, s'ha considerat la possibilitat de canviar el sistema de detecció emprant un detector electroquímic enlloc del de diodes en fila.

Degut a la distorsió de la línia base observada en emprar un gradient d'elució, amb la conseqüent pèrdua de sensibilitat, s'ha portat a terme la separació cromatogràfica mitjançant una elució isocràtica emprant dues fases mòbils, una pels més polars i una altra amb més força elutràtica per al 2,4,6-TCP i PCP. Posteriorment s'ha optimitzat el potencial de treball tenint en compte el senyal obtingut així com el soroll de fons i el temps d'estabilització del detector.

Un cop optimitzades totes les condicions cromatogràfiques, s'ha aplicat el sistema d'extracció en fase sòlida emprant les millors condicions trobades en l'estudi portat a terme en el capítol anterior: precolumna de PLRP-S i formació del parell iònic i, s'ha calculat l'interval de linealitat i límits de detecció preconcentrant patrons preparats amb aigua Milli-Q.

Finalment s'ha validat el mètode per mostres reals d'aigua, prestant especial atenció a l'efecte de la matriu sobre la determinació dels compostos fenòlics estudiats.

Els resultats d'aquest estudi es recullen en el treball que es presenta a continuació.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

AUTOMATED ON-LINE TRACE ENRICHMENT AND DETERMINATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN ENVIRONMENTAL WATERS BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

SUMMARY

Automated trace enrichment of phenolic compounds on a 10 x 2.0 mm I.D. precolumn packed with PLRP-S was coupled on-line with reversed-phase column liquid chromatography and electrochemical detection. Two different eluents were used owing to the different polarities of the phenolic compounds and the difficulty of combining gradient elution with electrochemical detection. In the analysis of real samples (tap and river water), each step of the automatic method was optimized taking into account the complexity of the matrix. In tap water, the preconcentration of 4 ml samples allowed phenolic compounds to be determined at the ng l^{-1} level and the limits of detection (LODs) were between 1 and 10 ng l^{-1} (except for 2,4-dinitrophenol and 2-methyl-4,6-dinitrophenol, for which the LODs were 75 and 50 ng l^{-1} , respectively). When river water was analyzed, only 1 ml of sample could be preconcentrated because of humic and fulvic acid interference and the detection limits were about four times higher.

INTRODUCTION

The determination of phenol and substituted phenols is receiving increasing attention because of their toxicity. Further, the presence of chlorinated phenols, which can be present in drinking waters as a consequence of the disinfection process with chlorine, has an adverse effect on the taste and odour of water [1,2]. The maximum admissible concentration (MAC) according to EC directives for phenols in drinking water is 0.5 $\mu\text{g l}^{-1}$, excluding those phenols which do not react with chlorine [3].

There are various methods for determining phenols in water. The spectrophotometric method based on the reaction of 4-aminoantipyrine with phenols [4] is recommended but only the total content of phenols can be determined. Another much used method is based on gas chromatography with derivatization and electron-capture detection, which is the standard EPA method [5].

Recently, these compounds have been determined by RPLC using mainly UV [6-8] or amperometric detection [9-11], although other detection techniques such as mass spectrometry [12], fluorescence or chemiluminescence after derivatization [13] have also been described.

When amperometric detection is used, it is necessary to develop the chromatographic separation by isocratic elution to avoid baseline distortion. In this case, when isocratic elution is used, the main problem in the separation is the different polarities of the compounds, which results in long analysis times and the appearance of broader peaks for the last-eluted compounds with a consequent loss of sensitivity.

Although amperometric detection is very sensitive, the low concentration allowed in drinking water by EC regulations implies a preconcentration process. Liquid-liquid extraction has been the most used technique, but in the last few years the solid-phase extraction (SPE) has become more popular [14,15]. Various packing materials with different selectivity such as octadecyl bonded silica, styrene-divinylbenzene copolymer and graphitized carbon black are currently available. Some of them have been applied to the determination of phenolic compounds [16-19], with varying results. On-line solid-phase extraction procedures involve better sensitivity, lower sample volume, lower consumption of organic solvents, higher automation potential and better reproducibility [20-25].

In this paper, the eleven phenolic compounds considered as priority pollutant by the EPA were determined using a liquid chromatographic system with an electrochemical detector. Isocratic elution was selected and two eluents had to be used. In order to decrease the limit of detection, an automatic on-line preconcentration system with a styrene-divinylbenzene copolymer precolumn and with the addition of the ion-pair reagent tetrabutylammonium bromide (TBA) to the sample was developed. The performance of the total system was checked with tap and river water.

EXPERIMENTAL

Equipment

Chromatographic experiments were performed using a Shimadzu (Tokyo, Japan) LC-9A pump with an HP-1049A electrochemical detector (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA). The temperature of the column was controlled by a Bio-Rad (Veenendaal, Netherlands) oven and chromatographic data were collected and recorded using the HP-3365 Series II Chemstation, which was controlled by Windows 3.1 (Microsoft). The separation was performed using a 250 x 4 mm I.D. Spherisorb ODS-2 column with a particle size of 5 μm .

The sample was injected through a Rheodyne valve with a 20 μl loop or with an automatic method using a Must column-switching device (Spark-Holland, Emmen, Netherlands) that allowed the sample to be injected after the preconcentration process. To carry out the solid-phase extraction, a precolumn (10 x 2 mm I.D.) packed with a styrene-divinylbenzene copolymer (PLRP-S)(15-25 μm particle size) (Spark Holland) and a Waters (Mildford, MA, USA) M45 pump to deliver the sample were used.

Reagents and Standards

Phenol (Ph), 4-nitrophenol (4-NP), 2,4-dinitrophenol (2,4-DNP), 2-chlorophenol (2-CP), 2-nitrophenol (2-NP), 2,4-dimethylphenol (2,4-DMP), 2-methyl-4,6-dinitrophenol (2-M-4,6-DNP), 4-chloro-3-methylphenol (4-C-3-MP), 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP), 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP) were obtained from Aldrich Chemie (Beerse, Belgium) and pentachlorophenol (PCP) from Janssen Chemie (Geel, Belgium). Standard solutions (2000 mg l⁻¹ of each compound) were prepared in methanol-water (50:50). If stored in a refrigerator, the solutions were stable for several months. A mixture of all phenolic compounds was prepared weekly by diluting the standard solution in water obtained with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA), and more diluted working solutions were prepared every day by diluting the solution with Milli-Q-purified, tap and river water.

HPLC-grade methanol (Scharlau, Barcelona, Spain) and Milli-Q quality water were used in the preparation of the eluent and in the solid-phase extraction system.

The pH values of the eluent were adjusted with sulphuric acid (Panreac, Barcelona, Spain) and acetate buffer (Merck, Darmstadt, Germany). To adjust the ionic strength of the eluent, potassium nitrate (Probus, Badalona, Spain) and potassium chloride (Probus) were added. The tetrabutylammonium bromide used as an ion-pair reagent in the extraction process was supplied by Fluka (Buchs, Switzerland).

Chromatographic Conditions and Detection

Two eluents with different solvent strength were used. For the separation of the nine most polar compounds studied, the eluent used was methanol-water (45:55) acidified to pH 3.0 with H_2SO_4 and containing KCl and KNO_3 at final concentrations of 0.05 and 2 g l⁻¹, respectively (eluent A). The eluent used for the separation of 2,4,6-TCP and PCP was methanol-water (65:35) adjusted at pH 4.7 with acetic acid-sodium acetate buffer and KCl and KNO_3 at final concentrations of 0.05 and 2 g l⁻¹, respectively (eluent B). In both instances, the flow-rate was 1 ml min⁻¹, the column temperature was kept at 50°C and the volume of sample for direct injection was 20 µl.

The potential values used in the electrochemical detector were 1.1 V for the nine most polar compounds and 0.8 V for 2,4,6-TCP and PCP. The electrochemical detector worked in the amperometric mode with a glassy carbon electrode. A solid-state Ag-AgCl reference electrode was used, so the eluents had to contain KCl (0.05 g l⁻¹). The electrochemical cleaning technique was used every twenty injections to correct the electrodeposition on the surface of the electrode, applying a cyclic treatment with alternate potentials. The working electrode was polished in the conventional way every 60 injections [8,26].

On-line trace enrichment

The on-line solid-phase extraction process was carried out using a 10 x 2 mm I.D. precolumn packed with the styrene-divinylbenzene copolymer (PLRP-S).

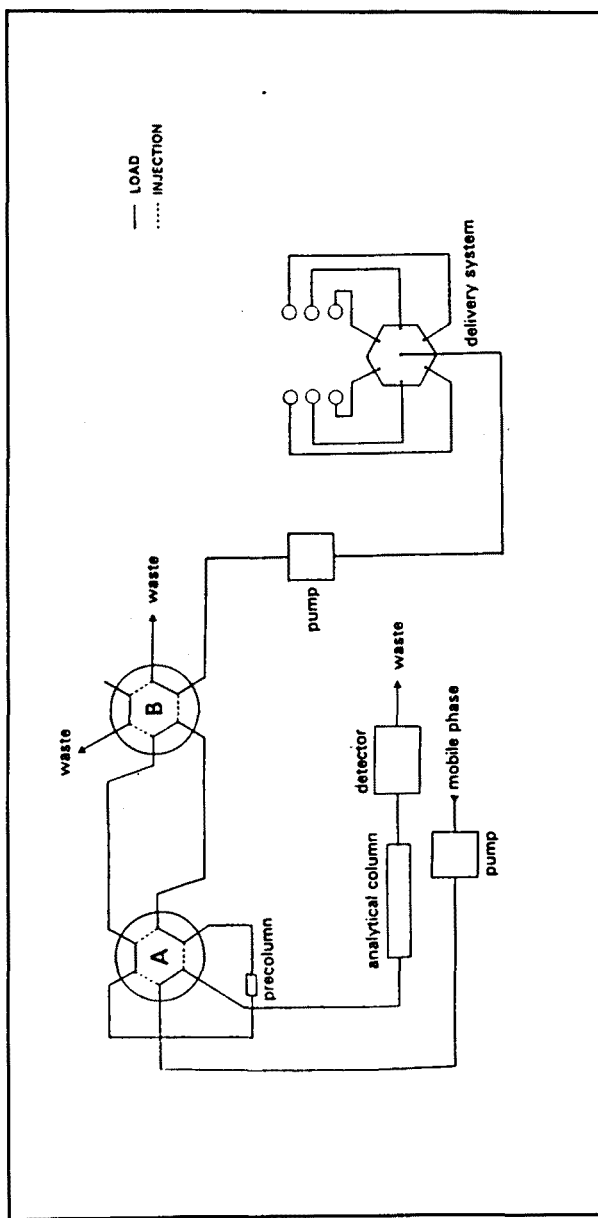


Figure 1.- Set up for automated pre-concentration of sample.

The pH of the samples was adjusted at about 9.0 and TBA was added at a concentration of 5 mM. The addition of TBA to the sample meant an increase in breakthrough volumes, mainly for the most polar compounds, as had been shown previously [27].

Figure 1 shows a diagram of the programmable delivery system used for automatic preconcentration. Two switching valves were used in order to clean up the tubs, activate the precolumn and measure more accurately the sample volume to be preconcentrate. Table I shows the programme followed in the extraction process. The flow-rate was 2 ml min^{-1} in all processes. First, the preconcentration system was washed with methanol for 2 minutes to remove all the solvents between the delivery system and the pump delivering sample. Then, in step 2, the cartridge was cleaned up and conditioned with methanol for 6 minutes. Another step (3) was introduced to remove the methanol with a 5 mM solution of TBA. After activating the cartridge with the TBA solution for 1 min and cleaning the tubes with the sample for 2 min, the preconcentration step started (at 13 min). The length of this step can be changed depending on the matrix sample (2 min for standard solution and tap water or 0.5 min for river water). In the next step, the analytes trapped on the precolumn were desorbed in the backflush mode and transferred on-line to the analytical column.

Table I.- Programme for the extraction process.

Step	Time (min)	Event	Valve A	Valve B
1	0	Washing tubes with methanol	Load	Load
2	2	Conditioning cartridge with methanol	Load	Inject
3	8	Washing tubes with water-TBA	Load	Load
4	10	Activation of cartridge with water-TBA	Load	Inject
5	11	Washing tubes with sample	Load	Load
6	13	Sample preconcentration	Load	Inject
7*	15	Washing tubes with water-TBA	Load	Load
8*	17	Clean-up with water-TBA	Load	Inject
9	15/18.5	Analyte desorption	Inject	Inject

* Only applied when river water was analysed.

When river water was analyzed, prior to the injection of the sample two additional steps were introduced in the programme to remove humic and fulvic acids, which may introduce an important distortion peak at the beginning of the chromatogram. In this case, two steps (7 and 8) to clean up the tubes and the cartridge were included in the programme.

RESULTS AND DISCUSSION

As mentioned above, two eluents were optimized to carry out the isocratic separation: one to separate the nine most polar phenolic compounds studied (eluent A, which contains 45% methanol) and another, with a higher solvent strength (eluent B, with 65% of methanol), to separate 2,4,6-TCP and PCP, which are the least polar compounds studied. The best results for the more polar compounds were obtained at pH 3.0, but for the other compounds (eluent B), the pH had to be increased in order to shorten the analysis time, because the retention time of PCP is highly pH dependent, although the retention time of 2,4,6-TCP does not change very much with pH. Of the different pH values tested, between 3 and 5, pH 4.7 allowed the separation of both compounds in less than 10 min. Although some workers used gradient elution [11], lower sensitivity was obtained because of the baseline drift and two runs are preferred [8].

In order to select the best working potential, different potential values were tested and for eluent A the potential had to be fixed at 1.1 V, because at lower potential nitrophenols had a very low response in the range of concentrations studied and a considerable background appeared in the chromatogram at higher potential values, which meant it took a longer time to stabilize the detector. On the other hand, for 2,4,6-TCP and PCP, with the eluent specified previously, the highest signal was obtained at 0.8 V.

The electrochemical ratios of the peak areas at different voltages for each phenolic compound were determined under the experimental conditions used so that they could be used as confirmation data when real samples were analyzed. The results are given in Table II and the relative standard deviations of the values ($n=4$) were between 1.5 and 7.9%.

Table II.- Electrochemical ratios of the peak areas at different voltages.

Compound	0.8/1.1 V	0.9/1.1 V	1.0/1.1 V	0.7/0.8 V	1.0/0.8 V	1.1/0.8 V
Ph	0.05	0.28	0.71			
4-NP	0.00	0.00	0.11			
2,4-DNP	0.00	0.02	0.08			
2-CP	0.13	0.44	0.74			
2-NP	0.00	0.01	0.29			
2,4-DMP	0.51	0.74	0.91			
2-M-4,6-DNP	0.00	0.00	0.07			
4-C-3-MP	0.27	0.60	0.76			
2,4-DCP	0.41	0.77	0.88			
2,4,6-TCP				0.89	0.94	0.91
PCP				0.29	0.86	0.81

Figure 2 shows the chromatograms obtained after a 20 μl injection of a standard solution of 20 $\mu\text{g l}^{-1}$ of each phenol except 2-M-4,6-DNP (40 $\mu\text{g l}^{-1}$) and 2,4-DNP (200 $\mu\text{g l}^{-1}$) with the two optimum eluents. Good resolution between the different peaks was observed. The linearity of the response was checked for different ranges depending on the sensitivity of each compound and in all cases good linearity was achieved. The detection limits of the chromatographic method were determined for a signal-to-noise ratio of about 3, and the results of linearity ranges and limits of detection are given in Table III.

In order to determine lower concentrations of phenols, a preconcentration system was required. On-line trace enrichment systems improve the limit of detection as all of the preconcentrated sample is injected into the chromatographic system whereas only an aliquot is injected when an off-line system is used.

Different packing materials were used for on-line SPE. In a previous paper [16] the off-line SPE of phenolic compounds was studied and it was shown that a styrene-divinylbenzene copolymer meant a higher breakthrough volume than C_{18} or cyclohexyl and the addition of an ion-pair reagent such as TBA also increased the breakthrough volumes of phenolic compounds. Some workers [20] recommend the use of two precolumns in series, one with PLRP-S for all phenolic compounds except for phenol, because of the low breakthrough volume, for which they recommended a non-ionic styrene-divinylbenzene copolymer with a large number of active aromatic sites (ENVI-Chrom P) and, consequently, a higher retention of phenolic compounds. In a recent paper

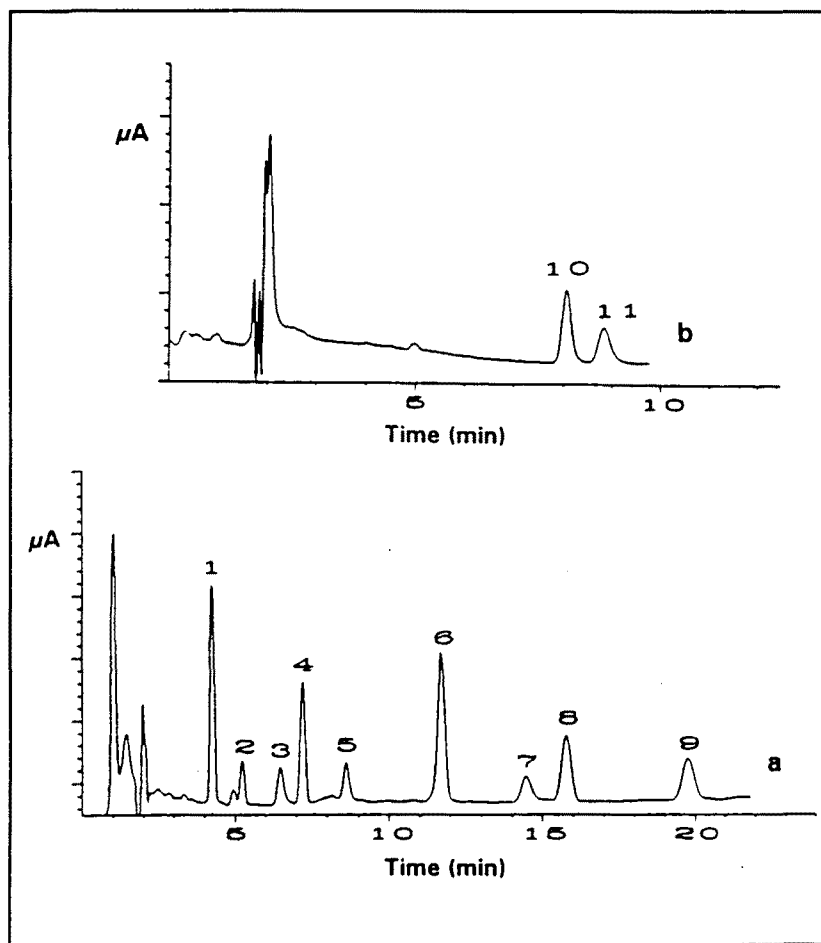


Figure 2.- Chromatograms obtained under optimum conditions for a standard solution of phenols of $20 \mu\text{g l}^{-1}$, except 2-methyl-4,6-dinitrophenol ($40 \mu\text{g l}^{-1}$) and 2,4-dinitrophenol ($200 \mu\text{g l}^{-1}$). (a) Eluent A; (b) Eluent B. 1 = phenol; 2 = 4-nitrophenol; 3 = 2,4-dinitrophenol; 4 = 2-chlorophenol; 5 = 2-nitrophenol; 6 = 2,4-dimethylphenol; 7 = 2-methyl-4,6-dinitrophenol; 8 = 4-chloro-3-methylphenol; 9 = 2,4-dichlorophenol; 10 = 2,4,6-trichlorophenol; 11 = pentachlorophenol.

Table III.- Linearity ranges, R^2 and limits of detection of phenolic compounds by direct injection and with on-line trace enrichment of 4 ml of Milli-Q-purified water adjusted to pH 9 and with TBA added.

Compound	Direct injection			On-line trace enrichment		
	Linear range ($\mu\text{g l}^{-1}$)	R^2	LOD ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Linear range ($\mu\text{g l}^{-1}$)	R^2	LOD (ng l^{-1})
Ph	1-20	0.9990	0.1	0.01-1.0	0.9996	2
4-NP	5-25	0.9984	1	0.025-5.0	0.9982	10
2,4-DNP	25-200	0.9996	10	0.1-10.0	0.9984	75
2-CP	1-20	0.9994	0.5	0.01-1.0	0.9996	5
2-NP	5-25	0.9986	1	0.025-5.0	0.9986	10
2,4-DMP	1-20	0.9994	0.1	0.01-1.0	0.9996	2
2-M,4,6-DNP	5-25	0.9990	2	0.075-5.0	0.9980	50
4-C,3-MP	1-20	0.9990	0.5	0.01-1.0	0.9990	5
2,4-DCP	1-20	0.9980	0.5	0.01-1.0	0.9980	5
2,4,6-TCP	1-50	0.9990	0.1	0.01-1.0	0.9978	1
PCP	1-50	0.9988	0.1	0.01-1.0	0.9962	1

[27], on-line SPE of phenolic compounds was studied and the influence of the different parameters, including the addition of TBA to the sample, on the breakthrough volumes was studied. Most compounds had breakthrough volumes considerably higher with PLRP-S than with other precolumns, whereas for the most polar compounds, mainly phenol, the breakthrough volumes were low and were considerably increased by the addition of TBA to the sample.

According to the values obtained, 4 ml of sample with TBA added was chosen as the volume for preconcentration, mainly determined by the phenol breakthrough volume. It should also be pointed out that higher sample volumes would cause overlap of the phenol peak with the chromatogram and owing to the polar compounds retained in the precolumn.

Figure 3 shows the chromatograms of 4 ml of Milli-Q-purified water spiked at $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ with each phenolic compound, except $0.2 \mu\text{g l}^{-1}$ for 2-M-4,6-DNP and $1 \mu\text{g l}^{-1}$ for 2,4-DNP when the on-line trace-enrichment process was used. Good resolution between the different peaks can be observed, in addition to the presence of several unknown peaks with different retention times from the peaks of the compounds studied. Only slight peak broadening was observed for the compounds when the automatic on-line preconcentration method was used.

The linearity of the response for the total analytical system, including the preconcentration step, was checked for a sample volume of 4 ml Milli-Q-purified water spiked at different concentrations depending on the sensitivity of each phenolic compound. The results obtained for the linearity range are included in Table III together with the limits of detection (signal-to-noise ratio = 3). The recoveries for a sample of $0.2 \mu\text{g l}^{-1}$ were >85% for all compounds except 2,4-DNP and 2-M-4,6-DNP, the recoveries of which were about 75%. The repeatability of the method was checked with a 4 ml Milli-Q-purified water sample spiked at the $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ level and the R.S.D. were between 1.5 and 7.7% ($n=4$).

The analytical performance of the system was tested with tap and river water. When tap water was analyzed, 300 μl of a 10% solution of Na_2SO_3 were added to 100 ml of water before adding the standard solution of phenolic compounds in order to eliminate free chlorine, which could react with phenols and produce chlorophenols [13].

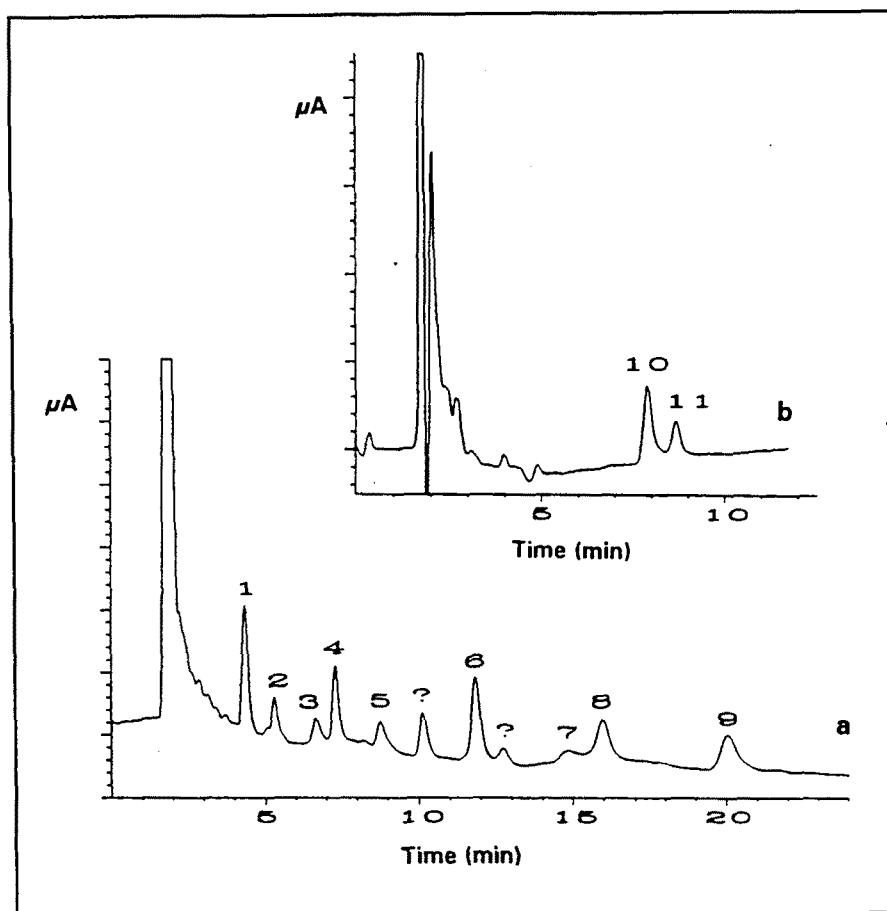


Figure 3.- Chromatograms obtained by on-line trace enrichment of 4 ml of Milli-Q-purified water spiked at $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ with each phenolic compound, except 2-methyl-4,6-dinitrophenol ($0.2 \mu\text{g l}^{-1}$) and 2,4-dinitrophenol ($1 \mu\text{g l}^{-1}$). (a) Eluent A; (b) eluent B. For peak designation, see Figure 2; ? = unknown.

The linearity of the method was checked with tap water and it was essentially as good as for Milli-Q-purified water (R^2 values between 0.995 and 0.9994). Recoveries were calculated from the calibration graph including a preconcentration step with Milli-Q-purified water [28] and they were $>90\%$ for all compounds. The repeatability of the method was checked with a 4 ml of tap water sample spiked at $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ level. The R.S.D.s were between 1.9 and 8.2% ($n=4$). The limits of detection were also similar to those obtained

with Milli-Q-purified water and allowed pollutants to be determined at the levels required by present EC regulations.

On-line trace enrichment for river water showed a large, distorted peak at the beginning of the chromatogram, owing to the presence of humic substances in the river water. When eluent A was used, a volume of 4 ml of sample could not be preconcentrated because of interference with the first compounds eluted. It was necessary to decrease the volume of preconcentration.

