

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

ACOPLAMIENTO MICROEXTRACCIÓN EN FASE
SÓLIDA-CROMATOGRAFÍA

CONSUELO CHÁFER PERICÁS

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2006

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 18 de Juliol de 2006 davant un tribunal format per:

- D^a. Amparo Salvador Carreño
- D^a. Purificación López Mahia
- D. Joan March Isern
- D. Xavier Rius Ferrus
- D^a. Carmen Molins Legua

Va ser dirigida per:

D^a. Pilar Campíns Falcó

D^a. Rosa Herráez Hernández

©Copyright: Servei de Publicacions
Consuelo Cháfer Pericás

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6581-6

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115



**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAD DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

ACOPLAMIENTO MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA-CROMATOGRFÍA

**TESIS DOCTORAL
Consuelo Cháfer Pericás
Mayo 2006**



**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAD DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

La Dra. Dña. Pilar Campíns Falcó, Catedrática del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Valencia, y la Dra. Dña. Rosa Herráez Hernández, Titular del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Valencia,

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria, "*Acoplamiento microextracción en fase sólida-cromatografía*", realizada en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valencia, constituye la Tesis Doctoral de Dña. Consuelo Cháfer Pericás.

Asímismo, certifican haber dirigido y supervisado tanto los diferentes aspectos del trabajo como su redacción.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos la presente en Valencia a 25 de Mayo de 2006.

Dra. Pilar Campíns Falcó

Dra. Rosa Herráez Hernández

ALS MEUS PARES

AGRAÏMENTS

- A Pilar i a Rosa, per tots els coneixements que m'han aportat durant aquests anys, per la seua disponibilitat a ajudar-me en qualsevol moment i per la seua amistat.
- Als meus pares, pel seu recolçament incondicional i per haver compartit amb mi cada moment d'esta Tesi.
- A Pepo, Juan Luis i Pablo, per entendre'm, animar-me i alegrar-se amb mi.
- A Adela, Jorge i Carmen, per ajudar-me quan els he necessitat.
- A Yolanda, a Susana, a Luis, a Jose Ramón, a Marta, a Juan, a Judit i a Sandra, pels dinars i tots els bons moments compartits, pel recolçament al laboratori quan les coses no ixen bé i per l'amistat que hem creat.
- A Ángel pel seu optimisme i la seua ajuda al laboratori.
- A Sonia, Sara, Gemma i Virginia per estar sempre al meu costat, pels cinc anys de carrera compartits, i pels que ens queden per compartir.
- A Victoria i José que amb la seua experiència i sencillesa m'han ajudat molt.
- Als meus amics, pel seu interès i escoltar-me quan els he necessitat.

ÍNDICE

TÍTULO	I
INDICE	IX
LISTADO DE FIGURAS	XV
LISTADO DE TABLAS	XIX
LISTADO DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	XXI
OBJETIVOS	1
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Consideraciones sobre el tratamiento de muestras y la extracción de analitos	9
1.2. Extracción en fase sólida	9
1.3. Microextracción en fase sólida (SPME)	10
1.3.1. Evolución de la SPME	10
1.3.2. Fundamentos de la SPME	12
1.3.2.1. SPME en muestras líquidas	14
1.3.2.2. SPME en muestras gaseosas	18
1.3.3. Parámetros que influyen en el proceso de SPME	21
1.3.4. Tipos de SPME y acoplamientos	22
1.3.4.1. SPME con fibras	22
1.3.4.2. SPME en tubo	26
1.3.4.3. SPME por sorción sobre barras magnéticas agitadoras	30
1.4. Características de los analitos estudiados y legislación aplicable a los mismos	33
1.4.1. Análisis medioambiental	33
1.4.1.1. Análisis de agua	33
1.4.1.2. Análisis de aire	37
1.4.1.3. Analitos y derivatización	41
1.4.2. Análisis clínico	48
1.4.3. Legislación aplicable	50
1.5. Bibliografía (Introducción)	54
2. REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN	61
2.1. Reactivos	63
2.2. Aparatos, montajes, instrumentación y software	65

3. RESULTADOS OBTENIDOS Y DISCUSIÓN	73
3.1. SPME acoplada a cromatografía líquida convencional y derivatización	75
3.1.1. Determinación de metilamina	75
3.1.1.1. Análisis de metilamina mediante microextracción en fase sólida y HPLC después de la derivatización sobre la fibra con 9- fluorenilmetil cloroformiato.....	76
Elección de la fibra	76
Optimización de las condiciones cromatográficas	78
Optimización del proceso de extracción/derivatización	79
Transferencia a la columna analítica	81
Características analíticas.....	83
Aplicación a muestras reales.....	86
Conclusiones.....	86
3.1.2. Determinación de dimetilamina.....	87
3.1.2.1. Un nuevo método selectivo para el análisis de dimetilamina en agua por cromatografía líquida utilizando microextracción en fase sólida y derivatización en dos etapas con <i>o</i> -ftalaldialdehído y 9- fluorenilmetil cloroformiato.....	88
Derivatización de dimetilamina con FMOC sobre la fibra ...	89
Derivatización de propilamina con OPA-NAC sobre la fibra	91
Determinación de dimetilamina mediante el método de OPA-NAC/FMOC	94
Aplicación a muestras reales de agua	95
Conclusiones	96
3.1.3. Determinación de trimetilamina	97
3.1.3.1 Determinación de TMA en agua mediante cromatografía líquida con derivatización en línea.....	98
Derivatización y condiciones de elución	98
Selectividad.....	100
Características analíticas	101
Aplicación a muestras reales de agua	103
Conclusiones	104
3.1.3.2. Determinación selectiva de TMA en aire mediante cromatografía líquida usando cartuchos de extracción en fase sólida para el muestreo.....	105
Procedimiento de muestreo.....	106
Parámetros analíticos	107
Aplicación	110
Conclusiones	110
3.1.3.3. Estudio comparativo de la determinación de TMA en agua y aire combinando cromatografía líquida y microextracción en fase sólida con derivatización sobre la fibra.....	111
Optimización del procedimiento de	

extracción/derivatización mediante SPME en muestras acuosas.....	111
Procedimiento de extracción mediante SPME/derivatización en patrones gaseosos.....	114
Características analíticas	115
Muestras de agua.....	115
Muestras de aire	117
Aplicación a muestras reales	118
Conclusiones	119
3.1.4. Determinación de aminas alifáticas	120
3.1.4.1. Evaluación de la microextracción en fase sólida para aminas alifáticas utilizando derivatización con 9-fluorenilmetil cloroformiato y cromatografía líquida.....	121
Comparación de las diferentes aproximaciones de extracción/ derivatización estudiadas.....	122
Optimización del procedimiento de extracción/derivatización con fibras recubiertas de FMOC...	128
Características analíticas.....	129
Aplicación a muestras reales de agua.....	129
Conclusiones.....	130
3.1.5. Determinación de anfetaminas	131
3.1.5.1. Aplicación de la microextracción en fase sólida combinada con la derivatización para la determinación de anfetaminas por cromatografía líquida.....	132
SPME seguida de la derivatización sobre la fibra.....	132
Derivatización en disolución seguida de SPME	135
Aplicación a muestras reales	137
Conclusiones	138
3.1.5.2. Aplicación de la microextracción en fase sólida combinada con la derivatización para la determinación enantiomérica de anfetaminas.....	140
Optimización del procedimiento de derivatización/SPME ...	140
Características analíticas	145
Comparación con otras aproximaciones de derivatización y tratamiento de muestras	149
Conclusiones	152
3.2. SPME acoplada a cromatografía de gases	153
3.2.1. Determinación de compuestos orgánicos volátiles.....	153
3.2.1.1. Procedimiento optimizado para la estimación de los principales VOCs legislados en muestras de agua mediante SPME en espaciado de cabeza acoplada a cromatografía de gases y detector de ionización de llama	154

Optimización del procedimiento SPME-CG.....	157
Influencia de la filtración de la muestra.....	164
Conclusiones.....	173
3.3. SPME en línea acoplada a cromatografía líquida capilar.....	175
3.3.1. Determinación de triazinas y compuestos organofosforados.....	175
3.3.1.1. Análisis de screening de triazinas en muestras de agua mediante SPME sobre la fibra y SPME en tubo.....	176
Optimización del proceso de extracción.....	180
Características analíticas.....	184
Aplicación a muestras reales.....	188
Conclusiones.....	193
3.3.1.2. Screening de triazinas y pesticidas organofosforados usando microextracción en fase sólida en tubo acoplada en línea a cromatografía líquida capilar.....	194
Eficacia de la extracción	195
Características analíticas.....	197
Aplicación a muestras reales.....	200
Conclusiones	208
3.4. Referencias bibliográficas	210
4. CONCLUSIONES FINALES.....	213
4.1. Conclusiones generales	215

5. APÉNDICES	225
Apéndice 1. Analysis of methylamine by solid-phase microextraction and HPLC after on-fibre derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate.	
Apéndice 2. A new selective method for dimethylamine in water analysis by liquid chromatography using solid-phase microextraction and two-stage derivatization with <i>o</i> -phthalaldialdehyde and 9-fluorenylmethyl chloroformate.	
Apéndice 3. Liquid chromatographic determination of trimethylamine in water.	
Apéndice 4. Selective determination of trimethylamine in air by liquid chromatography using solid phase extraction cartridges for sampling.	
Apéndice 5. Comparative study of the determination of trimethylamine in water and air by combining liquid chromatography and solid-phase microextraction with on-fiber derivatization.	
Apéndice 6. An evaluation of solid phase microextraction for aliphatic amines using derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and liquid chromatography.	
Apéndice 7. Application of solid-phase microextraction combined with derivatization to the determination of amphetamines by liquid chromatography.	
Apéndice 8. Application of solid-phase microextraction combined with derivatization to the enantiomeric determination of amphetamines.	
Apéndice 9. An optimized headspace-solid phase microextraction-gas chromatography-flame ionization detector procedure for the estimation of the main legislated VOCs in water samples.	
Apéndice 10. On-fibre solid-phase microextraction versus in-tube solid-phase microextraction for the screening analysis of triazines in water samples.	
Apéndice 11. In-tube SPME-capillary liquid chromatography as a solution to the screening analysis of organophosphorous pesticides in untreated environmental water samples.	

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Número de publicaciones sobre SPME en revistas científicas de ámbito internacional frente a cada año desde 1991 a 2005.....	11
Figura 2. Porcentajes de publicaciones sobre aplicaciones de la SPME a diversas muestras...	11
Figura 3. Esquema del dispositivo comercial de SPME.....	12
Figura 4. Comparación de los mecanismos de extracción por absorción y adsorción.....	13
Figura 5. Isoterma de Langmuir.....	17
Figura 6. Esquema de la extracción sobre una fibra de SPME revestida con un sólido poroso	20
Figura 7. Esquema del proceso de SPME acoplada a CL o a CG; (a) inmersión directa; (b) espacio de cabeza; (c) desorción con disolventes; (d) desorción térmica.....	23
Figura 8. Esquema del acoplamiento SPME-CG.....	24
Figura 9. Esquema del acoplamiento SPME en fibra-CL.....	25
Figura 10. Esquema de los tres tipos de capilares de extracción en tubo: (A) capilar convencional, (B) varilla en tubo y (C) fibra en tubo.....	26
Figura 11. Esquema del acoplamiento SPME en tubo- CL (en posición de extracción).....	27
Figura 12. Esquema del acoplamiento SPME en tubo- CG.....	29
Figura 13. Esquema del acoplamiento SPME en tubo-EC.....	30
Figura 14. Recuperaciones teóricas de los analitos en SBSE y SPME de una muestra de 10 mL en función de su $\log K_{o/w}$	31
Figura 15. Esquema del sistema de SBSE.....	32
Figura 16. Porcentajes de publicaciones sobre aplicaciones de SPME y derivatización a diferentes analitos.....	44
Figura 17. (A) Bomba de aire, (B) Medidor de flujo, (C) Bomba de detección de gases.....	65
Figura 18. Interfase de SPME-HPLC comercializada por Supelco.....	65
Figura 19. Soportes para fibras reemplazables de SPME aplicada a CG y CL.....	66
Figura 20. Espectrofotómetro de fila de diodos UV-vis HP 8452 conectado a un PC Hewlett Packard Vector XM 5/90.....	66
Figura 21. (A) Equipo cromatográfico HP 1100, (B) Detectores UV/vis y fluorímetro.....	67
Figura 22. Sistema de cromatografía líquida capilar HP 1100.....	67
Figura 23. Sistema de cromatografía de gases Focus GC Termo Finnigan.....	68
Figura 24. Sistema SPME en fibras-CL utilizado en los Apéndices 1, 2, 5-8 y 10.....	69
Figura 25. Esquema de columnas acopladas empleado en los Apéndices 3 y 4.....	69
Figura 26. Esquema para la volatilización y muestreo de patrones de TMA.....	70
Figura 27. Esquema para la generación de muestras sintéticas de aire en el Apéndice 4.....	70
Figura 28. Esquema de SPME en tubo con columna empaquetada acoplada a la CL capilar utilizado en el Apéndice 10.....	71
Figura 29. Esquema de SPME en tubo con columna abierta acoplada a CL capilar utilizado en los Apéndices 10 y 11.....	71
Figura 30. Cromatogramas obtenidos para un blanco de muestra (agua) con (a) fibra de PDMS/DVB de 60 μm , (b) fibra de CW/DVB y (c) fibra de CW/TPR, y (d) cromatograma obtenido para una disolución estándar de MA (20.0 $\mu\text{g/mL}$) con la fibra de CW/TPR. Detección: UV a 230 nm.....	77
Figura 31. Cromatogramas obtenidos para (a) un blanco (agua), y (b) una disolución estándar de MA (40.0 $\mu\text{g/mL}$). Tiempo de adsorción, 15 min; tiempo de reacción, 2 min; concentración de FMOC, 1mM; tiempo de desorción, 5 min. Sorbente de la fibra, CW-TPR. Detección: fluorimétrica, $\lambda_{\text{excitación}}$ 264 nm y $\lambda_{\text{emisión}}$ 313 nm.....	78

Figura 32. Efecto de las variables experimentales sobre las respuestas de MA-FMOC: (a) tiempo de adsorción, (b) concentración de FMOC y (c) tiempo de reacción. Concentración de MA en las muestras, 5.0 µg/mL. Sorbente de la fibra, CW-TPR. Detección: fluorimétrica, $\lambda_{\text{excitación}}$ 264 nm y $\lambda_{\text{emisión}}$ 313 nm.....	80
Figura 33. Cromatogramas obtenidos para la MA (a) transferida directamente desde la interfase SPME-HPLC a la columna analítica y (b) transferida desde la interfase SPME-HPLC a la precolumna y después a la columna analítica. Concentración de MA, 5.0 µg/mL. Sorbente de la fibra, CW-TPR. Detección: fluorimétrica, $\lambda_{\text{excitación}}$ 264 nm y $\lambda_{\text{emisión}}$ 313 nm..	83
Figura 34. Cromatogramas obtenidos para disoluciones estándar que contienen mezclas de aminas alifáticas: (a) MA, dimetilamina (DMA) y dietilamina (DEA), (b) <i>n</i> -butilamina (BuA) y <i>n</i> -pentilamina (PenA) y (c) etilamina (EA), propilamina (PA) y trimetilamina. Concentración de cada amina en las muestras, 5.0 µg/mL. Sorbente de la fibra, CW/TPR. Detección: fluorimétrica, $\lambda_{\text{excitación}}$ 264 nm y $\lambda_{\text{emisión}}$ 313 nm.....	85
Figura 35. Esquemas de reacción para la derivatización de aminas (a) con FMOC (aminas primarias y secundarias), y (b) con OPA-NAC (sólo aminas primarias).....	88
Figura 36. Optimización de las condiciones de reacción entre la DMA y el FMOC: (a) efecto de la concentración de reactivo, para un tiempo de reacción de 5 min; (b) efecto del tiempo de reacción, para una concentración de FMOC de 5 mM	89
Figura 37. Cromatogramas obtenidos para (a) un blanco (agua) y (b) una disolución estándar de DMA (5 µg/mL) mediante el método de derivatización con FMOC sobre la fibra. Los picos a 7.1 y 11.6 min corresponden a FMOC no reaccionado y a un producto de condensación, respectivamente. Concentración final de FMOC en la mezcla de reacción 3.3 mM; tiempo de reacción, 5 min	90
Figura 38. Cromatogramas obtenidos para disoluciones estándar conteniendo mezclas de las aminas alifáticas de cadena corta probadas: (a) etilamina (EA) y PA; (b) <i>n</i> -butilamina (BuA) y <i>n</i> -pentilamina (PenA); (c) metilamina (MA), DMA y dietilamina (DEA). Concentración de cada amina en las muestras, 5.0 µg/mL. Concentración final de FMOC en la mezcla de reacción 3.3 mM; tiempo de reacción, 5 min.....	91
Figura 39. Efecto de la concentración de OPA-NAC sobre las respuestas obtenidas para la PA. Concentración de PA, 5 µg/mL; tiempo de reacción, 5 min.....	93
Figura 40. Cromatogramas obtenidos para la PA (5.0 µg/mL) (a) por el método de FMOC, y (b) por el método del OPA-NAC/FMOC; (c) cromatograma obtenido para la DMA (5.0 µg/mL) por el método del OPA-NAC/FMOC. Reacción con OPA-NAC: concentración final de OPA-NAC, 13.5 mM; tiempo de reacción, 5 min. Reacción con FMOC: concentración final de FMOC 3.3 mM; tiempo de reacción, 5 min.....	93
Figura 41. Cromatograma obtenido para una muestra de agua residual mediante el método optimizado del OPA-NAC/FMOC.....	95
Figura 42. Cromatogramas obtenidos para (a) un blanco (agua) y (b) una disolución estándar que contiene 2.5 µg/mL de TMA.....	101
Figura 43. Cromatogramas obtenidos para (a) agua de mar, y (b) agua de mar fortificada con 1.0 µg/mL de TMA, después de SPE.....	104
Figura 44. Cromatogramas obtenidos para (a) un blanco de aire, y (b) aire que contiene 11.1 mg/m ³ de TMA.....	107
Figura 45. (a) Cromatograma obtenido para una mezcla de (1) metilamina, (2) etilamina, (3) propilamina, (4) dimetilamina, (5) butilamina, y (6) dietilamina bajo las condiciones propuestas, y (b) cromatograma obtenido para la misma mezcla inyectando el reactivo 0.1 min después de la inyección de la muestra.....	109
Figura 46. Efecto de las variables experimentales sobre las respuestas de TMA-FMOC (las barras de error significan \pm 1S.D. desde la media de n = 3): (a) concentración de FMOC, (b) pH, (c) tiempo de adsorción de FMOC, (d) tiempo de adsorción de TMA, (e) tiempo de	

desorción, y (f) tiempo de volatilización.....	112
Figura 47. Cromatogramas obtenidos para: (a) blanco (agua) bajo las condiciones optimizadas, (b) un patrón de TMA (5 µg/mL) bajo las condiciones optimizadas, y (c) un patrón de TMA (7.5 µg/mL) por el método de derivatización en disolución.....	113
Figura 48. Cromatogramas obtenidos para (a) blanco de aire y (b) aire que contiene 200 mg/m ³ de TMA.	114
Figura 49. Áreas medias de pico obtenidas para las aminas con los tres métodos de SPME/derivatización probados. Método 1: extracción de la amina seguida de la derivatización sobre la fibra; Método 2: derivatización en disolución seguida de la extracción del derivado; Método 3: extracción/derivatización sobre la fibra recubierta de reactivo. Concentración de MA y DMA, 1 mg/L; concentración de TMA, 5 mg/L.....	125
Figura 50. Perfiles de área de pico vs concentración de amina para la MA y la DMA obtenidos mediante el método de extracción/derivatización sobre la fibra recubierta de reactivo.....	126
Figura 51. Cromatogramas obtenidos para: (a) un blanco (agua), (b) una disolución que contiene 10 mg/L de TMA, y (c) una disolución que contiene una mezcla de MA y DMA (1 mg/L, de cada una). El pico de 6.9 min corresponde a FMOC no reaccionado.....	127
Figura 52. Cromatogramas obtenidos para (a) un blanco (agua), y (b) un patrón que contiene AP, MA y MDMA (5.0 µg/mL de cada una) por el método de SPME seguida de derivatización sobre la fibra.....	133
Figura 53. Cromatogramas obtenidos para (a) un blanco (agua), y (b) un patrón que contenía AP, MA y MDMA (5.0 µg/mL de cada una) por el método de derivatización en disolución/SPME.....	136
Figura 54. Cromatogramas obtenidos para (a) blanco de orina, y (b) orina fortificada con AP, MA y MDMA (10.0 µg/mL, de cada una) por el método de derivatización en disolución/SPME.....	138
Figura 55. Esquemas de los procedimientos probados de extracción/derivatización: (a) SPME del analito seguida de la derivatización sobre la fibra, (b) extracción/derivatización de la anfetamina con fibras recubiertas de OPA-NAC y (c) derivatización en disolución seguida de SPME de los derivados formados.....	142
Figura 56. Cromatogramas obtenidos para anfetamina racémica (7.5 µg/mL, de cada isómero) por las diferentes aproximaciones de extracción/derivatización probadas: (a) SPME del analito seguida de la derivatización sobre la fibra, (b) extracción/derivatización de la anfetamina con fibras recubiertas de OPA-NAC y (c) derivatización en disolución seguida de SPME de los derivados formados.....	143
Figura 57. Cromatogramas obtenidos con el procedimiento propuesto de derivatización en disolución/SPME para (a) un blanco (agua), (b) anfetamina en agua y (c) una mezcla de norefedrina y MDA en agua (2.5 µg/mL de cada enantiómero)	144
Figura 58. Cromatogramas obtenidos con el procedimiento propuesto de derivatización en disolución/SPME para: (a) blanco de orina y (b) orina fortificada con norefedrina y MDA (7.5 µg/mL, de cada isómero).....	147
Figura 59. Cromatogramas obtenidos tras la administración de una dosis de 30 mg de hidrocloreuro de norefedrina: sujeto 1 (a) inmediatamente y (b) 4.5 h después de la administración de la droga; sujeto 2 (c) inmediatamente y (d) 11 h después de la administración de la droga.....	148
Figura 60. Cromatogramas obtenidos para orina bajo diferentes aproximaciones de extracción/derivatización: (a) SPE con un cartucho con fase C ₁₈ seguida de derivatización en disolución, (b) derivatización asistida en soporte sólido en una precolumna empaquetada con fase C ₁₈ , y (c) el método propuesto de derivatización en disolución/SPME.....	151
Figura 61. Cromatogramas obtenidos con C1 para la disolución MIX 2: (a) inyección directa (2 µL) y (b) HS-SPME (10 min tiempo de adsorción; 2 min tiempo de desorción).	

Concentración de cada VOC, 1 µg/mL.....	157
Figura 62. Optimización de los parámetros relacionados con el muestreo en el espacio de cabeza, (a) tiempo de adsorción, (b) temperatura de extracción, y (c) volumen de muestra.....	158
Figura 63. Cromatogramas obtenidos para los distintos VOCs con C1: (a) MIX 1 con 1 µg/mL de cada compuesto, (b) patrón de 0.01 µg/mL de pentaclorobenceno y (c) MIX 2 con 0.5 µg/mL de cada compuesto.....	163
Figura 64. Cromatogramas obtenidos para los distintos VOCs con C2: (a) MIX 2 con 1 µg/mL de cada compuesto, (b) patrón de 0.001 µg/mL de pentaclorobenceno y (c) MIX 1 con 1 µg/mL de cada compuesto.....	163
Figura 65. Representación de log K_{ow} frente al log del tiempo de retención (min) obtenido con la columna C2 para cada analito: (1) 1,2-dicloroetano, (2) pentaclorobenceno, (3) tricloro metano, (4) benceno, (5) tetraclorometano, (6) tricloroetileno, (7) tolueno, (8) tetracloroetileno, (9) clorobenceno, (10) etilbenceno, (11) m,p-xileno, (12) o-xileno, (13) 1,3-dicloroetileno, (14) 1,4-dicloroetileno y (15) 1,2-dicloroetileno.....	164
Figura 66. Representación del tiempo de filtrado requerido para las dos fracciones	165
Figura 67. Cromatogramas obtenidos con la columna C2 para una muestra real de agua (a) fracciones no filtradas y (b) fracciones filtradas, en las condiciones óptimas.....	166
Figura 68. Concentraciones determinadas (µg/mL) de VOCs en las diferentes muestras de agua analizadas bajo las condiciones óptimas.....	167
Figura 69. Cromatogramas obtenidos con el procedimiento de SPME sobre la fibra-CL convencional para (a) blanco y (b) mezcla con 1 µg/mL de cada triazina; cromatogramas obtenidos mediante la SPME en tubo con una columna empaquetada para (c) blanco y (d) mezcla con 0.1 µg/mL de cada triazina; cromatogramas obtenidos mediante SPME en tubo con columna abierta para (e) blanco y (f) mezcla de 0.1 µg/mL de cada triazina.....	181
Figura 70. Efecto de la presencia de ácido húmico en la adsorción de triazinas sobre la fibra (1 µg/mL de cada triazina). Tiempo de adsorción 45 min y tiempo de desorción 10 min.....	182
Figura 71. Optimización del volumen de muestra para un patrón de 100 µg/L de cada triazina en el método de SPME en tubo con una columna abierta (a) columna de 0.1 mm de d. i. (C2) y (b) columna de 0.25 mm de d. i. (C1).....	183
Figura 72. Concentraciones de triazinas encontradas en diferentes tipos de aguas analizadas en la bibliografía: [68-71, 76, 82] y legislación Europea (columna rayada).....	185
Figura 73. Cromatogramas obtenidos para (a) agua residual (S5) diluida 5 veces e inyectada directamente, y (b) agua residual (S5) no diluida, analizada mediante el procedimiento basado en SPME sobre la fibra.....	188
Figura 74. Cromatogramas obtenidos mediante el procedimiento de SPME en tubo con columna abierta de 0.25 µm de espesor de capa para las muestras (a) S15 y (b) S17.....	193
Figura 75. Cromatogramas obtenidos en las condiciones óptimas para los compuestos organofosforados con (a) capilar de 0.1 mm de d.i. y 0.1 µm de espesor de capa, y (b) capilar de 0.25 mm de d.i. y 0.25 µm de espesor de capa; para las triazinas con (c) capilar de 0.1 mm de d.i. y 0.1 µm de espesor de capa, y (d) capilar de 0.25 mm de d.i. y 0.25 µm de espesor de capa; y (e) para los PAHs y el nonilfenol con capilar de 0.25 mm de d.i. y 0.25 µm de espesor de capa. Concentración de pesticidas organofosforados y triazinas, 0.1 µg/mL (de cada uno); concentración de PAHs y nonilfenol, 0.05 µg/mL.....	197
Figura 76. Cromatogramas obtenidos en las condiciones óptimas con el capilar de 0.25 mm de d.i. y 0.25 µm de espesor de capa para (a) dos réplicas de la muestra S10, (b) muestra S10 aditivada con los pesticidas organofosforados (0.1 µg/mL de cada uno), y (c) muestra S10 aditivada con las triazinas (0.05 µg/mL de cada una).....	201
Figura 77. Cromatogramas obtenidos en las condiciones óptimas para muestras residuales....	202
Figura 78. Gráfico de puntuaciones con dos componentes principales.....	221
Figura 79. Gráfico de puntuaciones con tres componentes principales.....	221

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de las fibras disponibles comercialmente.....	14
Tabla 2. Clasificación de contaminantes de las aguas en función de su naturaleza.....	34
Tabla 3. Normativa vigente en materia de aguas.....	36
Tabla 4. Legislación vigente en materia de contaminación atmosférica.....	38
Tabla 5. Normativa legal relacionada con la calidad del aire interior.....	40
Tabla 6. Valores límites ambientales y métodos de referencia para aminas en agua y en aire.	42
Tabla 7. Concentraciones máximas legisladas para los parámetros y tipos de muestras estudiadas.....	51
Tabla 8. Listado de reactivos, casas comerciales y pictogramas de seguridad.....	63
Tabla 9. Comparación entre los procedimientos utilizados para la extracción y derivatización de MA con los métodos de derivatización sobre la fibra de SPME y de derivatización asistida sobre un soporte sólido.....	81
Tabla 10. Exactitud para la determinación de MA mediante los métodos de derivatización sobre una fibra de SPME y de derivatización asistida sobre soporte sólido (n = 3).....	84
Tabla 11. Exactitud para la determinación de DMA mediante el método optimizado del OPA-NAC/FMOC (n = 3).....	94
Tabla 12. Programa de tiempos y condiciones usadas en la determinación de TMA.....	99
Tabla 13. Exactitud para la determinación de TMA (n= 3).....	103
Tabla 14. Datos analíticos obtenidos para la TMA en aire.....	108
Tabla 15. Procedimiento optimizado para la extracción mediante SPME/derivatización sobre la fibra de TMA con FMOC.....	113
Tabla 16. Datos analíticos para la determinación de TMA.....	115
Tabla 17. Exactitud para la determinación de TMA en diferentes tipos de muestras.....	117
Tabla 18. Comparación de las ecuaciones de calibración obtenidas para la MA, la DMA y la TMA por los diferentes procedimientos ensayados.....	127
Tabla 19. Optimización del método seleccionado de SPME/derivatización. Los valores subrayados corresponden a los valores seleccionados en el procedimiento final.....	128
Tabla 20. Datos analíticos para la determinación de MA, DMA y TMA por el método propuesto de derivatización sobre la fibra de SPME.....	129
Tabla 21. Resultados obtenidos del análisis de agua de consumo y agua de río fortificadas con MA, DMA y TMA (n = 3).....	130
Tabla 22. Eficacias de los métodos de SPME/derivatización sobre la fibra y derivatización en disolución/SPME (n= 3).....	134
Tabla 23. Datos analíticos para la determinación de AP, MA y MDMA en agua por el método de SPME/derivatización sobre la fibra.....	135
Tabla 24. Datos analíticos para la determinación de AP, MA y MDMA en agua y en orina por el método de derivatización/SPME.....	137
Tabla 25. Datos analíticos para la determinación de anfetamina, MDA y norefedrina en agua y en orina por el método de derivatización en disolución/SPME.....	146
Tabla 26. Exactitud en la determinación de anfetaminas en orina aditivada.....	149
Tabla 27. Datos analíticos de las diferentes aproximaciones para determinar anfetaminas en agua y orina.....	150
Tabla 28. Compuestos orgánicos volátiles seleccionados como analitos.....	155
Tabla 29. Datos analíticos obtenidos para los VOCs mediante las dos columnas evaluadas ...	160
Tabla 30. Exactitud para la determinación de VOCs en agua destinada al consumo humano..	162
Tabla 31. Resumen de las concentraciones encontradas ($\mu\text{g/L}$) en el análisis de muestras reales (n= 2).....	168

Tabla 32. Concentraciones máximas permitidas por la legislación europea y americana para triazinas en función del tipo de agua.....	176
Tabla 33. Características de los procedimientos de extracción de triazinas descritos en la bibliografía.....	177
Tabla 34. Triazinas seleccionadas como analitos.....	179
Tabla 35. Recuperaciones de los procedimientos de SPME sobre la fibra y SPME en tubo....	184
Tabla 36. Características analíticas de los procedimientos estudiados.....	186
Tabla 37. Concentraciones encontradas de triazinas y exactitud en diferentes tipos de muestras analizadas mediante los procedimientos estudiados (n= 3).....	189
Tabla 38. Programa de longitudes de onda de excitación y de emisión para el detector de fluorescencia.....	194
Tabla 39. Eficacias obtenidas con las dos columnas capilares de CG evaluadas para la SPME en tubo (n= 6).....	196
Tabla 40. Datos analíticos obtenidos con las dos columnas ensayadas para los analitos.....	198
Tabla 41. Resumen de los tiempos de retención y concentraciones encontradas de los analitos y otros contaminantes potenciales en muestras reales de agua mediante la SPME en tubo con el capilar de 0.25 mm de d.i. y 0.25 μ m de espesor de sorbente.....	203
Tabla 42. Principales características de los métodos propuestos en esta Tesis.....	215
Tabla 43. Ventajas de los métodos propuestos para el análisis de muestras líquidas (a mayor número de asteriscos *, mejor condición).....	218
Tabla 44. Ventajas de los métodos propuestos para el análisis de muestras gaseosas (a mayor número de asteriscos *, mejor condición).....	222

LISTADO DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

% CV	Coefficiente de variación (%)
% Er	Error relativo (%)
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{exc}	Longitud de onda de excitación
AP	Anfetamina
BuA	Butilamina
Car	Carboxen
CL	Cromatografía Líquida
CG	Cromatografía de Gases
Conc.	Concentración
CW	Carbowax
DAD	Detector de fila de diodos
DEA	Dietilamina
DER	Desviación estándar residual
d. i.	Diámetro interno
DMA	Dimetilamina
DNB	Dinitrobenzoilo
Dns-Cl	Cloruro de dansilo
d.s.r.	Desviación estándar relativa
DVB	Divinilbenceno
EA	Etilamina
EC	Electroforesis Capilar
ECD	Detector de captura electrónica
EPA	Agencia de Protección Medioambiental
FID	Detector de ionización en llama
FMOC	9-Fluorenilmetil cloroformiato
HA	Ácidos húmicos
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HS	Espacio de cabeza
IL	Intervalo lineal
INSHT	Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo
LDC	Límite de cuantificación
LDD	Límite de detección
LLE	Extracción líquido-líquido
LLME	Microextracción líquido-líquido
LPME	Microextracción en fase líquida
MA	Metanfetamina
MA	Metilamina
MDMA	3,4-Metilendioxitetanfetamina
MEPS	Microextracción sobre jeringa empaquetada
MIP	Polímeros de impresión molecular
MS	Espectrometría de masas
n	Número de puntos

NAC	N-Acetil-L-cisteína
OPA	<i>o</i> -ftaldialdehído
OSHA	Administración Ocupacional de la Seguridad y la Salud
PA	Propilamina
PAH	Hidrocarburo aromático policíclico
PDFS	Polidifenilsiloxano
PDMS	Polidimetilsiloxano
PenA	Pentilamina
QA	Química Analítica
RPLC	Cromatografía líquida de fase inversa
s	segundo
SBSE	Extracción por sorción sobre barras magnéticas
SDME	Microextracción sobre una sola gota
SPME	Microextracción en fase sólida
SPD	Dispersión en fase sólida
SPDE	Extracción dinámica en fase sólida
SPE	Extracción en fase sólida
SRM	Material de referencia certificado
s/S.D.	Desviación estándar
SWC	Cromatografía con agua en estado subcrítico
SWE	Extracción con agua en estado subcrítico
TEA	Trietilamina
TMA	Trimetilamina
TPR	Plantilla de resina
TSD	Detector termoiónico específico
UE	Unión Europea
UV	Ultravioleta
VLA-EC	Valor límite ambiental de exposición corta
VLA-ED	Valor límite ambiental de exposición diaria
VOC	Compuesto orgánico volátil
W	Agua
WHO	Organización Mundial de la Salud

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los compuestos orgánicos se caracterizan por tener una estructura molecular específica partiendo de unos pocos elementos como C, H, O, N, y en algunos casos de S, P y halógenos. Por tanto, es fácil comprender la complejidad que implica la determinación individual de los mismos. Por otro lado no son muy numerosos los detectores disponibles para el análisis de compuestos orgánicos y de ellos muy pocos son específicos. Esto hace que la mayor parte del peso del análisis recaiga en la preparación de la muestra, donde se ha de conseguir la separación de los analitos de la matriz y de otras sustancias interferentes. Esta preparación englobará, en general, tres etapas: extracción, preconcentración y limpieza.

El análisis de algunos compuestos, por sus propiedades físico-químicas, resulta especialmente complejo ya sea por su difícil extracción o por no disponer en el laboratorio de una técnica adecuada que permita su estimación final con los límites de detección adecuados. En estos casos, el empleo de procesos de derivatización para transformarlos en otros compuestos de más fácil análisis es la solución más adecuada.

La demanda actual de métodos analíticos rápidos, de coste adecuado, limpios y suficientemente sensibles para poder controlar la contaminación en medioambiente y establecer las concentraciones requeridas en análisis clínicos, es significativa.

Esta Tesis va dirigida al estudio del acoplamiento microextracción en fase sólida (SPME)-cromatografía. El grupo de investigación en el momento de plantearse la presente investigación tenía una larga tradición en extracción en fase sólida, y en cromatografía convencional y de columnas acopladas, por lo que el paso a la microextracción se orientó a la miniaturización, que era uno de los objetivos de la Química Analítica de aquel momento y del presente. La SPME nació en la década de los 90 de la mano del profesor Pawliszyn y todavía presenta un crecimiento exponencial en el número de publicaciones científicas (Figura 1, pág. 11 del Capítulo 1-Introducción). La Tesis abarca aspectos poco tratados en la bibliografía como se verá en el capítulo de Introducción: formación de derivados en la fibra y acoplamiento SPME-cromatografía líquida (CL). Se estudian las configuraciones SPME con fibras-CL convencional y SPME en tubo-CL capilar. También aborda el acoplamiento más utilizado SPME-cromatografía de gases con el objeto de contrastarlo con los estudiados.

Los analitos han sido elegidos por sus propiedades de toxicidad y por revestir interés clínico y/o medioambiental.

Los proyectos concedidos al grupo de investigación y las becas disfrutadas, han sido el marco de esta Tesis:

- **Proyecto PPQ2000-01641** concedido por el Ministerio de Ciencia y Tecnología: “Métodos totales de análisis de aminas en matrices de interés medioambiental”. Período de vigencia: 28-12-2000 a 27-12-2003.

- **Proyecto BQU2003-06138** concedido por el Ministerio de Ciencia y Tecnología: “Métodos totales de análisis de amoníaco, aminas y triazinas en matrices de interés ambiental: convencional, micro y nano”. Período de vigencia: 15-11-2003 a 14-11-2006.

- **Proyecto CTQ2004-03088/BQU** concedido por el Ministerio de Educación y Ciencia: “Métodos enantioselectivos para el control analítico de pesticidas: aplicación a la estimación del impacto ambiental y al desarrollo de nuevos productos”. Período de vigencia: 13-12-2004 a 13-12-2005.

- **Beca predoctoral FPU (2003-2006)** concedida por el Ministerio de Educación y Cultura de España.

Los **objetivos específicos** desarrollados se ajustan al siguiente esquema:

1. **Microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía líquida convencional y derivatización:** 1.1. Análisis de metilamina mediante microextracción en fase sólida y cromatografía líquida después de su derivatización sobre la fibra con 9fluorenilmetil cloroformiato (**Apéndice 1**). 1.2. Un nuevo método selectivo para el análisis de dimetilamina en agua por comatografía líquida utilizando microextracción en fase sólida y derivatización en dos etapas con *o*-ftalaldialdehido y 9-fluorenilmetil cloroformiato (**Apéndice 2**). 1.3. Determinación de trimetilamina en agua mediante cromatografía líquida (**Apéndice 3**). 1.4. Determinación selectiva de trimetilamina en aire mediante cromatografía líquida usando cartuchos de extracción en fase sólida para el muestreo (**Apéndice 4**). 1.5. Estudio comparativo de la determinación de trimetilamina en agua y aire combinando microextracción en fase sólida y cromatografía líquida con derivatización sobre la fibra (**Apéndice 5**). 1.6. Evaluación de la microextracción en fase sólida para aminas alifáticas utilizando derivatización con 9-fluorenilmetil cloroformiato y cromatografía líquida (**Apéndice 6**). 1.7. Aplicación de la microextracción en fase sólida combinada con la derivatización para la determinación de anfetaminas por cromatografía líquida (**Apéndice 7**). 1.8. Aplicación de la microextracción en fase sólida combinada con la derivatización para la determinación enantiomérica de anfetaminas (**Apéndice 8**).

2. **Microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía de gases:** 2.1. Procedimiento optimizado para la estimación de los principales VOCs legislados en muestras de agua mediante SPME en espaciado de cabeza acoplada a cromatografía de gases y detector de ionización de llama (**Apéndice 9**).

3. **Microextracción en fase sólida acoplada en línea a cromatografía líquida capilar:** 3.1. Análisis de screening de triazinas en muestras de agua mediante SPME sobre la fibra y SPME en tubo con columna empaquetada y abierta (**Apéndice 10**). 3.2. Screening de triazinas y pesticidas organofosforados mediante SPME en tubo con columna abierta (**Apéndice 11**).

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CONSIDERACIONES SOBRE EL TRATAMIENTO DE MUESTRAS Y LA EXTRACCIÓN DE ANALITOS

Los métodos analíticos generalmente requieren un paso de extracción y preconcentración antes de llevar a cabo la detección de compuestos orgánicos presentes a nivel de trazas en matrices medioambientales y biológicas. El pretratamiento de la muestra mejora la sensibilidad y reduce las interferencias de la matriz. En análisis medioambiental y biomédico se utilizan una gran variedad de técnicas de extracción y preconcentración, incluyendo la extracción líquido-líquido (LLE) [1], la extracción en fase sólida (SPE) [2], la extracción líquido-gas [3] y el equilibrio líquido-gas (como el espaciado de cabeza estático) [4] entre las más habituales.

Una tendencia actual en Química Analítica es la miniaturización. Las técnicas miniaturizadas para el tratamiento de las muestras son: la microextracción líquido – líquido (LLME) [5], la SPE utilizando discos o cartuchos [6, 7], la SPE en línea [8, 9], la SPE sobre una fibra colocada dentro de un tubo [10, 11], la microextracción en fase sólida (SPME) [12], la SPME en tubo [13], la extracción dinámica en fase sólida (SPDE) [14], la microextracción sobre una jeringa empaquetada (MEPS) [15], la microextracción en fase líquida (LPME) [16], la microextracción sobre una sola gota (SDME) [17], la extracción por sorción sobre barras magnéticas agitadoras (SBSE) [18] y la extracción sobre una membrana [19]. Estas técnicas permiten que los análisis sean más rápidos, presentando una mayor capacidad de procesamiento de muestras, un menor consumo de disolvente y muestra, un menor coste por unidad de muestra y una mejora de la sensibilidad. En general, la reducción en el consumo de disolventes contribuye a una reducción significativa de costes. Algunas de estas técnicas permiten realizar análisis de campo. En muchos casos, las técnicas miniaturizadas de preparación de muestras pueden automatizarse y operar en línea con el instrumento de medida. El acoplamiento en línea entre extracción y análisis aumenta la sensibilidad y minimiza las posibles pérdidas de analito.

1.2. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

En la actualidad la SPE es la técnica de preconcentración más utilizada debido a que el consumo de disolventes orgánicos es reducido, los tiempos requeridos para la extracción son cortos y la manipulación de la muestra es pequeña. Además todo el proceso de medida puede automatizarse conectando la SPE en línea con la cromatografía de gases (CG) [20] o con la cromatografía líquida (CL) [21]. La SPE se basa en el principio de la diferente afinidad del analito entre una fase sólida que es el sorbente, y una líquida que es la muestra. Existen diferentes tipos de sorbentes que se seleccionan en función de los analitos que se quieren determinar, y se comercializan en forma de discos o cartuchos. Se pueden diferenciar cinco tipos: de sílices entrelazadas, de carbón [22], poliméricos [23-25], inmunosorbentes, y polímeros de huella molecular [26]. Los analitos retenidos se desorben generalmente con volúmenes pequeños de un disolvente orgánico cuando la SPE se realiza fuera de línea combinada con la CG [27] o con la CL [28], y con

la fase móvil cromatográfica cuando la SPE se acopla en línea con la CL [26]. La SPE es el precedente de la microextracción en fase sólida.

En algunos casos la formación de derivados de los analitos puede mejorar las características analíticas del procedimiento [29]. El procedimiento de derivatización en el interior de cartuchos de SPE propuesto por el grupo de investigación en 1996, consiste en retener los analitos de la muestra en el soporte sólido y a continuación pasar el reactivo a su través; se dejan reaccionar durante un tiempo determinado, y finalmente se eluyen los derivados en un volumen pequeño [30]. *En esta Tesis se ha propuesto un procedimiento para la determinación de trimetilamina (TMA) en agua (Apéndice 3) mediante derivatización en el interior de una precolumna empaquetada con fase C_{18} y conectada en línea a la columna analítica de CL.*

Los métodos tradicionales para determinar las concentraciones de compuestos aromáticos y alifáticos en el aire se basan en el muestreo activo. Este tipo de muestreo se realiza mediante bombas que pasan el aire a través de soportes sólidos a un flujo determinado. A continuación se lleva a cabo la desorción térmica o química. La aproximación más usada consiste en el empleo de un adsorbente apropiado como gel de sílice [31], o un relleno ácido de tipo XAD-7 [32]. Otra posibilidad es el uso de borboteadores que contiene disoluciones ácidas [33], pero la tendencia es reemplazar los métodos de muestreo en disolución por técnicas de extracción sin disolventes. El empleo de cartuchos de SPE es una alternativa rápida y simple para retener las aminas volátiles. *En esta Tesis se describe un método para el análisis de TMA en aire, que se basa en el empleo de cartuchos de SPE con fase de tipo C_{18} para retener el analito y de CL (Apéndice 4).*

1.3. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

1.3.1 EVOLUCIÓN DE LA SPME

En los años 80 los químicos analíticos dieron mucha importancia a las técnicas de preparación de muestras sin disolventes, las cuales se basaban en la extracción por sorción sobre una base de goma. A mediados de los años 80 se investigó la extracción de compuestos orgánicos de una fase acuosa o gaseosa mediante trampas tubulares, abiertas y revestidas con capas gruesas de polidimetilsiloxano (PDMS). Sin embargo, su aplicación quedó limitada debido a su pequeña capacidad de muestreo y a los pequeños volúmenes de autoelución. En 1989, Arthur y Pawliszyn desarrollaron un método de microextracción basado en la sorción sobre PDMS al que llamaron microextracción en fase sólida [34]. Se propuso para solucionar algunos de los problemas relacionados con los métodos tradicionales, por ejemplo, la formación de emulsiones, el elevado consumo de disolventes, efectos de memoria y las altas señales del blanco. Debido a su simplicidad y rendimiento, la SPME despertó un gran interés como técnica de extracción por sorción. Desde su introducción esta técnica se ha extendido mucho, lo que queda reflejado en el número de publicaciones en revistas científicas de gran prestigio que, según la base de datos *Web del Conocimiento (Ciencias)* desde 1991 hasta 2005, es del orden de 2200

publicaciones. La **Figura 1** refleja el crecimiento exponencial en el número de publicaciones en los últimos 15 años. Se han presentado aplicaciones en diferentes campos, incluyendo el medioambiental, el farmacéutico, el biomédico y el agroalimentario [35] como se observa en la base de datos mencionada anteriormente. La **Figura 2** muestra el porcentaje de publicaciones para cada campo, destacando que el más estudiado es el alimentario.

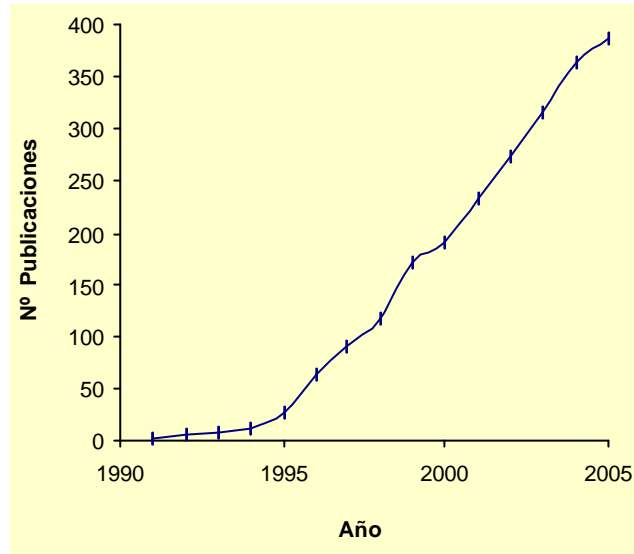


Figura 1. Número de publicaciones sobre SPME en revistas científicas de ámbito internacional frente a cada año desde 1991 a 2005.

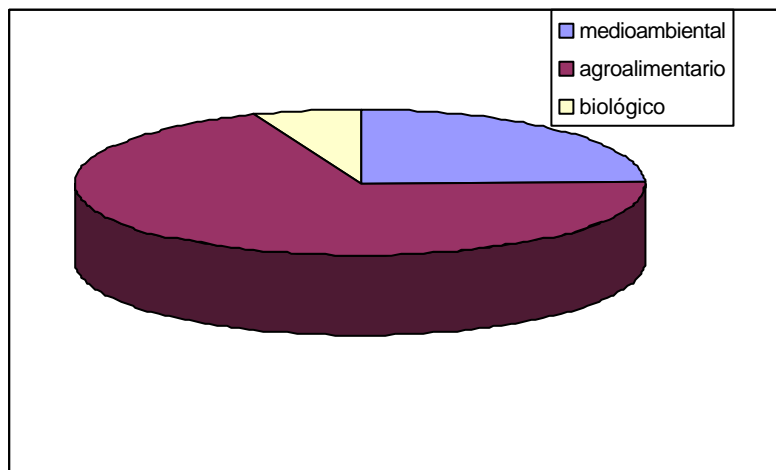


Figura 2. Porcentajes de publicaciones sobre aplicaciones de la SPME a diversas muestras.

1.3.2. FUNDAMENTOS DE LA SPME

La SPME es una técnica de extracción de los analitos de la matriz de la muestra que se caracteriza por ser rápida, barata, limpia y versátil, y que puede acoplarse a la CG o a la CL. Utiliza fibras de sílice fundida revestidas con un polímero para extraer los analitos de las muestras. El pequeño diámetro de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en una jeringa. De esta forma se facilita su manipulación y se protege la fibra cuando no se utiliza. En la **Figura 3** se muestra un dispositivo convencional de SPME. Su diseño hace de ésta una técnica adecuada para el análisis de campo.