A volume of 1 ml of sample was chosen to be preconcentrated. Under these conditions, a less distorted peak at the beginning of the chromatogram also appeared. Different clean-up steps were studied and the optimum one, with a decrease in the peak due to fulvic and humic acids and no decrease in the recoveries of phenolic compounds, is given in Table I. The linearity of the response of the complete system was checked and linear ranges were found to be 0.05-5 $\mu\text{g l}^{-1}$ for all the compounds analysed with eluent A, except 2,4-DNP (0.5-40 $\mu\text{g l}^{-1}$) and 2-M-4,6-DNP (0.5-20 $\mu\text{g l}^{-1}$) ($R^2 = 0.994 - 0.998$). The repeatability of the method in river water was checked with a sample spiked at 0.5 $\mu\text{g l}^{-1}$ and R.S.D.s found were between 3.2 and 8.5% ($n = 4$). The limits of detection (LOD) were between 5 and 50 ng l^{-1} , except for 2-M-4,6-DNP and 2,4-DNP (0.2 and 0.3 $\mu\text{g l}^{-1}$, respectively).

In Figures 4a and 4b the chromatograms of a river water sample and the same sample spiked with a standard solution of the nine phenolic compounds at the 0.5 $\mu\text{g l}^{-1}$ level are shown. Different peaks also appeared but none of them could be assigned to any phenolic compound.

Figure 4c shows the chromatogram obtained after the on-line preconcentration of 4 ml of tap water with the addition of Na_2SO_3 . Several peaks appeared, one of them at the same retention time as phenol, which was assigned to phenol using electrochemical ratios. The concentration of phenol was 43 ng l^{-1} . The chromatogram obtained for a 4 ml tap water sample spiked with a phenolic compounds at the 0.1 $\mu\text{g l}^{-1}$ level with the addition of Na_2SO_3 is shown in Figure 4d. Samples treated with Na_2SO_3 showed a larger peak at the beginning of the chromatogram.

The same study was carried out with the other two compounds and the results obtained in the analysis of 4 ml tap water sample and 4 ml tap water sample spiked with a standard solution of 0.1 $\mu\text{g l}^{-1}$ and addition of sulphite

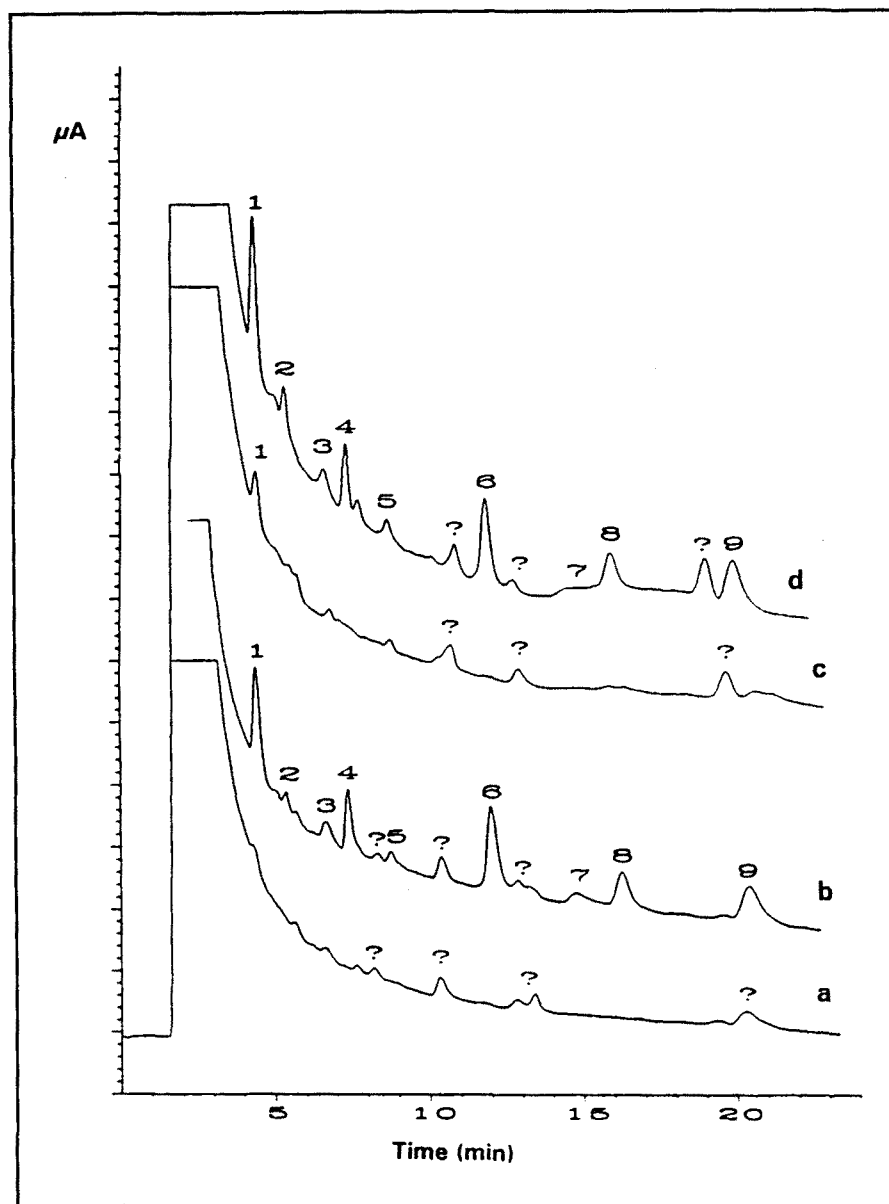


Figure 4.- Chromatograms with eluent A of (a) 1 ml of river water sample followed by clean-up step (3 ml of water-TBA); (b) 1 ml of river water sample spiked at $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ with each phenolic compound, except 2-M-4,6-DNP ($1 \mu\text{g l}^{-1}$) and 2,4-DNP ($4 \mu\text{g l}^{-1}$), followed by the clean-up step; (c) a 4ml sample of tap water with Na_2SO_3 added; (d) a 4ml sample of tap water with Na_2SO_3 added and spiked with a standard addition as in Figure 3. For peak designation, see Figure 2.

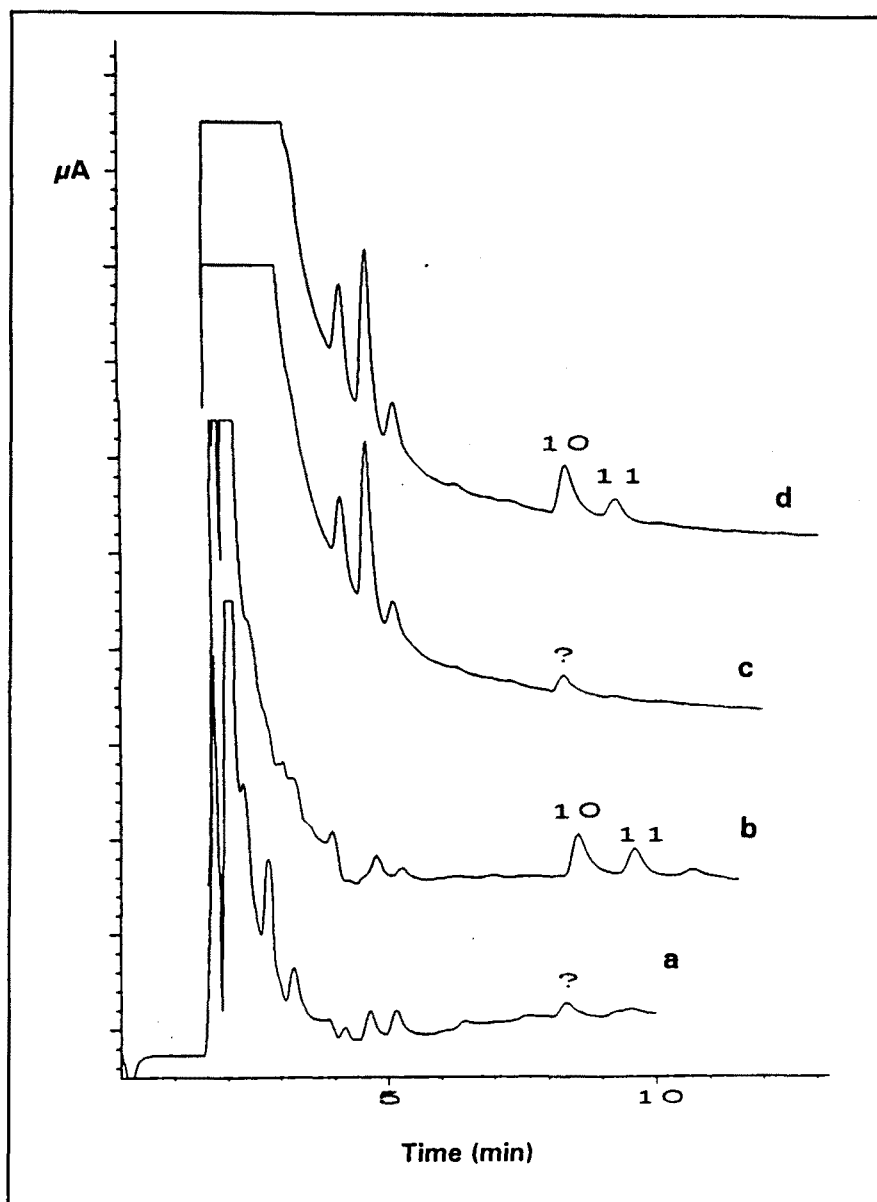


Figure 5.- Chromatogram with eluent B of (a) a 4 ml sample of tap water; (b) a 4 ml sample of tap water spiked at $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ with 2,4,6-TCP and PCP; (c) a 4 ml river water sample; (d) a 4 ml river water sample spiked at $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ with 2,4,6-TCP and PCP. For peak designation, see Figure 2.

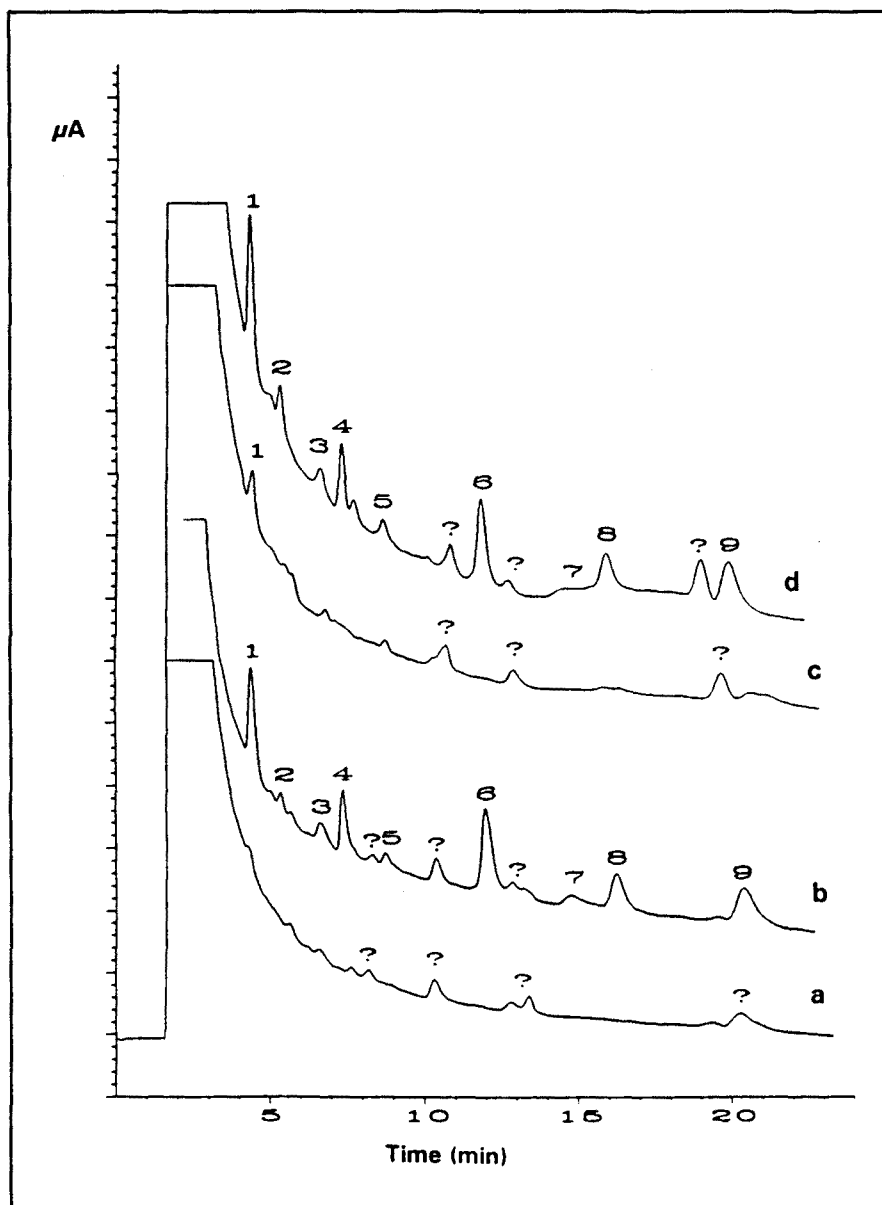


Figure 4.- Chromatograms with eluent A of (a) 1 ml of river water sample followed by clean-up step (3 ml of water-TBA); (b) 1 ml of river water sample spiked at $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ with each phenolic compound, except 2-M-4,6-DNP ($1 \mu\text{g l}^{-1}$) and 2,4-DNP ($4 \mu\text{g l}^{-1}$), followed by the clean-up step; (c) a 4ml sample of tap water with Na_2SO_3 added; (d) a 4ml sample of tap water with Na_2SO_3 added and spiked with a standard addition as in Figure 3. For peak designation, see Figure 2.

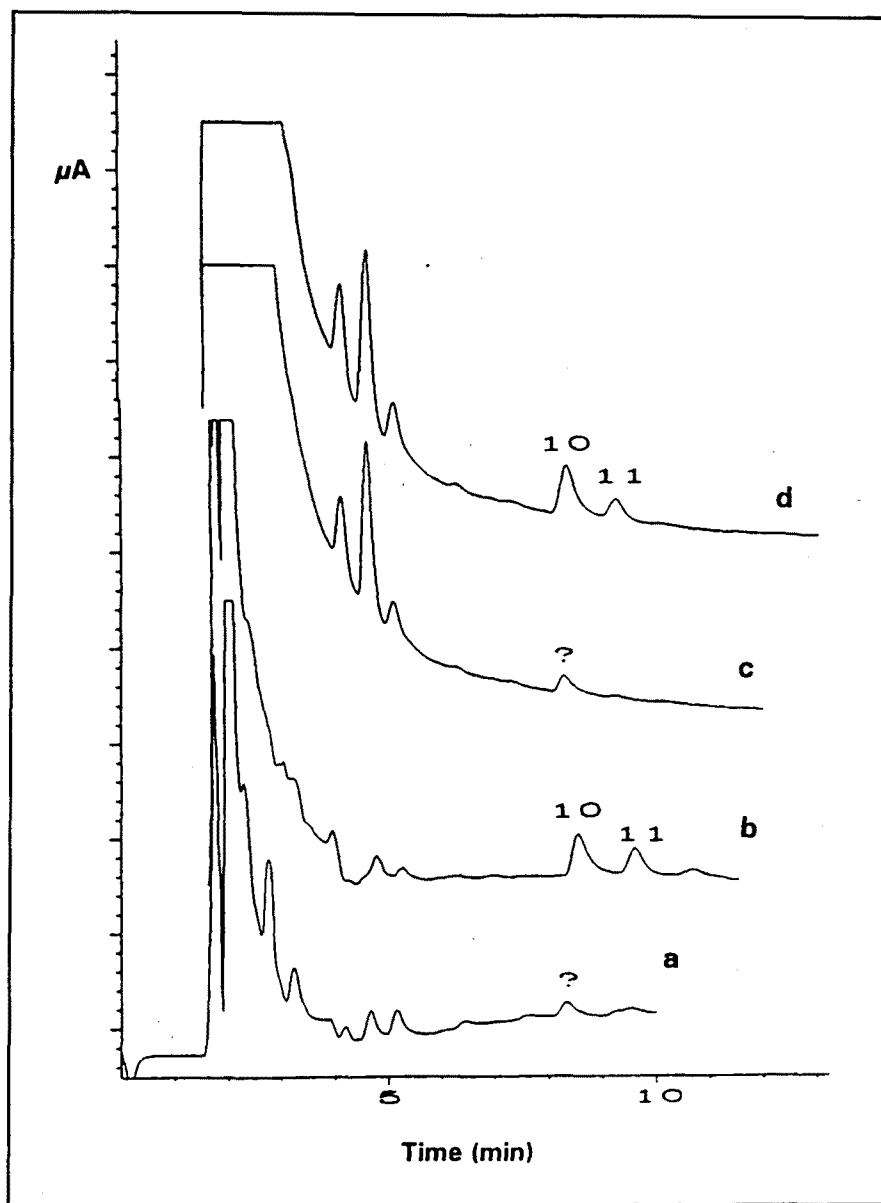


Figure 5.- Chromatogram with eluent B of (a) a 4 ml sample of tap water; (b) a 4 ml sample of tap water spiked at $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ with 2,4,6-TCP and PCP; (c) a 4 ml river water sample; (d) a 4 ml river water sample spiked at $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ with 2,4,6-TCP and PCP. For peak designation, see Figure 2.

solution are shown in Figures 5a and 5b, respectively. It can be seen that a peak with a retention time similar to that of 2,4,6-TCP appears, but a study of the response at several potential values did not confirm the presence of this compound. It should be pointed out that the narrower peak at the beginning of the chromatogram is due to the higher solvent strength of eluent B compared with eluent A.

For the determination of 2,4,6-TCP and PCP in river water, no clean-up step was required. In this instance, the volume of sample for the analysis was 4 ml and no large peak appeared at the beginning of the chromatogram, owing to the higher solvent strength. The linearity ranges for tap and river water were the same as those obtained for Milli-Q-purified water. The R.S.D.s for a 4 ml river water sample spiked at $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ with 2,4,6-TCP and PCP were 3.2 and 5.1%, respectively ($n=4$), and L.O.D. were 1 ng l^{-1} for both compounds. Chromatograms for a 4 ml river water sample and 4 ml river water sample spiked at $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ with each compound are shown in Figures 5c and 5d, respectively. The peak that appeared at the same retention time as TCP was not assigned to this compound using the electrochemical ratios.

CONCLUSIONS

An on-line trace-enrichment-reversed-phase liquid chromatographic method with electrochemical detection has been developed for the determination of phenolic compounds in environmental waters. Two different eluents had to be optimized owing to the different polarities of the compounds studied. The addition of an ion-pair reagent to the sample allowed higher volumes of sample to be preconcentrated with better recoveries, mainly for the most polar compounds. The preconcentration of only 4 ml of tap water allowed most compounds to be determined in the range $0.01\text{-}0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ and the LODs were at low ng l^{-1} level. When river water samples were analyzed, it was only possible to preconcentrate 1 ml of sample and the LODs were about four times higher.

REFERENCES

- [1] P.A. Realini, *J. Chromatogr. Sci.*, **19** (1981) 124.
- [2] D.A. Baldwin, J.K. Debowski, *Chromatographia*, **26** (1988) 186.
- [3] *Drinking Water Directive 80/778/EEC*, Commission of the European communities, Brussels, 1980.
- [4] *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, American Public Health Association, New York, 16th ed., 1985.
- [5] *Fed. Regist.*, **233**, No. 44, Dec. 3 (1979) 69464.
- [6] C.P. Ong, H.K. Lee, S.F.Y. Li, *J. Chromatogr.*, **464** (1989) 405.
- [7] O. Busto, J.C. Olucha, F. Borrull, *Chromatographia*, **32** (1991) 566.
- [8] J. Ruana, I. Urbe, F. Borrull, *J. Chromatogr. A*, **655** (1993) 217.
- [9] E. Nieminen, P. Heikkilä, *J. Chromatogr.*, **464** (1989) 405.
- [10] R.E. Shoup, G.S. Mayer, *Anal. Chem.*, **54** (1982) 1164.
- [11] D.A. Baldwin, J.K. Debowski, *Chromatographia*, **26** (1988) 186.
- [12] D.F. Hunt, J. Shabanowitz, T.M. Harvey, M. Coates, *Anal. Chem.*, **57** (1985), 525.
- [13] P.J.M. Kwakman, D.A. Kamminga, U.A.Th. Brinkman, G.J. de Jong, *J. Chromatogr.*, **553** (1991) 345.
- [14] I. Liska, J. Krupčík, P.A. Leclercq, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **12** (1989) 577.
- [15] B. Gawdzik, J. Gawdzik, U. Czerwińska-Bil, *J. Chromatogr.*, **509** (1990) 136.
- [16] E. Pocurull, M. Calull, R.M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia*, **38** (1994) 579.
- [17] A. Di Corcia, S. Marchese, R. Samperi, *J. Chromatogr.*, **642** (1993) 175.
- [18] C. Borra, A. Di Corcia, M. Marchetti, R. Samperi, *Anal. Chem.*, **10** (1991) 317.
- [19] L. Schmidt, J.J. Sun, J.S. Fritz, D.F. Hagen, C.G. Markell, E.E. Wisted, *J. Chromatogr.*, **641** (1993) 57.
- [20] E.R. Brouwer, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, **678** (1994) 223.
- [21] M.W. Nielen, U.A.Th. Brinkman, R.W. Frei, *Anal. Chem.*, **57** (1985) 806.
- [22] I. Liska, E.R. Brouwer, H. Lingeman, U.A.Th. Brinkman, *Chromatographia*, **37** (1993) 13.
- [23] P. Subra, M.C. Hennon, R. Rosset, R.W. Frei, *J. Chromatogr.*, **456** (1988) 121.

- [24] U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, **665** (1994) 217.
- [25] M.C. Hennion, *Trends Anal. Chem.*, **10** (1991) 317.
- [26] A.G. Huesgen, R.Schuster, *Selective HPLC Analysis in River Water (Application Note)*, Hewlett-Packard, Waldbronn, 1990.
- [27] E. Pocurull, R.M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia*, **40** (1995) 85.
- [28] V. Pichon, M.C. Hennion, *J. Chromatogr. A*, **665** (1994) 269.

**CAPÍTOL VI. MILLORA DEL PROCÉS D'EXTRACCIÓ EN FASE
SÒLIDA PER A LA DETERMINACIÓ DE
COMPOSTOS FENÒLICS EN AIGÜES.**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

Tot i que el mètode desenvolupat emprant una precolumna de PLRP-S acoblada en línia al sistema cromatogràfic amb detector electroquímic ha permès disminuir el límits de detecció fins a l'ordre dels ng l^{-1} , la utilització d'un sistema d'elució isocràtic, per tal d'evitar pèrdues de sensibilitat, ha comportat l'inconvenient d'emprar dues fases mòbils, una fase pels de polaritat alta i mitjana i una altra fase amb més força elutròpica per als menys polars, per tal de no tenir un temps d'anàlisi excessiu.

La problemàtica esmentada anteriorment que representa l'acoblament en línia de sorbents amb gran capacitat de retenció, com el copolímer d'estirè-divinilbenzè altament entrecreuat, a una columna de C_{18} , és que es produeix l'aixamplament dels pics cromatogràfics, la qual cosa ocasiona pèrdues de resolució i disminució de la sensibilitat entre d'altres. Per tal de minimitzar aquesta pèrdua d'eficàcia es pot emprar un gradient d'elució amb més percentatge de metanol, però això provoca una disminució dels temps de retenció, amb la qual cosa els fenols més polars es poden solapar amb la banda inicial que s'obté quan es preconcentren mostres reals.

Per tal de fer possible l'acoblament minimitzant la problemàtica de l'aixamplament dels pics cromatogràfics, s'ha optat per modificar el disseny de l'equip. La modificació consisteix en eluir els analits retinguts a la precolumna tant sols amb el solvent orgànic i per tant, formar la mescla de la fase mòbil entre la precolumna i la columna analítica.

El primer pas ha estat determinar l'eficàcia del nou disseny sobre la forma dels pics cromatogràfics, comparant els resultats obtinguts mitjançant un equip de disseny convencional i un equip amb el disseny modificat tal i com s'ha mencionat i és per això, que inicialment l'estudi s'ha portat a terme emprant diferents sorbents com C_{18} i PLRP-S.

Posteriorment s'ha comprovat la validesa del disseny en l'acoblament de sorbents com el copolímer d'estirè-divinilbenzè altament entrecreuat, pel qual els compostos fenòlics presenten una retenció més gran. Utilitzant la formació del parell iònic s'han calculat els volums de ruptura per tal de determinar el volum màxim de mostra a preconcentrar.

Finalment el mètode desenvolupat emprant PLRP-S i ENVI-Chrom P s'ha validat amb mostres reals.

Els resultats corresponents a aquest estudi es recullen en el treball que es presenta a continuació.

IMPROVEMENT OF ON-LINE SOLID-PHASE EXTRACTION FOR DETERMINING PHENOLIC COMPOUNDS IN WATER

SUMMARY

Modifying the most common design for the on-line coupling of a precolumn to reversed phase LC with diode array detection has resulted in reduction of the broadening of the peaks which results when the compounds of interest are strongly retained by a highly hydrophobic sorbent. The modification consists of the desorption of the analytes trapped on the precolumn solely by the organic solvent used to modified the solvent strength of the mobile phase.

Results obtained using this design were compared with those obtained with the conventional design, with C₁₈ and PLRP-S precolumns. The performance of the system was also tested with a highly cross-linked styrene-divinylbenzene copolymer (ENVI-chrom P) precolumn for the determination of phenolic compounds in real samples. The advantages and disadvantages are discussed. Ion-pair solid phase extraction is used in order to increase the breakthrough volumes of more polar compounds, mainly phenol. The use of the new design enables phenolic compounds to be determined at low $\mu\text{g l}^{-1}$ level with limits of detection ranging between 0.1 and 2 $\mu\text{g l}^{-1}$ in tap water when 10 ml of sample was analyzed.

INTRODUCTION

Phenolic compounds are environmental pollutants the sources of which can be as different as industrial effluents, the reaction products of chlorination processes, and the degradation products of some pesticides, etc.

Nowadays, reversed phase LC (RPLC) is the most widely used analytical technique for determining phenolic compounds in water [1-6]. In general, UV detection [3,4] is the most widely used, although electrochemical detection

[5,6] is more sensitive. For both, however, a preconcentration step is necessary in order to reach the low concentration levels allowed in drinking water. The maximum permissible concentration according to EC directives for phenols in drinking water is $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$, excluding those phenols which do not react with chlorine [7].

Solid-phase extraction is being increasingly used because of its advantages over liquid-liquid extraction [8,9]. An important advantage is the possibility of automating the system by on-line coupling of the precolumn containing the sorbent with the analytical column [10]. Different sorbents have been tested for determination of phenolic compounds. Those studied most are C_{18} [11-13] and PLRP-S [5,12,13]; other sorbents which have also been used include C_2 [12], C_8 [12,14], $\text{C}_{18}\text{-OH}$ [12], phenyl [12,14], cyano [12], XAD [15], cyclohexyl [12,16,17], graphitic carbon black [18,19] and other modified polymers such as ENVI-chrom P (Supelco, Bellefonte, USA) [13,20], LiChrolut (Merck, Darmstadt, Germany) [21] and Hysphere (Spark Holland, Emmen, Netherlands) [22].