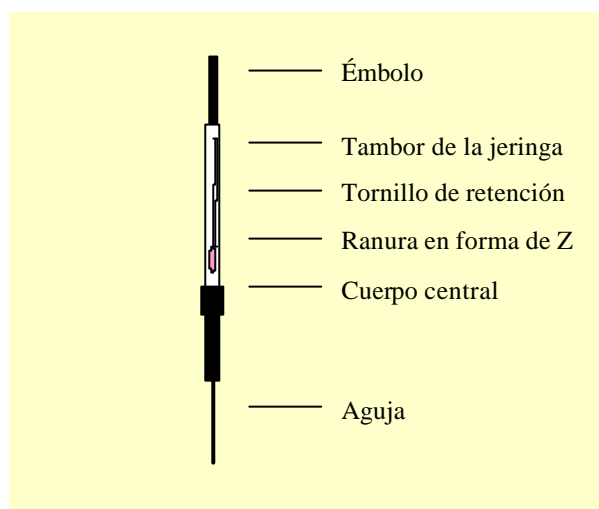


Figura 3. Esquema del dispositivo comercial de SPME.

Esta técnica presenta una serie de ventajas respecto a las técnicas de preconcentración mencionadas anteriormente ya que es una técnica de extracción que no utiliza disolventes y que requiere pequeños volúmenes de muestra. Con sólo tres tipos de materiales adsorbentes se cubre una gran variedad de analitos a determinar en muestras líquidas [36], sólidas [37] o gaseosas [38]. Como inconveniente se puede mencionar que debido a la limitada capacidad de extracción de las fibras (la cantidad de fase estacionaria es muy pequeña) la sensibilidad que puede alcanzarse es también limitada, sobre todo si se acopla a la CL [39].

Existen dos tipos de mecanismos de extracción en función de los distintos sorbentes de SPME disponibles comercialmente. El más usado es el polidimetilsiloxano (PDMS), que es líquido. Las fibras de PDMS y las de poliacrilato (PA) extraen los analitos por absorción, disolviéndolos. El resto de sorbentes, incluyendo PDMS-DVB (divinilbenceno), Carbowax-DVB, Carbowax-TPR (plantilla de resina) y Carboxen (Car)-PDMS, son mezclas de capas, en las que la fase primaria de extracción es un sólido

poroso, y los analitos se extraen por adsorción. Los fundamentos de la adsorción y de la absorción son diferentes. La **Figura 4** presenta los estados inicial y de equilibrio de ambos procesos de extracción. Independientemente de la naturaleza del sorbente, las moléculas de los analitos alcanzan su superficie. El hecho de que migren hacia el interior del sorbente o se queden en la superficie depende de la magnitud del coeficiente de difusión del analito en el sorbente. La difusión de las moléculas orgánicas en PDMS es relativamente rápida, por tanto la difusión en PDMS se produce por absorción. Sin embargo, los coeficientes de difusión de las moléculas orgánicas en DVB y Car son tan pequeños que, en el tiempo de análisis de la SPME, todas las moléculas permanecen en la superficie del sorbente. Estas moléculas orgánicas deberían permanecer en contacto con la capa durante un largo tiempo (días o semanas) para que difundieran hacia el interior del sorbente (distancias muy cortas). Esto se manifestaría durante el análisis en un persistente efecto memoria, difícil de eliminar incluso después de varias desorciones.

Algunas fases se comercializan con espesores diferentes (PDMS 7, 30 y 100 μm) y esto afecta tanto al tiempo de equilibrio como a la sensibilidad del método. El uso de una fibra gruesa requiere un tiempo de extracción más largo pero las recuperaciones son generalmente mayores. El tiempo de extracción para que se alcance el equilibrio es independiente de la concentración de analito en la muestra.

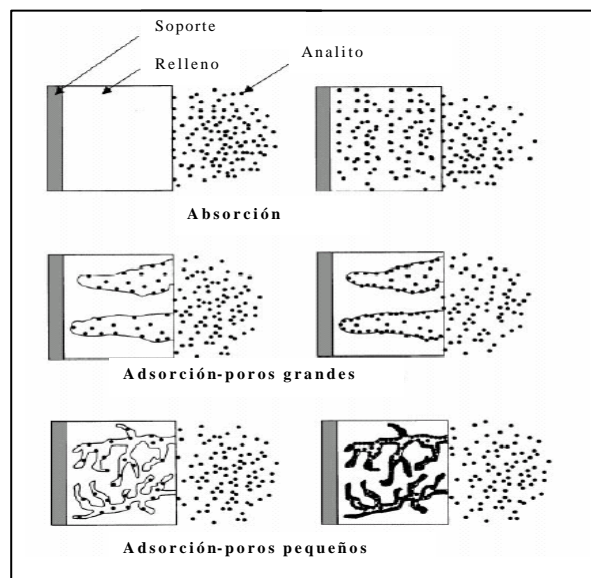


Figura 4. Comparación de los mecanismos de extracción por absorción y adsorción.

En la **Tabla 1** se enumeran los sorbentes poliméricos más comunes que están disponibles comercialmente. Las fases estacionarias están inmobilizadas sin enlaces, o bien están parcialmente o muy entrelazadas. Las fases no enlazadas son estables en algunos disolventes orgánicos miscibles con agua; sin embargo puede producirse una ligera hinchazón si se usa con disolventes no polares. Las fases enlazadas son compatibles con la mayoría de los disolventes orgánicos excepto con los no polares. Las

MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

fases parcialmente entrelazadas son estables en la mayoría de los disolventes miscibles en agua. Las fases muy entrelazadas son equivalentes a las parcialmente entrelazadas, excepto en que tienen algunos enlaces con el centro de la fibra [40].

Tabla 1. Resumen de las fibras disponibles comercialmente.

Sorbente de la fibra	Espesor de la capa (μm)	Polaridad	Descripción de la fase	Máxima Temp. de trabajo ($^{\circ}\text{C}$)	Técnica	Compuestos a analizar
PDMS	100	No polar	No entrelazada	280	CG/HPLC	Volátiles
PDMS	30	No polar	No entrelazada	280	CG/HPLC	No polares - semivolátiles
PDMS	7	No polar	Entrelazada	340	CG/HPLC	Poco polares - semivolátiles
PDMS-DVB	65	Bipolar	Entrelazada	270	CG	Polares volátiles
PDMS-DVB	60	Bipolar	Entrelazada	270	HPLC	General
PDMS-DVB ^a	65	Bipolar	Entrelazada	270	CG	Polares - volátiles
PA	85	Polar	Entrelazada	320	CG/HPLC	Polares - semivolátiles
Carboxen-PDMS	75	Bipolar	Entrelazada	320	CG	Gases y volátiles
Carboxen-PDMS ^a	85	Bipolar	Entrelazada	320	CG	Gases y volátiles
Carbowax-DVB	65	Polar	Entrelazada	265	CG	Polares
Carbowax-DVB ^a	70	Polar	Entrelazada	265	CG	Polares
Carbowax-TPR	50	Polar	Entrelazada	240	HPLC	Tensioactivos
DVB-PDMS-Carboxen	50/30	Bipolar	Entrelazada	270	CG	Volátiles

^aTipo Stableflex se encuentra sobre una fibra de 2 cm de longitud.

1.3.2.1. SPME EN MUESTRAS LÍQUIDAS

Absorción

El principio en el que se basa la SPME es la partición de los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra cuando se alcanza el equilibrio entre ambas fases. La absorción es un proceso no competitivo.

Existen básicamente dos modos de extracción en SPME, introduciendo la fibra directamente en la muestra, o bien en el espacio de cabeza de la muestra. El modelo matemático que explica la dinámica del proceso de absorción cuando la fibra se introduce directamente en la muestra, indica que existe una relación lineal entre el número de moles absorbidos sobre la fibra (n) y la concentración de analito en la fase acuosa (C_0) [41], tal como se recoge en la siguiente ecuación:

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_s}{K_{fs} V_f + V_s} \quad (1)$$

donde K_{fs} es el coeficiente de partición entre la fibra y la muestra, y V_f y V_s son los volúmenes de fibra y de muestra, respectivamente. Si en la ecuación anterior se asume que generalmente el volumen de la fibra es mucho más pequeño que el de la muestra ($V_f \ll V_s$):

$$n = K_{fs} V_f C_o \quad (2)$$

Esta aproximación no es válida en el caso de que los analitos tengan elevada afinidad por la fibra y se utilicen volúmenes de muestra pequeños.

El modelo matemático para la SPME cuando los analitos se extraen del espacio de cabeza tiene en cuenta una tercera fase gaseosa [42]. La cantidad de analito extraída en el sorbente está relacionada con el equilibrio de los analitos en las tres fases. La cantidad total de analito debe mantenerse constante durante la extracción:

$$C_o V_2 = C_1^\infty V_1 + C_2^\infty V_2 + C_3^\infty V_3 \quad (3)$$

donde C_o es la concentración inicial del analito en la muestra acuosa; C_1^∞ , C_2^∞ , C_3^∞ son las concentraciones en el equilibrio del analito en el sorbente, en la solución acuosa y en el espacio de cabeza, respectivamente; V_1 , V_2 , V_3 son los volúmenes de sorbente, de la solución acuosa y del espacio de cabeza, respectivamente. Se define el coeficiente de partición sorbente/gas como $K_1 = C_1^\infty / C_3^\infty$ y el coeficiente de partición gas/agua como $K_2 = C_3^\infty / C_2^\infty$. K es el coeficiente de partición entre la fibra y la disolución. La cantidad de analito absorbida sobre el sorbente (n) puede expresarse como:

$$n = \frac{C_o V_1 V_2 K}{K V_1 + K_2 V_3 + V_2} \quad (4)$$

Comparando la ecuación (4) con la ecuación (1), observamos que exceptuando el término extra de $K_2 V_3$, el cual está relacionado con la capacidad ($C_3^\infty V_3$) del espacio de cabeza, las dos ecuaciones son idénticas. Para la mayoría de los analitos K_2 es relativamente pequeña y el muestreo en el espacio de cabeza no afectará la cantidad de analito retenida en el sorbente si el volumen del espacio de cabeza es mucho menor que el volumen de la solución acuosa ($V_3 \ll V_2$). Asumiendo también que $V_1 \ll V_2$ resulta la expresión:

$$n = K V_1 C_o \quad (5)$$

Concluyendo, en las ecuaciones (2) y (5) la cantidad de analito adsorbida sobre la fibra (n) depende de la concentración inicial en la muestra (C_o).

La cinética del proceso es otra cuestión a tener en cuenta en SPME. Los analitos deben transportarse desde la matriz de la muestra hasta el sorbente en el muestreo por inmersión, o desde la matriz de la muestra al espacio de cabeza y de allí a la fibra en el muestreo en espacio de cabeza. Algunos compuestos con elevado coeficiente de partición

entre el sorbente y la fase acuosa requieren tiempos largos de muestreo. Esto es debido a que un gran número de moléculas de analito tienen que atravesar una capa estática de agua con un coeficiente de difusión muy bajo para llegar al sorbente. Esta limitación cinética se puede solucionar mediante técnicas de agitación eficaces como la sonicación. Los tiempos de muestreo pueden reducirse sustancialmente mediante el muestreo indirecto en el espacio de cabeza, ya que la difusión de los analitos en la fase gaseosa es 4 órdenes de magnitud mayor que en la fase acuosa. El equilibrio entre la fase acuosa y la fase gaseosa se puede conseguir rápidamente mediante agitación constante de la muestra acuosa, de modo que continuamente se esté generando una superficie nueva. El muestreo en el espacio de cabeza permite aplicar la SPME a muestras con matrices más complejas [43].

Adsorción

La adsorción es el otro proceso físico-químico de muestreo que se produce al utilizar fibras revestidas con fases sólidas porosas. En este proceso se establece una competencia entre los analitos por los sitios disponibles en la fibra para la adsorción, ya que éstos son limitados. Por tanto, la relación entre la concentración de un analito en la muestra y la cantidad extraída con la fibra no mantiene la linealidad para un intervalo muy amplio de concentraciones.

El modelo matemático se desarrolló para las fibras PDMS-DVB, Carbowax-DVB y Carbowax-TPR [44]. La dependencia entre la concentración en el equilibrio de un analito asociado a un adsorbente y su concentración en disolución obedece a la isoterma de adsorción de Langmuir, como podemos ver en la **Figura 5**. En este modelo, el sorbente tiene un limitado número de sitios de adsorción. Se aplican las siguientes suposiciones: 1) la molécula se adsorbe en un estado inmóvil; 2) todos los sitios son equivalentes; 3) en cada sitio sólo se une una molécula, y 4) no hay interacciones entre las moléculas adsorbidas en sitios contiguos, es decir, la constante de equilibrio es independiente del número de moléculas adsorbidas.

La ecuación que define el proceso de extracción por adsorción es la siguiente:

$$n = \frac{K_{fs}^D V_f C_0 V_s (C_{f \max} - C_f)}{K_{fs} V_f + V_s (C_{f \max} - C_f)} \quad (6)$$

donde K_{fs}^D es el coeficiente de distribución del analito entre la muestra y la superficie de la fibra, C_f es la concentración final de analito en la superficie de la fibra y $C_{f \max}$ es la concentración máxima de analito en la superficie de la fibra. Los demás parámetros son los mismos que aparecen en la ecuación (1).

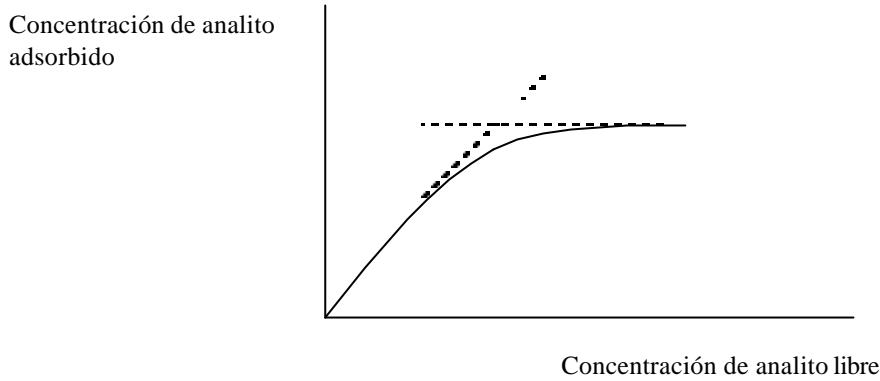


Figura 5. Isoterma de Langmuir

Las fibras empleadas en esta Tesis son de CW-TPR y de PDMS-DVB, y por tanto su mecanismo de extracción se basa en la adsorción. Se estudió la determinación de metilamina en agua mediante SPME con fibras de CW-TPR. Este procedimiento se ha comparado con los resultados obtenidos mediante la derivatización sobre un soporte sólido (**Apéndice 1**). La determinación selectiva de dimetilamina utilizando doble derivatización también se llevó a cabo en muestras reales de agua por inmersión directa de las fibras de CW-TPR (**Apéndice 2**). En el campo medioambiental también se estudió la determinación de trimetilamina en muestras de agua mediante la inmersión de la fibra de CW-TPR, previamente cargada con el reactivo derivatizante, en la muestra de agua (**Apéndice 5**). Las fibras de PDMS-DVB se han utilizado para la extracción de triazinas de muestras de agua también mediante inmersión directa, los resultados se han comparado con otros dos procedimientos de extracción (**Apéndice 10**).

En el campo del análisis clínico se ha abordado la determinación de anfetaminas en muestras de orina y en preparados farmacéuticos mediante SPME por inmersión de fibras de CW-TPR en las muestras (**Apéndice 7**), y como complemento a este trabajo se ha estudiado la determinación enantiomérica de anfetaminas empleando las mismas fibras (**Apéndice 8**).

La SPME por adsorción también puede llevarse a cabo por inmersión directa de la fibra en la muestra como hemos visto anteriormente o por exposición de la fibra al espacio de cabeza. En el segundo tipo de muestreo el balance de masas tiene en cuenta las tres fases, como ya se vió en la ecuación (3). La concentración de analito en la fibra en el equilibrio (C_{fA}^{∞}) se determina aplicando el modelo de Langmuir y la concentración de analito en el espacio de cabeza de la muestra (C_{hA}^{∞}) se determina mediante la ley de Henry (K_{HA}). Ambas concentraciones se sustituyen en la ecuación (3) y se deduce la cantidad de analito extraída con la fibra una vez alcanzado el equilibrio:

$$n = C_{fA}^{\infty} V_f = \frac{K'_A C_{0A} V_s V_f (C_{f \max} - C_{fA}^{\infty})}{V_s + V_h K_{HA} + K'_A V_f (C_{f \max} - C_{fA}^{\infty})} \quad (7)$$

donde V_h es el volumen del espacio de cabeza. Esta ecuación tiene un término adicional en el denominador ($V_h K_{HA}$). En el equilibrio, la cantidad de analito extraída del espacio de cabeza de la muestra puede ser igual o menor a la cantidad extraída directamente de la muestra. Por tanto, es obvio que la sensibilidad obtenida mediante el muestreo en espacio de cabeza será igual o menor a la del muestreo directo. Para minimizar la pérdida de sensibilidad, el volumen del espacio de cabeza debe ser lo menor posible. Por otro lado, el muestreo en espacio de cabeza reduce los problemas relacionados con la matriz de la muestra, y además suele ser más rápido.

La forma de la ecuación obtenida mediante el proceso de adsorción es muy similar a la obtenida mediante absorción. La principal diferencia es la presencia de un término de concentración de la fibra ($C_{f \max} - C_f$) en el numerador y denominador de la ecuación (6), y que el significado de K_s en (6) es el de constante de equilibrio de adsorción, mientras que en la ecuación (1) es el de coeficiente de partición. Para concentraciones muy bajas de analito sobre la fibra y analitos con baja afinidad por la fibra, se puede considerar $C_{f \max} \gg C_f$. De este modo se observaría una relación de dependencia lineal para la ecuación (6). Sin embargo, si la cantidad de analito sobre la fibra no es despreciable comparada con el total de sitios activos, la dependencia no puede considerarse lineal.

La cantidad de analito extraída de una muestra que contiene más de un compuesto será menor que n de la ecuación (6), ya que se reduce el número de sitios disponibles. Además como $C_{f \max}$ es menor para el analito, la no linealidad se hace significativa a concentraciones bajas si lo comparamos con el caso de que no existan compuestos interferentes. Estos efectos se minimizan si el compuesto interferente se encuentra a concentraciones muy bajas y si se caracteriza por tener baja afinidad por el sorbente.

En esta Tesis se ha propuesto un procedimiento para la determinación de compuestos orgánicos volátiles (VOC) presentes en muestras de agua, basado en el muestreo en el espacio de cabeza de la muestra sobre una fibra de PDMS-DVB (Apéndice 9).

1.3.2.2. SPME EN MUESTRAS GASEOSAS

Absorción

El muestreo de aire mediante SPME tiene una serie de ventajas respecto a los métodos tradicionales, en muestreo tanto activo como pasivo, y tiene muchas aplicaciones, desde estudios ambientales a estudios de calidad del aire en sitios cerrados. El PDMS es el sorbente más utilizado para extraer los analitos volátiles de muestras medioambientales mediante el proceso de absorción. La relativa facilidad de control de este proceso de extracción y el hecho de que la absorción no sea un proceso competitivo han impulsado el desarrollo de los métodos de muestreo sobre PDMS. Bajo condiciones de muestreo estático, los analitos se absorben sobre el PDMS y finalmente se alcanza el equilibrio. El tiempo necesario para alcanzar el equilibrio depende de las cinéticas del proceso conjunto por el cual el analito alcanza la fibra. Este proceso depende de la

velocidad de difusión del analito en el aire y del coeficiente de distribución del analito entre el aire y el sorbente.

El valor de K a una determinada temperatura para un analito en equilibrio entre la fibra y el aire se define como:

$$K = \frac{C_{\text{fibra}}}{C_{\text{aire}}} \quad (8)$$

$$C_{\text{aire}} = \frac{n_{\text{fibra}}}{V_{\text{fibra}} K} \quad (9)$$

siendo n_{fibra} el parámetro que se mide analíticamente. La relación lineal entre K y la temperatura viene dada por la ecuación de Clausius-Clapeyron:

$$\log K = \frac{\Delta H^v}{2.303RT} + \left[\log \left(\frac{RT}{\gamma_1 P^*} \right) - \frac{\Delta H^v}{2.303RT^*} \right] \quad (10)$$

Esta ecuación puede adoptar la siguiente forma general.

$$\log K = a / T + b \quad (11)$$

Por sustitución de la ecuación (11) en la ecuación (9) quedaría:

$$C_{\text{aire}} = \frac{n_{\text{fibra}} 10^{-(a/T+b)}}{V_f} \quad (12)$$

La ecuación (12) permite determinar la concentración de un analito en el aire, ya que las constantes a y b, así como la temperatura de muestreo son conocidas [45, 46].

Adsorción

Según los datos bibliográficos la sensibilidad de los sorbentes de SPME formados por mezcla de fases, como PDMS/DVB y Car/PDMS, es mayor que la obtenida con PDMS para la extracción de VOCs [47]. Un sorbente de PDMS/DVB puede extraer mayores cantidades de VOCs, sobretodo para tiempos cortos de muestreo y condiciones de no equilibrio. Se ha desarrollado una teoría que explica la extracción de un analito en condiciones de equilibrio utilizando fibras de polímeros porosos [44]. Las cinéticas de adsorción y saturación de un adsorbente delgado de SPME se han descrito utilizando un modelo límite [48]. Sin embargo, estas condiciones no se ajustan al muestreo real de aire, donde pueden encontrarse varios analitos presentes.

Se ha desarrollado una nueva aproximación basada en la difusión para explicar la extracción [49]. Según ésta si la fibra se expone a una muestra gaseosa que se mueve perpendicularmente al eje de la fibra durante un período de tiempo más corto que el tiempo de equilibrio se minimiza la competición y el desplazamiento entre analitos, ya que se tiene gran número de sitios disponibles en la fibra. Además, estas condiciones permiten calibrar en la región lineal inicial. El sorbente sólido de la fibra de SPME puede modelizarse como un cilindro con una longitud L y diámetros externo e interno de b y a , respectivamente (**Figura 6**).

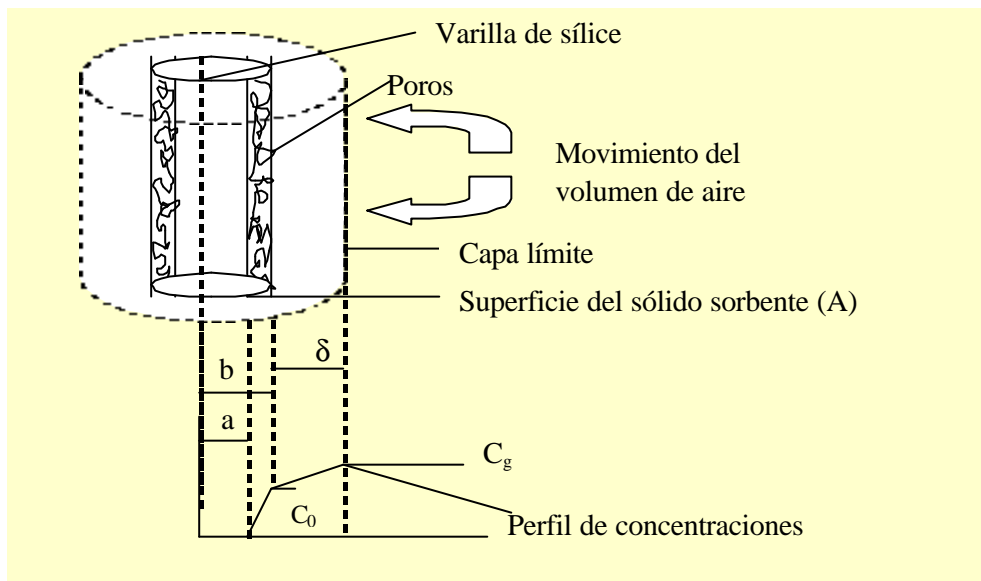


Figura 6. Esquema de la extracción sobre una fibra de SPME revestida con un sólido poroso.

Al poner la fibra en contacto con el aire en movimiento se forma una capa límite de espesor δ entre el volumen de aire y la superficie de la fibra. Los analitos son transportados por difusión molecular a través de esta interfase. Este suele ser el paso limitante de la velocidad del proceso. La concentración de analito en el volumen de aire (C_g) puede considerarse constante si el tiempo de muestreo es corto y hay un continuo suministro de analito por convección. Además, en SPME el volumen de aire es mucho mayor que el volumen de la interfase, y el proceso de extracción no afecta a la concentración en aire. La adsorción es instantánea, y la concentración de analito en la superficie (C_0) está lejos del nivel de saturación. El perfil de concentraciones del analito entre C_g y C_0 puede considerarse lineal. La difusión dentro de los poros del sorbente controla la transferencia de masa desde b hasta a . La masa de analito extraída en un intervalo de tiempo muy corto se puede expresar con la siguiente ecuación:

$$n(t) = \frac{2\pi D_g L}{\ln((b + \delta)/b)} C_g t \quad (13)$$

donde D_g es el coeficiente de difusión molecular en la fase gas y t es el tiempo de muestreo. La cantidad de analito extraída (n) se determina mediante la medida analítica, y con ella se estima la concentración en el aire:

$$C_g = \frac{n \ln((b + \delta)/b)}{2\pi D_g L t} \quad (14)$$

Mediante el muestreo dinámico en condiciones de equilibrio se aumentan las cantidades extraídas de analito respecto a las obtenidas mediante muestreo estático (simple exposición de la fibra al aire) [50]. Esto puede explicarse mediante el aumento de la velocidad del aire, que disminuye el espesor de la capa límite.

En el Apéndice 3 se estudió la determinación de trimetilamina en el aire mediante muestreo pasivo por adsorción sobre una fibra de SPME (CW-TPR) con la finalidad de compararlo con el muestreo activo en cartucho de SPE (Apéndice 2).

1.3.3. PARÁMETROS QUE INFLUYEN EN EL PROCESO DE SPME

La eficacia de la extracción (SPME) puede mejorarse mediante la optimización de las variables experimentales que afectan a dicho proceso. Entre estas variables cabe destacar la **agitación de la muestra**, de modo que se favorezca la difusión de los analitos desde la matriz de la muestra hasta la fibra o al espacio de cabeza reduciendo el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio. Esto es especialmente importante para analitos de elevado peso molecular y bajos coeficientes de difusión [51].

El **tiempo de extracción** es un parámetro muy importante en el proceso de absorción/adsorción. Cada par analito/fibra tiene un tiempo de equilibrio determinado, a partir del cual la cantidad de analito extraída se mantiene constante. El tiempo de equilibrio es inversamente proporcional al coeficiente de difusión [52]. Sin embargo, este tiempo puede ser muy largo, por lo que en algunos casos se elige trabajar en condiciones de no equilibrio [53]. En estos casos el tiempo de extracción se debe controlar estrictamente, ya que pequeñas oscilaciones en la medida del tiempo implican variaciones significativas en la cantidad de analito extraída.

La **temperatura de extracción** también puede influir en el proceso de extracción. La manera más simple y eficaz de liberar a los analitos de su matriz es la desorción térmica. Al calentar la muestra hasta una temperatura elevada se proporciona energía a las moléculas de analito superando de este modo las barreras energéticas que mantienen a los analitos en la matriz, se asegura el proceso de transferencia de masa y se aumenta la presión de vapor de los analitos. Sin embargo, el proceso de absorción de los analitos sobre la fibra es exotérmico, lo que significa que mientras que la temperatura elevada permite liberar los analitos de su matriz, también puede afectarles inversamente a la absorción debido a la disminución de los coeficientes de partición del analito entre la muestra y la fibra [54].

El estudio del efecto del **volumen de la muestra** indica que excepto para compuestos con valores de K (coeficiente de partición entre la muestra y la fibra) pequeños, el volumen tiene una influencia significativa sobre la cantidad extraída con la fibra. Por otra parte los compuestos semivolátiles suelen tener valores de K elevados, por tanto, cuando se emplean pequeños volúmenes de muestra, éstos tienen un efecto significativo sobre la cantidad extraída [55, 56].

La **adición de sal** en SPME permite modificar la matriz de modo que aumente la fuerza iónica y disminuya la solubilidad de los analitos, lo que permite que se liberen más analitos al espacio de cabeza de la muestra. Cuanto mayor es la solubilidad de los analitos en la fase acuosa mayor es la influencia que tiene la adición de sal sobre la eficacia de la extracción. La saturación con una sal puede usarse no solamente para disminuir los límites de detección, sino también para normalizar la influencia de una concentración variable de sal en la matriz de una muestra [52].

El efecto del **pH** depende del tipo de compuestos. Así por ejemplo, clorofenoles con elevado valor de pK_a no presentaron un cambio significativo en la cantidad absorbida cuando se bajó el pH a 2.5. Sin embargo, para compuestos con valores de pK_a entre 4.7 y 7, la disminución del pH produjo un aumento considerable de sus respuestas [53]. Por tanto los analitos deben estar en forma neutra para su extracción.

1.3.4. TIPOS DE SPME Y ACOPLAMIENTOS CON TÉCNICAS DE SEPARACIÓN

1.3.4.1. SPME CON FIBRAS

El proceso de SPME consta de dos etapas. La primera etapa es la extracción con una fibra recubierta del sorbente que se pone en contacto con la muestra durante un tiempo determinado a una temperatura controlada. Los analitos migran de la muestra a la fibra. La extracción en SPME puede llevarse a cabo por inmersión directa [57], en el espacio de cabeza [58] o mediante SPME con protección de membranas [59]. En este último modo de extracción se coloca una membrana semipermeable alrededor de la fibra que evita que compuestos de elevado peso molecular presentes en la matriz de la muestra dañen la fibra. El modo de extracción de espacio de cabeza también protege a la fibra de estos compuestos y de otras interferencias no volátiles. Este modo de extracción es muy útil para el análisis de muestras sólidas o biológicas en las que la interferencia de la matriz es importante; sin embargo está restringido para compuestos volátiles y semivolátiles. En la **Figura 7** se esquematizan los procesos de SPME por inmersión y de espacio de cabeza. La SPME de espacio de cabeza puede acoplarse a CL o a CG.

La segunda etapa consiste en la desorción de los analitos retenidos en la fibra. Esta etapa depende de la técnica analítica que se vaya a utilizar a continuación. Si se emplea la CL para llevar a cabo el análisis, la desorción se realiza empleando algún disolvente orgánico, mientras que en CG la desorción es térmica.

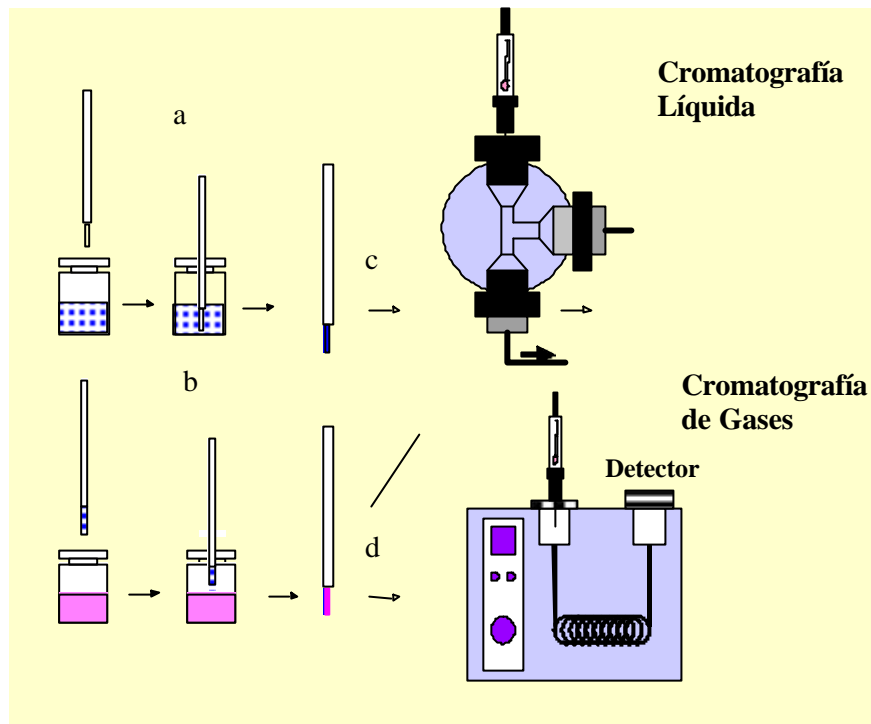


Figura 7. Esquema del proceso de SPME acoplada a CL o a CG; (a) inmersión directa; (b) espacio de cabeza; (c) desorción con disolventes; (d) desorción térmica.

En la SPME con fibras no es necesario eliminar las partículas presentes en las muestras antes de la extracción, ya que pueden eliminarse lavando la fibra con agua antes de la inserción en la cámara de desorción.

Acoplamiento SPME-CG

En la mayor parte de las aplicaciones de la SPME descritas hasta este momento para el análisis de compuestos orgánicos volátiles o semivolátiles esta técnica es acoplada a la cromatografía de gases (CG) [60].

La etapa de desorción se realiza térmicamente [61] como se ha comentado, ya que con la temperatura los compuestos disminuyen su afinidad por la fibra, y los analitos son introducidos en la columna analítica por el gas portador. En la **Figura 8** se presenta un esquema del acoplamiento SPME-CG.

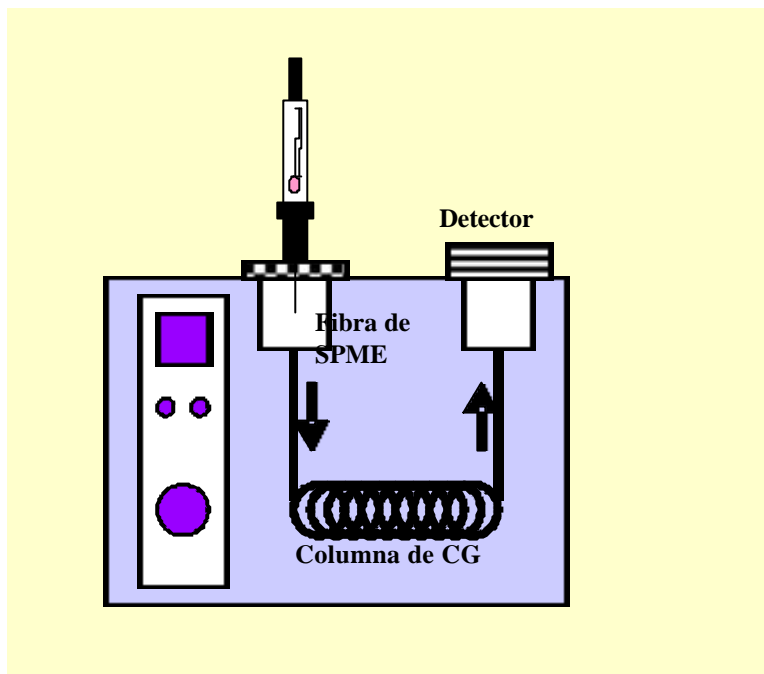


Figura 8. Esquema del acoplamiento SPME en fibra-CG.

Acoplamiento SPME-CL

Según la base de datos *Web del Conocimiento (Ciencias)* desde 1995 hasta 2005 el acoplamiento SPME-CL representa el 3% del total de publicaciones sobre SPME.

Una de las principales dificultades que conlleva el acoplamiento SPME-CL es la ausencia de una fase adecuada, que tenga no solamente elevada capacidad de extracción de los analitos, sino que también sea estable en disoluciones con diferentes matrices. Las fases comerciales son poco polares y algunos analitos presentan interacciones fuertes con el agua. Por tanto en el desarrollo de la SPME la extracción de los analitos polares e iónicos de las muestras de agua se ha convertido en un reto. Una solución para mejorar la capacidad de extracción de dichos analitos es convertirlos en formas menos polares o no-ionizadas mediante el ajuste del pH o mediante derivatización. Otra solución consiste en el desarrollo de nuevos materiales polares y de intercambio iónico.

La desorción se basa en el uso de un disolvente. Este tipo de desorción es adecuado para analitos térmicamente inestables o poco volátiles. Puede llevarse a cabo fuera de línea, introduciendo la fibra con los analitos retenidos en un vial que contenga el disolvente, y a continuación una alícuota de este disolvente es inyectada en el cromatógrafo de líquidos. También puede realizarse en línea, utilizando una interfase con

una cámara de desorción. En este caso si la desorción se lleva a cabo con la fase móvil se llama “dinámica” [62], y los analitos son desorbidos al mismo tiempo que son arrastrados hacia la columna analítica. Sin embargo, si se introduce un disolvente adecuado en la cámara de desorción y a continuación se introduce la fibra durante un tiempo determinado se habla de desorción “estática” [63, 64]. En la **Figura 9** se puede observar el esquema correspondiente a este acoplamiento.

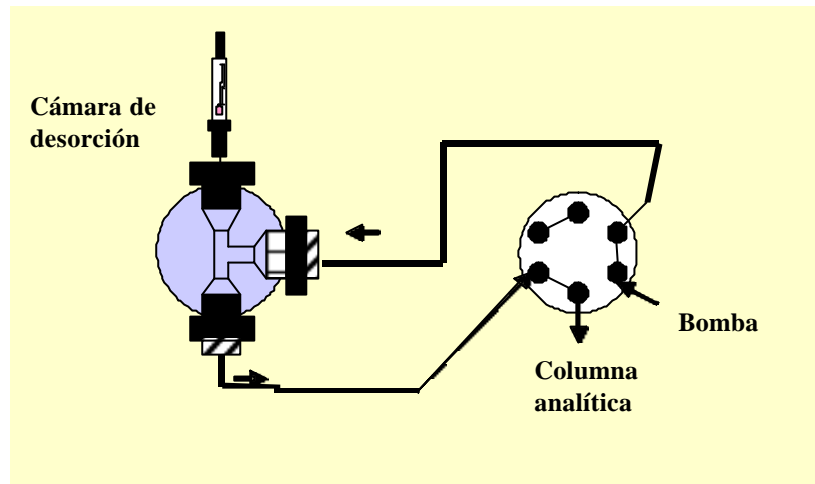


Figura 9. Esquema del acoplamiento SPME en fibra-CL.

Acoplamiento SPME-EC

También se han publicado diversos trabajos en los que la SPME se combina con la electroforesis capilar (EC) [65]. Si se combina fuera de línea, la única diferencia respecto al acoplamiento SPME-CL es la etapa de desorción. En esta combinación la desorción consiste en introducir la fibra con los analitos retenidos en el interior de un capilar que contenga unos mililitros de disolvente orgánico, de modo que tras la desorción de los analitos se lleve a cabo la inyección hidrodinámica o electrocinética en el capilar de EC. Entre los inconvenientes del procedimiento hay que destacar el bajo factor de preconcentración, ya que sólo una pequeña parte de los analitos desorbidos son inyectados en el equipo de EC. Si la SPME y la EC se combinan en línea, la desorción se lleva a cabo utilizando una interfase que permita conectar la fibra con el extremo del capilar de EC. Sin embargo, el diseño de esta interfase es difícil porque el volumen de inyección en EC es del orden de nanolitros.

1.3.4.2. SPME EN TUBO

La extracción de los analitos se lleva a cabo en la superficie interna de una columna capilar. Las muestras deben filtrarse antes de la extracción. Otra diferencia respecto a la SPME manual con fibras es que en la SPME en tubo no es posible el desacoplamiento entre la desorción y la inyección. La desorción se lleva a cabo por la fase móvil o aspirando un disolvente de desorción de un segundo vial. El ensanchamiento de picos es comparativamente pequeño si los analitos se desorben completamente antes de la inyección. El efecto memoria es del 0.1 % o incluso menor, lo cual hace que este procedimiento sea adecuado para la mayoría de las aplicaciones analíticas.

Las columnas de CG pueden usarse como capilares para llevar a cabo la SPME en tubo. La inserción de una **varilla** de acero inoxidable en el interior del capilar implica una reducción significativa de su volumen interno mientras que el área de superficie polimérica sigue siendo la misma. De este modo la relación volumen interno/fase se reduce considerablemente y la extracción es más eficaz. Otra modalidad es la llamada **fibra en tubo** que consiste en el uso de varios cientos de finos filamentos de material polimérico empaquetados longitudinalmente dentro del capilar. Esta técnica no sólo se usa para reducir el volumen interno del tubo de extracción, sino que además los filamentos poliméricos se utilizan como medio de extracción. La reducción del tamaño del mecanismo de extracción facilita el acoplamiento con métodos que emplean microcolumnas de separación [66]. En la **Figura 10** se presenta la estructura de la varilla en el tubo y de la fibra en el tubo.

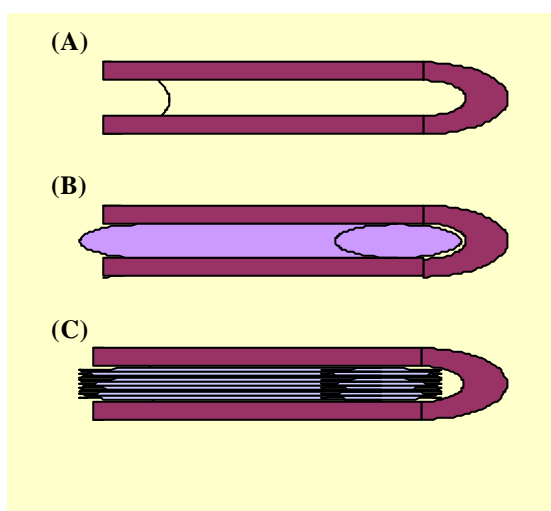


Figura 10. Esquema de los tres tipos de capilares de extracción en tubo: (A) capilar convencional, (B) varilla en tubo y (C) fibra en tubo [66].

Acoplamiento SPME en tubo-CL

La SPME en tubo es una variante relativamente nueva y eficaz de microextracción y preconcentración, que puede ser fácilmente acoplada en línea con la CL para el análisis de los compuestos menos volátiles y/o térmicamente inestables [67]. Como medio de extracción se utiliza el interior de un fragmento de columna capilar, permitiendo la automatización del proceso si se acopla el capilar con el automuestreador. El capilar tiene la superficie interna recubierta de un sorbente. Las fases disponibles comercialmente son poco polares y no iónicas, y por tanto no presentan alta eficacia de extracción para compuestos polares y especies iónicas [68]. Una posible solución para la extracción de dichos analitos presentes en las muestras sería el desarrollo de nuevas fases polares y de intercambio iónico [69, 70, 71]. Los polímeros conductores son materiales muy versátiles que presentan reconocimiento molecular de los analitos. Los polipirroles y sus derivados han sido los más utilizados debido a sus ventajas adicionales: *i*) pueden ser fácilmente polimerizables, *ii*) son relativamente estables en agua y en disolución, y *iii*) su monómero y alguno de sus derivados están disponibles comercialmente. La longitud del capilar depende de la aplicación, pero suele oscilar alrededor de los 60 cm; se coloca entre el loop de inyección y la jeringa de inyección del automuestreador como se puede observar en la **Figura 11**. Durante la etapa de extracción la muestra es aspirada y se hace pasar a través del capilar; después es devuelta de nuevo al vial, lo que se conoce como ciclo de aspiración-dispensa. Este proceso se repite hasta llegar al equilibrio o hasta alcanzar la sensibilidad requerida [72]. La desorción de los analitos retenidos se lleva a cabo pasando fase móvil o un disolvente adecuado a través del capilar; y finalmente son introducidos en la columna analítica.

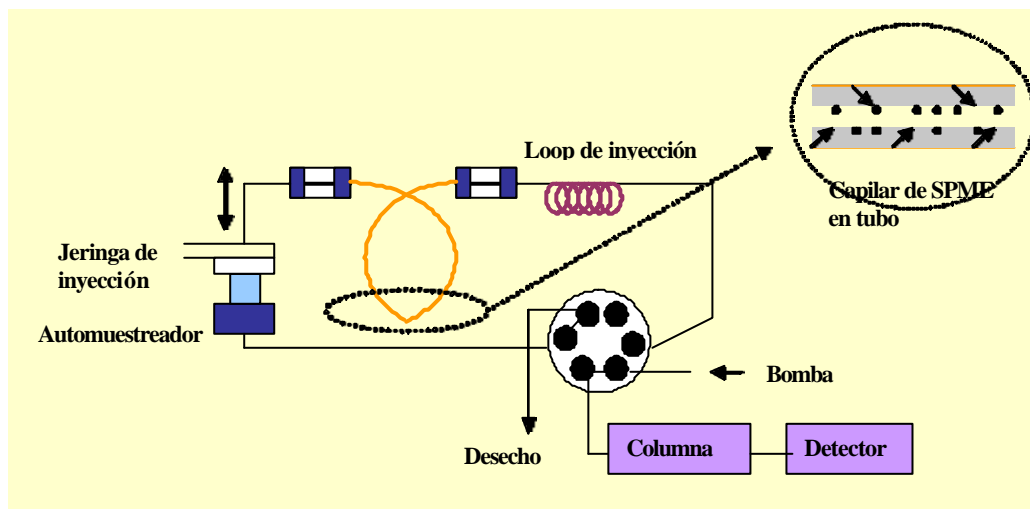


Figura 11. Esquema del acoplamiento SPME en tubo-CL (en posición de extracción).

Este acoplamiento permite llevar a cabo la extracción, concentración, desorción e inyección de los analitos de forma totalmente automatizada. Además no se utilizan disolventes, el tiempo de análisis es corto y es una técnica barata, por lo que se considera una buena alternativa al uso de fibras como medio de extracción. Otras ventajas adicionales de la SPME en tubo respecto a la de fibras son el hecho de que el número de columnas capilares con fases estacionarias diferentes es ilimitado y que el efecto memoria es inapreciable. El principal inconveniente de la SPME en tubo es que sólo puede aplicarse a muestras limpias para no obstruir el capilar y que sean miscibles con la fase móvil [73].

En esta Tesis se ha utilizado el acoplamiento entre la SPME en tubo con la cromatografía líquida capilar para el análisis de triazinas. Se han ensayado dos configuraciones: tubo empaquetado y tubo abierto (Apéndice 10). La SPME en tubo se ha aplicado también a la determinación de compuestos organofosforados (Apéndice 11) en muestras reales de agua. El uso de micro flujos facilita dicho acoplamiento. El grado de automatización es mayor al del procedimiento de extracción con una fibra y posterior desorción en la interfase. Por último se ha estudiado la influencia del espesor del sorbente que recubre la superficie interna del capilar (Apéndice 11), observando que la capacidad de extracción del mismo aumenta con el espesor del sorbente.

La miniaturización y la automatización son dos tendencias actuales en el campo de la CL. Las principales ventajas de la CL capilar son: *i*) aumento de la eficacia en un intervalo de tiempo muy corto, *ii*) disminución del consumo de disolventes, *iii*) disminución de los LDDs [74]. Además, la sensibilidad de la CL capilar puede mejorarse mediante diferentes técnicas que implican un aumento en el volumen de inyección.

El acoplamiento de la SPME en tubo con un sistema de CL capilar proporciona un método sensible, con una etapa de preparación de la muestra fácil y eficaz comparada con la de la CL convencional [75, 76]. Según la base de datos *Web del Conocimiento (Ciencias)* desde 1997 hasta 2005 se han publicado 51 artículos sobre SPME en tubo, lo cual representa el 2% del total de trabajos sobre SPME. De estas publicaciones, el 4% corresponde a su acoplamiento con CL capilar, mientras que el 43% corresponde a CL convencional.

Acoplamiento SPME en tubo-CG

También existen algunas aplicaciones en las que la SPME en tubo se acopla a la CG. El paso de extracción no requiere de un inyector a elevada temperatura, sino únicamente de un capilar que puede unirse como una precolumna a la columna de separación. De esta forma el capilar tiene una doble función, ya que actúa como sistema de SPME durante la etapa de extracción y como inyector “on-column” durante la etapa de elución, tanto si es isoterma como con gradiente de temperatura [77]. En la **Figura 12** se puede observar el esquema correspondiente a este acoplamiento.

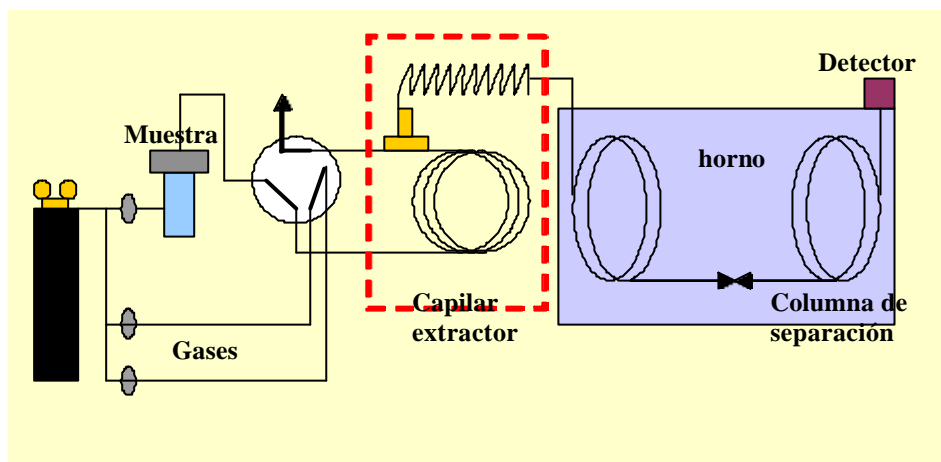


Figura 12. Esquema del acoplamiento SPME en tubo-CG.