In previous papers, off-line procedure has been studied using PLRP-S, C_{18} , cyclohexyl [17], graphitic carbon black and a highly cross-linked styrene-divinylbenzene copolymer [23]. The effect of adding an ion-pair reagent to the sample has also been studied [17] and for most polar compounds there was an increase in recovery values. Higher breakthrough volumes were obtained by used of the copolymer but some limitations appeared in the on-line coupling of a precolumn with this sorbent and a C_{18} column, as other authors had shown previously [20].

In this study, on-line procedure using a modified equipment design has been studied for quantitative desorption of phenolic compounds from a highly cross-linked styrene-divinylbenzene copolymer precolumn. The new design has also been tested with PLRP-S and found to give narrower peaks than the more widely used simple design. The advantages and limitations of the new design with these two sorbents are discussed here; the best conditions enable the eleven EPA priority phenolic compounds to be determined at low levels by ion-pair solid-phase extraction followed by RPLC and diode array detection (DAD). The performance of the method has been checked with tap and river water.

EXPERIMENTAL

Equipment

Chromatographic experiments were performed using two chromatographs. One consisted of two Shimadzu (Tokyo, Japan) LC-10AD pumps with a Shimadzu SPD-10A UV spectrophotometric detector. The temperature of the column was controlled by a Shimadzu CTO-10A oven. Chromatographic data were collected and recorded using an HP-3365 Series II ChemStation (Hewlett-Packard (HP), Palo Alto, CA, USA) operated under Windows 3.1 (Microsoft). The other instrument was a Hewlett-Packard 1090 (Waldbronn, Germany) ternary gradient liquid chromatograph with an HP 1040M diode array detector. Chromatographic data was recorded using the HP 79994A Workstation. In both sets of equipment, separation was performed on a 250 x 4 mm I.D. HP stainless-steel analytical column packed with 5 μm ODS-2.

Reagents and Standards

The phenolic compounds studied are: phenol (Ph), 2-nitrophenol (2-NP), 4-nitrophenol (4-NP), 2,4-dinitrophenol (2,4-DNP), 2,4-dimethylphenol (2,4-DMP), 2,6-dimethylphenol (2,6-DMP), 2,4,6-trimethylphenol (2,4,6-TMP), 2-chlorophenol (2-CP), 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP), 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP), pentachlorophenol (PCP), 4-chloro-3-methylphenol (4-C-3-MP) and 2-methyl-4,6-dinitrophenol (2-M-4,6-DNP). All phenolic compounds studied were from Aldrich Chemie (Beerse, Belgium) except pentachlorophenol, which was supplied by Jansen Chemie (Geel, Belgium). Standard solutions (2000 mg l⁻¹) of each compound were prepared in 50:50 methanol-water and stored in the refrigerator. Working solutions were prepared daily by diluting these solutions with Milli-Q quality water.

HPLC-grade methanol (Scharlau, Barcelona, Spain) and Milli-Q quality water (Millipore, Bedford, MA, USA) adjusted to pH 2.8 with acetic acid (Merck, Darmstadt, Germany) were used for the preparation of the mobile phase. TBA (tetrabutylammonium bromide) from Aldrich (Beerse, Belgium) was used as the ion-pair reagent in the extraction process.

Chromatographic conditions

In both chromatographic systems, the separation of phenolic compounds was performed using mixtures of two solvents phases: water containing 1% acetic acid (pH 2.8; solvent A) and methanol (solvent B). The flow-rate was 1 ml min⁻¹ and the wavelength was set at 280 nm for all phenolic compounds except for PCP, for which the wavelength was 302 nm. Temperature and gradient elution were modified in each case to obtain the best resolution values. When the Shimadzu chromatograph was used with PLRP-S or ENVI-chrom P as the preconcentration column, the oven temperature was set at 65°C and the gradient profile was initially 25% B, 60% B after 25 minutes, 100% B at 30 minutes, isocratic for 2 minutes, returning to initial conditions after 2 minutes.

When the HP 1090 was used with a C₁₈ precolumn, the gradient profile was initially 25 % B, 47 % B after 22 min; 100 % B at 24 min before returning to initial conditions at 30 min. When the same chromatograph was used with PLRP-S as precolumn, the temperature and gradient profile were also modified. The oven temperature was reduced to 50°C; isocratic elution was performed for 10 min at 40% B; this was followed by gradient elution reaching 60 % B at 18 min; this was then changed to 100 % B at 24 min, followed by isocratic elution up to 28 min and then return to the initial conditions (40 % B) at 30 min. Under these conditions, the percentage of initial organic solvent had to be increased to obtain well defined peaks in the chromatogram.

On-line trace enrichment

The on-line trace-enrichment experiments were performed with a Must automatic column-switching device (Spark Holland, Emmen, Netherlands) which enables automation of the different steps: conditioning of the precolumn, retention of phenolic compounds, rinsing of the precolumn and elution of compounds. Four precolumns were tested for performing solid-phase extraction: (a) 10 x 3 mm I.D. purchased from the Free University (Amsterdam, The Netherlands) hand-packed with 10 µm Spherisorb ODS-2 purchased from Teknokroma (Barcelona, Spain); (b) 10 x 2 mm I.D. packed with PLRP-S (15-25 µm particle size) (Spark Holland); (c) 10 x 2 mm I.D. and (d) 10 x 3 mm I.D. hand-packed with the highly cross-linked styrene-divinylbenzene copolymer ENVI-chrom P (80-160 µm particle size; Supelco,

Bellafonte, USA). An M45 Waters (Milfor, MA, USA) pump was used to deliver the sample and the conditioning solutions.

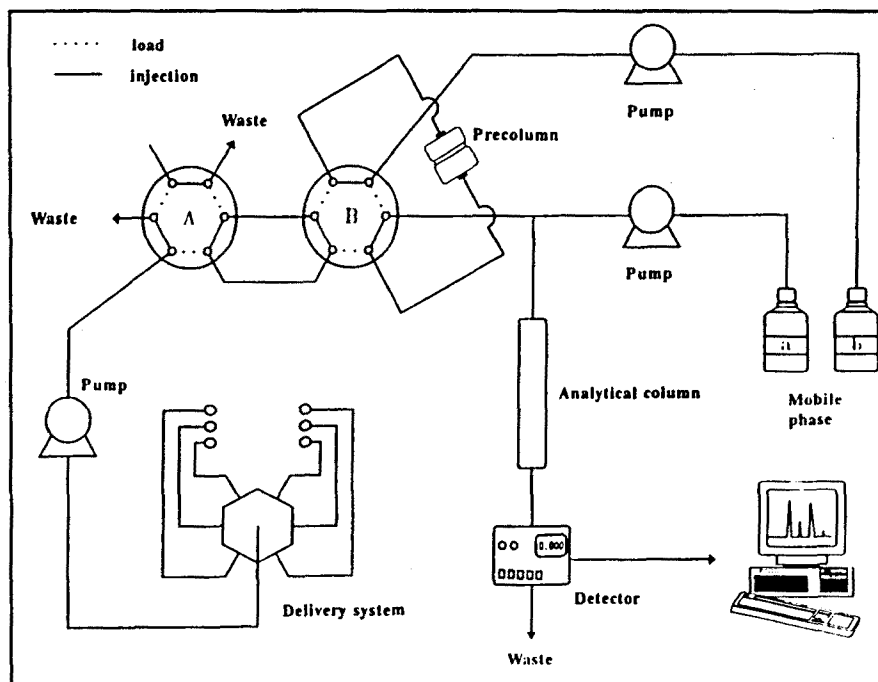


Figure 1.- Schematic diagram of automatic preconcentration with Shimadzu equipment.

With the different precolumns used, in all cases, the pH of the samples was adjusted to 9.0 with 0.1 M NaOH and TBA was added at a concentration of 5 mM to form the ion-pairs. The optimization of these conditions has been described previously [17].

The programmable delivery system used for automatic preconcentration with the Shimadzu equipment is shown in Figure 1. It can be seen that solvent B passes through the precolumn before being mixed with solvent A. In this case the mixer chamber was changed for a T junction with no dead volume. When the HP 1090 system was used, solvents A and B were mixed before passing through the precolumn.

In the automatic preconcentration step, two switching valves were used to clean the tubes, condition the precolumn and for more accurate measurement of the sample volume to be preconcentrated. Table 1 shows the programme followed in the extraction process. The flow-rate was 2 ml min^{-1} throughout the process. Firstly, the preconcentration system was washed with methanol for 5 minutes to remove all solvents between the delivery system and the pump delivering system. The precolumn was then cleaned and conditioned with methanol for 1 min. After washing the tubes with water-5 mM TBA, the precolumn was activated with 2 ml of this solution and again the tubes were cleaned with the sample solution. The sample was then preconcentrated and in the next step the analytes trapped in the precolumn were desorbed in the backflush mode with 100% methanol for 1 min (Shimadzu equipment) or with the mobile phase (HP 1090 system) and transferred on-line to the analytical column. When the copolymer precolumn was used, a clean-up step with 10 ml water-methanol, 90:10, was introduced to reduce the influence of the matrix before desorbing the compounds retained.

Table 1.- Program for the extraction process.

Step	Time (min:s)	Event	Valve A	Valve B
1	0	Washing tubes with methanol	Inject	Load
2	5	Conditioning cartridge with methanol	Load	Load
3	6	Washing tubes with water - TBA	Inject	Load
4	11	Activation of cartridge with water - TBA	Load	Load
5	12	Washing tubes with sample	Inject	Load
6	17	Sample preconcentration	Load	Load
7	24:30*	Washing tubes with water - 10 % methanol	Inject	Load
8	29:30*	Clean-up with water - 10 % methanol	Load	Load
9	19:30 34:30*	Analyte desorption	Inject	Inject
10	20:30 35:30*	End desorption	Inject	Load

* Only when copolymer is used as sorbent in the on-line process.

RESULTS AND DISCUSSION

The different sorbents in the precolumn and the analytical column can lead to peak broadening because of the greater retention of compounds in the precolumn. Although the PLRP-S precolumn is widely used, slight peak

broadening may appear in on-line coupling to a C₁₈ analytical column, depending on the strength of the mobile phase. For instance, the chromatogram obtained after preconcentrating 5 ml of a standard solution of 400 µg l⁻¹ of Ph, 40 µg l⁻¹ of 2-M-4,6-DNP and 10 µg l⁻¹ of the rest of the compounds in a 3 mm i.d. ODS-2 precolumn and that corresponding to the preconcentration of 10 ml of the same solution on a 2mm I.D. PLRP-S precolumn using a conventional HP 1090 chromatograph are shown in Figures 2a and 2b respectively. Wider peaks are obtained for the PLRP-S precolumn compared with the ODS-2 precolum; this implies a decrease in peak resolution and sensitivity.

When the highly cross-linked styrene-divinylbenzene copolymer was connected to a precolumn, the solvent strength of the mobile phase was not strong enough to elute the phenolic compounds trapped in the precolumn and there was a considerable peak broadening, as has also been shown by other authors [20]. The instrument design was, therefore modified; in the new design, shown in Figure 1, the compounds trapped in the precolumn were eluted by the methanol (solvent B in the mobile phase) instead of the real mobile phase, as in the most widely used design.

Figure 2c shows the chromatogram obtained with the new system when 10 ml of standard solution of 6 µg l⁻¹ of each phenolic compound was preconcentrated in the PLRP-S cartridge with analytical conditions similar to those used for Figure 2b. Narrower peaks were obtained with the new design, as can be seen by comparing Figure 2c with 2b, as well as an increase in sensitivity. Figure 2d shows the chromatogram of 20 ml Milli-Q water spiked with 3 µg l⁻¹ of phenolic compounds preconcentrated on a 3 mm. I.D. copolymer precolumn. It should be remarked that narrow peaks were obtained despite the high retention of compounds on the sorbent and the wider precolumn.

In order to decrease the effect of some interfering peaks, the time of elution by the methanol of the compounds trapped in the precolumn was optimized. 1 min was chosen in order to elute the compounds trapped. After 1 min the position of the valve is changed, enabling cleaning of the precolumn in order to be ready for the next analysis.

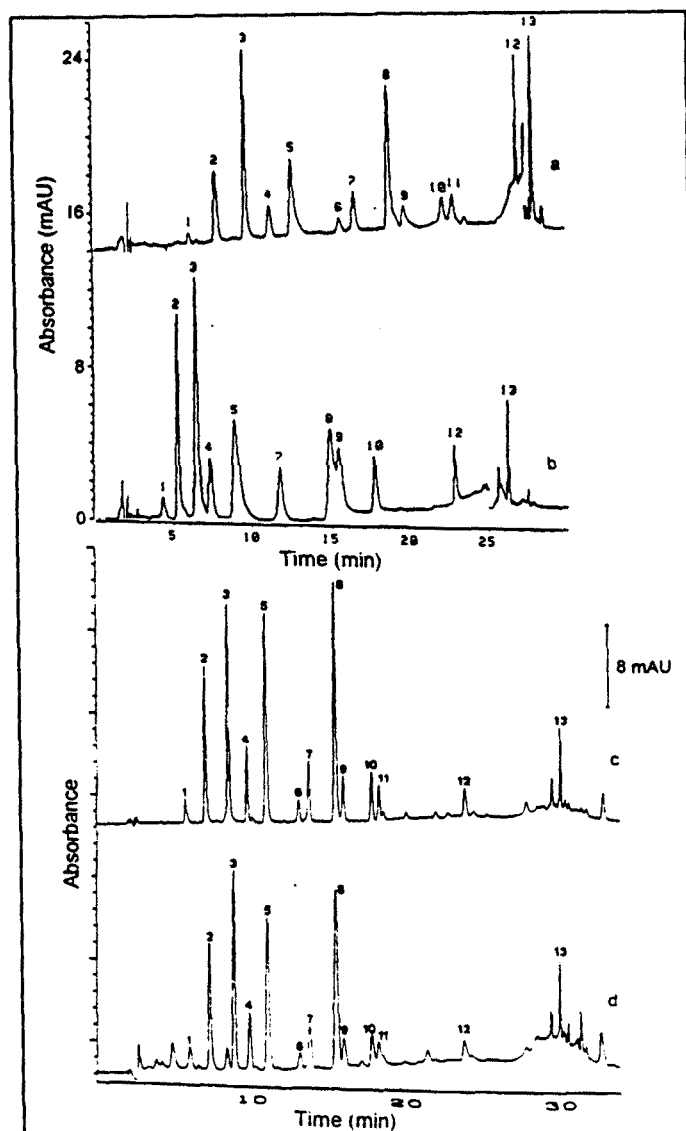


Figure 2.- Chromatograms obtained after ion-pair extraction of a standard solution using the HP 1090 (a, b) and the new equipment design (c, d): a) 5 ml Milli-Q water spiked with $400 \mu\text{g l}^{-1}$ Ph, $40 \mu\text{g l}^{-1}$ 2-M-4,6-DNP and $10 \mu\text{g l}^{-1}$ of the rest of the compounds, extracted using a 3 mm I.D. C_{18} precolumn; b) 10 ml Milli-Q water with addition the same standard of each compound as a) extracted using a 2 mm I.D. PLRP-S precolumn; c) 10 ml Milli-Q water spiked with $6 \mu\text{g l}^{-1}$ of each compound, extracted using a 2 mm I.D. PLRP-S precolumn; d) 20 ml Milli-Q water spiked with $3 \mu\text{g l}^{-1}$ of each compound, extracted using a 3 mm I.D. copolymer precolumn. Peak designation: 1 = Ph; 2 = 4-NP; 3 = 2,4-DNP; 4 = 2-CP; 5 = 2-NP; 6 = 2,6-DMP; 7 = 2,4-DMP; 8 = 2-M-4,6-DNP; 9 = 4-C-3-MP; 10 = 2,4-DCP; 11 = 2,4,6-TMP; 12 = 2,4,6-TCP AND 13 = PCP.

The linearity of the response was initially checked, by injecting 20 μl of a standard solution in Milli-Q water, in order to measure the efficiency of the copolymer precolumn. Good linearity was observed for all phenolic compounds between 0.050 and 20 mg l^{-1} , except for 2,4,6-TCP and PCP for which the linearity was between 0.250 and 20 mg l^{-1} . Regression coefficients (R^2) were always greater than 0.9996. The detection limits of the chromatographic method were between 6 $\mu\text{g l}^{-1}$ for 2-M-4,6-DNP and 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ for 2,4,6-TCP (signal-to-noise ratio $S/N=3$).

The next step was comparing the results obtained with the PLRP-S and copolymer precolumns. Differences were found in the breakthrough volumes and, when the copolymer was used, in the presence of other unknown peaks; this was mainly as a consequence of the different selectivities of the sorbents.

Breakthrough volumes using a 2 mm I.D. PLRP-S precolumn and with TBA as the ion-pair reagent have been determined previously [24]. In this study, breakthrough volumes have been determined using a copolymer precolumn. Firstly, a 2 mm I.D. highly cross-linked styrene-divinylbenzene copolymer precolumn was tested using TBA as the ion-pair reagent and adjusting the pH of the sample to 9 prior to the preconcentration step. All compounds had breakthrough volumes greater than 20 ml except phenol, for which recovery was near 50% at this volume. Higher sample volumes were not studied because of losses of phenol.

To increase breakthrough volumes a 3 mm I.D. copolymer precolumn was tested. A sample volume of 75 ml gave recovery values higher than 85% for all the compounds studied except phenol, for which recovery was 70%. An increase in breakthrough volumes was observed in comparison with those obtained with 2 mm I.D. column, as was expected, and no additional peak broadening was observed. For phenol, 80% recovery was obtained for a 50 ml sample with the 3 mm I.D. column.

The selectivity of both methods was checked with real samples such as tap and Ebro river water. In the first experiment, the 2 mm I.D. PLRP-S precolumn was tested. The experiments were performed by preconcentrating 5 ml of tap water or Ebro river water with 5 mM of TBA and adjusting to pH 9 with NaOH. The peaks obtained were narrower than those obtained previously [24] and so better resolution was obtained for all the compounds studied. A slight increase in the matrix effect was, however, observed; this was caused by the

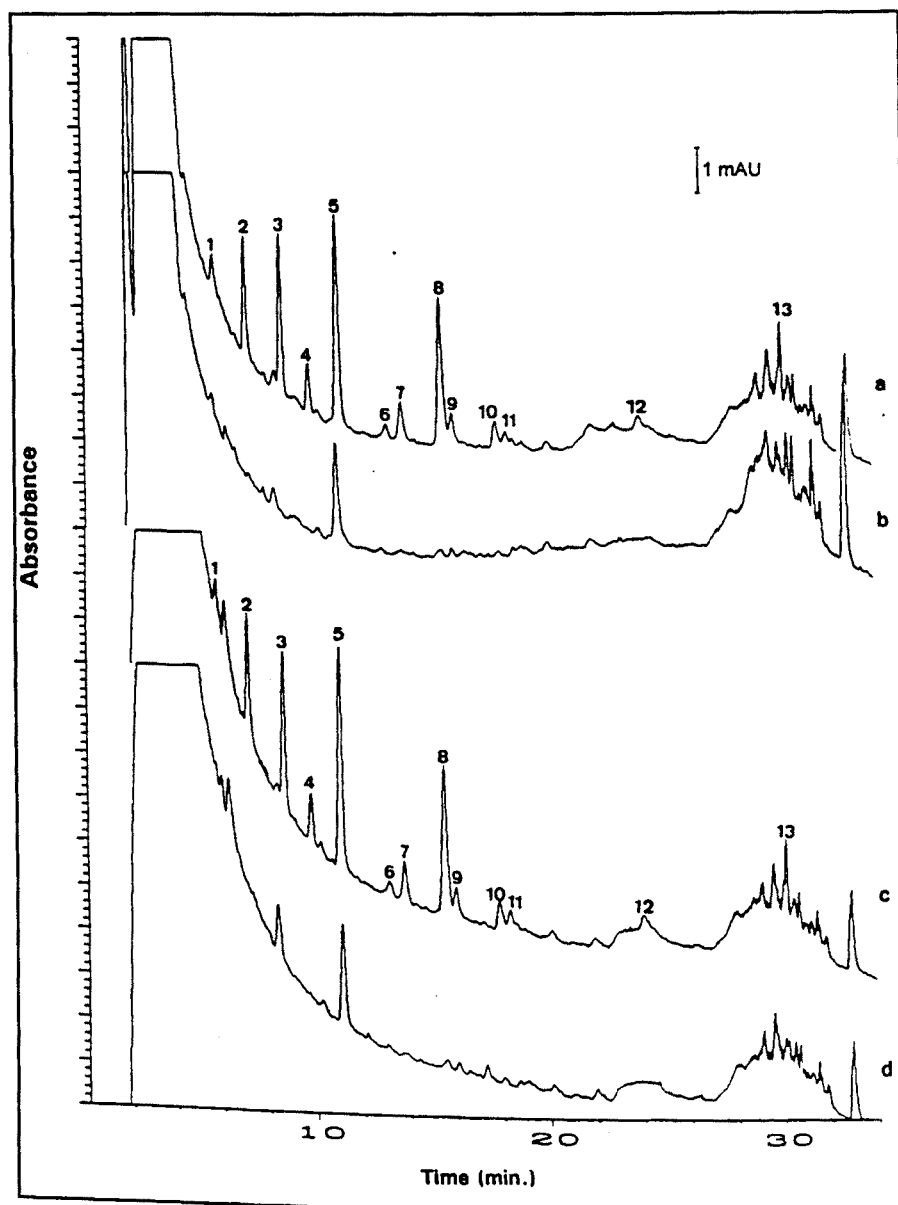


Figure 3.- Chromatograms obtained after preconcentration of 5 ml of real sample with a 2 mm I.D. PLRP-S precolumn: a) tap water spiked with $2 \mu\text{g l}^{-1}$ of each compound studied; b) tap water; c) Ebro river water spiked with $2 \mu\text{g l}^{-1}$ of each compound studied; d) Ebro river water. Peak designation as for Figure 2.

higher strength of the solvent used to desorb the compounds studied. Sample volumes greater than 5 ml were not tested because the peak corresponding to phenol overlapped the initial system peak.

To obtain better resolution of the phenol peak, mainly during analysis of river water, different clean-up steps with water or MeOH-water were studied, but none could be used without considerable losses of phenol because of the low breakthrough volume of this compound with this sorbent. The chromatograms obtained from 5 ml of tap and Ebro river water spiked with $2 \mu\text{g l}^{-1}$, and the respective blanks, are shown in Figure 3.

In both cases a peak appeared at the same retention time as 2-NP but it could not be identified as this compound by comparison of UV spectra. Recoveries of all the compounds studied were greater than 90% from both samples.

Use of the 3 mm I.D. copolymer precolumn to preconcentrate real samples resulted in higher breakthrough volumes for all compounds; this enabled the use of a clean-up step without losses of the most polar compounds. The best conditions involved preconcentration of a 15 ml sample and clean-up with 10 ml 9:1 water-MeOH before desorption. Figure 4 shows the chromatograms obtained from extraction of 15 ml of tap water spiked with $5 \mu\text{g l}^{-1}$ Ph and $1 \mu\text{g l}^{-1}$ of the rest of the compounds studied, with and without a clean-up step. In the absence of a clean-up step, phenol cannot be determined because of the band appearing at the beginning of the chromatogram.

The linearity for tap water, including the clean-up step mentioned, ranged from 5 to $20 \mu\text{g l}^{-1}$ for Ph, from 1 to $10 \mu\text{g l}^{-1}$ for 4-NP, 2,4-DMP, 2,4,6-TMP and 2,4,6-TCP and from 0.5 to $10 \mu\text{g l}^{-1}$ for the rest of the compounds studied; regression coefficients were good ($R^2 > 0.998$). The detection limits in tap water ($S/N=3$) were between 0.1 and $2 \mu\text{g l}^{-1}$. The repeatability and reproducibility of the method were determined with a tap water sample spiked with $5 \mu\text{g l}^{-1}$ phenol and $1 \mu\text{g l}^{-1}$ of the other compounds. The relative standard deviations obtained ($n=5$) were lower than 8% and 10%, respectively.

Figure 5 shows the chromatograms obtained following extraction of 15 ml tap water, with a clean-up step, and the same sample spiked with $5 \mu\text{g l}^{-1}$ phenol and $1 \mu\text{g l}^{-1}$ of the rest of the compounds. The peak appearing at the same retention time as 2-NP could not be identified as this compound by comparison

of the UV spectra. Similar results were obtained when Ebro river water was analyzed, with the exception of an slight increase in the background signal.

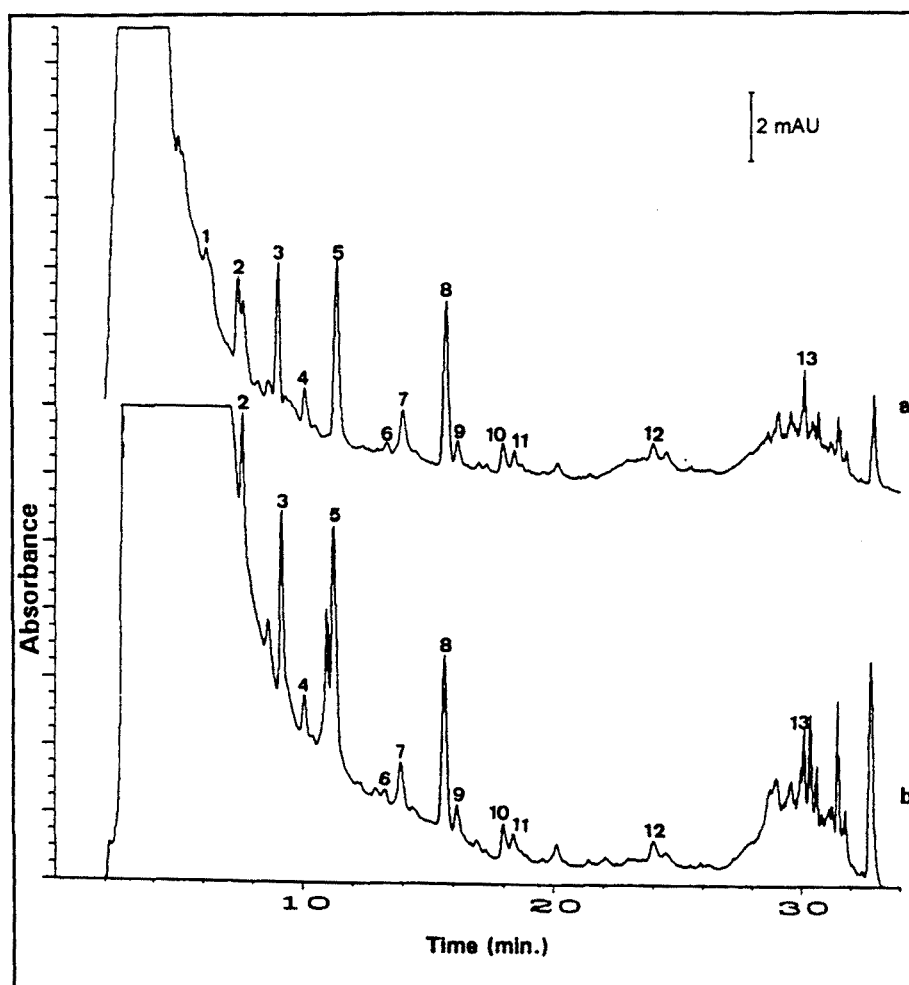


Figure 4.- Chromatograms obtained after preconcentration of 15 ml of tap water spiked with $5 \mu\text{g l}^{-1}$ Ph and $1 \mu\text{g l}^{-1}$ of the rest of the compounds, using a 3 mm I.D. copolymer column: a) with clean-up step; b) without clean-up step. Peak designation as for Figure 2.