Acoplamiento SPME en tubo-EC

La inyección de volúmenes pequeños se puede conseguir mediante el diseño de microinyectores. Un ejemplo es el inyector desarrollado para isotacoforesis capilar [78]. La extracción se lleva a cabo sobre una fibra insertada en un capilar de la misma longitud. Este tipo de preconcentración se ha aplicado a muestras medioambientales [79]. La **Figura 13** muestra el esquema del sistema. En el proceso de extracción, la muestra se hace pasar a través de la fibra insertada en el capilar durante un determinado tiempo y a una velocidad de flujo determinada. Los analitos interaccionan y quedan retenidos en la fibra y en el polímero que reviste la superficie interior del capilar. En el proceso de desorción se bombea el disolvente a través del medio de extracción. Los analitos desorbidos son arrastrados hasta el conector cruzado, donde la muestra preconcentrada es inyectada y, al aplicar un voltaje los analitos son separados.

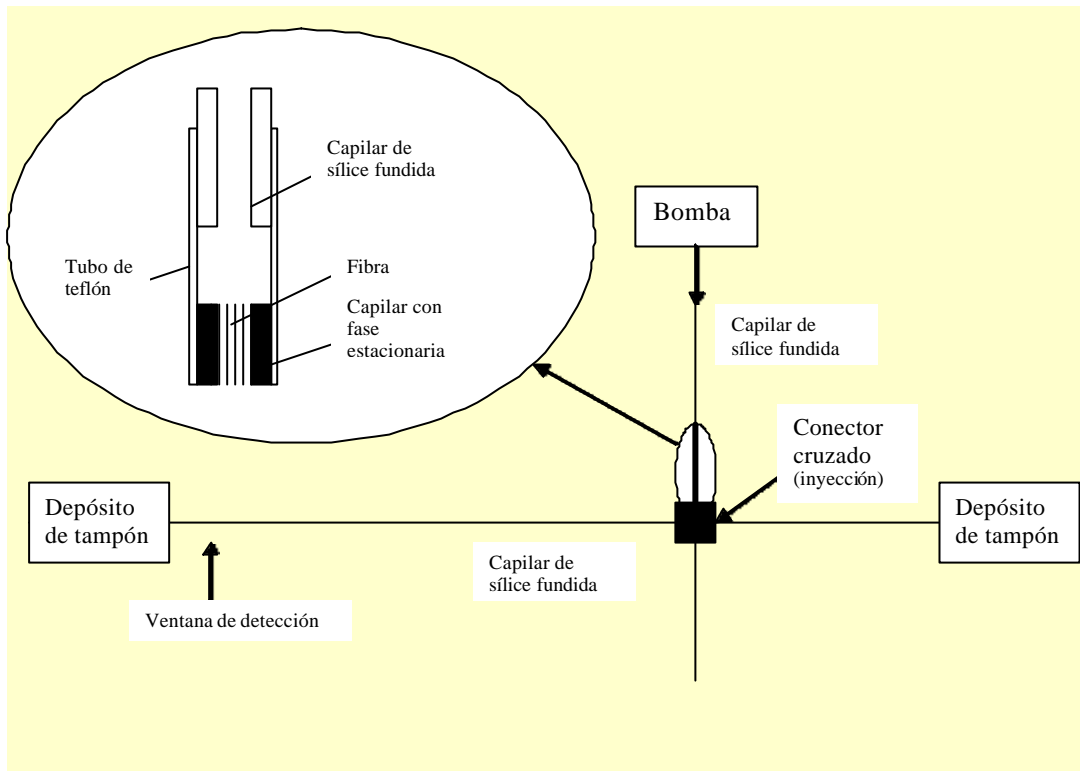


Figura 13. Esquema del acoplamiento SPME en tubo-EC.

1.3.4.3. SPME POR SORCIÓN SOBRE BARRAS MAGNÉTICAS AGITADORAS

La extracción por sorción sobre barras magnéticas agitadoras (SBSE) es una nueva técnica de muestreo y preconcentración que permite la extracción de analitos orgánicos presentes en muestras de agua mediante su sorción sobre el polidimetilsiloxano que recubre las barras de agitación. La teoría de esta técnica se basa en los mismos principios que la SPME y se realiza la aproximación de que los coeficientes de partición de los analitos entre el PDMS y el agua ($K_{PDMS/w}$) son proporcionales a sus coeficientes de partición octanol- agua ($K_{o/w}$) [80].

$$K_{o/w} = K_{PDMS/w} = \frac{C_{PDMS}}{C_w} = \left[\frac{m_{PDMS}}{m_w} \right] \left[\frac{V_w}{V_{PDMS}} \right] = \beta \frac{m_{PDMS}}{m_w} \quad (14)$$

De este modo pueden calcularse las recuperaciones teóricas:

$$R = \frac{m_{\text{PDMS}}}{m_0} = \frac{\left[\frac{K_{\text{PDMS/w}}}{\beta} \right]}{1 + \left[\frac{K_{\text{PDMS/w}}}{\beta} \right]} \quad (15)$$

donde R es la recuperación teórica, m_{PDMS} es la masa de analito en la barra de agitación, m_0 es la masa total de analito presente en la muestra de agua, $K_{o/w}$ ($K_{\text{PDMS/w}}$) es el coeficiente de partición octanol-agua, y $\beta = V_w/V_{\text{SBSE}}$ es la relación entre los volúmenes de fases. Cuanto mayor es el valor de β menor es la recuperación y el tiempo de equilibrio se alarga. Por tanto, en SBSE es importante aumentar la cantidad de PDMS al máximo. Por otra parte, si los $K_{o/w}$ de los analitos son inferiores a 10000, las recuperaciones con las fibras son muy bajas; en cambio, las barras permiten la recuperación completa de los analitos con $K_{o/w}$ mayores de 500 ya que tienen mayor cantidad de PDMS. La diferencia fundamental que presenta la SBSE con la SPME en fibras es la mayor cantidad de sorbente que contienen las barras magnéticas agitadoras recubiertas de PDMS (entre 55 y 300 μL) en comparación con las fibras (0.5 μL en las fibras de 100 μm de PDMS). En conclusión, en SPME no existe la posibilidad de realizar una extracción cuantitativa, mientras que en SBSE la extracción se ve aumentada entre 100 y 1000 veces. En la **Figura 14** se presenta la comparación teórica entre las eficacias de extracción en SPME y SBSE. Por tanto, la ventaja de la SBSE frente a la SPME es la mayor sensibilidad. Como inconveniente se tiene que indicar el que hasta ahora sólo se comercializan barras magnéticas agitadoras recubiertas de PDMS.

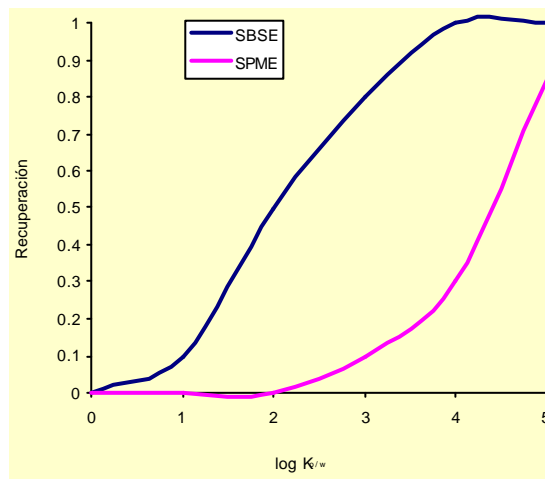


Figura 14. Recuperaciones teóricas de los analitos en SBSE y SPME de una muestra de 10 mL en función de su $\log K_{o/w}$. Volumen de PDMS en la fibra: 0.5 mL; Volumen de PDMS en la barra magnética: 50 mL [81].

El procedimiento de SBSE se lleva a cabo colocando una cantidad adecuada de muestra en un vial. El muestreo se puede llevar a cabo suspendiendo una barra magnética agitadora en el espacio de cabeza de una muestra sólida o líquida, o bien introduciéndola directamente en la muestra, como podemos ver en la **Figura 15**. El tiempo para alcanzar el equilibrio está determinado por el volumen de muestra, la velocidad de agitación y las dimensiones de la barra de agitación, que son los parámetros que se deben optimizar [82]. Por tanto, el tiempo de extracción es un parámetro a controlar. En las condiciones de equilibrio la recuperación no aumenta aunque se siga aumentando el tiempo de extracción. La recuperación se ha estudiado en varios trabajos, observando que para los compuestos polares mejora mediante la adición de cloruro de sodio [83]. Después de la etapa de extracción, la barra magnética agitadora se retira de la muestra y se seca con un pañuelo. La etapa de desorción depende de la técnica que se vaya a acoplar a continuación del procedimiento de extracción

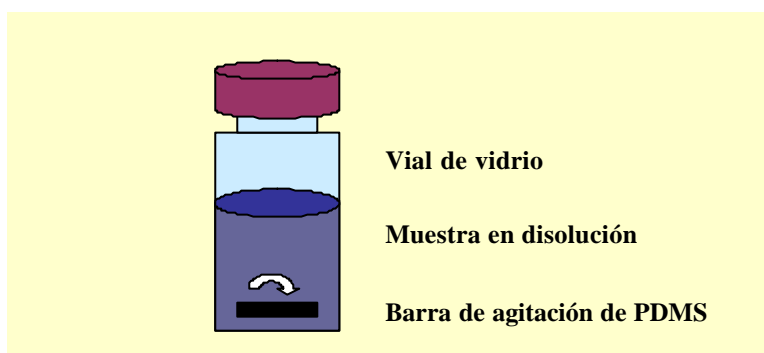


Figura 15. Esquema del sistema de SBSE.

Acoplamiento SBSE –CG

En el muestreo en el espacio de cabeza, la barra de agitación se suspende en el volumen del espacio de cabeza, donde los analitos se retienen durante la etapa de extracción [84, 85]. En el análisis por CG la desorción es térmica, y se realiza en una unidad de termodesorción conectada al cromatógrafo de gases [80]. Como alternativa, la desorción se puede llevar a cabo con disolventes acoplando la CG con la inyección de un gran volumen de disolvente [86, 87].

Acoplamiento SBSE –CL

En el acoplamiento con la CL la desorción se realiza mediante el empleo de un disolvente orgánico [88, 89, 90, 91, 92]. Aproximadamente se usan 100-200 μL de disolvente, normalmente metanol o acetonitrilo.

La SBSE seguida de desorción con disolventes también puede acoplarse a la EC [93].

1.4. CARACTERÍSTICAS DE LOS ANALITOS ESTUDIADOS Y LEGISLACIÓN APLICABLE A LOS MISMOS.

1.4.1. ANÁLISIS MEDIOAMBIENTAL

1.4.1.1. ANÁLISIS DE AGUA

La **composición química de las aguas** naturales depende entre otras variables del tipo de agua (marina, de lago, superficial, subterránea, de riego, residual, hielo, lluvia), localización geográfica y estación del año [94]. Los constituyentes mayoritarios (1-1000 mg/L) son Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3^- , SO_4^{2-} y Cl^- , y las especies minoritarias (0.1-10 mg/L) Fe^{2+} , Fe^{3+} , Sr^{2+} , K^+ , CO_3^{2-} , NO_3^- , F^- , H_3BO_3 . A nivel de trazas existen otras muchas especies.

Esta composición puede ser alterada por fuentes naturales y antropogénicas. La contaminación del agua consiste en una modificación de su calidad haciéndola impropia o peligrosa para el consumo humano, la agricultura, la pesca, actividades recreativas así como para los animales o la vida. Las fuentes primarias de contaminación de las aguas son desechos, residuos industriales, riego y vertidos de aceite [95, 96]. El resultado final es que la composición de las aguas está alterada por la presencia de compuestos inorgánicos y orgánicos adicionales [96-98]. El ciclo del agua se verá afectado por el aumento de la demanda biológica de oxígeno y por los procesos de eutrofización, y también por la acidificación y salinización de las aguas [99]. La **Tabla 2** muestra una clasificación de los contaminantes que podemos encontrar en las aguas basada en la naturaleza física, química o biológica de los agentes contaminantes.

Tabla 2. Clasificación de contaminantes de las aguas en función de su naturaleza.

CONTAMINANTE	EJEMPLOS
<i>Agente físico</i>	Calor
<i>Contaminantes inorgánicos</i>	Sales: aniones y cationes: Cl^- , HCO_3^- , CN^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ Ácidos y bases: H_2SO_4 , HNO_3 , NaOH , KOH Elementos tóxicos: Hg, Fe, Mn, Cr, Cu, Pb... Elementos radioactivos: ^{137}Cs , ^{230}Th , ^{90}Sr Gases: NH_3 , Cl_2 , CO_2 Especies minerales disueltas: sílice, arcillas...
<i>Contaminantes orgánicos</i>	Hidratos de carbono, aminoácidos, proteínas Aceites y grasas Hidrocarburos Hidrocarburos aromáticos policíclicos Jabones y detergentes Pesticidas Herbicidas Dioxinas Otros compuestos: fenoles, trihalometanos, nitrosaminas, aminas, clorofenoles, compuestos orgánicos volátiles
<i>Bionutrientes</i>	Compuestos nitrogenados: NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- Compuestos fosforados: PO_4^{3-} , organofosforados
<i>Microorganismos</i>	

Existen unas **características específicas** para cada tipo de agua contaminada:

- Las **aguas residuales** urbanas e industriales son disoluciones acuosas complejas que contienen una variada gama de compuestos orgánicos e inorgánicos, tanto disueltos como en suspensión, y también microorganismos [94]. Pueden contener concentraciones puntuales muy elevadas de contaminantes, lo que puede originar variaciones muy significativas en los equilibrios originando especies nuevas.
- Las **aguas subterráneas** presentan problemas de salinidad debido a procesos de infiltración del agua marina, y también problemas de toxicidad debido al almacenamiento de sustancias tóxicas en tanques subterráneos o a actividades agrícolas.
- Las **aguas costeras** reciben la descarga directa de los ríos, vertidos de barcos, liberación de materiales de protección de embarcaciones, etc. Presentan problemas de eutrofización, de bioacumulación de metales tóxicos en los moluscos o de contaminación microbiana. Los problemas a niveles profundos se deben a la difusión desde la superficie o desde los sedimentos por lo que se estudian tanto gradientes horizontales como verticales, ya que ambos definen su nivel de impacto y su biodisponibilidad.

*Dada la gran **variedad de muestras** de aguas medioambientales y los problemas que presentan, en esta Tesis se han estudiado diferentes tipos de agua con el fin de evitar la generalización, y abarcar una parte de la amplia variabilidad que nos podemos encontrar en cuanto a la matriz. Así, se han estudiado: muestras de aguas residuales depuradas o no, muestras de río, de consumo público, de riego, de mar, de lago y subterránea.*

La legislación vigente en materia de aguas comprende por una parte las Directivas Europeas, y por otra, las Órdenes, Leyes y Reales Decretos tanto estatales como autonómicas. En la **Tabla 3**, se puede ver la normativa más representativa en los diferentes ámbitos en materia de aguas. Las normativas estatales y autonómicas se ajustan a las exigencias de la normativa europea, siendo igual o más restrictivas que ésta.

Tabla 3. Normativa vigente en materia de aguas.

ÁMBITO	NORMATIVA
Legislación europea	<p>Directiva 76/464/CEE del Consejo, del 4 de Mayo de 1976, relativa a la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas vertidas en el medio acuático de la comunidad.</p> <p>Directiva relativa a aguas de baño 76/160/CEE</p> <p>Directiva relativa a la calidad de las aguas destinada al consumo humano 80/778/CEE modificada por la directiva 98/83/CE.</p> <p>Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas (Directiva Marco de Aguas).</p>
Legislación estatal	<p>Real Decreto 849/1986, del 11 de Abril, por el que se aprueba el Reglamento del Dominio Público Hidráulico, que desarrolla los Títulos Preliminar, I, IV, V, VI y VII de la Ley 29/1985, del 2 de Agosto, de Aguas.</p> <p>Real Decreto 734/1988, del 1 de Julio, que establece normas de calidad de las aguas de baño (BOE nº 167, de 13.07.88).</p> <p>Ley 22/1988, del 28 de Julio, de Costas. (BOE nº 181, de 29.07.88).</p> <p>Real Decreto 1541/1994, del 8 de Julio, que modifica el Anexo I del Reglamento de la Administración pública del agua y de la planificación hidrológica aprobado por el Real Decreto 927/1988, del 29 de Julio de 1988</p> <p>Real Decreto 2116/1998, del 2 de Octubre, por el que se modifica el Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo, de desarrollo del Real Decreto-Ley 11/1995, del 28 de Diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales.</p> <p>Orden del 13 de Agosto de 1999 por la que se dispone la publicación de las determinaciones de contenido normativo del Plan Hidrológico de Cuenca del Júcar, aprobado por el Real Decreto 1664/1998, del 24 de Julio.</p> <p>Real Decreto 995/2000, del 2 de Junio, por el que se fijan objetivos de calidad para determinadas sustancias contaminantes y se modifica el Reglamento de Dominio Público Hidráulico, aprobado por el Real Decreto 849/1986, del 11 de Abril.</p> <p>Real Decreto Legislativo 1/2001, del 20 de Julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas (Deroga la Ley 29/1985, del 2 de Agosto, de Aguas)</p> <p>Real Decreto 140/2003, del 7 de Febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.</p> <p>Ley 11/2005, del 22 de Junio, por la que se modifica la Ley 10/2001, del 5 de Julio, del Plan Hidrológico Nacional (BOE nº 149, de 23.06.05).</p>
Legislación autonómica	<p>Ley 7/1986, del 22 de Diciembre, sobre utilización de aguas para riego.</p> <p>Ley 2/1992, del 26 de Marzo, de saneamiento de las aguas residuales de la Comunidad Valenciana.</p> <p>Orden del 3 de Junio de 2003, de la Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación, por la que se establece el Programa de Actuación sobre las Zonas Vulnerables designadas en la Comunidad Valenciana.</p>

1.4.1.2. ANÁLISIS DE AIRE

La **contaminación atmosférica** se define como la impurificación de la atmósfera por inyección y permanencia temporal en ella de materias gaseosas, líquidas o sólidas o radiaciones ajenas a su composición natural o en proporción superior a ella. En general, una sustancia sólo se considera contaminante en el caso de que cause efectos perjudiciales en las personas, los animales, los vegetales o los materiales. Además el deterioro en la calidad del aire ha provocado cambios en el clima [100, 101].

Las fuentes de contaminación pueden ser tanto de origen natural [102] (erupciones volcánicas y meteoritos) como de origen antropogénico [103-106] (transporte, combustiones y procesos industriales). Las fuentes de contaminación de origen antropogénico se resumen en los siguientes grupos:

- Generación de electricidad vía térmica y cogeneración.
- Combustión comercial, institucional y residencial.
- Combustión industrial y otros procesos industriales con combustión.
- Procesos industriales sin combustión.
- Extracción y distribución de combustibles fósiles.
- Uso de disolventes.
- Transporte en carretera.
- Otros transportes.
- Tratamiento y eliminación de residuos.
- Agricultura.

Dada la importancia de la calidad del aire atmosférico, existe **legislación europea, estatal y autonómica** que trata de disminuir la contaminación atmosférica así como controlar las emisiones de sustancias nocivas al medioambiente estableciendo valores límite. La **Tabla 4** muestra algunas directivas, decisiones, reales decretos... que forman parte de la legislación en materia de calidad del aire atmosférico.

MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Tabla 4. Legislación vigente en materia de contaminación atmosférica.

AMBITO	NORMATIVA
LEGISLACION EUROPEA	<p>Decisión del Consejo 82/459/CEE del 24 de Junio, relativa al intercambio de informaciones y datos procedentes de las Redes de las Estaciones aisladas que miden la contaminación atmosférica en los Estados Miembros .</p> <p>Directiva 96/62/CE, del Consejo del 27 de Enero, sobre la evaluación y gestión de calidad del aire ambiental .</p> <p>Reglamento (CE) 307/97, del 17 de Febrero, relativa a la protección de bosques de la Comunidad contra la contaminación atmosférica.</p> <p>Directiva 99/30/CE del Consejo del 22 de Abril, relativa a valores límite de dióxido de nitrógeno, dióxido de azufre, óxidos de nitrógeno, partículas y plomo en aire.</p> <p>Directiva 99/100/CE de la Comisión del 15 de Diciembre relativa a las emisiones de dióxido de carbono y consumo de vehículos de motor.</p> <p>Directiva 2001/81/CE del Parlamento Europeo y Consejo del 23 de Octubre relativa a la emisión de determinados contaminantes atmosféricos .</p> <p>Directiva 2003/87/CE del Parlamento Europeo y Consejo del 13 de Diciembre, relativa a la emisión de gases de efecto invernadero.</p> <p>Directiva 2004/42/CE del Parlamento Europeo y del Consejo del 22 de Abril, relativa a emisión de compuestos orgánicos volátiles .</p>
LEGISLACIÓN ESTATAL	<p>Ley 38/1072 del 22 de Diciembre de Protección del Ambiente Atmosférico.</p> <p>Real Decreto 2616/1985 del 9 de Octubre sobre la homologación de vehículos de motor relativo a la emisión de gases contaminantes.</p> <p>Real Decreto 717/1987 del 25 de Septiembre sobre contaminación atmosférica por dióxido de nitrógeno.</p> <p>Real Decreto 646/1991 del 22 de Abril relativo a la limitación de determinados agentes contaminantes procedentes de grandes instalaciones de combustión.</p> <p>Real Decreto 1088/1992 del 11 de Septiembre relativo emisiones a la atmósfera de agentes contaminantes procedentes de instalaciones de residuos municipales .</p> <p>Real Decreto 1494/1995 del 8 de Septiembre sobre la contaminación atmosférica por ozono.</p> <p>Real Decreto 117/2003 del 31 de Enero sobre la emisión de compuestos orgánicos .</p> <p>Real Decreto 430/2004 relativo a nuevas normas sobre la limitación de contaminantes y control de emisiones a la atmósfera de refinerías de petróleo.</p>
LEGISLACIÓN AUTONÓMICA	<p>Ley 7/2002 del 3 de Diciembre de la Generalitat Valenciana, para la Protección contra la Contaminación atmosférica.</p> <p>Decreto 211/2004 del 8 de Octubre del Consell de la Generalitat Valenciana, por el que se designan órganos competentes en materia de emisiones de gases de efecto invernadero</p>

La calidad del aire se refiere tanto a la calidad del aire exterior (*outdoor air quality*) como interior (*indoor air quality*) [107, 108]. Dentro de la calidad del aire interior podemos destacar la **calidad del aire de los ambientes laborales**. Los trabajadores se encuentran expuestos, generalmente por inhalación o vía dérmica, a un conjunto de riesgos que pueden tener su origen en los agentes químicos presentes en el lugar de trabajo y que pueden afectar a corto o largo plazo a su salud [109].

Las normativas concernientes a la contaminación ambiental, tanto atmosférica como de ambientes laborales, hacen referencia a valores permitidos de emisión e inmisión:

Niveles de emisión: la cuantía de cada contaminante vertida sistemáticamente a la atmósfera en un período de tiempo.

Niveles de inmisión: límites máximos tolerables de presencia en la atmósfera de cada contaminante, aisladamente o asociado a otros.

La exposición se define como la presencia de un agente químico en la zona de respiración del trabajador. La *exposición* puede ser *diaria (ED)*, que es la concentración media del contaminante para la jornada laboral real y referida a una jornada estándar de 8 horas diarias. Sin embargo, *la exposición de corta duración (EC)* se calcula para un periodo de 15 minutos a lo largo de la jornada laboral.

Las nuevas normativas de la UE establecen tres tipos de valores:

- **Valores límite:** Deben respetarse a lo largo de todo el territorio y en caso de superarse debe estudiarse las causas y establecer actuaciones.
- **Valores guía:** tienen la consideración de objetivo a alcanzar a más largo plazo y serán indicativos de un aire limpio
- **Valores de alerta:** establece concentraciones de contaminantes que obliguen a la toma inmediata de decisiones para atajar el problema.

En materia de calidad del ambiente laboral, primero deben considerarse los **Valores Límites Ambientales (VLA)**. Son los valores de referencia para las concentraciones de agentes químicos en el aire y representan condiciones en las cuales se cree, basándose en los conocimientos actuales, que la mayoría de trabajadores pueden estar expuestos día tras día durante su vida laboral sin sufrir efectos adversos para su salud. Existen dos categorías, **VLA-ED** que es valor de referencia para la exposición diaria, y **VLA-EC** que es el valor límite ambiental de corta duración establecido por el *Ministerio de Trabajo y Seguridad*. Existen listas de valores límites ambientales de exposición profesional para algunos compuestos y valores límites biológicos del *Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT)* [110]. Otros organismos públicos como la OSHA y OMS han desarrollado guías y valores de referencia de exposición [111, 112].

La legislación relacionada con la higiene industrial en cuanto a contaminación química y biológica se muestra en la **Tabla 5**.

MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Tabla 5. Normativa legal relacionada con la calidad del aire interior.