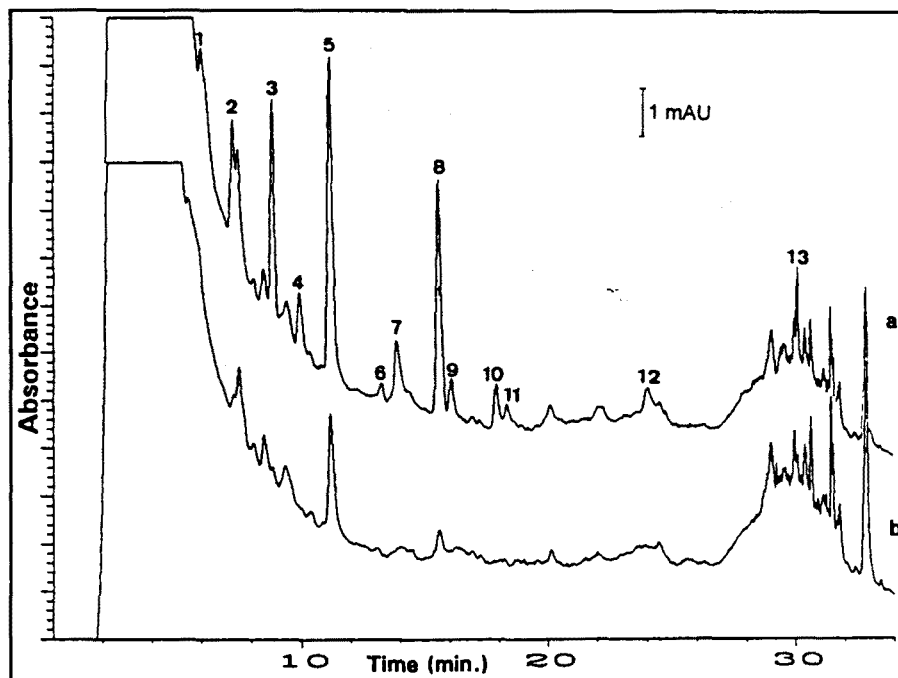


Figure 5.- Chromatograms obtained after pre-concentration of 15 ml of tap water using a 3 mm I.D. copolymer column, including clean-up step: a) with standard addition of $5 \mu\text{g l}^{-1}$ Ph and $1 \mu\text{g l}^{-1}$ of the rest of the compounds studied; b) without addition of standard. Peak designation as for Figure 2.

CONCLUSIONS

From the results obtained it can be concluded that, because narrower peaks are obtained, the new design enables on-line pre-concentration with sorbents of high hydrophobicity such as PLRP-S and the copolymer. The copolymer sorbent has higher breakthrough volumes than PLRP-S but the higher background when real samples are analyzed necessitates pre-concentration of sample volumes below the breakthrough volume. The high breakthrough

volume obtained when ENVI-Chrom P was used in front of PLRP-S enables the use of a clean-up step prior to analysis without losses of the compounds studied. The method has been successfully used for determination of phenolic compounds in tap and river water.

REFERENCES

- [1] D.A. Baldwin, J.K. Debowski, *Chromatographia*, **26** (1988) 186.
- [2] G. Lamprecht, J.F.K. Huber, *J. Chromatogr. A*, **667** (1994) 47.
- [3] O.Busto, J.C. Olucha, F. Borrull, *Chromatographia*, **32** (1991) 566.
- [4] E.R. Brouwer, I. Liska, R.B. Geerdink, P.C.M. Fintrop, W.H. Mulder, H. Lingeman, U.A.Th. Brinkman, *Chromatographia*, **32** (1991) 455.
- [5] J.Ruana, I. Urbe, F. Borrull, *J. Chromatogr. A*, **655** (1993) 217.
- [6] E. Pocurull, G. Sánchez, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, **696** (1995) 31.
- [7] Drinking water Directive 80/778 EEC, Commission of the European Communities, Brussels, 1980.
- [8] M.C. Hennion, *Trends. Anal. Chem.*, **10** (1991) 317.
- [9] G. Font, J. Mañes, J.C. Moltó, Y. Picó, *J. Chromatogr.*, **642** (1993) 135.
- [10] U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, **665** (1994) 217.
- [11] P. Mußmann, R. Levsen, W. Radeck, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **348** (1994) 654.
- [12] D. Puig, D. Barceló, *Chromatographia*, **40** (1995) 435.
- [13] L. Nolan, *Supelco Reporter* 12 (1993).
- [14] J. Frébortová, V. Tatarkovicová, *Analyst*, **119** (1994) 1519.
- [15] P. Mußmann, K. Levsen, W. Radeck, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **348** (1994) 654.
- [16] E. Chladek, R.S. Marano, *J. Chromatogr. Sci.*, **22** (1984) 313.
- [17] E. Pocurull, M. Calull, R.M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia*, **38** (1994) 579.
- [18] A. Di Corcia, M. Marchetti, *Anal. Chem.*, **63** (1991) 580.
- [19] A. Di Corcia, S. Marchese, R. Samperi, *J. Chromatogr.*, **642** (1993) 175.
- [20] E.R. Brouwer, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, **678** (1994) 223.
- [21] Merck, LiChrolut Application (1994).
- [22] Spark Holland, Application note (1995).

- [23] E. Pocurull, M. Calull, R.M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr A*, **719** (1996) 105.
[24] E. Pocurull, R.M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia*, **40** (1995) 85.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

**CAPÍTOL VII. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS EN
AIGÜES PER CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA I
PRECONCENTRACIÓ EN LÍNIA AMB DETECCIÓ
ULTRAVIOLADA I ELECTROQUÍMICA.**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

En l'estudi anterior s'ha observat que la modificació del disseny de l'equip minimitza l'aixamplament dels pics cromatogràfics, per la qual cosa és possible emprar sorbents amb gran capacitat de retenció. Els millors resultats s'han obtingut emprant una precolumna farcida amb ENVI-Chrom P de 10x3 mm D.I. i utilitzant la formació del parell iònic prèviament al procés de preconcentració. Degut al tipus de sorbent i a que l'elució es porta a terme només amb metanol, s'ha observat un important pic a l'inici del cromatograma, però degut als elevats volums de ruptura, ha estat possible incloure una etapa de neteja de la mostra prèviament a l'elució. Sota les condicions òptimes trobades, els límits de detecció han estat al voltant dels pocs $\mu\text{g l}^{-1}$.

Per tal d'augmentar la sensibilitat del mètode s'ha considerat la possibilitat d'emprar el detector electroquímic tot i que aquest augment pot no ser tant pronunciat com l'esperat degut a la utilització d'un gradient d'elució. D'altra banda, segons els resultats obtinguts en el capítol V, s'ha observat que el detector electroquímic és poc sensible als nitrofenols al potencial de treball, per la qual cosa s'ha estudiat la possibilitat de connectar els dos detectors en sèrie. Així, els nitrofenols s'han detectat emprant el detector d'absorbància ultraviolada-visible i la resta de fenols estudiats han estat detectats pel detector electroquímic.

Els sorbents emprats per al sistema de preconcentració han estat PLRP-S i ENVI-Chrom P, ja que tot i que aquest últim ha proporcionat volums de ruptura més grans per a tots els fenols estudiats en treballs anteriors, el primer és més selectiu. També s'ha emprat parell iònic. L'equip utilitzat per a portar a terme el procés d'extracció ha estat el descrit en el capítol anterior, pels avantatges esmentats. La separació cromatogràfica s'ha portat a terme mitjançant un gradient d'elució, per tal de determinar tots els analits en una única injecció.

Segons els volums de ruptura calculats en treballs anteriors s'ha validat el mètode per mostres reals.

El mètode desenvolupat emprant ENVI-Chrom P com a sorbent, ha permès determinar els onze fenols, considerats com a contaminants prioritaris segons la E.P.A., en mostres reals a nivells de $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ (concentració màxima permesa per aquests contaminants en aigües destinades al consum humà).

Els resultats obtinguts es recullen en el següent treball.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

DETERMINATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN NATURAL WATERS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH UV AND ELECTROCHEMICAL DETECTION AFTER ON-LINE TRACE ENRICHMENT.

SUMMARY

The eleven EPA priority phenolic compounds are determined by liquid chromatography followed by UV and electrochemical detection. Modified on-line trace enrichment is used to detect lower concentrations of phenolic compounds which enables stronger sorbents to be used without broadening the peaks. PLRP-S and a highly crosslinked styrene divinylbenzene copolymer are compared for the on-line trace enrichment. Higher breakthrough volumes were obtained with the latter sorbent but selectivity was lower. The performance of the methods developed was checked with tap and river water and the methods studied enable phenolic compounds at levels of $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ to be determined in real samples. The repeatability and reproducibility between days ($n=5$) for real samples spiked at $1 \mu\text{g l}^{-1}$ were lower than 10%.

INTRODUCTION

The environmental interest of phenol and substituted phenols is well known. These compounds are formed in the course of several industrial processes, particularly in pulp processing [1] and many phenols, specially chlorophenols, have a well-established reputation for their toxicity and their persistency in the environment.

For this reason, many phenols are subject to legislation. Directive 80/778 EEC specifies $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ of total phenols as the maximum admissible concentration (MAC) in water intended for human consumption, excluding those phenols which do not react with chlorine, or $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ for the individual compounds [2]. Some of the chlorinated compounds are listed in the European Community

Directive 76/464/EEC and the US Environmental Protection Agency (EPA) list as priority pollutants [3,4,5].

High performance liquid chromatography is the most suitable technique to determine phenolic compounds in water using UV or DAD [6-12] or electrochemical detection (ED) [13-16] but, although amperometric detection is more sensitive than UV detection, a preconcentration step is necessary in both cases in order to achieve the low levels allowed in real samples.

Solid-phase extraction is widely used instead of a liquid-liquid process to concentrate phenolic compounds, using several alkylsilica bonded phases such as phenyl [10,12], octyl [10,12], octadecyl [7-13,17], cyanoyl [12], etc... or poly(styrene-divinylbenzene) [11,12] by itself or containing quaternary ammonium groups [6] and some other highly crosslinked poly(styrene-divinylbenzene) such as ENVI-Chrom P [18,19], LiChrolut [20], Hysphere [21], etc.. In general low breakthrough volumes are obtained with alkylsilica bonded phases, mainly for the most polar compounds. On the other hand, poly(styrene-divinylbenzene) involves higher breakthrough volumes which are even higher with the highly crosslinked sorbents. Graphitized carbon black has also been used for the extraction of phenolic compounds [22,23] with different results. Some authors [23] obtained better results by using a reversible graphitized carbon black cartridge because of the higher retention capacity of the carbon.

The membrane extraction discs, either with C_{18} or poly(styrene-divinylbenzene) adsorbent, have also been used for the extraction of phenolic compounds [13,24-27] and have the advantage of a faster elution rate so a shorter extraction time.

The main problem in all sorbents is the low recoveries obtained for the most polar phenolic compounds. It has been demonstrated that using tetrabutylammonium bromide as ion-pair reagent increases the recovery of some of these compounds [9,11].

In order to decrease the detection limits of the method and increase the reproducibility and automation potential, several authors have used on-line solid phase extraction instead of off-line solid phase extraction to determine phenolic compounds in water using C_{18} [11,12,14], PLRP-S [11,12,28], or some more specific sorbents such as ENVI-Chrom P [28]. The most important

limitation of these systems is the incompatibility between the precolumn sorbent and the analytical column stationary phase. Thus, the use of sorbents which strongly retain phenolic compounds, such as ENVI-Chrom P [28] and graphitized carbon [29], can cause peak broadening because of the low solvent strength used for the chromatographic separation.

The main objective of this study was to use on-line solid phase extraction with PLRP-S and ENVI-Chrom P coupled to liquid chromatography with UV and electrochemical detectors connected in series, to compare the performance of the two detection systems and select the best analytical conditions to establish a protocol capable of determining the eleven EPA priority phenolic compounds in tap and river water at the levels required by the current legislation. To prevent peak broadening when a strong sorbent is used, the design of the equipment is modified in accordance with a previous paper [30].

EXPERIMENTAL

Equipment

Chromatographic experiments were performed using two Shimadzu (Tokyo, Japan) LC-10AD pumps with a Shimadzu SPD-10A UV spectrophotometric detector and an HP-1049A electrochemical detector (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) connected in series. The temperature of the column was controlled by a Shimadzu CTO-10A oven and chromatographic data were collected and recorded using an HP-3365 Series II Chemstation which was controlled by Windows 3.1 (Microsoft). The separation was performed using a 250 x 4 mm I.D. Spherisorb ODS-2 column steel cartridge with a particle size of 5 μm purchased from Teknokroma (Barcelona, Spain).

To check the response of the instrument, standard solutions were injected through a Rheodyne valve with a 20 μl loop, but an automatic Must column-switching device (Spark Holland, Emmen, Netherlands) was used with on-line solid-phase extraction. The trace enrichment experiments were performed using two precolumns, one of which was 10 x 3 mm I.D. and laboratory-packed with the highly crosslinked styrene-divinylbenzene copolymer (ENVI-Chrom P, Supelco, Bellafonte, USA) (80-160 μm particle size), and the other

was a commercial 10 x 2 mm I.D. packed with styrene-divinylbenzene (Spark Holland). A M45 Waters (Milford, MA, USA) pump was used to deliver the sample.

Reagents and Standards

The phenolic compounds studied and their abbreviations are: phenol (Ph), 2-nitrophenol (2-NP), 4-nitrophenol (4-NP), 2,4-dinitrophenol (2,4-DNP), 2,4-dimethylphenol (2,4-DMP), 2-chlorophenol (2-CP), 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP), 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP), pentachlorophenol (PCP), 4-chloro-3-methylphenol (4-C-3-MP) and 2-methyl-4,6-dinitrophenol (2-M-4,6-DNP). All phenolic compounds studied were from Aldrich Chemie (Beerse, Belgium) except pentachlorophenol, which was supplied by Jansen Chemie (Geel, Belgium). A standard solution (2000 mg l⁻¹) of each compound was prepared in methanol-water (50:50) and stored in a refrigerator. The working solutions were prepared every day by diluting these solutions with Milli-Q quality water.

HPLC-grade methanol (Scharlau, Barcelona, Spain) and Milli-Q quality water adjusted to pH 2.8 with acetic acid (Merck, Darmstadt, Germany) were used in the preparation of the mobile phase. To adjust the ionic strength of the eluent, potassium chloride (Probus, Badalona, Spain) was added. Tetrabutylammonium bromide (TBA) used as the ion-pair reagent in the extraction process was supplied by Aldrich (Beerse, Belgium).

Chromatographic conditions

The eluents for the chromatographic separation were: a solution of acetic acid (1%) containing 0.05 g l⁻¹ of KCl as solvent A and methanol as solvent B. The flow-rate was 1 ml min⁻¹ and the temperature was set at 65°C. The gradient profile was initially 25% B, 60% B after 25 minutes, 100% B at 30 minutes, isocratic for 2 minutes and the mobile phase was returned to initial conditions in 2 minutes.

The wavelengths used in the UV detector were 316 nm for 4-NP and 280 nm for the rest of the nitrophenols: 2,4-DNP, 2-NP and 2-M-4,6-DNP. The potential value used in the electrochemical detector to determine the rest of the phenolic compounds studied was 1.0 V. This detector worked in the

amperometric mode with a glassy carbon electrode. A solid-state Ag-AgCl reference electrode was used, so the eluent had to contain KCl (0.05 g l^{-1}). The electrochemical cleaning technique was used every twenty injections to correct the electrodeposition on the surface of the electrode, applying a cyclic treatment with alternate potentials. The working electrode was polished in the conventional way every 60 injections [14].

On-line Trace Enrichment

On-line trace enrichment was carried out in the two precolumns previously mentioned. In both cases, and prior to the preconcentration step, the pH of the sample was adjusted to 9.0 with NaOH and TBA was added at a concentration of 5 mM to form the ion-pair.

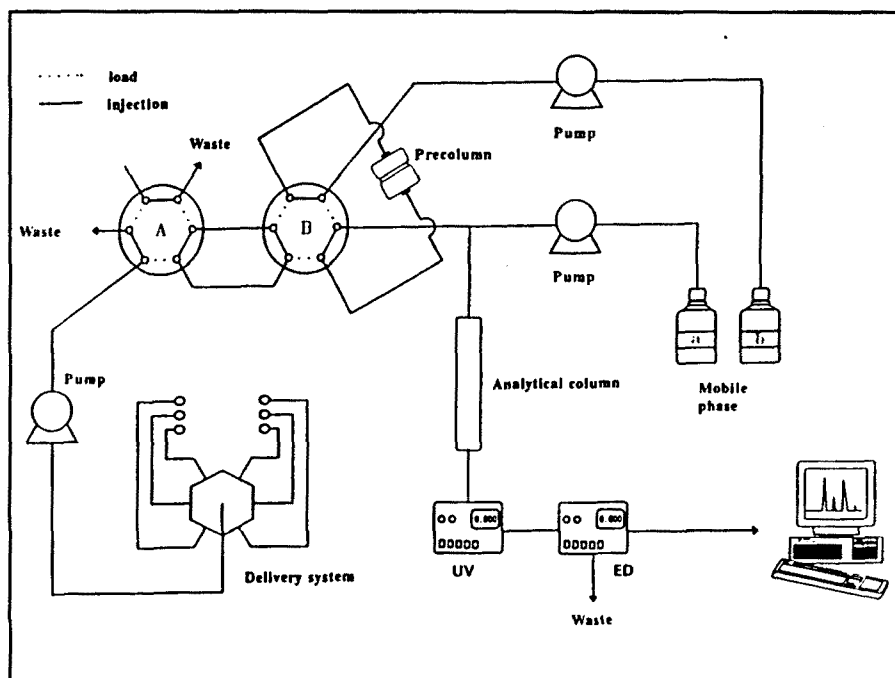


Figure 1.- Set-up of the system used.

To desorb the phenolic compounds of these sorbents, a modification of the common elution design was used [30] and it is shown in Figure 1. A Must column-switching device with two switching valves was used to clean up the tubes, activate the precolumn and more accurately measure the sample volume to be preconcentrated. Firstly, the preconcentration system was washed with methanol for 5 minutes to remove all solvents between the delivery system and the pump delivering sample. Then, the precolumn was cleaned-up and conditioned with methanol for 1 minute. After washing the tubes with water-5 mM TBA, the precolumn was activated with 2 ml of this solution and again the tubes were cleaned with the sample solution. Then different sample volumes were preconcentrated depending on the sorbent used. Before elution, when ENVI-Chrom P was used as sorbent, there was a clean-up step with 10 ml of methanol/water 10% v/v to reduce the matrix influence. In the next step the analytes trapped on the precolumn were desorbed in the backflush mode for 1 minute with methanol 100% and transferred on-line to the analytical column [30] after being mixed with the solvent A of the mobile phase. The flow-rate was 2 ml min⁻¹ throughout the process. The different steps are summarized in Table I.

Table I.- Program for the extraction process.

Step	Time(min)	Event	Valve A	Valve B
1	0	Washing tubes with methanol	Inject	Load
2	5	Conditioning cartridge with methanol	Load	Load
3	6	Washing tubes with water-TBA (pH = 9)	Inject	Load
4	11	Activation of cartridge with water-TBA (pH = 9)	Load	Load
5	12	Washing tubes with sample	Inject	Load
6	17	Sample preconcentration	Load	Load
7	29:30	Washing tubes with water-10% methanol*	Inject	Load
8	34:30	Clean-up with water-10% methanol*	Load	Load
9	39:30	Analyte desorption	Inject	Inject
10	40:30	End desorption	Inject	Load

* only for the highly crosslinked styrene-divinylbenzene copolymer.

Real samples were filtered through a 0.45 μm filter before preconcentration. When tap water was analyzed, and prior to the standard addition, 300 μl of a solution of Na_2SO_3 10% were added for each 100 ml of water in order to eliminate free chlorine.

RESULTS AND DISCUSSION

Analytical LC separation

The use of two detectors in series has enabled the eleven EPA phenolic compounds to be determined at low levels since the nitrophenolic compounds, which have a low response in the electrochemical detector, have a higher response in the UV detector. For nitrophenols to respond better to ED it is necessary to work at higher potential values, as was shown in another paper [14], and this involves a higher background in the chromatogram, especially in the present method, in which gradient elution is applied. For this reason, these compounds were better detected using a UV detector working at the maximum absorbance wavelength of these compounds (316 nm for 4-NP and 280 nm for 2,4-DNP, 2-NP and 2-M-4,6-DNP). On the other hand, the rest of the compounds studied had a better response using an electrochemical detector at 1.0 V. For this reason, the electrochemical detector was set at 1.0 V during the analysis whereas the UV detector was set at 316 nm until 8 minutes, when it changed to 280 nm. The ratio of the responses from both detectors may also be used to confirm the presence of some phenolic compounds.

To determine the linearity of the response of the chromatographic method, 20 μl of the standard solutions of the phenolic compounds studied were injected. Using an electrochemical detector good linearity was observed for the compounds studied between 15 $\mu\text{g l}^{-1}$ and 1 mg l^{-1} except for Ph, whose last point was statistically considered to be an out-lier, and 2,4,6-TCP and PCP. Their linearities were between 15 and 500 $\mu\text{g l}^{-1}$ (for Ph) and between 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ and 5 mg l^{-1} for 2,4,6-TCP and PCP. When using a UV detector to determine nitrocompounds (4-NP, 2,4-DNP, 2-NP and 2-M-4,6-DNP), good linearity was obtained between 15 $\mu\text{g l}^{-1}$ and 20 mg l^{-1} . In both cases regression coefficients (R^2) were higher than 0.996.

It should be pointed out that lower sensibility was obtained in the gradient elution compared to the isocratic one [14], due to the baseline distortion in the electrochemical detector.

On-line trace enrichment

Solid-phase extraction was selected to decrease the detection limits of the method by using two different sorbents, styrene-divinylbenzene commercially available in 10 x 2 mm I.D. cartridges and a highly crosslinked styrene-divinylbenzene copolymer (ENVI-Chrom P) in a 10 x 3 mm I.D. laboratory-packed cartridge. As the ENVI-Chrom P was not available commercially as precolumns, it was laboratory-packed and a 10x3 mm. I.D. was selected in order to obtain higher breakthrough volumes than with a 10x2 mm. I.D. one. The modification of the elution system which involves the phenolic compounds retained in the precolumn being eluted only by the methanol of the mobile phase instead of the initial conditions of the gradient elution, allowed these stronger sorbents to be connected on-line to a C₁₈ analytical column with no peak broadening, because of the higher solvent strength of methanol compared with the initial gradient mixture and, also, the subsequent rapid formation of the proper LC eluent [30].

In previous studies [11,30], breakthrough volumes with these two precolumns were determined using TBA as the ion-pair reagent because it increased the volume of the sample to be concentrated without important losses of phenolic compounds. When PLRP-S was used, good recovery for phenol was obtained by concentrating 10 ml of Milli-Q water but when a volume of 20 ml is preconcentrated, recoveries higher than 85% were obtained for 4-NP, 2-CP, 2-NP and 2,4-DMP and about 25% for phenol. For the rest of the compounds breakthrough volumes were higher than 30 ml and for some of them, such as 2-M,4,6-DNP, 2,4,6-TCP and PCP, even higher than 100 ml [11]. So, 10 ml of sample was selected for further studies and at these conditions the chromatogram obtained by preconcentrating 10 ml of Milli-Q water is included in Figures 2a and 3a, for electrochemical and UV detection respectively.

When the highly crosslinked styrene-divinylbenzene copolymer was used as the sorbent, it was possible to concentrate 50 ml of Milli-Q water with no important losses of phenolic compounds including phenol whose recovery value was about 80%. When this sorbent was used with real samples, there

was an important system peak at the beginning of the chromatogram and thus, a clean-up step before eluting the sample was carried out in order to reduce this matrix effect. For this reason, 25 ml of sample was preconcentrated and then, 10 ml of methanol/water 10/90 (v/v) was used as a clean-up step to reduce the big band appearing at the beginning of the chromatogram when real samples were analyzed. The clean-up step allowed phenol and 2-NP to be determined with good recoveries in real samples whereas without the clean-up these peaks are overlapped by the band [30]. Under these conditions, recoveries obtained by preconcentrating a sample of $5 \mu\text{g l}^{-1}$ of phenols in Milli-Q water were higher than 80% for all compounds studied.

Application

The performance of both sorbents was checked with tap and river water. Figure 2 shows the chromatograms obtained with the electrochemical detector when 10 ml of tap water, with TBA as ion pair reagent and adjusted to pH 9 with NaOH was analyzed with a PLRP-S precolumn and when the same sample was spiked with $1 \mu\text{g l}^{-1}$ of standard solution of phenolic compounds, after the addition of Na_2SO_3 to eliminate free chlorine. There was a peak with the same retention time as phenol appeared in the chromatogram. This peak was identified as phenol by comparing the ratio of peak areas at different potential values [14]. On the other hand, Figures 3b and 3c, show the chromatogram obtained with UV detection, in which there is a peak with the same retention time as 2-NP. The ratio of responses with UV and ED detection did not enable us to assign this peak to 2-NP. Moreover, no signal appeared at the phenol retention time, which confirmed that the compound appearing with ED could be phenol.

The same experiment was carried out with Ebro river water. In this case, it was only necessary to add TBA and NaOH to adjust the pH value to 9. Na_2SO_3 was not added because there was no free chlorine in the sample. Figure 3 shows the chromatogram obtained for 10 ml of Ebro river water with TBA as ion pair reagent and adjusted to pH 9 with NaOH and the same sample spiked with $1 \mu\text{g l}^{-1}$ of standard solution of phenolic compounds.