AMBITO	NORMATIVA
LEGISLACION COMUNITARIA	Directiva 83/477/CEE del Consejo del 19 de Septiembre, sobre la protección de trabajadores contra la exposición al amianto.
	Directiva 87/217/CEE del Consejo del 19 de Marzo sobre la prevención y la reducción de la contaminación producida por amianto.
	Directiva 88/364/CEE del 9 de Junio relativa a la protección mediante la prohibición de agentes y/o actividades cancerígenas.
	Directiva 97/42/CEE del Consejo del 27 de Junio relativa a la protección de los trabajadores contra riesgos derivados de agentes cancerígenos.
	Directiva 2000/39/CEE de la Comisión del 8 de Junio, por la que se establece una primera lista de valores límite de exposición profesional.
	Directiva 2000/54/CEE del Parlamento Europeo y Consejo del 18 de Septiembre sobre la protección de trabajadores contra riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos.
LEGISLACION ESTATAL	Directiva 2004/37/CEE del Parlamento Europeo y Consejo del 29 de Abril relativa a la protección contra agentes cancerígenos y mutagénicos.
	Real Decreto 108/1991 del 1 de Febrero sobre la prevención y reducción de la contaminación por amianto.
	Real Decreto 665/1997 del 12 de Mayo para la protección de trabajadores contra riesgos relacionados con la exposición a agentes cancerígenos.
	Real Decreto 664/1997 del 12 de Mayo sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos.
	Real Decreto 374/2001 del 6 de Abril sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores relacionados con los agentes químicos durante el trabajo.

La Química Analítica tiene un papel fundamental en el control de la calidad del aire tanto exterior como interior. De ella depende la medida de la concentración de las especies existentes en el aire y también de los contaminantes emitidos al ambiente. Así pues, la ciencia del medioambiente plantea dos tipos de medidas o monitorización de la contaminación del aire: *monitorización del ambiente* y *monitorización de la fuente* [113, 114]. La primera se refiere a la determinación de un contaminante en el aire que respiramos para asegurar su calidad teniendo en cuenta los valores límites ambientales. La monitorización de fuente es la determinación de la concentración de un contaminante en una fuente determinada para tener bajo control las emisiones al ambiente. El empleo de los métodos de referencia o de nuevos métodos para el análisis de contaminantes ambientales debe encaminarse hacia procedimientos que permitan la monitorización *in situ* y con sensibilidad cada vez mayor debido a la reducción de los valores límite ambientales.

En esta Tesis se proponen metodologías para la determinación de contaminantes ambientales en muestras de aire. Los métodos propuestos pretenden mejorar los ya existentes en cuanto a sensibilidad y selectividad. Además, se busca la posibilidad de realizar análisis in situ mediante la SPME.

1.4.1.3. ANALITOS

Aminas alifáticas de cadena corta

Las aminas alifáticas de cadena corta son un grupo de compuestos de creciente interés, tanto por su volumen de producción en industrias de diversa naturaleza (reactivos de partida en la síntesis de numerosos productos farmacéuticos, polímeros, pesticidas, etc.), como por su carácter nocivo para la salud y los ecosistemas. Algunas aminas dentro de este grupo se originan en procesos naturales. Además, son precursoras de las nitrosaminas, especies potencialmente carcinogénicas. Las aminas alifáticas se caracterizan por ser muy volátiles y de elevada polaridad. Ello justifica su alta difusión en la naturaleza, tanto en el aire como en ecosistemas acuáticos, así como que su análisis sea a menudo problemático, lo que también es debido a las bajas concentraciones presentes en las muestras reales.

La legislación obliga a su control cada vez más riguroso en aguas próximas a instalaciones industriales, así como en aguas destinadas a consumo público y en atmósferas laborales. Aunque para las aminas en agua no existe una concentración máxima permitida establecida por la legislación, sí está legislada la concentración de Nitrógeno Kjeldahl total, que depende del tipo de agua analizada. Así, en vertidos de agua residuales esta concentración es de 20 mg/L, mientras que en lagos y embalses es de 10 mg/L. En aire la legislación es más específica, marcando los límites ambientales de exposición diaria. En la **Tabla 6** se resumen los valores límites ambientales para las aminas.

Actualmente se determinan mediante CG [115, 116] o por CL [117, 118]. Sin embargo, la cuantificación de estas aminas, que suelen encontrarse a nivel de trazas, es un trabajo complejo por varias razones. En primer lugar, su aislamiento y preconcentración son problemáticos debido a sus propiedades físico-químicas, como son su elevada polaridad, solubilidad en agua, volatilidad y basicidad. Además, esta clase de aminas a menudo presentan propiedades cromatográficas inadecuadas (baja resolución). Otra dificultad que presenta la determinación de estos compuestos en CL es su baja sensibilidad frente a detectores de UV, fluorescencia y electroquímicos. Para solucionar estos problemas la mayoría de los análisis que utilizan CL incorporan una **derivatización química** antes del paso cromatográfico [117, 118]. Se han propuesto varios reactivos portadores y/o formadores de grupos fluoróforos o cromóforos. La derivatización suele llevarse a cabo en disolución, es decir, las muestras acuosas son mezcladas directamente con la disolución del reactivo, formándose derivados más adecuados para su aislamiento y preconcentración, así como para su resolución y detección. La cuantificación de aminas alifáticas en aire implica el empleo de sorbentes sólidos o de frascos borboteadores que contienen disoluciones ácidas. Después del muestreo, los analitos son disueltos en un

MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

medio adecuado para su derivatización con el reactivo seleccionado [31]. Sin embargo, la mayoría de los reactivos disponibles para aminas no reaccionan con grupos amino terciarios, y por tanto las aminas alifáticas terciarias de cadena corta no están incluidas en la gran mayoría de trabajos publicados [119]. Este es el caso de la trimetilamina (TMA), a pesar de la creciente demanda de métodos para controlar esta amina en el campo medioambiental y en higiene industrial.

Tabla 6. Valores límites ambientales y métodos de referencia para aminas en agua y en aire.

Analito	Muestreo	Valor límite ambiental (mg m ³)		Método recomendado
		VLA-ED	VLA-EC	
<i>Amoniaco</i>	Tubo de adsorbente sólido,	14	36	Espectrofotometría de absorción, método del indofenol Cromatografía iónica con detección conductimétrica
<i>Metilamina</i>	*Adsorbente sólido, XAD-7 recubierto con NBD-Cl	6.5	19	*Cromatografía líquida
<i>Etilamina</i>	*Adsorbente sólido, XAD-7 recubierto con NBD-Cl	9	-	*Cromatografía líquida
<i>Propilamina</i>	-	-	-	-
<i>Butilamina</i>	Tubo de adsorbente sólido, gel de sílice	-	15	Cromatografía gaseosa
<i>Pentilamina</i>	-	-	-	-
<i>Dimetilamina</i>	Tubo de adsorbente sólido, gel de sílice y *XAD-7 recubierto con NBD-Cl	3.8	9.4	Cromatografía gaseosa *Cromatografía líquida
<i>Dietilamina</i>	Tubo de adsorbente sólido, gel de sílice y *XAD-7 recubierto con NITC	30	75	Cromatografía gaseosa *Cromatografía líquida
<i>Trimetilamina</i>	Tubo de adsorbente sólido XAD-7	12	24	Cromatografía de gases con detección de ionización en llama

Analito	Tipo de agua	Concentración (mg/L)	Método recomendado
<i>Aminas en agua (N Total)</i>	Lagos o embalses	10	Kjeldahl
<i>Aminas en agua (N Total)</i>	Vertidos de aguas residuales	20	Kjeldahl

*: métodos de muestreo y de análisis recomendados por la OSHA. El resto son los procedimientos de muestreo y análisis del NIOSH.

El reactivo **9-fluorenilmetil cloroformiato** (FMOC) ha sido ampliamente utilizado en CL para aminas primarias y secundarias, y también reacciona con aminas terciarias en disolución y bajo condiciones de reacción suaves [120]. Sin embargo, los rendimientos de reacción son sustancialmente inferiores a los observados para las aminas primarias y secundarias. La técnica de derivatización asistida sobre soporte sólido, propuesta por el grupo en 1996, es una de las aproximaciones para aumentar los rendimientos de conversión del analito y por tanto la sensibilidad, respecto a los resultados obtenidos con la derivatización en disolución [121]. Esta técnica se basa en la retención de los analitos en el interior de un soporte sólido, normalmente el relleno de un cartucho de SPE, a través del cual se hace pasar una alícuota de disolución derivatizante. Después de un tiempo de reacción determinado se elimina el exceso de reactivo con un disolvente adecuado, y el derivado formado se desorbe y se recoge para continuar el análisis. Este tipo de derivatización puede llevarse a cabo en el interior de una precolumna conectada en línea a la columna analítica mediante una válvula de conmutación. *En esta Tesis, se ha estudiado la utilidad del reactivo FMOC en la determinación de TMA en agua (Apéndice 3) y en aire (Apéndice 4), mediante derivatización asistida en soporte sólido.* Esta metodología simplifica drásticamente el procedimiento analítico y mejora la sensibilidad, haciendo innecesarios los pasos de re-extracción y/o evaporación de disolventes.

El concepto de **derivatización sobre soporte sólido** se ha ampliado a la metodología de SPME. Según la base de datos *Web del Conocimiento (Ciencias)* desde 1994 hasta 2005 el número de publicaciones sobre derivatización y SPME es de 218. Esto representa aproximadamente el 10% del total de publicaciones sobre SPME. Este tipo de derivatización simplifica sustancialmente el análisis, ya que el muestreo por SPME integra extracción, preconcentración e introducción de la muestra en un único paso. Esto resulta en un aumento de la capacidad de procesamiento de muestras. Además de mejorar la detectabilidad del analito, la derivatización sobre la fibra cargada con el reactivo puede aumentar la afinidad del analito por el sorbente de la fibra, mejorando la eficacia de extracción. Hasta hace relativamente poco tiempo, la derivatización ha sido casi exclusivamente usada en SPME acoplada a la CG para mejorar las propiedades cromatográficas de los analitos [39]. Habitualmente la derivatización se lleva a cabo añadiendo el reactivo a las muestras antes de la SPME, y a continuación se extraen los derivados formados [122]. La derivatización en disolución, previa a la SPME, representa el 58% del total de publicaciones sobre derivatización y SPME. No obstante, la derivatización química puede efectuarse tratando la fibra con el reactivo apropiado antes o después de la extracción del analito (derivatización sobre la fibra). En la primera

aproximación la fibra se carga con el reactivo y a continuación se usa para extraer los analitos de la muestra o del espacio de cabeza [123]. Según la base de datos mencionada anteriormente, esta aproximación representa el 28% del total de publicaciones sobre derivatización y SPME. Alternativamente, los analitos pueden ser extraídos en primer lugar y después derivatizados por *i*) inmersión de la fibra en el interior de una disolución que contiene el reactivo [124], *ii*) exposición de la fibra al espacio de cabeza del vial que contiene el reactivo [125], o *iii*) rociando el reactivo sobre la fibra [126].

Algunas de las aplicaciones en esta área son la determinación de ácidos grasos [127], la determinación de anfetaminas en orina [124], la determinación de aminas alifáticas en agua y en orina [128], y la cuantificación de aldehidos en agua [129]. La **Figura 16** muestra el porcentaje de publicaciones para cada tipo de analito según la base de datos *Web del Conocimiento (Ciencias)*. Cabe destacar que el 31% de los trabajos incluidos en el bloque de aminas y el 6% de los del bloque de anfetaminas corresponden a capítulos de esta Tesis.

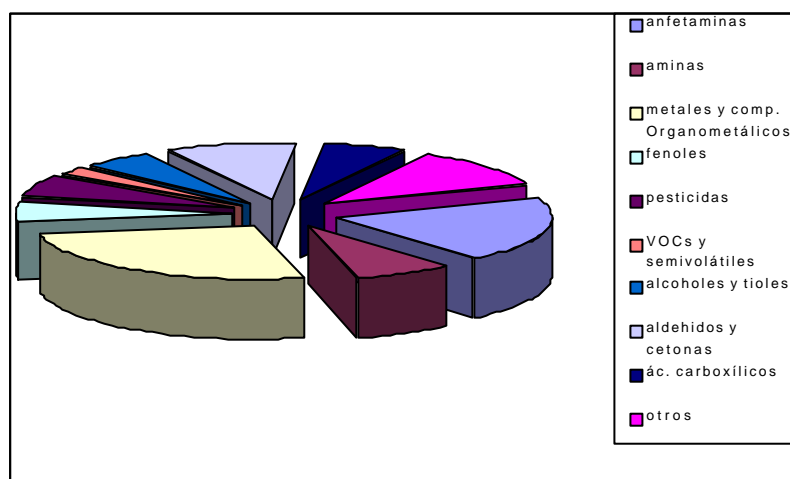


Figura 16. Porcentajes de publicaciones de aplicaciones de SPME y derivatización a diferentes analitos.

Más recientemente se han realizado intentos por combinar la **derivatización química con la SPME acoplada a CL**. En este sentido, Pawliszyn y colaboradores describieron un procedimiento para el análisis de anatoxin-a en muestras de agua basado en su derivatización sobre la superficie de fibras de SPME con el reactivo fluorogénico 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol [126]. El reactivo fue rociado sobre la superficie de la fibra que ya contenía el analito extraído. Después, la fibra se calentó a 70°C durante 10 min, y finalmente la fibra se insertó en la interfase del equipo de CL. La combinación de la SPME y la derivatización química para aminas alifáticas fue presentada en primer lugar por Pawliszyn y colaboradores en 1997 [130]. Los autores demostraron que la transformación de los analitos en derivados menos polares disminuía considerablemente los límites de detección (LDDs) respecto a la SPME directa.

La **TMA** es una amina alifática maloliente frecuentemente identificada en emisiones gaseosas de varias industrias. También pueden encontrarse cantidades significativas de TMA en emisiones procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales. La inhalación de TMA tiene efectos nocivos sobre la salud, entre los que se incluyen la irritación de las vías respiratorias, ojos y piel. Su concentración máxima permitida en atmósferas laborales para exposición diaria está establecida en 12 mg/m³ (ACGIH 1993-1994). *En esta Tesis se ha demostrado la utilidad del reactivo FMOC para la derivatización sobre la fibra de diferentes compuestos amino. En el **Apéndice 5** se estudia la determinación de TMA en agua y en aire basada en su derivatización con FMOC sobre la fibra después de la extracción del analito; se discuten las diferencias de procedimiento para las dos matrices y se compara con el procedimiento basado en la derivatización en soporte sólido de SPE en línea (**Apéndices 3 y 4**)*

La determinación de **metilamina** (MA) en muestras medioambientales tiene gran importancia porque, al igual que el resto de aminas de cadena corta, la metilamina es peligrosa para la salud humana. Debido a su creciente empleo en varios tipos de industrias ha aumentado el interés por su cuantificación en muestras de agua. *En el **Apéndice 1** se ha demostrado la utilidad de la aproximación de derivatización sobre la fibra para el análisis de MA en agua.*

La amina secundaria **dimetilamina** (DMA) es un compuesto de gran interés medioambiental debido a su toxicidad, reactividad y alta presencia como resultado de su amplio uso industrial. Además, la DMA puede reaccionar con agentes nitrosantes dando el compuesto carcinogénico N-nitrosodimetilamina. Por estas razones, hay un aumento en la demanda de métodos analíticos para controlar la DMA en aguas. *En esta Tesis se ha evaluado la posibilidad de efectuar la derivatización en dos etapas con dos reactivos diferentes utilizando la SPME para la determinación de DMA en agua (**Apéndice 2**). En el **Apéndice 6** se han probado y evaluado diferentes opciones para acoplar la SPME y la derivatización.*

Triazinas

Las triazinas se utilizan como herbicidas, y algunos de sus productos de transformación son considerados compuestos químicos muy contaminantes debido a su amplio uso y toxicidad. Las triazinas se aplican en agricultura como un medio de control selectivo de la salida de malas hierbas en el cultivo de trigo, maíz, cebada y caña de azúcar, pero también son ampliamente usadas con fines no agrícolas (mantenimiento de ferrocarriles y de bordes de caminos). Son compuestos relativamente solubles y estables en agua. La **atrazina** ha sido un herbicida muy popular y en las últimas dos décadas ha llegado a ser el pesticida que con más frecuencia se detecta en aguas superficiales y subterráneas. Por ello es muy importante su control. La legislación de la UE estableció 0.1 µg/L como la concentración máxima permitida para triazinas individuales y 0.5 µg/L para la suma de todas ellas en aguas de consumo.

La determinación de triazinas en muestras de aguas se ha llevado a cabo utilizando una gran variedad de técnicas para preconcentrar y purificar los analitos, tales como la LLE, la SPE [131], la SPE en línea [132], y la SPME [133]. La cuantificación se ha realizado utilizando diferentes técnicas como la CL [134] y la CG [135]. La SPME acoplada a la CG ha sido ampliamente utilizada para la determinación de triazinas. Los parámetros que afectan al procedimiento son el tiempo de extracción, la fuerza iónica, la temperatura de extracción, el pH de la muestra, la presencia de ácidos húmicos y la competición con otros componentes durante el proceso de extracción. Algunos trabajos sugieren que las medidas de SPME están libres de las interferencias que causan los ácidos húmicos debido a las pequeñas dimensiones de la fibra. En otros trabajos se observó una baja recuperación de algunos pesticidas organoclorados en presencia de ácidos húmicos [136] debido posiblemente a un aumento en la solubilidad de los herbicidas al enlazarse con los ácidos húmicos. Se observó que la presencia de una gran cantidad de iones corrige dicho efecto [137]. Se han obtenido resultados satisfactorios en el análisis de gran variedad de triazinas como **atrazina, simazina, propazina, terbutilazina, simetrina, prometon, trietazina, prometrin, terbutrin y ametrin**, mediante el detector de captura electrónica [138], detección termiónica específica [138] y detección por espectrometría de masas [139, 140].

La **miniaturización del sistema** de cromatografía líquida utilizando columnas capilares tiene la ventaja de que se reducen los desechos puesto que se utiliza menos fase móvil, con lo que también se minimiza el coste y el impacto ambiental debido a disolventes orgánicos. No obstante, la ventaja más importante de utilizar flujos tan pequeños a través de columnas capilares es el aumento de la sensibilidad. *En el Apéndice 10 se ha evaluado la utilidad de la SPME en línea con columna empaquetada y con columna abierta, así como la SPME fuera de línea para el muestreo, evitando de este modo una gran cantidad de subproductos que interferirían en el análisis de triazinas en muestras de aguas residuales.*

Compuestos organofosforados

A lo largo de los últimos años, el análisis de compuestos usados en agricultura con la finalidad de aumentar la producción de los cultivos, como son los compuestos organofosforados se ha convertido en un tema muy importante. *Los compuestos seleccionados en esta Tesis son: fensulfotion, fenamifos, paration, fenitrotion, clorfenvinfos, fention, fonofos, clorpirifos y trifluralin.* Estos compuestos constituyen una fuente importante de contaminación medioambiental debido a su persistencia y solubilidad en agua. Es necesario desarrollar métodos analíticos para detectar estos contaminantes a bajos niveles de concentración, de acuerdo con los límites fijados en la lista europea de contaminantes prioritarios. Estos valores en aguas destinadas al consumo humano son 0.1 µg/L para cada compuesto organofosforado encontrado individualmente, y 0.5 µg/L para la suma de todos ellos.

La mayoría de métodos analíticos propuestos para el análisis de pesticidas organofosforados están basados en el uso de la GC [141] y de la CL [142]. En el primer caso la detección puede realizarse con detector de nitrógeno-fósforo [143], con detector

de captura electrónica [144], con detector fotométrico [145] y mediante espectrometría de masas [146]. En los métodos basados en la CL la detección normalmente se lleva a cabo mediante detector de UV [147, 148], detector electroquímico [149] o de fluorescencia [150]. La metodología de preparación de la muestra es compleja, ya que incluye los pasos de extracción y purificación para mejorar la sensibilidad y selectividad. El tipo de procedimiento de extracción que se selecciona depende de la complejidad de la matriz y de las características del analito. Los procedimientos que se realizan fuera de línea como la LLE [151], la SPE [134] y el intercambio iónico [152], son largos, laboriosos y requieren grandes volúmenes de muestra y de disolventes orgánicos. Las técnicas de extracción en línea son muy útiles porque la totalidad de los analitos extraídos pueden ser transferidos a la columna analítica, reduciéndose significativamente las cantidades de muestra y de disolventes, lo cual hace que sean adecuadas para el análisis de muestras biológicas [153].

En esta Tesis se estudia la aplicación de un método automatizado de SPME en tubo con columna capilar abierta acoplada a la cromatografía líquida capilar, con detección UV para la determinación de triazinas y pesticidas organofosforados (Apéndice II).

Compuestos orgánicos volátiles

La principal fuente de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) son las emisiones naturales procedentes de la vegetación y las emisiones antropogénicas procedentes del uso exhaustivo de combustibles. Estos factores hacen que los VOCs se encuentren muy extendidos como contaminantes medioambientales. En la lista de sustancias prioritarias según la legislación de aguas se encuentran VOCs como el **benceno**, el **pentaclorobenceno** y el **triclorometano**. La presencia de estos compuestos en las aguas se debe a vertidos de combustibles, depósitos subterráneos con fugas y la liberación directa de combustible en procesos de combustión incompleta. Debido a su elevada toxicidad es importante reducir su expansión. Los niveles máximos establecidos por la legislación europea en aguas de consumo son 1 µg/L para benceno, 150 µg/L para triclorometano, 10 µg/L para la suma de tricloroetileno y tetracloroetileno, y 3 µg/L para 1,2-dicloroetano [154].

Los VOCs presentes en muestras de aguas se determinan principalmente por CG y detección de ionización en llama (FID) [155], o por espectrometría de masas [156]. Algunos métodos analíticos están basados en la inyección directa [157]. Otros requieren un paso previo de extracción de los analitos de las muestras de agua. Como alternativa a la LLE se emplea el muestreo en espacio de cabeza (HS) estático acoplado a la SPME [158] y en HS dinámico que puede estar acoplado a LPME [159], a sistemas cromatográficos de atomizador y trampa [160], a la SPME [69], etc. El muestreo en el espacio de cabeza es el procedimiento más adecuado en los casos en que la matriz puede afectar a la determinación de los analitos. Entre las variables que afectan al procedimiento de muestreo en el espacio de cabeza acoplado a la SPME se encuentran el tipo de fibra, la

velocidad de agitación, la temperatura de extracción, el tiempo de extracción y la adición de sal.

En esta Tesis se han determinado los VOCs presentes en muestras reales de agua mediante muestreo en el espacio de cabeza de la muestra y SPME; se han comparado dos columnas capilares, y se ha estudiado el efecto de la etapa de filtrado de aguas (Apéndice 9).

1.4.2. ANÁLISIS CLÍNICO

La Química Clínica se ocupa del estudio de los aspectos químicos de la vida, con la aplicación de los métodos de laboratorio para el diagnóstico, el seguimiento, el control del tratamiento, la prevención y la investigación de la enfermedad. La Farmacología se define como la ciencia que estudia la acción de las drogas sobre los sistemas bioquímicos y los mecanismos de acción de las drogas.

Una droga es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una sustancia o producto que se usa para modificar o explorar los sistemas fisiológicos o los estados patológicos con la finalidad de que mejoren. También se puede definir como una sustancia activa que interacciona con el cuerpo para curar o prevenir, alargando la vida y mejorando su calidad. El uso de drogas para el tratamiento de enfermedades humanas se extiende desde la Grecia antigua [161]. Las reacciones adversas a las drogas implican un problema serio de salud. Éstas pueden afectar a todos los órganos del cuerpo, incluyendo el hígado, la piel y el sistema inmunitario [162].

La información que proporciona un laboratorio clínico debe ser útil para ayudar a tomar la decisión médica que permita el cuidado óptimo de la salud. Por tanto, el primer paso para mejorar la estandarización es que las medidas sean correctas, de modo que se puedan establecer intervalos de referencia comunes para todos los laboratorios [163].

La importancia de las determinaciones clínicas en el campo de la Química Analítica, ha tenido una evolución creciente en los últimos años, como queda reflejado en el número de publicaciones científicas. Además, la Unión Europea genera el 61.7 % de todos los artículos publicados en Química Clínica del mundo [164].

La SPME es una técnica óptima de preparación de las muestras en análisis biomédicos [165].

Anfetaminas

Las anfetaminas son fuertes estimulantes del sistema nervioso central. Pueden causar dependencia y/o psicosis. Aumentan la confianza en uno mismo y la vigilancia, mejoran el rendimiento físico, y se abusa de ellas como un medio para aumentar el rendimiento en competiciones, como anoréxico en el tratamiento de la obesidad y para mejorar el estado de humor. En muchos países se ha observado un aumento considerable del consumo de anfetaminas de variedades conocidas como “drogas de diseño” principalmente entre gente joven con fines recreativos. La 3,4-metilendioximetanfetamina

(MDMA o Éxtasis) es la más consumida. Su detección en fluidos biológicos es muy importante en los campos deportivo, clínico, forense y toxicológico. Sin embargo, el período de tiempo durante el cual puede detectarse en la orina es normalmente corto, alrededor de 10 días después de su uso.

Para la identificación y cuantificación de anfetaminas se han descrito diversas técnicas como el inmunoensayo [166], la CL [167], la CG [168] y la EC [169]. En los métodos de CL generalmente se utiliza una derivatización química de modo que los analitos sean más fácilmente resueltos, así como para mejorar la sensibilidad. Además, si estas aminas se van a determinar en matrices complejas (por ejemplo, plasma u orina), la preparación de la muestra también supone la preconcentración y purificación del analito.

En el análisis de anfetaminas, la SPME ha sido utilizada acoplada generalmente con CG. Las muestras se basifican y se calientan para volatilizar las anfetaminas, las cuales después se extraen del espacio de cabeza del vial de la muestra, y posteriormente se inyectan en el cromatógrafo de gases. Se han obtenido buenos resultados en el análisis directo de una gran variedad de anfetaminas [170]. En algunos métodos se ha utilizado una reacción química para asegurar la detectabilidad de los analitos y/o para aumentar su afinidad por la fibra. Normalmente la **derivatización** se realiza añadiendo el reactivo a las muestras antes de la SPME [171]. Alternativamente, las anfetaminas pueden extraerse en primer lugar y después llevar a cabo la derivatización por inmersión de la fibra dentro de una disolución que contiene el reactivo [124] o por exposición de la fibra al espacio de cabeza del vial que contiene el reactivo [172] (derivatización sobre la fibra). En algunos trabajos se ha presentado el análisis de anfetaminas mediante la SPME acoplada a la CL [70]. En dicho estudio las anfetaminas no derivatizadas se detectaron por espectrometría de masas (MS). *En esta Tesis se determinan anfetaminas mediante CL combinando la SPME con la derivatización con reactivos fluorogénicos o de UV clásicos (Apéndices 7 y 8).*

El reactivo **9-fluorenilmetil cloroformiato** (FMOC) proporcionó resultados favorables en la derivatización de anfetaminas tanto en disolución [173] como en fase sólida [174]. *Por tanto, en el Apéndice 7 éste fue el reactivo seleccionado para la determinación de anfetamina (AP), metanfetamina (MA) y MDMA; además se examinaron y se compararon dos alternativas de derivatización.*

El **análisis enantioselectivo** de anfetaminas y sustancias relacionadas es cada vez más importante por diversas razones. Estos compuestos existen como pares de enantiómeros, que pueden diferir en su acción con muestras biológicas. Además, a diferencia de las preparaciones clandestinas, algunas preparaciones farmacéuticas contienen sólo uno de los enantiómeros. Por tanto, la determinación de la composición enantiomérica puede ser útil para la diferenciación entre consumo terapéutico e ingestión ilícita de anfetaminas. La caracterización y determinación enantiomérica también pueden ayudar a identificar las rutas de síntesis utilizadas en la obtención clandestina de anfetaminas.

Entre los diferentes métodos disponibles para el análisis enantiomérico de anfetaminas, la estrategia más ampliamente adoptada consiste en la **derivatización** con un reactivo quirál seguida de la separación de los diastereómeros formados por CL [175]. La razón es que la derivatización es un paso común y a menudo obligatorio en la mayoría de los métodos (enantioselectivos o no) debido a las bajas absorbancias en el UV y a la baja fluorescencia natural de las anfetaminas. Por tanto, la derivatización también está dirigida a la mejora de la sensibilidad, lo cual es particularmente importante en el análisis de muestras biológicas. En este sentido, se han descrito varios reactivos y estrategias de derivatización [176].

La principal desventaja de los métodos indirectos en CL respecto a los métodos basados en el empleo de selectores quirales es que generalmente implican una gran manipulación de la muestra. Ello es debido a que, como en las determinaciones quirales aumenta el número de picos que pueden aparecer en los cromatogramas, es necesaria la eliminación de gran parte de la matriz de la muestra. Además, el proceso de derivatización a menudo implica pasos adicionales dirigidos a la eliminación del exceso de reactivo y de productos secundarios. Para ello, las técnicas que suelen utilizarse son la LLE o la SPE [177]. En algunos de los métodos propuestos las condiciones de reacción requeridas para obtener rendimientos de conversión satisfactorios dan como resultado procedimientos inadecuados para los análisis de rutina [178].

La utilidad del empleo de un soporte sólido para llevar a cabo la purificación y derivatización del analito ha sido demostrada a través del análisis de enantiómeros de anfetamina. Para ello se utilizó una precolumna empaquetada con una fase C₈ y el reactivo *o*-ftalaldialdehído-*N*-acetil-*L*-cisteína (OPA-NAC) [179]. Más recientemente, la aproximación de derivatización asistida sobre soporte sólido se ha aplicado a la resolución de algunas drogas de diseño derivadas de la anfetamina, utilizando cartuchos de SPE empaquetados con C₁₈ y el reactivo (-)-1-(9-fluorenil)etil cloroformiato (FLEC) [180]. Alternativamente, los analitos pueden ser aislados y purificados en cartuchos de SPE, desorbidos con el disolvente apropiado, y después derivatizados con FLEC en disolución [181]. Sin embargo, la última opción es significativamente menos sensible que el método basado en la derivatización asistida sobre soporte sólido. *En el Apéndice 8 se ha estudiado por primera vez la posibilidad de acoplar la SPME y la derivatización con un reactivo quirál como es el OPA-NAC. De este modo se simplifica el análisis enantioselectivo de las anfetaminas.*

1.4.3. LEGISLACIÓN APLICABLE

La legislación establece las normas de calidad ambiental en España y las concentraciones máximas permitidas en aguas de consumo para algunos de los compuestos estudiados en esta Tesis. En la **Tabla 7** se indican estos valores.

Tabla 7. Concentraciones máximas legisladas para los parámetros y tipos de muestras estudiadas.

Parámetro	Tipo de muestra	Legislación	Concentración
Total Triazinas	Aguas de consumo humano	Real Decreto 140/2003	0.5 µg/l
Triazina individual	Aguas de consumo humano	Real Decreto 140/2003	0.1 µg/l
Atrazina	Aguas continentales superficiales	Real Decreto 995/2000	1 µg/l
Simazina	Aguas continentales superficiales	Real Decreto 995/2000	1 µg/l
Organofosforados	Aguas de consumo humano	Real Decreto 140/2003	0.1 µg/l
Organofosforados	Aguas continentales superficiales	Real Decreto 995/2000	1 µg/l
Benceno	Aguas de consumo humano	Real Decreto 140/2003	1.0 µg/l
Benceno	Aguas continentales superficiales	Real Decreto 995/2000	30 µg/l
Tetracloruro de carbono	Aguas continentales superficiales	Normas de calidad ambiental: Orden 12/11/87	12 µg/l
Tolueno	Aguas continentales superficiales	Real Decreto 995/2000	50 µg/l
Clorobenceno	Aguas continentales superficiales	Real Decreto 995/2000	20 µg/l
Etilbenceno	Aguas continentales superficiales	Real Decreto 995/2000	30 µg/l
Xileno (suma de isómeros)	Aguas continentales superficiales	Real Decreto 995/2000	30 µg/l
1,2-dicloroetano	Aguas de consumo humano	Real Decreto 140/2003	3.0 µg/l
1,2-dicloroetano	Aguas continentales superficiales	Normas de calidad ambiental: Orden 28/6/91	10 µg/l
trihalometanos	Aguas de consumo humano	Real Decreto 140/2003	150 µg/l
Cloroformo	Aguas continentales superficiales	Normas de calidad ambiental: Orden 12/11/87	12 µg/l
Tricloroetano + tetracloroetano	Aguas de consumo humano	Real Decreto 140/2003	10 µg/l
Tricloroetano	Aguas continentales superficiales	Normas de calidad ambiental: Orden 12/11/87	10 µg/l
Benzo (a) pireno	Aguas de consumo humano	Council Directive 98/83/EC	0.01 µg/l
Fluoranteno	Aguas de consumo humano	Council Directive 98/83/EC	0.1 µg/l
Benzo (b) fluoranteno	Aguas de consumo humano	Council Directive 98/83/EC	0.1 µg/l
Benzo (k) fluoranteno	Aguas de consumo humano	Council Directive 98/83/EC	0.1 µg/l
Benzo (g,h,i) perileno	Aguas de consumo humano	Council Directive 98/83/EC	0.1 µg/l
Indeno (1,2,3-cd) pireno	Aguas de consumo humano	Council Directive 98/83/EC	0.1 µg/l

MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Naftaleno	Aguas continentales superficiales	Real Decreto 995/2000	5 µg/l
PAH	Aguas de consumo humano	Council Directive 98/83/EC	0.1 µg/l
N Kjeldahl	Superficiales destinadas a potabilización	Real Decreto 1541/1994	2 mg/l
N Total	Lagos o embalses	Real Decreto 849/1986	10 mg/l
N Total	Vertidos de aguas residuales	Orden 13 Agosto 1999 Plan Hidrográfico Júcar	20 mg/l
N Total	Agua de baño (incluye aguas marinas)	Real Decreto 734/1988	*
TMA	Aire	OSHA	12 mg/m ³

*No existe un valor límite para este tipo de aguas, pero este parámetro deberá ser verificado cuando exista una tendencia a la eutrofización de aguas.

1.5. BIBLIOGRAFÍA INTRODUCCIÓN

- [1] M. Galignani, C. Ayala, M. R. Brunetto, J. L. Burguera, M. Burguera, *Talanta* 68 (2005) 470.
- [2] S. Seccia, P. Fidente, D. A. Barbini, P. Morrica, *Analytica Chimica Acta* 553 (2005) 21.
- [3] L. Ferrer, G. Armas, M. Miró, J. M. Estela, V. Cerdà, *Talanta* 68 (2005) 343.
- [4] J. Gaca, G. Wejnerowska, *Analytica Chimica Acta* 540 (2005) 55.
- [5] J. Wu, K. H. Ee, H. K. Lee, *Journal of Chromatography A* 1082 (2005) 121.
- [6] J. Beltran, F. J. López, F. Hernández, *Analytica Chimica Acta* 283 (1993) 297.
- [7] C. Molins, P. Campins, *Analytica Chimica Acta* 546 (2005) 206.
- [8] L. Oliferova, M. Statkus, G. Tsysin, O. Shpigun, Y. Molotov, *Analytica Chimica Acta* 538 (2005) 35.
- [9] D. Puig, D. Barceló, *Chromatography* 311 (1995) 63.
- [10] Y. Saito, M. Imaizumi, T. Takeichi, K. Jinno, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 372 (2002) 164.
- [11] Y. Saito, *Chromatography* 24 (2003) 53.
- [12] A. K. Malik, V. Kaur, N. Verma, *Talanta* 68 (2006) 842.
- [13] Y. Fan, M. Zhang, Y-Q. Feng, *Journal of Chromatography A* 1099 (2005) 84.
- [14] J. Lipinski, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 369 (2001) 57.
- [15] M. Abdel-Rehim, *Journal of Chromatography B* 801 (2004) 317.
- [16] M. Charalabaki, E. Psillakis, D. Mantzavinos, N. Kalogerakis, *Chemosphere* 60 (2005) 690.
- [17] M. Saraji, M. Bakhshi, *Journal of Chromatography A* 1098 (2005) 30.
- [18] M. Kawaguchi, R. Ito, N. Endo, N. Sakui, N. Okanouchi, K. Saito, N. Sato, T. Shiokazi, H. Nakazawa, *Analytica Chimica Acta* 557 (2005) 272.
- [19] L. Setková, J. Hajslová, P-A. Bergqvist, V. Kocourek, R. Kazda, P. Suchan, *Journal of Chromatography A* 1092 (2005) 170.
- [20] L. Brossa, R. M. Marcé, F. Borrull, E. Pocurull, *Journal of Chromatography A* 998 (2003) 41.
- [21] Y. Alnouti, K. Srinivasan, D. Waddell, H. Bi, O. Kavetskaia, A. I. Gusev, *Journal of Chromatography A* 1080 (2005) 99.
- [22] R. Steen, A. C. Hogenboom, P. E. G. Leonards, R. A. L. Peerboom, W. P. Cofino, U. A. T. Brinkman, *Journal of Chromatography A* 857 (1999) 157.
- [23] E. Pocurull, L. Brossa, F. Borrull, R. M. Marcé, *Journal of Chromatography A* 885 (2000) 361.
- [24] M. López de Alba, D. Barceló, *Journal of Chromatography A* 938 (2001) 145.
- [25] R. A. Gimeno, A. F. M. Altelaar, R. M. Marcé, F. Borrull, *Journal of Chromatography A* 958 (2002) 141.
- [26] N. Masqué, M. Galià, R. M. Marcé, F. Borrull, *Journal of Chromatography A* 803 (1998) 147.
- [27] E. Porazzi, M. Pardo, R. Fanelli, E. Benfenati, *Talanta* 68 (2005) 146.
- [28] K. Conka, B. Drobná, A. Kocan, J. Petrik, *Journal of Chromatography A* 1084 (2005) 33.
- [29] J. You, Y. Ming, Y. Shi, X. Zhao, Y. Suo, H. Wang, Y. Li, J. Sun, *Talanta* 68 (2005) 448.

- [30] S. Meseguer-Lloret, C. Molins-Legua, P. Campins-Falcó, *Journal of Chromatography A* 978 (2002) 59.
- [31] OSHA Method Number PV 2060, Organic Service Branch I, Salt Lake city, UT, 1993.
- [32] N. A. Santagati, E. Bousquet, A. Spadaro, G. Ronsisvalle, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 29 (2002) 1105.
- [33] L. Groenberg, P. Loevkvist, J. A. Joensson, *Chemosphere* 24 (1992) 1533.
- [34] C. Arthur, J. Pawliszyn, *Analytical Chemistry* 62 (1990) 2145.
- [35] C. G. Zambonin, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 375 (2003) 73.
- [36] S. Guillot, M. T. Kelly, H. Fenet, M. Larroque, *Journal of Chromatography A* 1101 (2006) 46.
- [37] C. Domeño, G. Munizza, C. Nerín, *Journal of Chromatography A* 1095 (2005) 8.
- [38] J. A. Koziel, I. Novak, *Trends in Analytical Chemistry* 21 (2002) 840.
- [39] M. Alpendurada, *Journal of Chromatography A* 889 (2000) 3.
- [40] G. Vas, K. Vékey, *Journal of Mass Spectrometry* 39 (2004) 233.
- [41] D. Louch, S. Motlagh, J. Pawliszyn, *Analytical Chemistry* 64 (1992) 1187.
- [42] Z. Zhang, J. Pawliszyn, *Analytical Chemistry* 65 (1993) 1843.
- [43] A. Navalón, A. Prieto, L. Araujo, J. L. Vílchez, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 379 (2004) 1100.
- [44] T. Górecki, X. Yu, J. Pawliszyn, *The Analyst* 124 (1999) 643.
- [45] P. A. Martos, J. Pawliszyn, *Analytical Chemistry* 69 (1997) 206.
- [46] P. Martos, A. Saraullo, J. Pawliszyn, *Analytical Chemistry* 69 (1997) 402.
- [47] M. Jia, J. Koziel, J. Pawliszyn, *Field Analytical Chemistry and Technology* 4 (2000) 73.
- [48] S. N. Semenov, J. A. Koziel, J. Pawliszyn, *Journal of Chromatography A* 873 (2000) 39.
- [49] J. Koziel, M. Jia, J. Pawliszyn, *Analytical Chemistry* 72 (2000) 5178.
- [50] F. Augusto, J. Koziel, J. Pawliszyn, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 481.
- [51] P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, *Journal of Chromatography A* 1072 (2005) 107.
- [52] D. A. Lambropoulou, T. A. Albanis, *Journal of Chromatography A* 992 (2001) 243.
- [53] M. N. Sarrión, F. J. Santos, M. T. Galceran, *Journal of Chromatography A* 947 (2002) 155.
- [54] Z. Zhang, J. Pawliszyn, *Analytical Chemistry* 67 (1995) 34.
- [55] T. Górecki, J. Pawliszyn, *The Analyst* 122 (1997) 1079.
- [56] T. Górecki, A. Khaled, J. Pawliszyn, *The Analyst* 123 (1998) 2819.
- [57] C. García, M. Llompert, M. Polo, C. Salgado, S. Macías, R. Cela, *Journal of Chromatography A* 963 (2002) 277.
- [58] M. Llompert, K. Li, M. Fingas, *Talanta* 48 (1999) 541.
- [59] H. Lord, J. Pawliszyn, *Journal of Chromatography A* 885 (2000) 153.
- [60] E. Matisová, M. Medved'ová, J. Vraniaková, P. Simon, *Journal of Chromatography A* 960 (2002) 159.
- [61] M. Polo, M. Llompert, C. García, R. Cela, *Journal of Chromatography A* 1072 (2005) 63.
- [62] I. O. M. Chan, P. K. S. Lam, R. H. Y. Cheung, M. H. W. Lam, R. S. S. Wu, *The Analyst* 130 (2005) 1524.
- [63] C. C. Chou, M. R. Lee, *Analytica Chimica Acta* 538 (2005) 49.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [64] C. Blasco, G. Font, J. Manes, Y. Pico, *Analytical Chemistry* 75 (2003) 3606.
- [65] J. Hernández, A. Cifuentes, F. J. García, M. A. Rodríguez, *Electrophoresis* 26 (2005) 980.
- [66] Y. Saito, K. Jinno, *Journal of Chromatography A* 1000 (2003) 53.
- [67] D. J. Djozan, M. Amir-Zehni, *Chromatographia* 60 (2004) 567.
- [68] J. Wu, J. Pawliszyn, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 55.
- [69] J. Wu, J. Pawliszyn, *Journal of Chromatography A* 909 (2001) 37.
- [70] J. Wu, H. Lord, J. Pawliszyn, *Talanta* 54 (2001) 655.
- [71] J. Wu, H. L. Lord, J. Pawliszyn, H. Kataoka, *Journal of Microcolumn Separations* 12 (2000) 255.
- [72] H. Kataoka, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373 (2002) 31.
- [73] J. Pawliszyn, *Applications of Solid Phase Microextraction*, The Royal Society of Chemistry, 1999, Cambridge.
- [74] Y. Shintani, X. Zhou, M. Furuno, H. Mainakuchi, K. Nakanishi, *Journal of Chromatography A* 985 (2003) 351.
- [75] Y. Gou, J. Pawliszyn, *Analytical Chemistry* 72 (2000) 2774.
- [76] R. Eisert, J. Pawliszyn, *Analytical Chemistry* 69 (1997) 3140.
- [77] L. Nardi, *Journal of Chromatography A* 985 (2003) 39.
- [78] T. McDonnell, J. Pawliszyn, *Analytical Chemistry* 63 (1991) 1889.
- [79] K. Jinno, M. Kawazoe, Y. Saito, T. Takeichi, M. Hayashida, *Electrophoresis* 22 (2001) 3785.
- [80] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, *Journal of Microcolumn Separations* 11 (1999) 737.
- [81] M. Kawaguchi, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40 (2006) 500.
- [82] C. Bicchi, C. Cordero, P. Rubiolo, P. Sandra, *Journal of Separation Science* 26 (2003) 1650.
- [83] V. M. León, B. Álvarez, M. A. Cogollo, S. Muñoz, I. Valor, *Journal of Chromatography A* 999 (2003) 91.
- [84] C. Bicchi, C. Cordero, E. Liberto, P. Rubiolo, B. Sgorbini, P. Sandra, *Journal of Chromatography A* 1071 (2005) 111.
- [85] N. Ochiai, K. Sasamoto, S. Daishima, A. C. Heiden, A. Hoffmann, *Journal of Chromatography A* 986 (2003) 101.
- [86] P. Seródio, J. M. F. Nogueira, *Analytica Chimica Acta* 517 (2004) 21.
- [87] A. Peñalver, V. García, E. Pocurull, F. Borrull, R. M. Marcé, *Journal of Chromatography A* 1007 (2003) 1.
- [88] P. Popp, C. Bauer, L. Wennrich, *Analytica Chimica Acta* 436 (2001) 1.
- [89] P. Popp, C. Bauer, A. Paschke, L. Montero, *Analytica Chimica Acta* 504 (2004) 307.
- [90] C. Blasco, G. Font, Y. Picó, *Journal of Chromatography A* 970 (2002) 201.
- [91] C. Blasco, M. Fernández, Y. Picó, G. Font, *Journal of Chromatography A* 1030 (2004) 77.
- [92] M. S. García, B. Cancho, J. Simal, *Water Research* 38 (2004) 1679.
- [93] A. Juan-García, Y. picó, G. Font, *Journal of Chromatography A* 1073 (2005) 229.
- [94] X. Domenech, *Química de la Hidrosfera. Origen y Destino de los Contaminantes, Miraguano*, Madrid, 1995.
- [95] R. T. Nickson, J. M. McArthur, B. Shrestha, T. O. Kyaw-Myint, D. Lowry, *Applied Geochemistry* 20 (2005) 55.