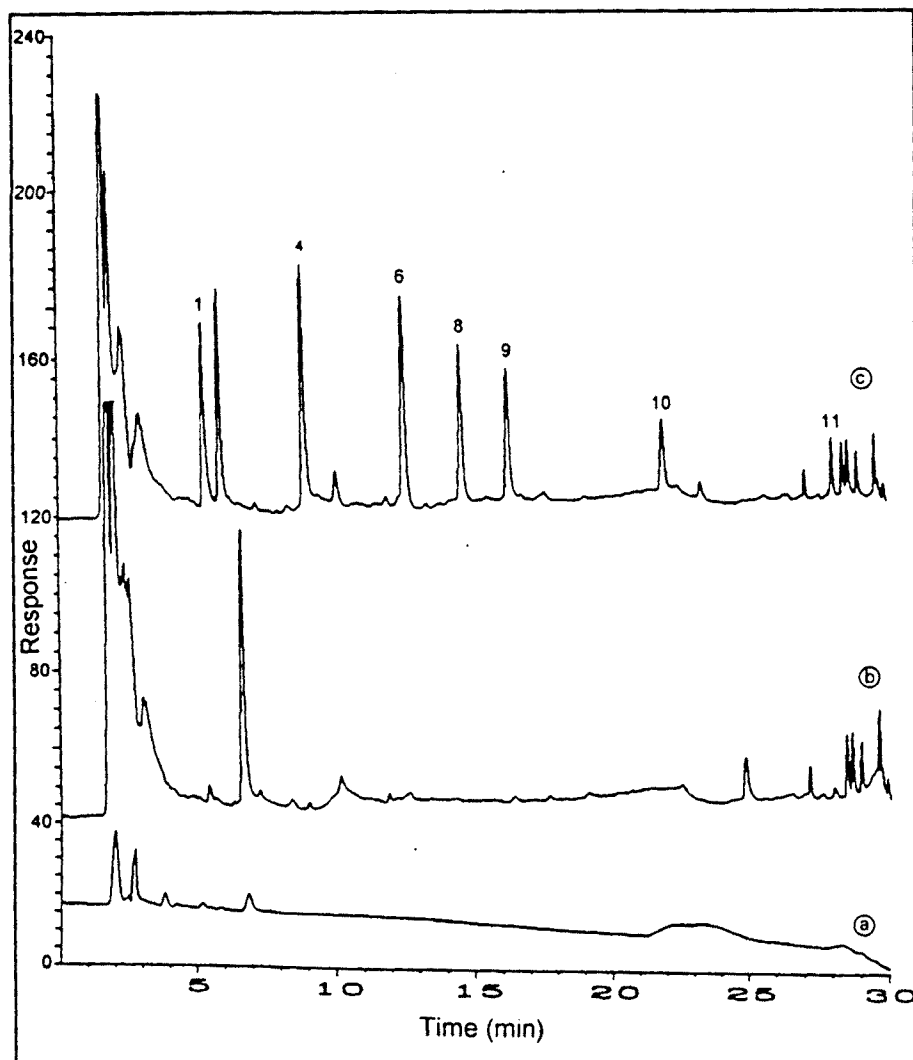


Figure 2.- Chromatograms obtained by on-line trace enrichment with a PLRP-S precolumn of a 10 ml sample using electrochemical detection. a) Milli-Q water. b) Tap water. c) Tap water spiked at $1 \mu\text{g l}^{-1}$ with each phenolic compound. Peak designation: 1. Ph; 2. 4-NP; 3. 2,4-DNP; 4. 2-CP; 5. 2-NP; 6. 2,4-DMP; 7. 2-M-4,6-DNP; 8. 4-C-3-MP; 9. 2,4-DCP; 10. 2,4,6-TCP; 11. PCP.

Results obtained with electrochemical detection (Figures 4a and 4b) enabled one peak to be detected with the same retention time as phenol, but no positive identification could be carried out from the ratio of areas at different potential values. Using the UV detector, only a peak with the same retention time as 2-NP appeared in the chromatogram, but, like the analysis of tap water, no positive identification was confirmed.

In both samples, recovery values were determined, and the results obtained were similar to the ones with Milli-Q water, higher than 80% for all compounds. The linearity of the method with tap and river water was also checked and in both cases, it was good linearity ($R^2 > 0.994$) for all compounds in the range 0.1 to 2 $\mu\text{g l}^{-1}$ except for 2,4,6-TCP and PCP when it was between 0.2 and 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ when electrochemical detection was used and between 0.1 and 20 $\mu\text{g l}^{-1}$ for nitrocompounds when UV detection was used. The detection limits of the method when 10 ml of real sample were analyzed were between 0.02 $\mu\text{g l}^{-1}$ for 2-NP and 0.1 $\mu\text{g l}^{-1}$ for PCP. In river water the LOD of phenol could not be determined because of the presence of a peak with the same retention time. The repeatability and the reproducibility between days were determined by preconcentrating 5 samples of tap water spiked at 1 $\mu\text{g l}^{-1}$ and RSDs (%) were lower than 7% and 10% respectively.

The use of the highly crosslinked styrene-divinylbenzene allows a higher volume of sample to be preconcentrated and thus, lower limits of detection to be achieved. The chromatogram obtained by preconcentrating 25 ml of tap water with TBA to pH 9.0 and the same sample spiked with 0.5 $\mu\text{g l}^{-1}$ of the eleven compounds studied using this sorbent can be seen in Figure 5. It should be pointed out that the use of electrochemical detection enabled phenol to be determined when it could not be with UV detection because of the band appearing at the beginning of the chromatogram [30]. In the chromatogram corresponding to electrochemical detection (Fig. 5a and 5b), various peaks appeared, some of them at the same retention time as the compounds studied. One peak appeared at the same retention time as phenol and another one at the same retention time as 4-NP, 2,4-DNP, 2-NP and 2,4-DMP but none of them could be identified from the ratio of responses of the two detection systems. A peak corresponding to phenol appeared with the same retention time as another interfering peak, and so it could not be identified in tap water. In the chromatogram corresponding to UV detection (Fig 5c and 5d), a peak appeared at the same retention time as 2-NP but it could not be identified as such.

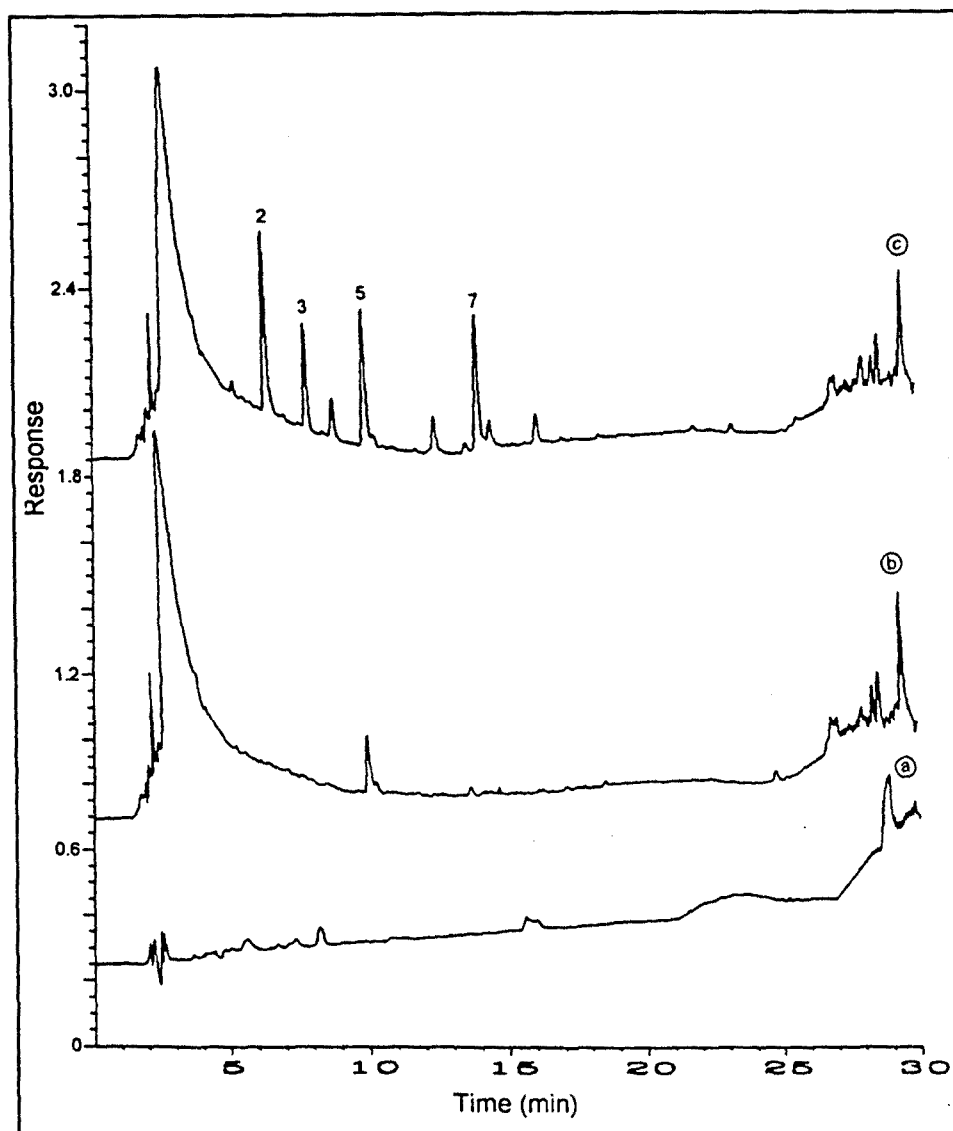


Figure 3.- Chromatograms obtained by on-line trace enrichment with a PLRP-S precolumn of a 10 ml sample using UV detection. a) Milli-Q water. b) Tap water. c) Tap water spiked at $1 \mu\text{g l}^{-1}$ with each phenolic compound. For peak designation, see Figure 1.

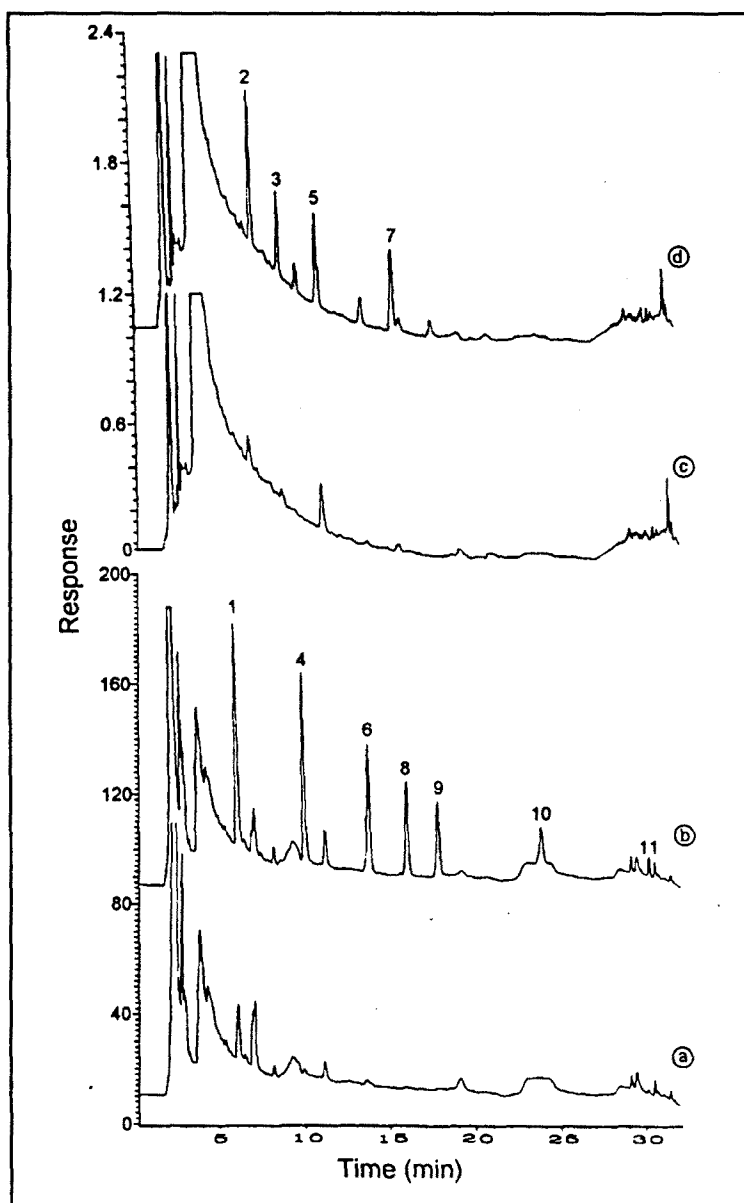


Figure 4.- Chromatograms obtained by on-line trace enrichment with a PLRP-S precolumn and a electrochemical detector (a,b) or a UV detector (c,d) of 10 ml of: a) Ebro river water. b) Ebro river water spiked at $1 \mu\text{g l}^{-1}$ with each phenolic compound. c) Ebro river water. d) Ebro river water spiked at $1 \mu\text{g l}^{-1}$ with each phenolic compound. For peak designation, see Figure 1.

The linearity of the method with tap water was checked and results are included in Table II as well as the limits of detection and the reproducibility (%R.S.D.).

Table II.- Linearity range, correlation coefficients, detections limits and relative standard deviations (n=5) for the analysis of tap water under optimum conditions using ENVI-Chrom P.

PHENOLIC COMPOUNDS	LINEARITY RANGE ($\mu\text{g l}^{-1}$)	R ²	L.O.D. ($\mu\text{g l}^{-1}$)	R.S.D. (%) (n=5)
Ph	0.05 - 5	0.997	0.02	8.7
4-NP	0.10 - 5	0.999	0.03	8.6
2,4-DNP	0.10 - 5	0.998	0.04	8.6
2-CP	0.05 - 2	0.999	0.02	3.3
2-NP	0.10 - 5	0.999	0.03	3.5
2,4-DMP	0.05 - 2	0.999	0.03	5.8
2-M-4,6-DNP	0.10 - 5	0.999	0.03	3.9
4-C-3-MP	0.05 - 2	0.999	0.02	8.4
2,4-DCP	0.05 - 5	0.999	0.03	3.1
2,4,6-TCP	0.10 - 5	0.998	0.05	7.9
PCP	0.10 - 5	0.994	0.05	8.2

Figure 6 shows the chromatogram obtained by preconcentrating 25 ml of Ebro river water with TBA to pH 9.0 and the same sample spiked with $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ of all compounds studied. It can be observed that in both chromatograms corresponding to ED and UV detection, a peak appeared at the same retention time that 2-NP, but it was not assigned to this compound since at the levels corresponding to UV detection no peak should have appeared in the ED chromatogram.

Linearities were similar to those obtained with tap water and regression coefficients were higher than 0.992. The only exception was phenol because of a slight increase in background noise. Detection limits were between $0.03 \mu\text{g l}^{-1}$ for 2,4-DMP and 2-M-4,6-DNP and $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ for Ph.

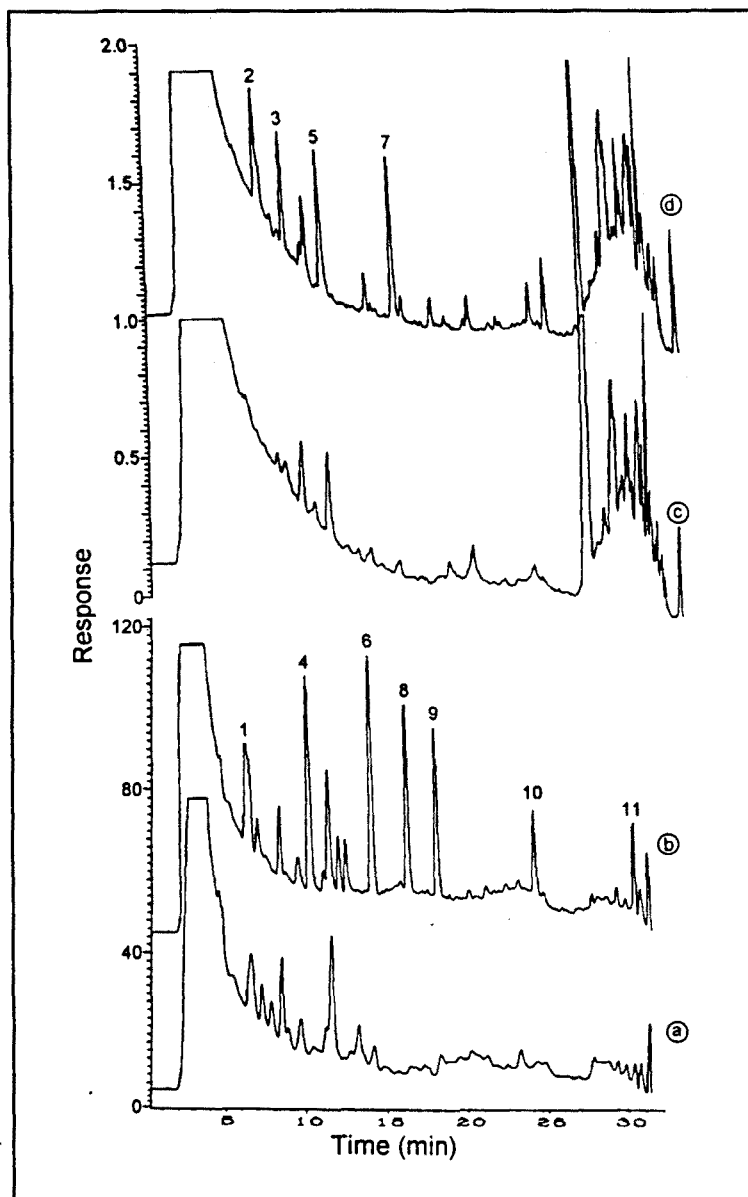


Figure 5.- Chromatograms obtained by on-line trace enrichment of 25 ml of tap water with a clean-up step using an electrochemical detector (a,b) or UV detector (c,d) using a highly crosslinked styrene-divinylbenzene copolymer as the sorbent. a) Tap water. b) Tap water spiked at $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ with each phenolic compound. c) Tap water. d) Tap water spiked at $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ with each phenolic compound. For peak designation, see Figure 1.

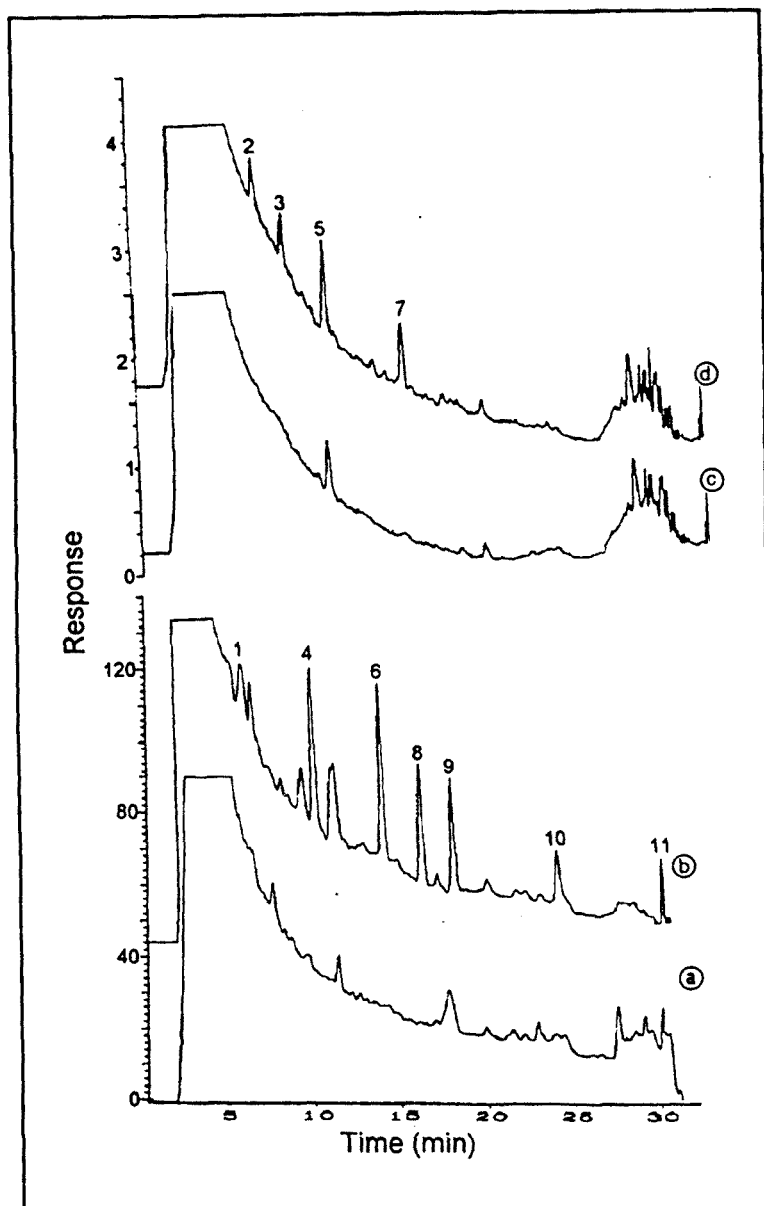


Figure 6.- Chromatograms obtained by on-line trace enrichment of 25 ml of Ebro river water with a clean-up step using an electrochemical detector (a,b) or a UV detector (c,d) using a highly cross-linked styrene-divinylbenzene copolymer as the sorbent. a) Ebro river water. b) Ebro river water spiked at $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ with each phenolic compound. c) Ebro river water. d) Ebro river water spiked at $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ with each phenolic compound. For peak designation, see Figure 1.

The precision of the method for real samples was also checked with river water samples spiked at $1 \mu\text{g l}^{-1}$ and the repeatability and reproducibility of the method expressed as relative standard deviations ($n = 5$) were both lower than 10%.

CONCLUSIONS

The coupling of a UV detector in series to an electrochemical detector allows the determination of nitrophenolic compounds which have a low response to electrochemical detection with RPLC and gradient elution in less than 30 minutes. When the compounds retained in a precolumn on-line connected to the analytical column are eluted only with methanol and not the initial conditions of the mobile phase, sorbents in which phenolic compounds are highly retained and which broaden peaks quite considerably in the common design can be used. This allows a higher samples volume to be preconcentrated and thus, lower limits of detection. Although the highly crosslinked styrene-divinylbenzene copolymer allowed lower detection limits than PLRP-S, the latter is more selective and so the number of interfering peaks appearing in the chromatogram when real samples are analyzed decreases considerably.

The methods developed enable phenolic compounds to be determined at levels of $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ in real samples, the maximum concentration allowed in water for human consumption.

REFERENCES

- [1] A.H. Nielson, A.S. Allard, P.A. Hynning, M. Remberger, *Toxicol. Environ. Chem.*, **30** (1991) 3.
- [2] Drinking Water Directive 80/778/EEC, Commission of the European Communities, Brussels, 1980.
- [3] EPA method 604. Phenols in "Federal Register, October 26, 1984, Environmental Protection Agency, Part VIII, 40 CFR Part 136", p.58.

- [4] EPA method 625. Base/neutrals and acids in "Federal Register, October 26, 1984, Environmental Protection Agency, Part VIII, 40 CFR Part 136", p.153.
- [5] Directive 76/160/EEC, Commission of the European Communities, Brussels, 1975.
- [6] C. Elvira-Cozar, P. Cano-Faura, L.V. Pérez-Arribas, M.E. León-González, L.M. Polo-Díez, *Chromatographia*, **40** (1995) 91.
- [7] J. Ruana, I. Urbe, F. Borrull, *J. Chromatogr. A*, **655** (1993) 217.
- [8] O. Busto, J.C. Olucha, F. Borrull, *Chromatographia* **32** (1991) 566.
- [9] E. Pocurull, M. Calull, R.M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia*, **38** (1994) 579.
- [10] J. Frébortová, V. Tatarkovicová, *Analyst*, **119** (1994) 1519.
- [11] E. Pocurull, R.M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia* **40** (1995) 85.
- [12] D. Puig, D. Barceló, *Chromatographia* **40** (1995) 435.
- [13] M.T. Galcerán, O. Jáuregui, *Anal. Chim. Acta*, **304** (1995) 75.
- [14] E. Pocurull, G. Sánchez, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, **696** (1995) 31.
- [15] E.R. Brouwer, I. Liska, R.B. Geerdink, P.C.M. Fintrop, W.H. Mulder, H. Lingeman, U.A.Th. Brinkman, *Chromatographia*, **32** (1991) 445.
- [16] E. Nieminen, P. Heikkila, *J. Chromatogr.*, **609** (1990) 405.
- [17] P. Mußmann, K. Levsen, W. Radeck, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **348** (1994) 654.
- [18] L. Nolan, *Supelco Reporter*, **12** (1993).
- [19] E. Pocurull, M. Calull, R.M. Marcé and F. Borrull, *J. Chromatogr. A*, **719** (1996) 105.
- [20] Merck, *Lichrolut Application* (1994).
- [21] Spark Holland, *Application note* (1995).
- [22] A. Di Corcia, M. Marchetti, *Anal. Chem.*, **63** (1991) 580.
- [23] A. Di Corcia, S. Marchese, R. Samperi, G. Cecchini, L. Cirilli, *J. AOAC International*, **77**, 2 (1994) 446.
- [24] C.G. Markell, D.F. Hagen. *Proceedings of the 7th Annual Waste Testing Quality Assurance Symposium*, Washington, DC, July 8-12, 1991, Vol. II, Environmental Protection Agency, Washington, DC, p. 27.
- [25] L.J. Yoo, Y. Shen, S. Fitzsimmons, *Proceeding of Water Quality Technology Conference*, Orlando, FL, November 10-14, 1991, Part II, p. 913.
- [26] A. Kraut-Vass, J. Thoma, *J. Chromatogr.*, **538** (1991) 233.
- [27] L. Schmidt, J.J. Sun, J.S. Fritz, D.F. Hagen, C.G. Markell, E.E. Wisted, *J. Chromatogr.*, **641** (1993) 57.

- [28] E.R. Brouwer, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, **678** (1994) 223.
- [29] S. Guenu, M.C. Hennion, *J. Chromatogr. A*, **665** (1994) 243.
- [30] E. Pocurrull, R.M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia*, **41** (1995) 521.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

**CAPÍTOL VIII. ACOBLAMENT EN LÍNIA DE L'EXTRACCIÓ EN
FASE SÒLIDA A LA CROMATOGRÀFIA DE
FLUIDS SUPERCRÍTICS PER LA DETERMINACIÓ
DE FENOL I NITROFENOLS EN AIGÜES.**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

En els dos capítols següents s'han aplicat dues tècniques de separació diferents de la RPLC, per tal d'estudiar les possibilitats en la determinació de compostos fenòlics. Les tècniques emprades tenen en comú que separen els analits de manera més ràpida que la RPLC i que són tècniques relativament noves, és a dir, estan en procés de desenvolupament.

L'objectiu del treball que s'inclou en el present capítol ha estat estudiar la determinació de fenol i nitrofenols emprant la cromatografia de fluids supercrítics amb detector de diodes en fila, així com l'estudi de l'acoblament en línia de l'extracció en fase sòlida a aquesta tècnica.

En primer lloc s'ha portat a terme l'optimització de la separació cromatogràfica dels fenols estudiats. Les variables estudiades per a portar a terme la separació han estat: tipus de columna cromatogràfica, flux de CO₂, gradient de modificador (metanol), efecte d'un additiu a la fase mòbil i temperatura de treball. Un cop portada a terme la separació s'ha calculat la linealitat del mètode cromatogràfic i els límits de detecció.

Posteriorment s'ha portat a terme l'estudi de l'acoblament en línia del sistema d'extracció. Els sorbents estudiats inicialment per a portar a terme l'extracció en fase sòlida han estat C₁₈, PLRP-S i ENVI-Chrom P per comparar la capacitat del CO₂ per eluir els compostos retinguts en els sorbents, i també en aquest cas s'ha emprant parell iònic. A diferència de l'acoblament SPE-HPLC, s'ha hagut d'incloure una etapa addicional de secar del sorbent abans de l'elució dels analits, essent el temps de secar un dels paràmetres optimitzats per a cada tipus de sorbent.

Els millors resultats s'han obtingut per l'acoblament de la precolumna de PLRP-S i, el mètode s'ha validat amb mostres reals.

Els resultats obtinguts es recullen en el treball que s'inclou a continuació.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

ON-LINE SOLID-PHASE EXTRACTION COUPLED TO SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY TO DETERMINE PHENOL AND NITROPHENOLS IN WATER.

SUMMARY

Determining of phenol and nitrophenols using solid-phase extraction on-line coupled to supercritical fluid chromatography (SFC) is studied. SFC quickly separated the compounds studied, in less than 6 minutes, and solid-phase extraction (SPE) was used to decrease the limits of detection. C₁₈, PLRP-S and a highly crosslinked styrene-divinylbenzene copolymer in a 10 x 3 mm I.D. laboratory-packed precolumn were tested comparatively as sorbents in the preconcentration step. TBA was used as ion-pair reagent in the extraction process to increase breakthrough volumes, mainly for phenol. Performance of the method was checked with tap and river waters.

INTRODUCTION

Phenol and nitrophenols are of great environmental interest and have been found in water as common pollutants. They are currently formed through different processes: industrially, during the manufacture of dyes or explosives; biogeochemically through the degradation of natural organic compounds, and mainly through the degradation of pesticides [1-3].

Determining of phenol and nitrophenols in water has become increasingly important in the last few years because of growing knowledge about their toxicity, even at low concentrations, and especially for aquatic organisms.

The analysis were performed using HPLC or GC techniques after some preconcentration procedures based on liquid-liquid extraction. Methods based on gas chromatography are time consuming because they usually require a derivatization step to enhance the volatility of the phenolic compounds [4-7].

Although in a recent paper *L. Wennrich et al.* [8] used a highly deactivated separation system for the quantitative GC analysis of underivatized nitrophenols, the analysis time was still high, almost 40 minutes. HPLC methods have been the most widely used, due to the fact that the derivatization step is not necessary, but even using amperometric detectors they are not sensitive enough to detect these compounds at $\mu\text{g l}^{-1}$ level, so there must be a preconcentration process [9,10]. Of the different preconcentration techniques, nowadays solid-phase extraction (SPE) is the most used. This technique has been on-line coupled to GC [11] and to HPLC [12-14], the coupling in the latter case being less complex.

In previous works, we have been able to determine phenol and nitrophenols at $\mu\text{g l}^{-1}$ levels using these techniques [10,15], but when real water samples were analysed a band peak appeared at the beginning of the chromatogram which made it difficult to correctly quantify the phenol. A biosensor based method using on-line SPE has been developed recently by *E. Burestedt et al.* [16], and although phenol was determined at $1 \mu\text{g l}^{-1}$ level only three phenolic compounds could be screened, and there were problems with the stability of the biosensor when organic solvents were used, so collecting phenolic compounds with different polarities in a single fraction was difficult.

In recent years, interest in the use of supercritical fluid chromatography (SFC) as a separation technique has been increasing rapidly because of the unique properties of supercritical fluids: their higher diffusivity and lower viscosity enable analysis to be 3 to 10 times faster than HPLC and they are very efficient at separation. On the other hand, they have relatively similar densities to liquids and viscosities comparable to gases, so SFC can be used to analyse a wide range of compounds, particularly those that are thermally labile, non volatile and of high molecular weight that cannot be satisfactorily analysed by gas chromatography [17-19]. The most widely used supercritical fluid is CO_2 , although for analyses of polar and high molecular weight solutes polar modifiers such as methanol must be incorporated, to increase the solvent strength [20].

So far, a few papers [20-24] have described the separation of phenolic compounds by studying the different parameters that affect the separation such as temperature, pressure or polar modifiers; but none of them have used on-line solid-phase extraction to improve the detection limits. Taking into account that the desorption of the compounds by CO_2 can be more selective

than in on-line SPE-HPLC, some interference from the matrix can be avoided, and the analysis time can also be reduced significantly using SFC.

The aim of this paper is to study the capability of SPE on-line coupled to SFC with diode array detection, in the rapid and sensitive determination of phenol and nitrophenols in water samples. Several columns and the influence of chromatographic conditions such as temperature, pressure, flow-rate and adding methanol in the mobile phase, were studied in order to separate the compounds. To decrease the detection limits of the method, solid-phase extraction on-line coupled to SFC was tested. An ion-pair reagent was added to the samples to increase the breakthrough volumes of the compounds studied. Finally the performance of the method was checked with tap and river water samples.

EXPERIMENTAL

Equipment

The experiments were performed on a Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) model G1205A supercritical fluid chromatograph equipped with an HP 7673 automatic injector with a 5 μ l loop and an HP 1050 diode array detector. Chromatographic data were collected using an HP-SFC 3365 chemstation, which was controlled by Windows 3.1 (Microsoft). The columns tested for carrying out chromatographic separation were 150x4.6 mm I.D. 5 μ m HP Spherisorb ODS-2, 250x4.6 mm I.D. 5 μ m HP LiChrospher Diol, and HP Hypersil Silica.

Reagents and Standards

The phenolic compounds studied are: phenol (Ph), 2-nitrophenol (2-NP), 4-nitrophenol (4-NP), 2,4-dinitrophenol (2,4-DNP) and 2-methyl-4,6-dinitrophenol (2-M-4,6-DNP). All phenolics studied were supplied by Aldrich Chemie (Beerse, Belgium). Standard solutions (2000 mg l⁻¹) of each compound were prepared in methanol:water (50:50) and stored in the refrigerator. Working solutions

were prepared weekly by diluting these solutions with Milli-Q-quality water (Millipore, Bedford, MA, USA).

Carbon dioxide of 99.999 quality purchased from Carbueros Metálicos (Madrid, Spain) was used as mobile phase and HPLC-grade methanol (Scharlau, Barcelona, Spain) as modifier. TBA (tetrabutylammonium bromide) from Aldrich (Beerse, Belgium) was used as ion-pair reagent in the extraction process. Helium 99.999 quality purchased from Carbueros Metálicos was used to dry the sorbent of the precolumn before eluting the analytes.

NaOH was purchased from Probus (Badalona, Spain) to adjust the pH of sample before solid-phase extraction and HPLC quality methanol was used in the same process to clean the tubes and precolumn.

Chromatographic conditions

The phenolic compounds studied were separated using carbon dioxide as the mobile phase and methanol as modifier. The modifier gradient profile was as following: initial conditions 3% methanol, at 2 minutes, 7% and at 6 minutes 47%, returning to initial conditions at 9 minutes. So, the total analysis time was 9 minutes. The flow-rate was 2 ml min^{-1} and the outlet pressure was maintained constant during the analysis at 150 bar. The oven temperature was set at 40°C . For single wavelength monitoring the detection was set at the optimum wavelength for each compound studied: 280 nm for 2-NP and Ph, 254 nm for 2-M-4,6-DNP and 2,4-DNP and 302 nm for 4-NP. The spectra were recorded between 210 and 350 nm.

On-line trace enrichment

The on-line trace-enrichment experiments were performed using two six-port rotary valves (Rheodyne, Cotati, California, USA) connected in series to make the different steps of the preconcentration process possible: conditioning and activation of the precolumn, retention of the analytes, drying of the precolumn and elution of the compounds. To carry out the solid-phase extraction, three sorbents were tested by hand-packing them in a $10 \times 3 \text{ mm}$ I.D. precolumn purchased from the Free University (Amsterdam, the Netherlands). The sorbents tested were $10 \mu\text{m}$ Spherisorb ODS-2 purchased from Teknokroma

(Barcelona, Spain), 20 μm PLRP-S (Polymer laboratories, Shropshire, UK) and 80-160 μm highly cross-linked styrene-divinylbenzene copolymer ENVI-Chrom P (Supelco, Bellafonte, USA). An Eldex Waters (Milford, MA, USA) pump was used to deliver the sample and the conditioning solutions.

The scheme of the equipment used is shown in Figure 1 and the sequence followed in the extraction process is described in Table I. The flow-rate used throughout the extraction process was 2 ml min⁻¹. Firstly, the preconcentration system was washed with 10 ml methanol to remove all solvents from the tubes. Then, the precolumn was cleaned and conditioned with 10 ml methanol. Next, tubes were washed with 10 ml of water-TBA and the precolumn was activated with 10 ml of the same solution. In the next step the sample was preconcentrated after washing the tubes and at the same time the tubes were dried with helium. Then, the precolumn was dried with 5 bar helium for the optimized time for the type of sorbent. The analytes trapped in the precolumn were desorbed in the backflush mode and on-line transferred to the analytical column.

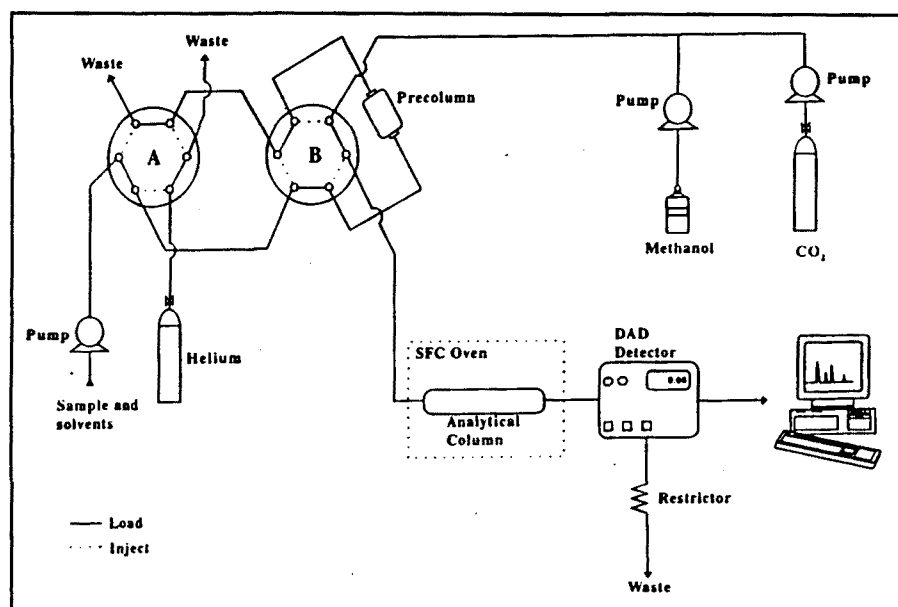


Figure 1.- Scheme of the equipment used.

When river or tap water was analyzed, water was filtered through a 0.45 μm filter (msi, Westboro, USA) before analysis. Also, 300 μl of a 10% solution of Na_2SO_3 was added for each 100 ml of tap water before analysis in order to eliminate free chlorine, which could react with phenol added as standard addition and produce chlorophenols [15].

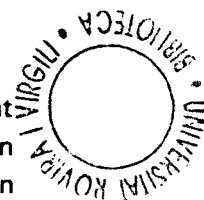
In all cases, the pH of the samples was adjusted to 9.0 with 0.1 M NaOH and TBA was added at a concentration of 5 mM before the preconcentration step. These conditions were optimized in a previous paper [25].

Table I.- Sequence followed in the extraction process.

Step	Event	Valve A	Valve B
1	Washing tubes with 10 ml methanol	Inject	Load
2	Conditioning precolumn with 10 ml methanol	Load	Load
3	Washing tubes with 10 ml water-TBA	Inject	Load
4	Activation precolumn with 10ml water-TBA	Load	Load
5	Washing tubes with 10 ml sample	Inject	Load
6	Sample preconcentration and drying tubes with helium.	Load	Load
7	Drying precolumn with 5 bar helium	Inject	Load
8	Analyte desorption	Load	Inject

RESULTS AND DISCUSSION

To carry out the separation of phenol and nitrophenols, different analytical columns were tested: C_{18} , silica and diol. C_{18} and silica columns had not been used before in the separation of this kind of compounds by SFC. These columns were evaluated by varying experimental conditions such as temperature, pressure, percentage of methanol and flow-rate in order to obtain the best chromatographic separation. The results were not good. Peak shapes were distorted and some compounds were not resolved even when nine silica columns or three C_{18} columns were connected in series.



The diol column was found to provide better separations. Different temperatures as well as pressures were tested but they had no influence on the selectivity and only the retention time changed slightly. The use of an additive (acetic or trifluoroacetic acids) in the mobile phase was studied in order to improve peak shapes [20]. The concentration was varied from 0.025% to 1%, but better peak shapes were not obtained, so the next studies were carried out without additive. The flow-rate was also varied between 1 ml min⁻¹ and 4 ml min⁻¹. Some problems in the nozzle appeared when the flow-rate was higher than 3 ml min⁻¹ and there were good separations in a short analysis time (six minutes) using a flow-rate of 2 ml min⁻¹ and the following methanol gradient: initial conditions 3%, at 2 minutes 7% and at 6 minutes 47%. The chromatogram corresponding to 50 mg l⁻¹ for each compound studied under optimum conditions is shown in Figure 2. The use of a diode array detector enabled us to detect each phenolic compound at maximum absorbance wavelength and also to compare the spectra of peaks in real samples with those of standards.

The range of linearity of response in the chromatographic method was between 1 and 150 mg l⁻¹ for all compounds studied except Ph and 2,4-DNP whose linearity was between 5 and 150 mg l⁻¹. Regression coefficients were higher than 0.997 in all cases and the detection limits obtained considering S/N = 3 were between 0.2 mg l⁻¹ for 4-NP and 1 mg l⁻¹ for Ph and 2,4-DNP.

In order to lower the detection limits, on-line solid-phase extraction was studied and various sorbents such as C₁₈, PLRP-S and ENVI-Chrom P were tested. The on-line coupling of these sorbents to HPLC for the analysis of phenolic compounds has already been studied by our group [25,26]. On-line systems have a higher automation potential, higher sensitivity and a lower organic solvent consumption. TBA was used as ion-pair reagent to increase breakthrough volumes, mainly for Ph, as has been described in previous papers [15,25]. Moreover, the ion-pair formed is less polar than the analyte so its solubility in CO₂ may be higher and the efficiency of the elution may increase the broadening of the peaks would decrease which is a drawback in the coupling of strong sorbents, such as ENVI-Chrom P, to RPLC systems.

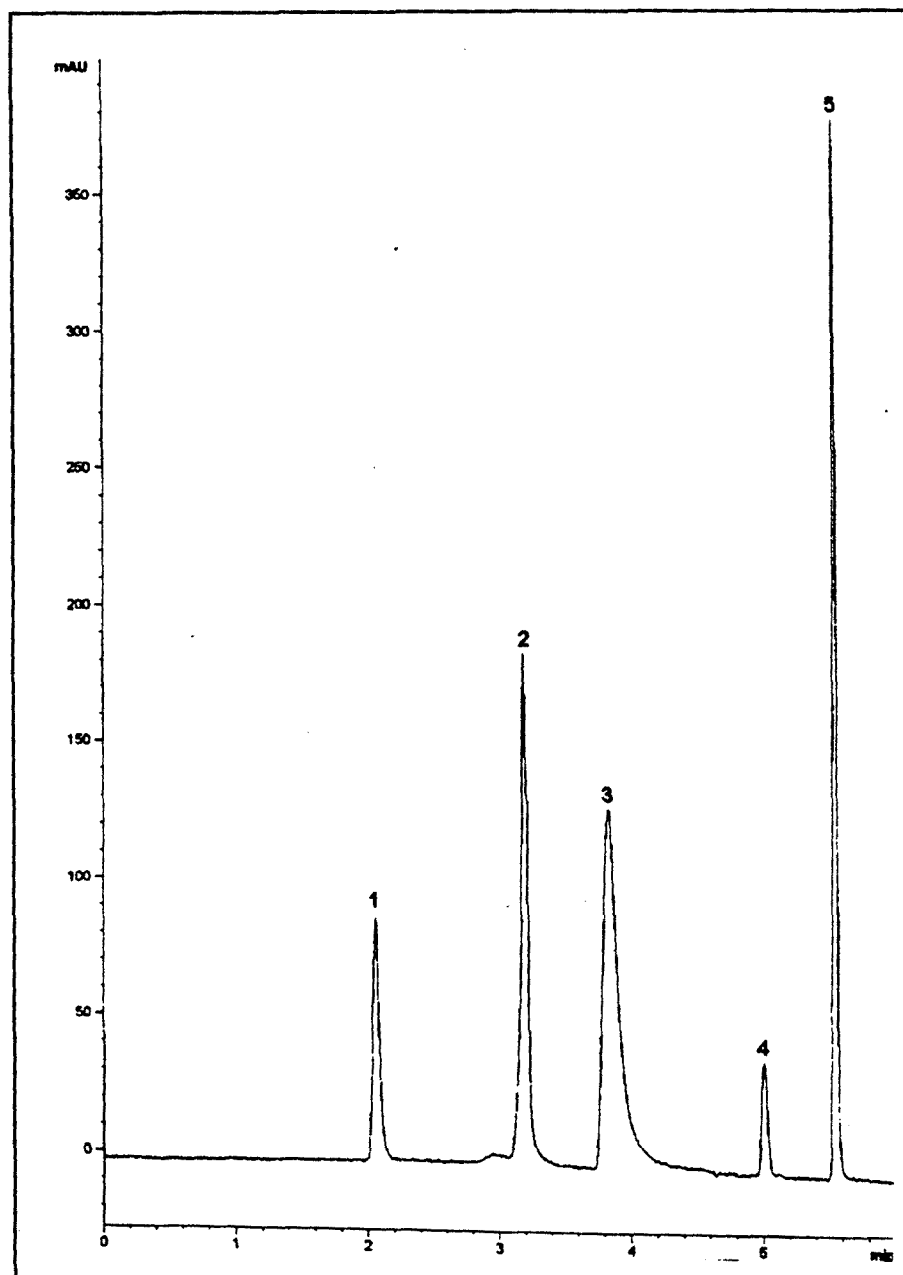


Figure 2.- Chromatogram corresponding to 50 mg l^{-1} each compound studied under optimum conditions found. (1) 2-NP, (2) 2-M-4,6-DNP, (3) 2,4-DNP, (4) Ph, (5) 4-NP.

Thus, drying time was optimized for each type of sorbent using helium at a pressure of 5 bar. The initial volume of preconcentrated sample was only 2 ml of a standard solution of 0.1 mg l^{-1} to prevent losses of compounds studied due to their breakthrough volumes, mainly when C_{18} is used. It was observed that, using the preconcentration step, the retention times of some compounds were slightly higher than the direct injection ones. However, chromatographic time did not increase by more than 6 min. This was mainly observed with the most acidic compounds studied, 2-M-4,6-DNP and 2,4-DNP (pK_a 4.35 and 4.09 respectively). This could be explained by the fact that the ion-pair formed was not broken by the mobile phase used in the supercritical fluid chromatography system and, instead the phenolic compounds were separated as ion-pairs. This effect was not observed when SPE was coupled to RPLC because the ion-pair was destroyed by the acid present in the mobile phase. The rest of the compounds studied are less acidic and the ion-pair is more easily broken. For all the sorbents tested, peaks broadened and resolution decreased when the drying time was lower than the optimum. On the other hand, times which were higher than the optimum led to some peaks being distorted, in particular the last one eluted. Using C_{18} or ENVI-Chrom P a double peak for the second compound corresponding to 2-M-4,6-DNP was observed. The optimum times found were 5 min for C_{18} and Envi-chrom P and 10 min for PLRP-S. As an example, chromatograms for different drying times using PLRP-S sorbent are shown in Figure 3.

In order to check the possible matrix effect, tap and river water were preconcentrated in each precolumn. 2 ml of each real sample spiked with a standard addition of 0.1 mg l^{-1} of phenolic compounds were preconcentrated and the precolumn was dried for the optimum time found. Slight band broadening of the peaks was observed in all cases compared to direct injection using Milli-Q quality water, but there were no losses in resolution. Using C_{18} or ENVI-Chrom P there was a higher distortion of the peak corresponding to 2-M-4,6-DNP so this compound could not be reliably quantified. This effect was not observed when PLRP-S was used, so it was selected for the next studies. It should be pointed out that with supercritical fluid chromatography no band peak appeared at the beginning of the chromatogram as happened when real samples were analysed with HPLC. This means that SFC correctly quantifies phenol while RPLC may present some limitations.

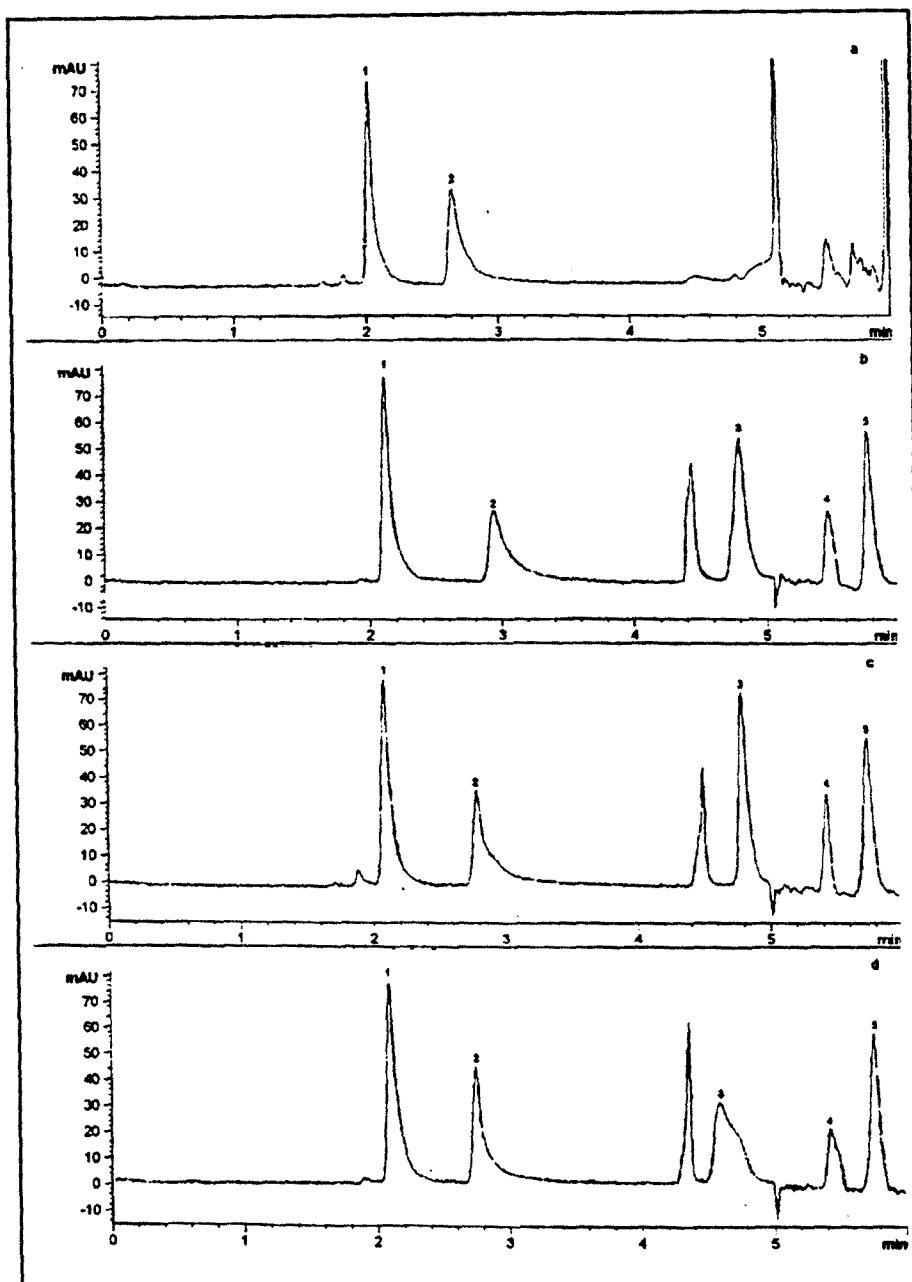


Figure 3.- Chromatograms corresponding to different time of dry using PLRP-S sorbent. a) 0 min, b) 5 min, c) 10 min and d) 15 min. For conditions, see text. For peak designation see Figure 2.

The breakthrough volumes of the compounds studied on the 10 x 3 mm PLRP-S precolumn were calculated by preconcentrating under optimum conditions different sample volumes prepared with Milli-Q quality water and the corresponding addition of TBA with the pH value adjusted to 9.0. From the results obtained, which are shown in Table II, the volume selected to be preconcentrated was 20 ml because with higher volumes there were phenol losses. The recoveries obtained by preconcentrating 20 ml were higher than 90% for all compounds studied. Higher volumes were not tested because of a fenol recoveries decreased.

Table II.- Recoveries obtained with the 10x3 mm PLRP-S precolumn using different volumes of standard solution with 5 mM TBA adjusted at pH 9.0. Values are mean of three determinations.

COMPOUNDS	20 ml		25 ml		30 ml	
	%R	RSD	%R	RSD	%R	RSD
2-NP	95	3.2	94	3.8	94	3.9
2-M-4,6-DNP	98	1.1	98	1.1	98	1.3
2,4-DNP	100	2.5	99	2.8	100	2.8
Ph	92	1.0	75	1.3	69	1.5
4-NP	100	2.2	100	2.2	100	2.4

The analytical performance of the method was tested with tap and river water under the optimum conditions found.

The linearity of the method checked with tap water was between 1-40 $\mu\text{g l}^{-1}$ for 2-NP and 4-NP, 5-40 $\mu\text{g l}^{-1}$ for 2,4-DNP, 10-40 $\mu\text{g l}^{-1}$ for Ph and 1-20 $\mu\text{g l}^{-1}$ for 2-M-4,6-DNP. The regression coefficients (R^2) found were higher than 0.990. The repeatability and reproducibility between days of the method were checked with 20 ml of tap water spiked at a level of 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ of each compound and the R.S.D.s found were between 1.1% - 8.8% and between 0.7% - 9.4% ($n = 4$), respectively. The limits of detection, corresponding to a

signal-noise ratio of about 3, were between $0.2 \mu\text{g l}^{-1}$ for 4-NP and $1 \mu\text{g l}^{-1}$ for Ph and 2,4-DNP. The precolumn was re-used several times as no cross-contamination was observed. Chromatograms for 20 ml tap water and 20 ml tap water spiked with $10 \mu\text{g l}^{-1}$ for Ph and $5 \mu\text{g l}^{-1}$ for the rest of compounds studied are shown in Figure 4. It can be seen that no peak appeared at the same retention time as the compounds studied.

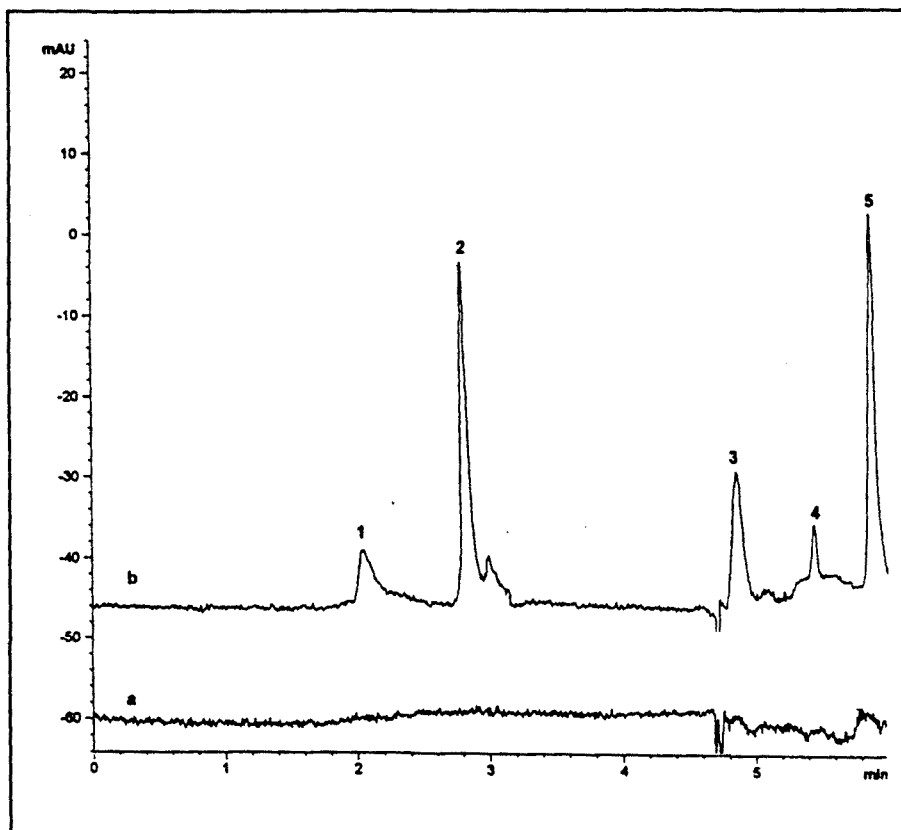


Figure 4.- Chromatograms obtained preconcentrating 20 ml of tap water on PLRP-S precolumn. a) Without standard addition. b) With standard addition of $10 \mu\text{g l}^{-1}$ for Ph and $5 \mu\text{g l}^{-1}$ for the rest of compounds studied. For more conditions, see text. For peak designation, see Figure 2.

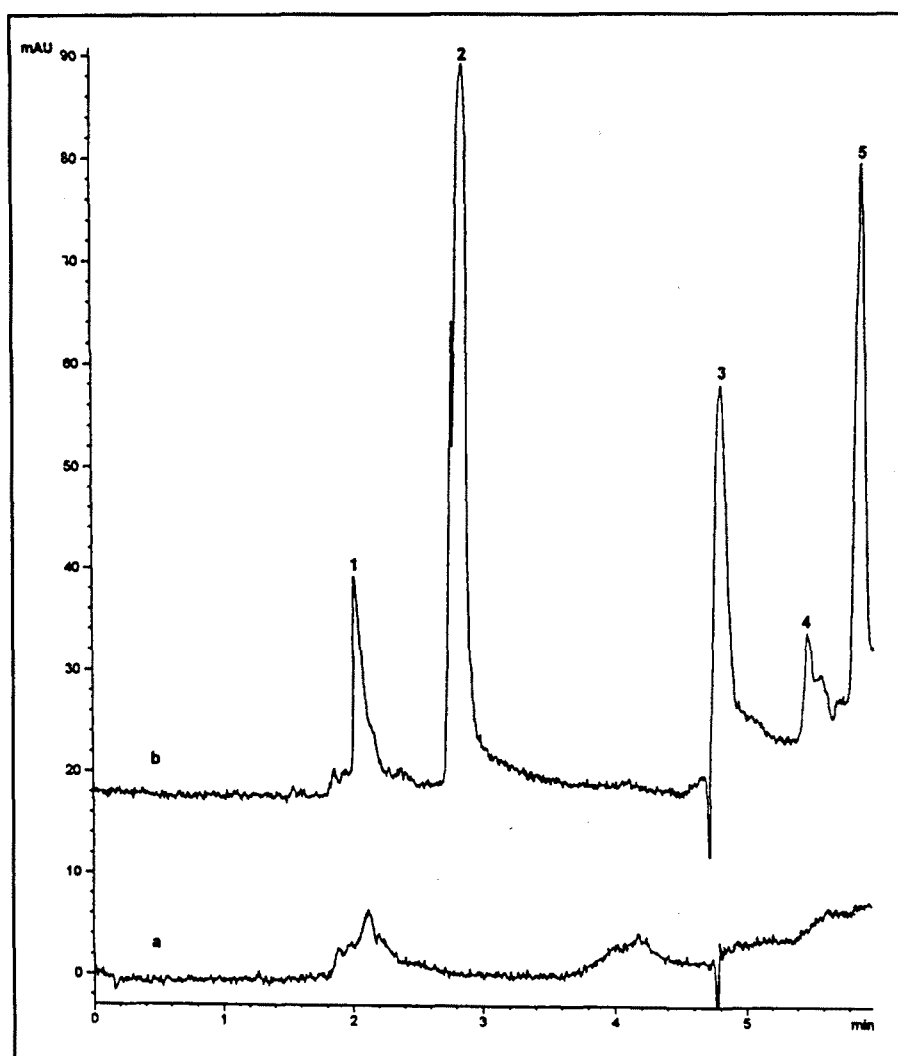


Figure 5.- Chromatograms obtained preconcentrating 20 ml of Pisuerga river water on PLRP-S precolumn. a) Without standard addition. b) With standard addition of $5 \mu\text{g l}^{-1}$ for 2-NP and 4-NP and $10 \mu\text{g l}^{-1}$ for the rest of compounds studied. For more conditions, see text. For peak designation, see Figure 2.

The same study was carried out with Pisuerga river water. The linearity of the method was between 5-40 $\mu\text{g l}^{-1}$ for 2-NP and 4-NP and between 10-40 $\mu\text{g l}^{-1}$ for the rest of the compounds studied, with regression coefficients higher than 0.990. The repeatability and reproducibility of the method were determined with 20 ml of river water spiked with 10 $\mu\text{g l}^{-1}$. The R.S.D.s ($n=4$) found were between 1.8% - 7.8% and 1.5% - 8.5%, respectively. The limits of detection calculated, as mentioned above, were between 1 $\mu\text{g l}^{-1}$ for 2-NP and 4-NP and 3 $\mu\text{g l}^{-1}$ for 2,4-DNP. Figure 5 shows the chromatograms for 20 ml of Pisuerga river water and the same sample spiked with 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ of 2-NP and 4-NP and 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ of the rest of the compounds studied. One peak appeared at the same retention time as 2-NP but it could not be identified as a phenolic compound when compared with the UV spectra.

CONCLUSIONS

SFC separated five phenolic compounds, including phenol, in less than 6 minutes with good resolution for all compounds. In comparison to the coupling of SPE to RPLC, the on-line coupling of SPE to SFC only involves the additional step of drying the precolumn. This step was optimized for the different sorbents tested (C_{18} , PLRP-S and ENCI-Chrom P) and of these, PLRP-S was selected because the peaks were not distorted. Under the optimum conditions found, the method detected phenol and nitrophenols at concentration levels of between 0.2 and 1 $\mu\text{g l}^{-1}$ for tap water and between 2 and 6 $\mu\text{g l}^{-1}$ for river water. The repeatability and reproducibility were lower than 10% in both samples. Furthermore, the method determined phenol with no matrix interference, which is a drawback when SPE is used on-line coupled to RPLC to detect these compounds with a UV detector.

REFERENCES

- [1] J.C. Hoffsommer, D.J. Glover, C.Y. Hazzard, *J. Chromatogr.*, **195** (1980) 435.
- [2] M.E. León-González, L.V. Pérez-Arribas, M.J. Santos-Delgado, L.M. Polo-Díez, *Anal. Chim. Acta*, **258** (1992) 269.
- [3] S. Lacorte, D. Barceló, *Anal. Chim. Acta*, **296** (1994) 223.
- [4] J. Folke, U. Land, *J. Chromatogr.*, **279** (1983) 189.
- [5] K. Abrahamsson, T.M. Xie, *J. Chromatogr.*, **279** (1983) 199.
- [6] R. Infante, C. Gutiérrez, C. Pérez, *Wat. Sci. Tech.*, **26** (1992) 2583.
- [7] P. Mussmann, A. Preiss, K. Levsen, G. Günsch, J. Efer, W. Engewald, *Von Wasser*, **79** (1992) 145.
- [8] L. Wennrich, J. Efer, W. Engewald, *Chromatographia*, **41** (1995) 361.
- [9] J. Ruana, I. Urbe, F. Borrull, *J. Chromatogr.*, **655** (1993) 217.
- [10] E. Pocurull, G. Sánchez, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, **696** (1995) 31.
- [11] J.J. Vreuls, R.T. Ghijsen, G.L. de Jong, U.A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr.*, **625** (1992) 237.
- [12] E.R. Brouwer, U.A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, **678** (1994) 223.
- [13] A. Gelencser, G. Kiss, Z. Krivacsy, Z. Varga-Puchony, J. Hlavary, *J. Chromatogr. A*, **693** (1995) 227.
- [14] U.A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, **665** (1994) 217.
- [15] E. Pocurull, M. Calull, R.M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia*, **38** (1994) 579.
- [16] E. Burestedt, J. Emnéus, L. Gorton, G. Marko-Varga, E. Domínguez, F. Ortega, A. Narvaez, H. Irth, M. Lutz, D. Puig, D. Barceló, *Chromatographia*, **41** (1995) 207.
- [17] T.L. Chester, J.D. Pinkston, D.E. Raynie, *Anal. Chem.*, **66** (1994) 106.
- [18] J.J. Suárez, J.L. Bueno, I. Medina, *Química Analítica*, **12** (1993) 192.
- [19] R.D. Smith, B.W. Wright, C.R. Yonker, *Anal. Chem.*, **60** (1985) 1323A.
- [20] T.A. Berger, J.F. Deye, *J. Chromatogr. Sci.*, **29** (1991) 26.
- [21] T.A. Berger, J.F. Debye, *J. Chromatogr. Sci.*, **29** (1991) 54.
- [22] C.P. Ong, H.K. Lee, S.F.Y. Li, *J. Chromatogr. Sci.*, **30** (1992) 319.
- [23] S.K. Yeo, C. P. Ong, H.K. Lee, S.F.Y. Li, *Environ. Monitor. and Assess.*, **19** (1991) 47.
- [24] C.P. Ong, H.K. Lee, S.F.Y. Li, *Anal. Chem.*, **62** (1990) 1389.
- [25] E. Pocurull, R.M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia*, **40** (1995) 85.
- [26] E. Pocurull, R.M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia*, **41** (1995) 521.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

**CAPÍTOL IX. SEPARACIÓ DELS ONZE FENOLS PRIORITARIS
PER ELECTROFORESI CAPILAR DE ZONA I
DETECCIÓ D'ABSORBÀNCIA ULTRAVIOLADA.**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

Tal i com s'ha comentat en el capítol anterior, una altra de les tècniques emprades per a la determinació dels compostos fenòlics ha estat l'electroforesi capil·lar. Així doncs, l'objectiu del treball que es recull en aquest capítol ha estat desenvolupar un mètode per a la determinació de fenols en aigües, emprant l'electroforesi capil·lar de zona amb detector d'absorbància ultraviolada-visible i l'extracció en fase sòlida com a tècnica de preconcentració.

En primer lloc s'ha portat a terme l'estudi de les diferents variables que afecten la separació electroforètica dels onze fenols considerats com a contaminants prioritaris segons l'EPA. Les variables optimitzades han estat: tipus de tampó electroforètic, pH de la mostra, potencial, addició de modificadors orgànics al tampó i temperatura. Un cop optimitzada la separació cromatogràfica, s'ha optimitzat la longitud d'ona de treball i les condicions de la injecció, la qual s'ha portat a terme hidrodinàmicament.

Posteriorment s'ha determinat la linealitat de la resposta, els límits de detecció, la repetibilitat i reproductibilitat emprant patrons preparats amb aigua Milli-Q.

Per tal de disminuir els límits de detecció, ja que estaven per sobre dels nivells de concentració recomenats per la normativa, s'ha portat a terme el procés *off-line* d'extracció en fase sòlida, emprant les millors condicions trobades en els estudis *off-line* realitzats anteriorment utilitzant la HPLC com a tècnica de separació. Aquestes condicions, descrites en el capítol III, impliquen emprar com a sorbent ENVI-Chrom P, així com la formació de parells iònics.

Finalment el mètode desenvolupat s'ha aplicat a mostres d'aigua de riu i de beguda.

Els resultats obtinguts es recullen en el següent treball.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

SEPARATION OF ELEVEN PRIORITY PHENOLS BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS WITH ULTRAVIOLET DETECTION

SUMMARY

This paper describes the separation and detection of eleven priority phenols using capillary zone electrophoresis (CZE) with UV detection. Using a 70 cm x 75 μm I.D. capillary at 15 kV and an electrophoretic buffer of 20 mM sodium borate (pH 9.9 \pm 0.1), the eleven compounds can be completely separated in less than 14 min. The different variables that affect separation were studied and optimized, and good linearity was obtained between 0.5 and 20 mg l⁻¹ for 2,4-DMP (2,4-dimethylphenol) and between 0.25 and 20 mg l⁻¹ for the rest of compounds, and detection limits were 0.1 mg l⁻¹ for all compounds except for 2,4-DMP for which it was 0.25 mg l⁻¹. Previous analysis of real samples, an off-line SPE process with a highly crosslinked styrene divinylbenzene copolymer cartridge was used to determine the priority phenolic compounds at low $\mu\text{g l}^{-1}$ levels. The method was tested with tap and Ebro river waters

INTRODUCTION

Phenol and substituted phenols are common by-products of many industrial processes. They are generated, for instance, in the manufacturing of dyes, plastics, drugs, antioxidants, paper and in the petroleum industry [1].

The presence of phenol and substituted phenols is not significant in natural water because they are only present as a result of some types of vegetation decomposition. They only increase if waste water from industrial or mineral processes in which phenol and substituted phenols are used is not properly treated [2].

Under environmental conditions they can persist, depending on temperature and pH, at a level of mg l⁻¹ in ground water for a number of days or weeks. Phenols have been found to be toxic to most aquatic organisms and even at

low concentrations have an adverse effect on the taste and odour of water (less than $1 \mu\text{g l}^{-1}$) [3]. Therefore, if such ground waters are to be used as sources for drinking water it is necessary to screen them for contamination by these organic pollutants. Moreover, the disinfection process with chlorine increases the effect of odour and taste because of the reaction of phenol to form chlorinated compounds [4-6]. The U.S. Environmental Protection Agency (EPA) listed eleven phenols as priority organic pollutants [7].

There are various methods to analyze phenolic compounds in water samples. Gas chromatography (GC) and high-performance liquid chromatography (HPLC) have been commonly used for the analysis of individual phenolic compounds [8,9]. In order to enhance the volatility and detectability of phenols, sample derivatization is usually necessary before GC analysis [10-12]. On the other hand, HPLC has advantages for the analysis of phenols because no derivatization process has to be carried out. Isocratic or gradient elution is widely used to determine these compounds, isocratic elution in HPLC is mainly applied when electrochemical detection is used because it allows these compounds to be determined at low $\mu\text{g l}^{-1}$ levels [13, 14]. However, it is necessary to carry out two injections in order to analyze the eleven EPA priority phenolic compounds, one of them for more polar compounds and the other one for less polar compounds [14].

If the eleven EPA compounds are to be analyzed in only one injection, gradient elution is required. In this case, UV detector is preferred because of the better stability of signal [15-17]. It is also possible to determine some of the phenolic compounds by gradient elution with electrochemical detector, but in this case detection limits obtained are higher than isocratic elution [18].

In the past few years, capillary electrophoresis (CE) has been shown to be a rapid, powerful, and efficient technique for separating several compounds [19]. Most of the environmental applications of CE are restricted to demonstrating high resolution separations for specific pollutants and only a few refer to the determination of pollutants in real matrices [20-24].

Capillary zone electrophoresis (CZE) and micellar electrokinetic chromatography (MECC) are two different separation techniques and both have been used for the separation of phenolic compounds [23-28] with different detection techniques.

The analysis of eleven phenols using micellar electrokinetic chromatography (MECC) with UV detection has been established [28]. In this case it is necessary a micellar solution and an analysis time of *ca.* 45 min was required to separate the eleven priority phenols. If CZE technique is used with indirect fluorescence detection a noninteracting fluorescing ion needs to be added into the running buffer to create a constant fluorescence background [24].

In the present paper, a method for the separation and detection of the eleven priority phenols using free solution CZE coupled with on-column UV detection is described using a simple solution of sodium tetraborate as running buffer. Detection limits, linearity and repeatability are examined.

An off-line solid-phase extraction prior to separation is used to determination these compounds in water samples in order to decrease the detection limits of the method. Ion-pair extraction with a highly cross-linked styrene-divinylbenzene copolymer is used because higher breakthrough volumes were obtained for the more polar phenolic compounds compared with other sorbent such as C₁₈ or PLRP-S [29]. The separation and detection of eleven priority phenols using CZE with UV detection is described and the selectivity of the method was checked with tap and Ebro river water.

EXPERIMENTAL

Instrumentation

A Crystal 310CE instrument (ATI UNICAM, Cambridge, United Kingdom) in combination with a UNICAM 4225 absorbance detector was used. Data were collected with the HP Chemstation version A.01.01. chromatographic data system. The separations were carried out using an uncoated fused-silica capillary (70 cm x 75 μ m I.D.) supplied by Supelco (Bellafonte, USA). 56 cm from the capillary inlet a detection window was obtained by burning off the polyimide coating. The injection mode was hydrodynamic.

Chemicals

The eleven phenolic compounds studied are: (1) 2,4-dimethylphenol (2,4-DMP); (2) phenol (Ph); (3) 4-chloro-3-methylphenol (4-C-3-MP); (4) pentachlorophenol (PCP); (5) 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP); (6) 2-methyl-4,6-dinitrophenol (2-M-4,6-DNP); (7) 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP); (8) 2-chlorophenol (2-CP); (9) 2,4-dinitrophenol (2,4-DNP); (10) 4-nitrophenol (4-NP); (11) 2-nitrophenol (2-NP).

All of them were obtained from Aldrich Chemie (Beerse, Belgium) except pentachlorophenol, which was obtained from Janssen Chemie (Geel, Belgium). A standard solution of 2000 mg l⁻¹ of each compound was prepared in methanol:water (50:50) and stored in the refrigerator. The working solutions were prepared weekly or daily, depending on their concentration, by diluting the standard solutions in Milli-Q water (Millipore, Bedford, USA).

Sodium tetraborate (Fluka, Buchs, Switzerland) and sodium hydroxide (Aldrich, Beerse, Belgium) were used to prepare the electrolyte solution.

HPLC-gradient grade methanol (Scharlau, Barcelona, Spain), acetic acid (Merck, Darmstadt, Germany) and TBAB (tetrabutylammonium bromide) (Aldrich, Beerse, Belgium) as the ion-pair reagent were used in the solid-phase extraction process.

Electrophoretic conditions and detection

The electrolyte solution was made by adjusting the pH of a 20 mM sodium tetraborate solution to pH 9.9 ± 0.1 with sodium hydroxide. The pH of the electrolyte buffer was checked prior to use, and, if necessary, brought to pH 9.9 ± 0.1.

Before use, the capillary was washed (1000 mbar pressurized flow) with NaOH 0.1M for 15 minutes followed by a 10 minutes rinse with water and a 10 minutes flush with the running buffer. Every day, or when the composition of the electrolyte was changed, the capillary was equilibrated with NaOH 0.1M for 5 minutes followed by a 2 minute rinse with water and a 10 minute flush with the running buffer by pressurized flow at 1000 mbar.

The applied voltage in the separation was 15 kV, and the capillary temperature was kept constant at 35°C. The detection was set at 220 nm. The injection was performed hydrodynamically by pressure at 100 mbar for 0.05 minutes.

Extraction process

The off-line trace enrichment process was carried out using the 500 mg highly cross-linked styrene-divinylbenzene copolymer ENVI-Chrom P (Supelco, Bellafonte, USA) (80-160 μm particle size). The extraction was carried out using the Bond Elut/Vac ElutTM system (Varian, Harbar City, USA). Previous extraction process, sample was adjusted at pH 9 and different volumes of TBA were added to adjust the final concentration at 5 mM. Then, 500 ml sample volume was extracted and the phenolic compounds retained were eluted with 5 ml of methanol acidified with 1% of acetic acid to decrease the effect of ion pair reagent. The 5 ml were concentrated with a rotatory evaporator (Büchi, Flawil, Switzerland) until a volume of about 200 μl and then diluted to a final volume of 500 μl with methanol. This extraction process was described in a previous paper [29].

Tap and Ebro river water samples were filtered through 0.45 μm (MSI, Westboro, MA, USA) before preconcentration.

RESULTS AND DISCUSSION

As a result of initial investigations testing several buffers, sodium borate was chosen as the background buffer for the separation of the eleven phenols. Once the buffer had been selected, the first parameter studied was the pH of the electrolyte. Figure 1 shows the influence of the buffer pH on the migration time. Best results were obtained at a pH of around 10, and the great influence of this parameter at peak resolution made a precise study of this parameter necessary. Figure 2 shows the results obtained and the pH chosen was 9.9 ± 0.1 .

It is known that when the buffer concentration increases there is an improvement in the separation efficiency. In this paper, the range of borate

concentration studied was limited to 20 - 35 mM because an initial study had demonstrated that a concentration of 10 mM of borate was too low to separate the different compounds, and a concentration of borate higher than about 35 mM did not significantly improve the resolution. Figure 3 shows that the best separation was obtained at a concentration of 20 mM of borate.

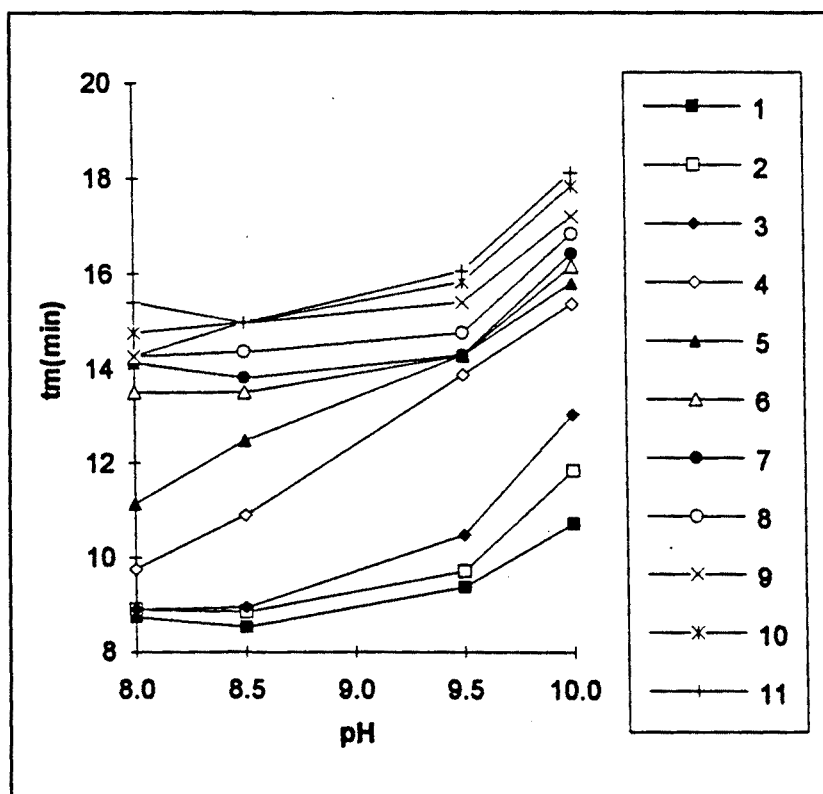


Figure 1.- Influence of the pH of the buffer on migration time. Electrolyte: sodium borate 15 mM, separation voltage 10 kV, injection: 100 mbar for 0.05 minutes. Concentration of the different phenolic compounds: 5 mg l⁻¹, detection 220 nm. See Table I for compound identification.

Adding organic modifiers to the separation buffer is known to reduce the electroosmotic flow, and may result in better resolution at the expense of a longer analysis time [30]. In this paper, two organic solvents, methanol and acetonitrile were studied at different percentages up to 20%. In general, the electroosmotic flow decreased when the organic solvent fraction increased, but the resolution of the phenolic compounds in the range of concentrations of organic solvents studied did not improve, so the electrolyte with no organic solvent was used.

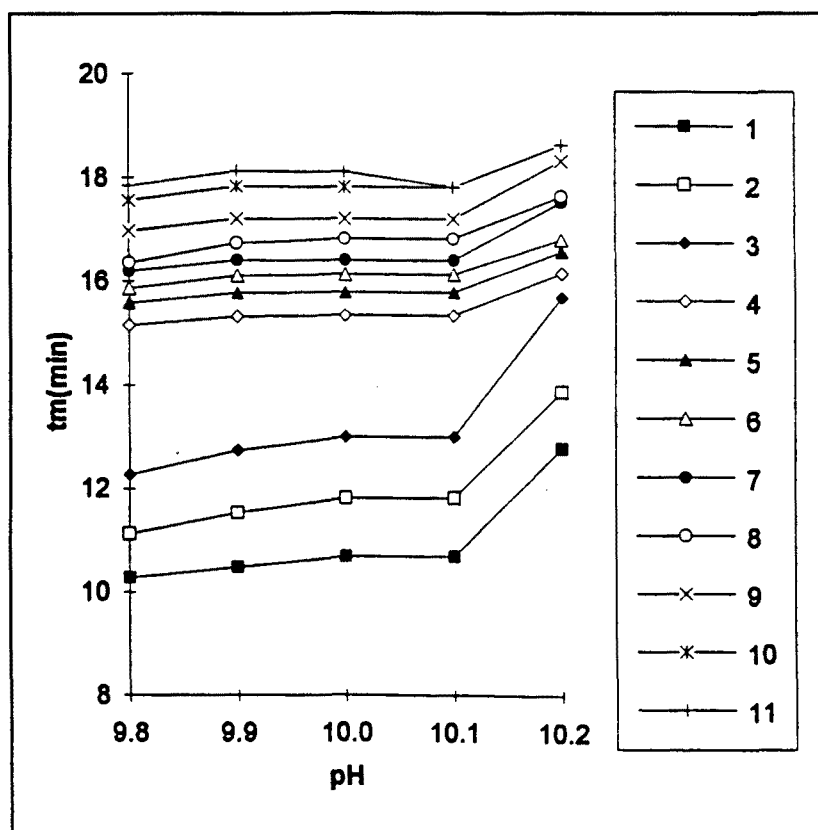


Figure 2.- Influence of the buffer pH on migration time. For experimental conditions, see text.

Temperature control is commonly used for efficient heat removal [31]. Figure 4 shows the influence of capillary temperature on migration time. In the range studied, 35° - 60°C, the change in temperature appeared to influence all migration times in a similar way. The migration sequence remained unchanged throughout the temperature range.

In this paper, hydrodynamic injection was performed. The conditions chosen for the injection were 100 mbar for 0.05 minutes (5 mbar min) . The wavelength for the detection was also optimized and the highest sensitivity was obtained at 220 nm.

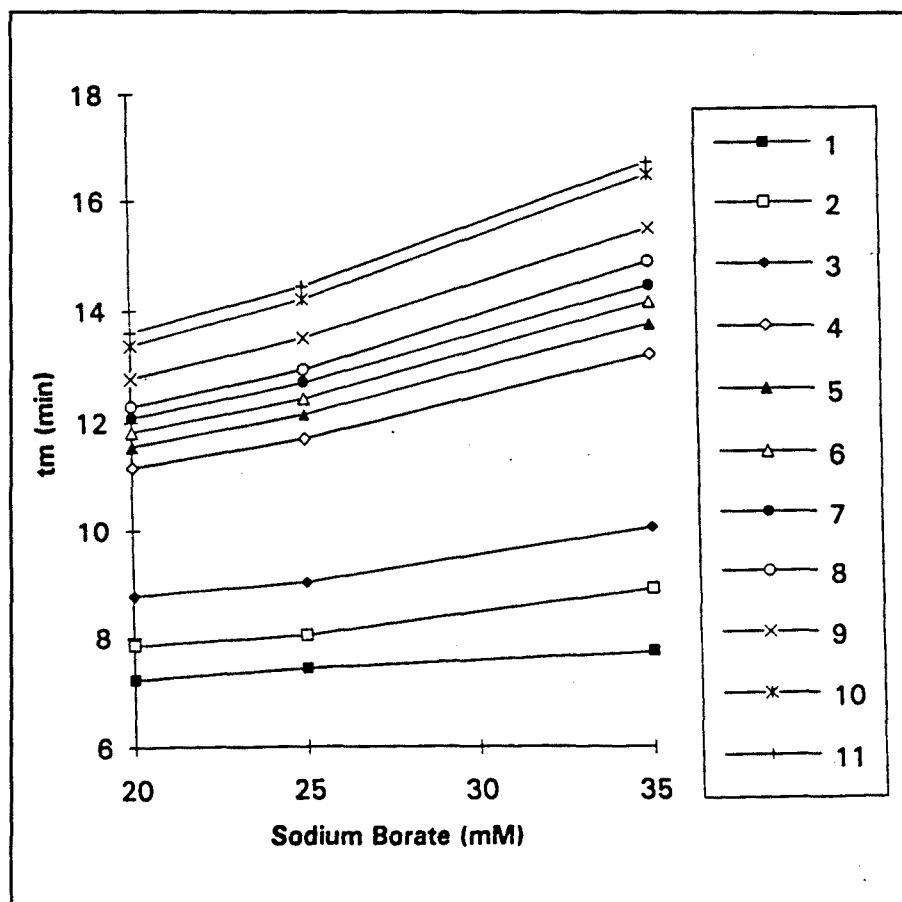


Figure 3.- Variation of migration time v.s. sodium borate concentration. For other experimental conditions, see text.

Figure 5 shows an electropherogram of a standard solution of 1 mg l^{-1} of each phenolic compound at optimum conditions: sodium borate 20 mM , separation voltage 15 kV , injection 100 mbar for 0.05 minutes and detection at 220 nm .

The results obtained from studying the linearity and response repeatability for standard solutions are shown in Table 1. Within the concentration range studied ($0.25\text{-}20 \text{ mg l}^{-1}$ for all compounds except $0.5\text{-}20 \text{ mg l}^{-1}$ for 2,4-DMP), there was a good correlation between peak area and concentration for every compound.

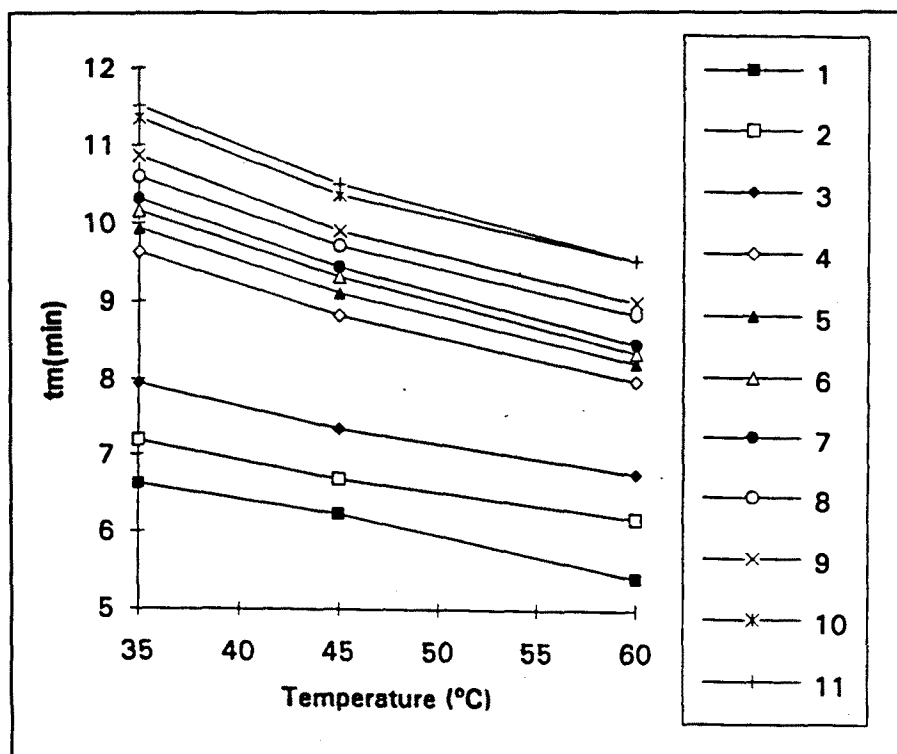


Figure 4.- Effect of capillary temperature on the separation of eleven phenolic compounds. For experimental conditions see text.

Table I.- pK_a values, calibration data and precision for eleven phenolic compounds.

Peaks	Compounds	pK_a	Linear Range(mg l ⁻¹)	Slope	Intercept	R ²	R.S.D.(%) [*]
1	2,4-DMP	10.5	0.50-20	136.6	7.15	0.9996	8.3
2	Ph	9.9	0.25-20	291.6	16.60	0.9999	6.0
3	4-C-3-MP	9.6	0.25-20	239.0	0.60	1.0000	11.2
4	PCP	4.9	0.25-20	761.3	-277.20	0.9974	10.9
5	2,4,6-TCP	7.4	0.25-20	676.6	-144.50	0.9972	9.0
6	2-M-4,6-DNP	4.3	0.25-20	420.3	-33.80	0.9992	4.2
7	2,4-DCP	7.7	0.25-20	421.8	-10.30	0.9998	10.4
8	2-CP	8.1	0.25-20	490.8	9.60	0.9999	8.7
9	2,4-DNP	4.1	0.25-20	578.7	1.10	0.9999	5.8
10	4-NP	7.2	0.25-20	381.5	18.80	0.9999	9.8
11	2-NP	7.2	0.25-20	840.8	142.40	0.9981	9.5

(*) Obtained for the lowest point on the calibration line.

Repeatability was examined by five replicate injections of each compound at a concentration corresponding to the lowest point on the calibration line and R.S.Ds were between 11.2% for 4-C-3MP and 4.2% for 2-M-4,6-DNP. The limits of detection (LOD) were calculated using the ratio of the signal to the background noise level (S/N) equal to 3. It was 0.10 mg l^{-1} for all compounds except 2,4-DMP, for which it was 0.25 mg l^{-1} .

To decrease the detection limit of the method, a SPE process with a cross-linked styrene-divinylbenzene copolymer cartridge was carried out. In this case, the method optimized in a previous paper [29] applied previous the CZE analysis enabled these compounds to be detected at $\mu\text{g l}^{-1}$ levels with LOD between $0.3 \mu\text{g l}^{-1}$ to $1 \mu\text{g l}^{-1}$.

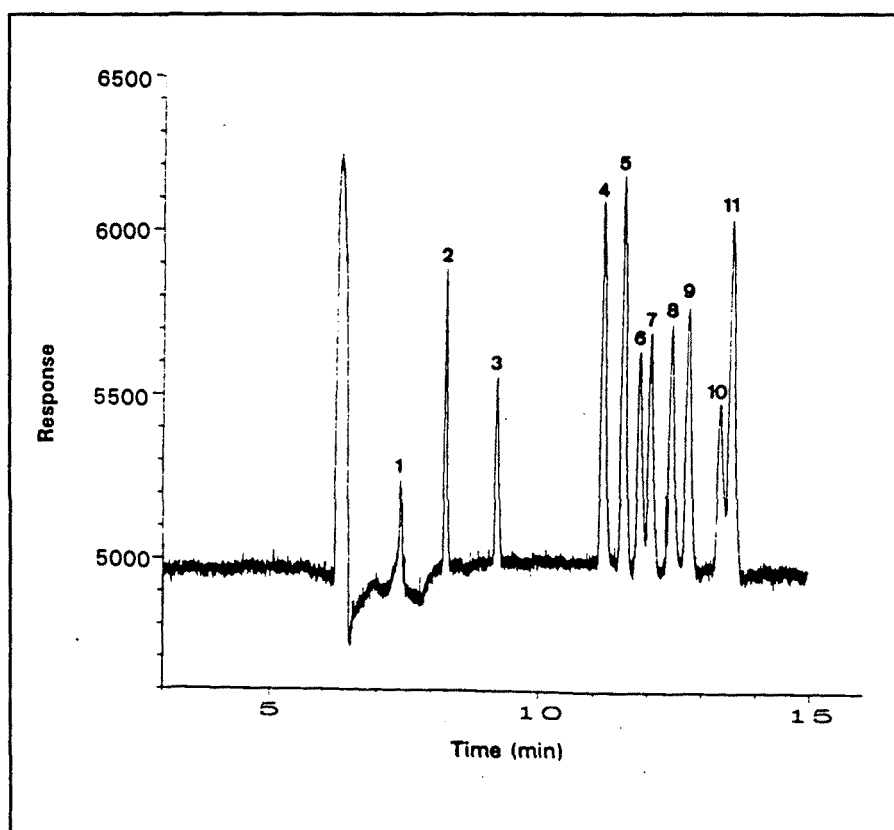


Figure 5.- Electropherogram of 1 mg l^{-1} of each phenolic compound. Electrolyte: sodium borate 20 mM , separation voltage 15 kV , injection: 100 mbar for 0.05 minutes . Detection at 220 nm . For peak designation see Table I.

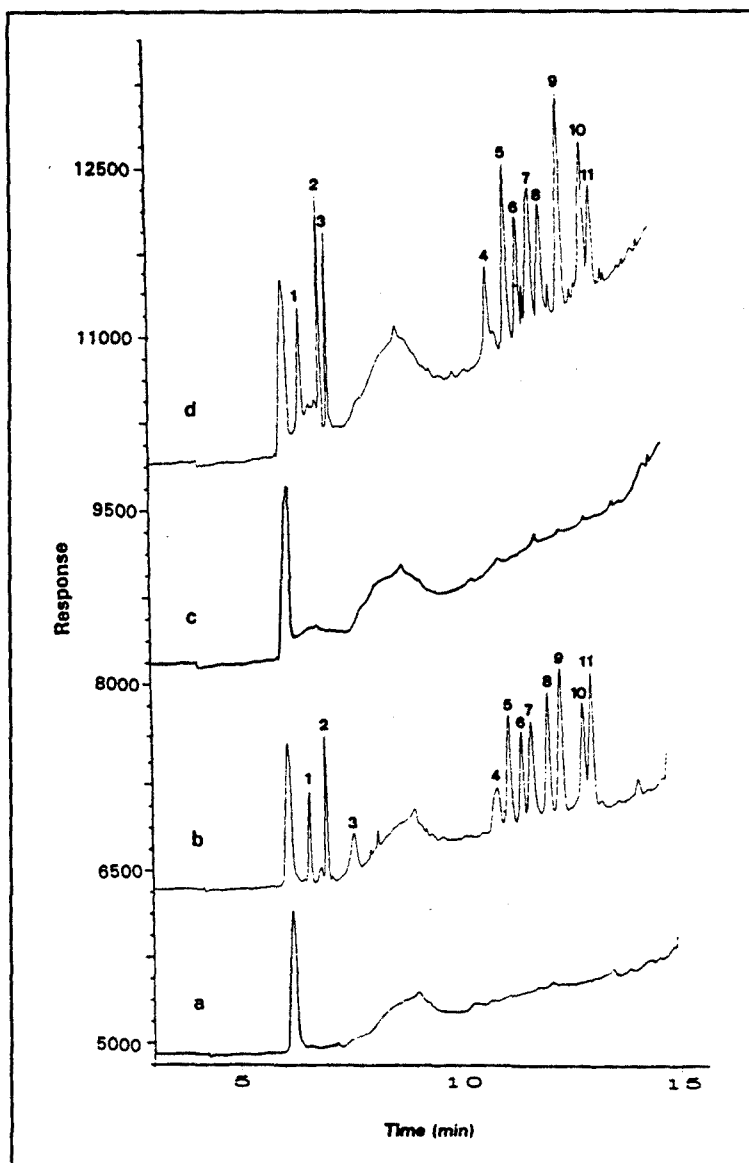


Figure 6.- Electropherogram obtained from an extract of 500 ml of:

- a) Tap water.
- b) Tap water spiked with a standard solution of phenolic compounds at a level of $5 \mu\text{g l}^{-1}$.
- c) Ebro river water.
- d) Ebro river water spiked with a standard solution of phenolic compounds at a level of $5 \mu\text{g l}^{-1}$.

For experimental conditions, see text.

The method was applied to tap and Ebro river water. Real samples were filtered through a 0.45 μm filter and, after filtration, 300 μl of a solution of 10% Na_2SO_3 was added for each 100 ml of drinking water to eliminate free chlorine which could have reacted with phenols to produce chlorophenols.

Figure 6a shows the electropherogram obtained when 500 ml of tap water was preconcentrated 1000 times by using the copolymer cartridge, and Figure 6b shows the same sample spiked with a standard solution of phenolic compounds at a level of 5 $\mu\text{g l}^{-1}$.

The same analysis was carried out with Ebro river water. 500 ml of the river water (Figure 6c) and the same sample spiked with 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ of a standard solution of phenolic compounds (Figure 6d) were analyzed by the same method.

In all cases, there was good resolution between different peaks and no interference of the system's peaks .

Comparing the electropherogram obtained by this method with the chromatogram obtained when RPLC was used in the analysis of real samples, it can be deduced that phenol, one of the most important compounds, is more easily determined by CZE than by RPLC, because of the appearance of a large peak at the beginning of the RPLC chromatogram due to the humic and fulvic acids.

CONCLUSIONS

CZE with UV detection can rapidly separate and sensitively detect the eleven priority phenols. Complete separation of the eleven compounds can be achieved in *ca.* 14 minutes using an electrophoretic buffer of 20 mM sodium borate (pH=9.9). The calibration graphs over two orders of magnitude of concentration were linear and the limits of detection were on the mg l^{-1} level or $\mu\text{g l}^{-1}$ level when a SPE process was applied. The CZE method enabled these compounds, mainly phenol, to be detected with lower matrix interference than when the RPLC method was applied.

ACKNOWLEDGMENT

We wish to thank the ATI UNICAM for technical support.

REFERENCES

- [1] A.H. Nielson, A.S. Allard, P.A. Hynning, M. Remberger, *Toxicol. Environ. Chem.*, **30** (1991) 3.
- [2] C.P. Ong, H.K. Lee, S.F.Y. Li, *J. Chromatogr.*, **464** (1989) 405.
- [3] *Drinking Water Directive 80/778/EEC*, Commission of the European Communities, Brussels, 1980.
- [4] P.A. Realini, *J. Chromatogr. Sci.*, **13** (1981) 124.
- [5] J.D. le Roux, *Municipal Engineer*, July, **19** (1988).
- [6] D.A. Baldwin, J.K. Debowski, *Chromatographia*, **26** (1988) 186.
- [7] *Sampling and Analysis Procedures for Screening of Industrial Effluents for Priority Pollutants*, U.S. Environmental Protection Agency, Environment Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati, OH, 1977.
- [8] M.T. Galcerán, O. Jáuregui, *Anal. Chim. Acta*, **304** (1995) 75.
- [9] U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, **665** (1994) 217.
- [10] J.I. Hedges, J.R. Ertel, *Anal. Chem.*, **54** (1982) 174.
- [11] L. Renberg, K. Lindstrom, *J. Chromatogr.*, **214** (1981) 327.
- [12] R. Infante, C. Gutierrez, D. Pérez, *Wat. Sci. Tech.*, **26** No.9-11 (1992) 2583.
- [13] J. Ruana. I. Urbe, F. Borrull, *J. Chromatogr. A*, **655** (1993) 217.
- [14] E. Pocurull, G. Sánchez, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, **696** (1995) 31.
- [15] E. Pocurull, M. Calull, R.M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia*, **38** (1994) 579.
- [16] D. Puig, D. Barceló, *Chromatographia*, **40** (1995) 435.
- [17] E. Pocurull, R.M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia*, **40** (1995) 85.
- [18] E. Pocurull, R.M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia*, **41** (1995) 521.
- [19] C.A. Monning, R.T. Kennedy, *Anal. Chem.*, **66** (1994) 280R.
- [20] A. Farran, O. Hernanz, *Quím. Anal.*, **12** (1993) 205.
- [21] M.C. Carneiro, L. Puignou, M.T. Galcerán, *J. Chromatogr. A*, **669** (1994) 217.

- [22] M.W.F. Nielen, *Trends Anal. Chem.*, **12** (1993) 345.
- [23] I.-C. Chen, C.-W. Whang, *J. Chin. Chem. Soc.*, **41** (1994) 419.
- [24] Y.-C. Chao, C.-W. Whang, *J. Chromatogr. A*, **663** (1994) 229.
- [25] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.*, **56** (1984) 111.
- [26] S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando, *Anal. Chem.*, **57** (1985) 834.
- [27] M.G. Khaledi, S.C. Smith, J.K. Strasters, *Anal. Chem.*, **63** (1991) 1820.
- [28] C.P. Ong, C.L. Ng, N.C. Chong, H.K. Lee, S.F.Y. Li, *J. Chromatogr.*, **516** (1990) 263.
- [29] E. Pocurull, M. Calull, R.M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A*, **719** (1995) 105.
- [30] James P. Landers (Editor), "Handbook of Capillary Electrophoresis", CRC Press, Boca Ratón, 1993.
- [31] S.F.Y. Li, "Capillary Electrophoresis. Principles, practice and applications", *Journal of Chromatography Library - Volume 52*, Elsevier, Amsterdam, 1992.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

CONCLUSIONS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

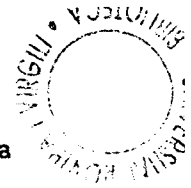
ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

Dels resultats obtinguts es poden extreure les següents conclusions:

- 1.- La cromatografia líquida d'alta resolució permet la determinació dels principals compostos fenòlics d'interès mediambiental, inclosos els 11 indicats per la E.P.A., amb un temps d'anàlisi inferior als 35 minuts. Les anàlisis per injecció directa de la mostra permeten la identificació i quantificació d'aquests compostos a nivells de pocs ppm.
- 2.- L'aplicació d'un sistema *off-line* d'extracció en fase sòlida emprant tres sorbents de diferents característiques, C₁₈, ciclehexil i PLRP-S, permeten poder determinar aquests compostos a més baixos nivells de concentració. La utilització d'un reactiu formador de parells iònics, fa augmentar la retenció dels fenols en el procés de preconcentració, sense ocasionar distorsió de l'anàlisi, per la qual cosa és recomenable la seva utilització en els processos de preconcentració, sobretot, dels compostos més polars. Preconcentrant 500 ml d'aigua amb un cartutx de 500 mg de PLRP-S les recuperacions han estat bones per a tots els fenols excepte pel fenol, el qual presenta una recuperació a l'entorn del 20%. Sota aquestes condicions els límits de detecció han oscil·lat al voltant de 0.5 µg l⁻¹.
- 3.- La utilització de PLRP-S en front a C₁₈ ha comportat un augment quant a la retenció dels fenols i per tant el volum de mostra a preconcentrar ha pogut ser més gran, però a la vegada, amdós factors han comportat una pèrdua de selectivitat de l'anàlisi que es caracteritza per l'elució dels compostos més polars, principalment el fenol, conjuntament amb el pic inicial del cromatograma format per la presència d'àcids húmics i fúlvics. La fase ciclehexil, a diferència d'algunes dades trobades a la bibliografia, ha comportat uns resultats similars als obtinguts amb C₁₈.
- 4.- L'ús d'altres sorbents com ENVI-Chrom P (estirè-divinilbenzè altament entrecreuat) ha permès poder concentrar fins a 500 ml d'aigua, fet que permet obtenir uns límits de detecció per sota dels nivells recomanats per la normativa, incloent el fenol amb un valor de recuperació a l'entorn del 90%, amb cartutxos de 500 mg d'aquests farciment.
- 5.- El fet d'emprar carbó com a sorbent, no ha portat millores sobre els farciments estudiats, a diferència d'alguns dels resultats esmentats en alguna cita bibliogràfica. La necessitat a més d'emprar solvents no

compatibles amb la fase mòbil cromatogràfica ens ha fet desistir de la utilització d'aquest sorbent.

- 6.- La precolumnes de C_{18} i PLRP-S han estat acoblades en línea amb columnes C_{18} amb bons resultats. No obstant, si bé els volums de mostra a analitzar permeten arribar a uns límits de detecció inferiors als trobats amb sistemes *off-line*, quan s'utilitza un detector de díodes en fila, no són suficients per poder determinar els compostos en estudi als valors recomanats per la normativa europea. D'altra banda, s'observa al principi del cromatograma una banda molt pronunciada en l'anàlisi de mostres reals que solapa en alguns casos els pics que elueixen al principi del cromatograma, per tant, es pot deduir que la selectivitat de l'anàlisi es menor en sistemes *on-line* que *off-line*.
- 7.- La utilització d'un detector electroquímic millora els límits de detecció del mètode i permet determinar els compostos en estudi dins dels valors recomanats per la normativa; no obstant, és aconsellable treballar en règim isocràtic per obtenir bons límits de detecció ja que el règim en gradient comporta una important distorsió de la línia base, per la qual cosa, i en funció de la diferent polaritat dels compostos en estudi, és necessari fer dues elucions. La utilització d'aquest detector també millora la selectivitat del mètode.
- 8.- La utilització de precolumnes amb sorbents amb més capacitat acoblats en línea amb una columna C_{18} comporta una modificació de l'equip cromatogràfic. La formació de la fase mòbil mitjançant una unió sense volum mort immediatament abans de la columna analítica i posterior a la precolumna, elueix els analits tan sols amb el component orgànic de la mescla, i així permet utilitzar sorbents com ENVI-Chrom P sense que es produeixi una pèrdua en la resolució dels pics cromatogràfics. La utilització d'aquest sorbent permet arribar a límits de detecció molt propers als recomanats per la normativa amb un sol anàlisi, entre 0.1 i $2 \mu\text{g l}^{-1}$, quan s'empra el detector d'absorbància ultraviolada-visible.
- 9.- La utilització d'un sorbent amb més capacitat a la precolumna, a més d'eluir la mostra amb tan sols metanol, fa augmentar el pic inicial degut a àcids húmics i fúlvics principalment, per la qual cosa existeix el solapament dels pics que surten en primer lloc. No obstant, en tenir un volum de ruptura més gran, l'ús d'aquests sorbents possibiliten la



realització d'una etapa de neteja prèvia a la injecció, per la qual cosa l'anàlisi resulta més selectiu.

- 10.- La utilització d'un detector electroquímic amb una elució en gradient fa disminuir considerablement els límits de detecció d'alguns compostos en estudi en comparació amb els valors determinats emprant un detector ultraviolat-visible. La utilització de dos detectors en sèrie, un detector ultraviolat-visible i un detector electroquímic, permet la detecció, en una sola anàlisi, de tots els compostos estudiats en les seves millors condicions. La utilització del sorbent ENVI-Chrom P junt amb la detecció dels compostos nitroderivats mitjançant detecció UV i de la resta mitjançant detecció electroquímica permet determinar aquests compostos al nivells recomanats per la normativa europea.
- 11.- La cromatografia de fluids supercrítics presenta una alternativa vàlida per la determinació de compostos fenòlics en aigua. Si bé l'estudi realitzat ha estat aplicat tan sols als compostos nitrogenats i al fenol, s'ha pogut constatar un temps d'anàlisi curt, tot i que els límits de detecció no han estat inferiors als trobats emprant RPLC.
- 12.- L'acoblament de l'extracció en fase sòlida a la cromatografia de fluids supercrítics s'ha pogut portar a terme de manera similar al acoblament a HPLC, si bé cal constatar la gran importància que presenta l'etapa de secar de la precolumna prèvia a l'elució pel posterior anàlisi. S'ha observat que l'acoblament no comporta l'aparició d'un pic inicial corresponent a àcids húmics i fúlvics, present quan l'anàlisi es porta a terme per HPLC.
- 13.- L'electroforesi capil·lar es presenta com una alternativa per la determinació dels compostos fenòlics en aigua. Si bé els intervals de linealitat i límits de detecció són comparables als obtinguts mitjançant les tècniques cromatogràfiques, tampoc apareix el pic inicial corresponent a àcids fúlvics i húmics, per la qual cosa presenta avantatges respecte a la cromatografia; no obstant, degut la dificultat de l'acoblament en línia a l'extracció en fase sòlida, s'ha hagut d'emprar un sistema *off-line*.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.
Eva Pocurull Aixalà
ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

ANNEX

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

Els treballs que han sorgit de la present tesi doctoral han estat publicats o estan pendents de publicació a les següents revistes.

- * E. Pocurull, M. Calull, R.M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia*, **38** (1994) 579. (Capítol II).
- * E. Pocurull, M. Calull, R.M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A*, **719** (1996) 105. (Capítol III).
- * E. Pocurull, R.M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia*, **40** (1995) 85. (Capítol IV).
- * E. Pocurull, G. Sánchez, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, **696** (1995) 31. (Capítol V).
- * E. Pocurull, R.M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia*, **41** (1995) 521. (Capítol VI).
- * E. Pocurull, R.M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A*, (acceptat). (Capítol VII).
- * E. Pocurull, R.M. Marcé, F. Borrull, M.L. Serna, L. Toribio, J.L. Bernal, *J. Chromatogr. A*, (pendent acceptació). (Capítol VIII).
- * D. Martínez, E. Pocurull, R.M. Marcé, F. Borrull, M. Calull, *J. Chromatogr. A*, (acceptat). (Capítol IX).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EXTRACCIÓ EN FASE SÓLIDA APLICADA A LA DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS FENÒLICS.

Eva Pocurull Aixalà

ISBN: 978-84-693-6281-5/DL:1609-2010