- [96] M. Vitali, F. Ensabella, D. Stella, M. Guidotti, *Chemosphere* 57 (2004) 1637.
- [97] D. Pérez-Bendito, S. Rubio, *Environmental Analytical Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, 1999.
- [98] I. Bodek, W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Roseblatt, *Environmental Inorganic Chemistry*, Pergamon Press, New York, 1988.
- [99] M. Radojevic, V. N. Bashkin, *Practical Environmental Analysis*, RSC, Cambridge, 1999.
- [100] J. Sliggers, *Environmental Science & Policy* 7 (2004) 47.
- [101] F. Semazzi, *Environment Internacional* 29 (2003) 253.
- [102] D. M. Gaiero, J. L. Probst, P. J. Depetris, S. M. Bidart, L. Leleyter, *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67 (2003) 3603.
- [103] H. Peace, B. Owen, D. W. Raper, *Science of the Total Environment* 334 (2004) 347.
- [104] H. Wang, D. Shooter, *Chemosphere* 56 (2004) 725.
- [105] K. N. Yu, Y. P. Cheung, T. Cheung, R. C. Henry, *Atmospheric Environment* 38 (2004) 4501.
- [106] Y. Qin, K. Oduyemi, *Atmospheric Environment* 37 (2003) 1799.
- [107] C. H. Halios, V. D. Assimakopoulos, C. G. Helmis, H. A. Flocas, *Science of the Total Environment* 337 (2005) 183.
- [108] K. Sakai, D. Norbäck, Y. Mi, E. Shibata, M. Kamijima, T. Yamada, Y. Takeuchi, *Environmental Research* 94 (2004) 75.
- [109] *Guía técnica para la Evaluación y Prevención de los Riesgos en los Lugares de Trabajo Relacionados con Agentes Químicos*. INSHT. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales (Real Decreto 374/2001, 6 de Abril. BOE nº 104, del 1 de Mayo).
- [110] INSHT, NTP 243: Ambiente cerrado: calidad del aire, USA.
- [111] <http://www.osha.gov>
- [112] <http://www.who.int/es/>
- [113] A. Alastuey, X. Querol, S. Rodríguez, F. Plana, A. López-Soler, C. Ruiz, E. Mantilla, *Atmospheric Environment* 38 (2004) 4979.
- [114] V. Desauziers, *Trends in Analytical Chemistry* 23 (2004) 252.
- [115] J. B. Forehand, G. L. Dooly, S. C. Moldoveanu, *Journal of Chromatography A* 898 (2000) 111.
- [116] M. Kaykhaia, S. Nazarib, M. Chamsazb, *Talanta* 65 (2005) 223.
- [117] H. Moriwaki, H. Harino, H. Hashimoto, R. Arakawa, T. Ohe, T. Yoshikura, *Journal of Chromatography A* 995 (2003) 239.
- [118] Y. Moliner-Martínez, C. Molins-Legua, P. Campins-Falcó, *Talanta* 62 (2004) 373.
- [119] Z. M. Siddiqi, D. Pathania, *Talanta* 60 (2003) 1197.
- [120] R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, *The Analyst* 125 (2000) 77.
- [121] P. Campins-Falcó, R. Herráez-Hernández, A. Sevillano-Cabeza, I. Trümpler, *Analytica Chimica Acta* 344 (1997) 125.
- [122] M. Llompart, M. Lourido, P. Landín, C. García-Jares, R. Cela, *Journal of Chromatography A* 963 (2002) 137.
- [123] J. A. Koziel, J. Noah, J. Pawliszyn, *Environmental Science Technology* 35 (2001) 1481.
- [124] E. H. M. Koster, C. H. P. Bruins, G. J. De Jong, *The Analyst* 127 (2002) 598.
- [125] F. Musshoff, H. P. Junker, D. W. Lachenmeier, L. Kroener, B. Madea, *Journal of Chromatographic Science* 40 (2002) 359.
- [126] A. Namera, A. So, J. Pawliszyn, *Journal of Chromatography A* 963 (2002) 295.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [127] L. Pan, J. Pawliszyn, *Analytical Chemistry* 69 (1997) 196.
- [128] L. S. Cai, Y. Y. Zhao, S. L. Gong, L. Dong, C. Y. Wu, *Chromatographia* 58 (2003) 615.
- [129] S. W. Tsai, C. M. Chang, *Journal of Chromatography A* 1015 (2003) 143.
- [130] L. Pan, J. M. Chong, J. Pawliszyn, *Journal of Chromatography A* 773 (1997) 249.
- [131] G. M. Pinto, I. C. Jardim, *Journal of Chromatography A* 869 (2000) 463.
- [132] A. Asperger, J. Efer, T. Koal, W. Engewald, *Journal of Chromatography A* 960 (2002) 109.
- [133] T. Kumazawa, O. Suzuki, *Journal of Chromatography B* 747 (2000) 241.
- [134] M. S. Dopico, M. V. González, J. M. Castro, E. González, J. Pérez, M. Rodríguez, A. Calleja, J. M. L. Vilariño, *Talanta* 59 (2003) 561.
- [135] Z. Cai, D. Wang, W. T. Ma, *Analytica Chimica Acta* 503 (2004) 263.
- [136] G. Ohlenbusch, M. U. Kumke, F. H. Frimmel, *The Science of the Total Environment* 253 (2000) 63.
- [137] D. R. Stempvoort, S. Lesage, *Advances in Environmental Research* 6 (2002) 495.
- [138] C. Gonçaves, M. F. Alpendurada, *Journal of Chromatography A* 968 (2002) 177.
- [139] S. Frías, M. A. Rodríguez, J. E. Conde, J. P. Pérez-Trujillo, *Journal of Chromatography A* 1007 (2003) 127.
- [140] W. T. Ma, K. K. Fu, Z. Cai, G. B. Jiang, *Chemosphere* 52 (2003) 1627.
- [141] M. Solé, C. Porte, D. Barceló, J. Albaiges, *Marine Pollution Bulletin* 40 (2000) 305.
- [142] Y. Gou, R. Eisert, J. Pawliszyn, *Journal of Chromatography A* 873 (2000) 137.
- [143] H. Berrada, G. Font, J. C. Moltó, *Journal of Chromatography A* 890 (2000) 303.
- [144] H.-P. Li, G.-C. Li, J.-F. Jen, *Journal of Chromatography A* 1012 (2003) 129.
- [145] P.-G. Su, S.-D. Huang, *Talanta* 49 (1999) 393.
- [146] S. Lacorte, I. Guiffard, D. Fraisse, D. Barceló, *Analytical Chemistry* 72 (2000) 1430.
- [147] J. Beltran, F. J. López, F. Hernández, *Journal of Chromatography A* 885 (2000) 389.
- [148] T. Lekkas, G. Kolokythas, A. Nikolau, M. Kostopoulou, *Environment International* 30 (2004) 995.
- [149] A. Sánchez, M. C. Sampedro, N. Unceta, M. A. Goicolea, R. J. Barrio, *Journal of Chromatography A* 1094 (2005) 70.
- [150] A. Muñoz de la Peña, M. C. Mahedero, A. Bautista, *Journal of Chromatography A* 950 (2002) 287.
- [151] J. J. Jiménez, J. L. Bernal, M. J. Del Nozal, C. Alonso, *Journal of Chromatography A* 1048 (2004) 89.
- [152] A. Legrouri, M. Lakraimi, A. Barroug, A. De Roy, J. P. Besse, *Water Research* 39 (2005) 3441.
- [153] Y. Fan, Y.-Q. Feng, S.-L. Da, Z.-H. Wang, *Talanta* 65 (2005) 111.
- [154] BOE 21 de Febrero 2003, 7228.
- [155] G. Xiong, J. A. Koziel, J. Pawliszyn, *Journal of Chromatography A* 1025 (2004) 57.
- [156] R. C. Borden, D. C. Black, K. V. McBlief, *Environmental Pollution* 118 (2002) 141.
- [157] R. Kubinek, J. Adamuscin, H. Jurdáková, M. Foltin, I. Ostrovský, A. Kraus, L. Soják, *Journal of Chromatography A* 1084 (2005) 90.

- [158] J. C. Flórez, M. L. Fernández, J. E. Sánchez, E. Fernández, A. Sanz, *Analytica Chimica Acta* 415 (2000) 9.
- [159] X. Jiang, C. Basheer, J. Zhang, H. Lee, *Journal of Chromatography A* 1087 (2005) 289.
- [160] K.-L. Yang, C.-H. Lai, J.-L. Wang, *Journal of Chromatography A* 1027 (2004) 41.
- [161] M. Williams, *Biochemical Pharmacology* 70 (2005) 1707.
- [162] K. Park, D. P. Williams, D. J. Naisbitt, N. R. Kitteringham, M. Pirmohamed, *Toxicology and Applied Pharmacology* 207 (2005) 425.
- [163] M. Panteghini, J. C. Forest, *Clinica Chimica Acta* 355 (2005) 1.
- [164] Letter to the Editor, *Clinica Chimica Acta* 362 (2005) 189.
- [165] S. Ulrich, *Journal of Chromatography A* 902 (2000) 167.
- [166] Z. Huang, S. Zhang, *Journal of Chromatography B* 792 (2003) 241.
- [167] D. Talwar, I. D. Watson, M. J. Stewart, *Journal of Chromatography B* 735 (1999) 229.
- [168] M. Pellegrini, F. Rosati, R. Pacifici, P. Zuccaro, F. S. Romolo, A. López, *Journal of Chromatography B* 769 (2002) 243.
- [169] G. Boatto, M. V. Faedda, A. Pau, B. Asproni, S. Menconi, R. Cerri, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 29 (2002) 1073.
- [170] N. Raikos, K. Christopoulou, G. Theodoridis, H. Tsoukali, D. Psaroulis, *Journal of Chromatography B* 789 (2003) 59.
- [171] M. Yonamine, N. Tawil, R. Lucia de Moraes Moreau, O. Silva, *Journal of Chromatography B* 789 (2003) 73.
- [172] F. Musshoff, D. Lachenmeier, L. Kroener, B. Madea, *Journal of Chromatography A* 598 (2002) 231.
- [173] R. Herráez-Hernández, P. Campins-Falcó, J. Verdú-Andrés, *The Analyst* 126 (2001) 581.
- [174] R. Herráez-Hernández, P. Campins-Falcó, A. Sevillano-Cabeza, *Analytical Chemistry* 68 (1996) 734.
- [175] R. Herráez-Hernández, P. Campins-Falcó, J. Verdú-Andrés, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 54 (2002) 147.
- [176] J.M.C. Waterval, H.Lingeman, A. Bult, W. J. M. Underberg, *Electrophoresis* 21 (2000) 4029.
- [177] T. Kraemer, H. H. Maurer, *Journal of Chromatography B* 713 (1998) 163.
- [178] C. Gunaratna, P. T. Kissinger, *Journal of Chromatography A* 828 (1998) 95.
- [179] M. D. Pastor, R. Porras, R. Herráez-Hernández, P. Campins-Falcó, *The Analyst* 123 (1998) 319.
- [180] J. Verdú-Andrés, P. Campins-Falcó, R. Herráez-Hernández, *Chromatographia* 60 (2004) 537.
- [181] P. Campins-Falcó, J. Verdú-Andrés, R. Herráez-Hernández, *Chromatographia* 57 (2003) 309.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS







2. REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN

2. REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN

2.1. REACTIVOS





En la **Tabla 8** se muestra el listado de reactivos utilizados para la realización de esta Tesis, así como las casas comerciales que los suministraron y los pictogramas de seguridad de cada uno de ellos.



Tabla 8. Listado de reactivos, casas comerciales y pictogramas de seguridad.

Reactivo	casa comercial						
		X _i	X _n	T/T+	I/I+	C	N
Acetato de sodio	Panreac						
Acetonitrilo	J.T. Baker, Scharlau		X		+X		
Ácido acético	Panreac					X	
Ácido bórico	Panreac		X				
Ácido clorhídrico	Merck, Panreac					X	
Ácido fosfórico	Panreac					X	
Ácido nítrico	Merck					X	
Ácido sulfúrico	Fluka					X	
Ácido húmico	Aldrich	X					
Ametrin	Sigma		X				X
Amoniaco	Prolabo	X					
Antraceno	Dr. Ehrenstorfer			X	X		
Atrazina	Sigma		X				X
Benceno	Dr. Ehrenstorfer			X	X		
Benzo(a)pireno	Dr. Ehrenstorfer			X	X		
Benzo(b)fluoranteno	Dr. Ehrenstorfer			X	X		
Benzo(k)fluoranteno	Dr. Ehrenstorfer			X	X		
Benzo(g,h,i)perileno	Dr. Ehrenstorfer			X	X		
Butilamina	Sigma				+X	X	
Carbonato de sodio	Probus, Panreac	X					
Clorfenvinfos	Sigma			X			X
Clorobenceno	Dr. Ehrenstorfer			X	X		
Clorpirifos	Sigma	X			X		
Cloroformo	Dr. Ehrenstorfer			X	X		
Cloruro de dabsilo	Fluka	X				X	
Cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo	Aldrich					X	
Cloruro de sodio	Prolabo						
1,2-Dicloroetano	Dr. Ehrenstorfer			X	X		
1,2-Diclorobenceno	Dr. Ehrenstorfer			X	X		
1,3-Diclorobenceno	Dr. Ehrenstorfer			X	X		
1,4-Diclorobenceno	Dr. Ehrenstorfer			X	X		
Dietilamina	Sigma		X		+X	X	
Dimetilamina	Sigma				+X	X	
Etilamina	Sigma			X	X		
Etilbenceno	Dr. Ehrenstorfer			X	X		
Fenamifos	Dr. Ehrenstorfer			X	X		
Fenilalanina	Aldrich						
Fenitrotion	Sigma	X					X

Capítulo 2. REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN

Fensulfotión	Dr. Ehrenstorfer			X	X		
Fention	Sigma			X			X
Fluoranteno	Dr. Ehrenstorfer			X	X		
9-Fluorenilmetil cloroformiato	Aldrich					X	
Fonofos	Dr. Ehrenstorfer			X	X		
<i>o</i> -Ftaldialdehido	Fluka	X					
Hexano	Scharlau		X		X		X
Hidrocloruro de metanfetamina	Sigma		X				
Hidrocloruro de 3,4-metilendioxfanfetamina	Sigma		X				
Hidrocloruro de 3,4-metilendioximetanfetamina	Sigma		X				
Hidrogenocarbonato de sodio	Probus						
Hidrogenofosfato de sodio	Probus						
Hidróxido de potasio	Probus					X	
Hidróxido de sodio	J.T. Baker, Panreac					X	
Indeno(1,2,3-cd) pireno	Dr. Ehrenstorfer			X	X		
Malation	Dr. Ehrenstorfer	X					
Metanol	Merck, Scharlau, J.T. Baker			X	+X		
Metilamina	Sigma	X					
<i>m,p</i> -Xileno	Dr. Ehrenstorfer			X	X		
N-Acetil-L-cisteína	Fluka, Aldrich						
Naftaleno	Dr. Ehrenstorfer			X	X		
1,2-Naftoquinona-4-sulfonato	Sigma	X					
Nonilfenol	Dr. Ehrenstorfer	X					X
Norefedrina	Sigma		X				
<i>o</i> -Xileno	Dr. Ehrenstorfer			X	X		
Paration	Sigma			X			
Pentaclorobenceno	Dr. Ehrenstorfer			X	X		
Pentilamina	Sigma				+X	X	
Prometon	Sigma		X				X
Prometrin	Sigma		X				X
Propazina	Sigma		X				X
Propilamina	Sigma				+X	X	
Simazina	Aldrich		X				
Sulfato de anfetamina	Sigma		X				
Terbutrin	Sigma						X
Tetracloroetileno	Dr. Ehrenstorfer			X	X		
Tetracloruro de carbono	Dr. Ehrenstorfer			X	X		
Tolueno	Dr. Ehrenstorfer			X	X		
Tricloroetileno	Dr. Ehrenstorfer			X	X		
Trimetilamina	Sigma	X					
Trifluralina	Sigma	X			+X		

* Oxidante.  X_i : Irritante.  X_n : Nocivo.  T/T+: Tóxico/muy tóxico.  I/I+:

Inflamable/Muy inflamable.  C: Corrosivo.  N: Peligroso para el medio ambiente.

2.2. APARATOS, MONTAJES, INSTRUMENTACIÓN Y SOFTWARE

Los aparatos, instrumentos y software utilizados en esta Tesis fueron los siguientes:

- Sistema de purificación de agua Barnstead modelo Nanopure II (Iowa, EUA).
- pH-metro Crisol modelo micropH 2000 (Barcelona, España).
- pH-metro portátil Hanna modelo HI9025 (Rhode Island, EUA).
- Agitador magnético-calefactor Raypa (Barcelona, España).
- Baño de agua termostatzado Clifton (Avon, Inglaterra).
- Equipo de vacío de columnas de extracción IST VacMaster (Hengoed, Inglaterra).
- Bomba de aire Buck-Genie VSS-5 (EUA) (**Figura 17A**).
- Medidor de flujo de aire Dräger Multicom KS (Luebeck, Alemania) (**Figura 17B**).
- Bomba de detección de gases Dräger (Luebeck, Alemania) (**Figura 17C**).



Figura 17. (A) Bomba de aire, (B) Medidor de flujo y (C) Bomba de detección de gases

- Interfase de SPME-HPLC Supelco (Bellefonte, PA, EUA) (**Figura 18**).

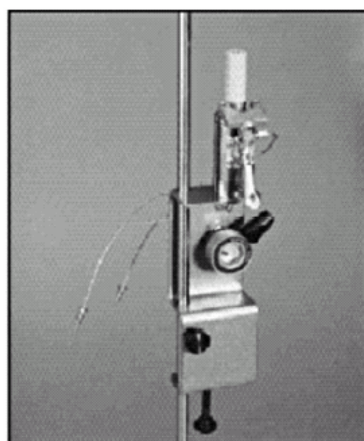


Figura 18. Interfase de SPME-HPLC

- Soportes para fibras reemplazables de SPME de Supelco (Bellefonte, PA, EUA) (**Figura 19**).

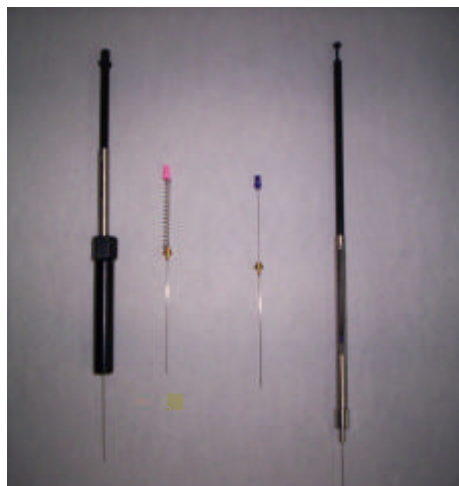


Figura 19. Fibras y soportes para fibras de SPME

- Espectrofotómetro de fila de diodos HP 8452 UV-vis (Golden Valley, Alemania), equipado con una celda de 1 cm de camino óptico, conectado a un PC Hewlett Packard Vector XM 5/90 controlado por el software G1115AA (**Figura 20**).



Figura 20. Espectrofotómetro de fila de diodos UV-vis HP 8452 conectado a un PC Hewlett Packard Vector XM 5/90.

- Sistema cromatográfico equipado con una bomba cuaternaria Hewlett Packard Series 1100 (Palo Alto, CA, EUA) y una válvula de 6 vías para alta presión Rheodyne modelo 7000 (**Figura 21A**); detector UV/vis Hewlett Packard 1040 M Series II o detector programable de fluorescencia Hewlett Packard 1046 A (Palo Alto, CA, EUA) (**Figura 21B**), conectado con el sistema de almacenamiento y procesamiento de datos Hewlett Packard Chem-Station.

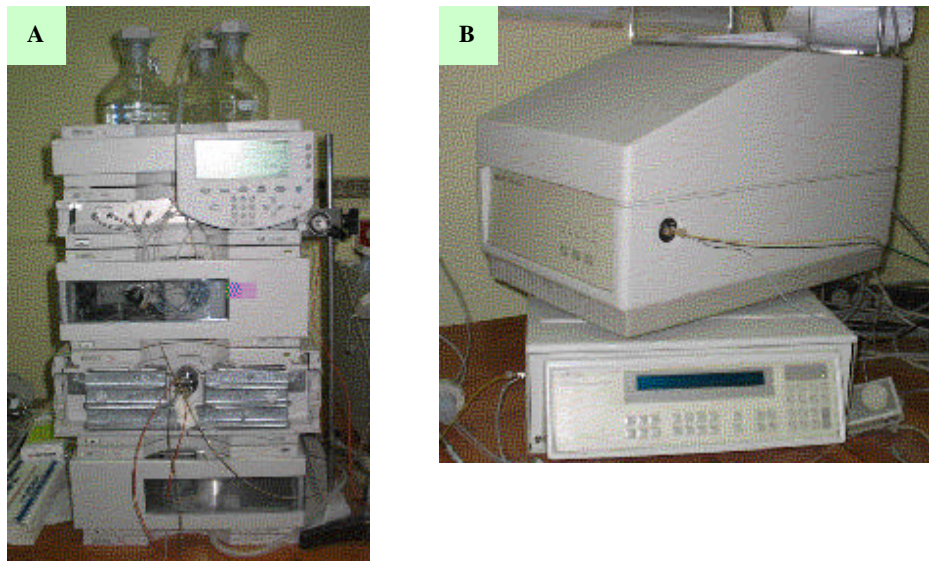


Figura 21. (A) Equipo cromatográfico HP Series 1100. (B) Detectores de UV/vis y fluorímetro.

- Sistema de cromatografía líquida capilar equipado con bomba cuaternaria Series 1100 Agilent (EUA), con válvula de inyección de 6 vías con un loop interno de 2 μL y válvula de 6 vías para alta presión Rheodyne modelo 7725; detector UV-vis 1100 Series Hewlett Packard (EUA) y detector de fluorescencia Agilent 1100 Series (EUA). Los detectores se acoplaron a un sistema de adquisición y tratamiento de datos Agilent HPLC ChemStation (**Figura 22**).



Figura 22. Sistema de cromatografía líquida capilar HP 1100.

- Cromatógrafo de gases Focus GC Thermo Finnigan (Walthman, MA, EUA) equipado con un inyector split/splitless y detector de ionización en llama (**Figura 23**).



Figura 23. Sistema de cromatografía de gases Focus GC Thermo Finnigan.

- El esquema del sistema propuesto para la desorción estática de los derivados de MA, DMA y TMA en agua, de anfetaminas en orina y de triazinas en agua, mediante el acoplamiento entre la SPME con fibras y la CL se presenta en la **Figura 24** (**Apéndices 1, 2, 5, 6, 7, 8 y 10**).

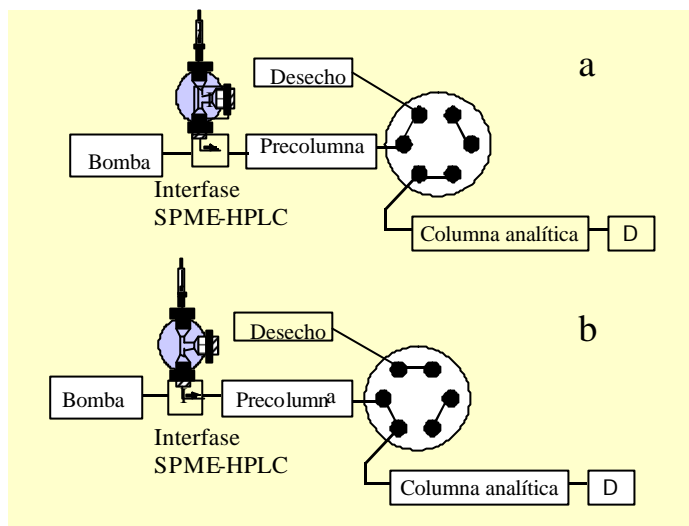


Figura 24. Sistema de SPME en fibras acoplado a CL utilizado en la determinación de MA, DMA y TMA (**Apéndices 1, 2, 5 y 6**) anfetaminas (**Apéndices 7 y 8**) y triazinas (**Apéndice 10**); posición (a) preconcentración y (b) elución.

- El esquema del sistema de derivatización en línea asistida en soporte sólido, para (a) preconcentración, purificación y derivatización, y (b) elución, separación y detección de TMA (**Apéndices 3 y 4**) se muestra en la **Figura 25**.

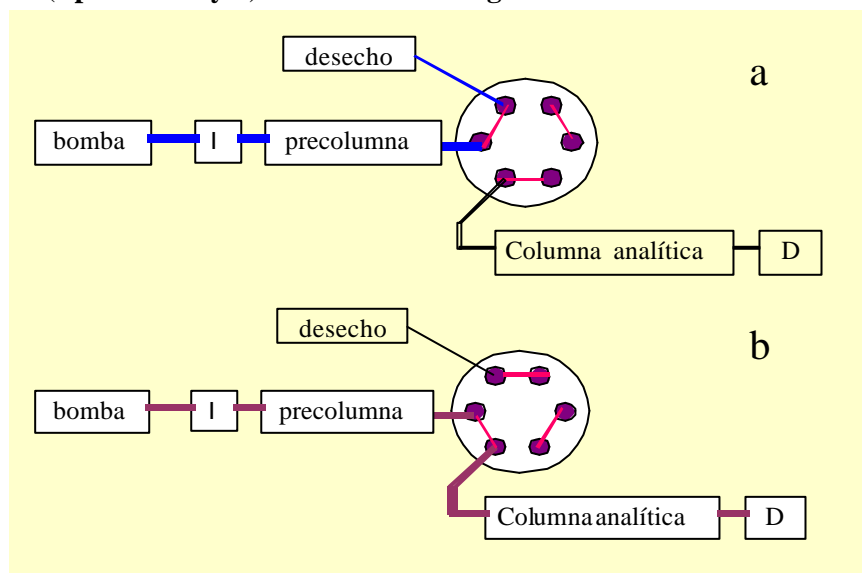


Figura 25. Esquema de columnas acopladas empleado para la determinación de TMA en agua y en aire (**Apéndices 3 y 4**); posición (a) preconcentración y (b) elución.

- El esquema empleado para el muestreo de aire en la determinación de TMA mediante derivatización con FMOC en línea (**Apéndice 4**) se muestra en la **Figura 26**.

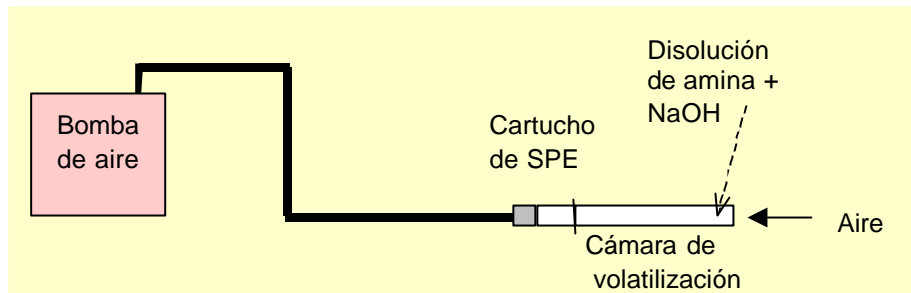


Figura 26. Esquema para la volatilización y muestreo de patrones de TMA.

- El esquema empleado para la generación de muestras sintéticas de TMA para la aplicación del método de determinación de TMA en aire con FMOC (**Apéndice 4**) se muestra en la **Figura 27**.

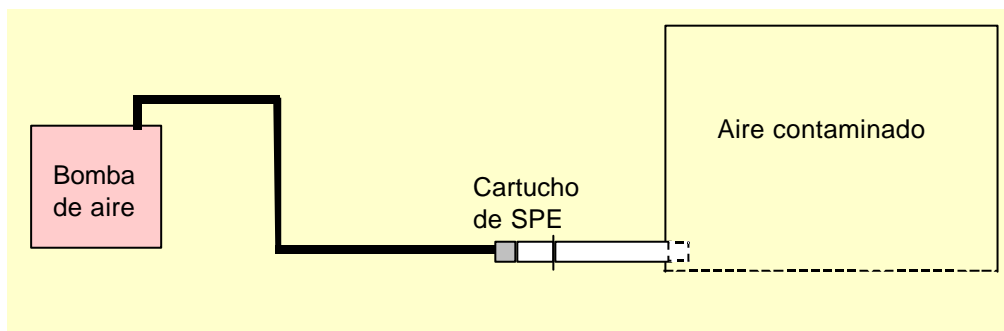


Figura 27. Esquema para la generación de muestras sintéticas de aire (**Apéndice 4**).

- El montaje utilizado para la SPME en tubo sobre una columna empaquetada en la determinación de triazinas en agua mediante la inyección de un gran volumen de muestra en el sistema de CL capilar (**Apéndice 10**) se presenta en la **Figura 28**.

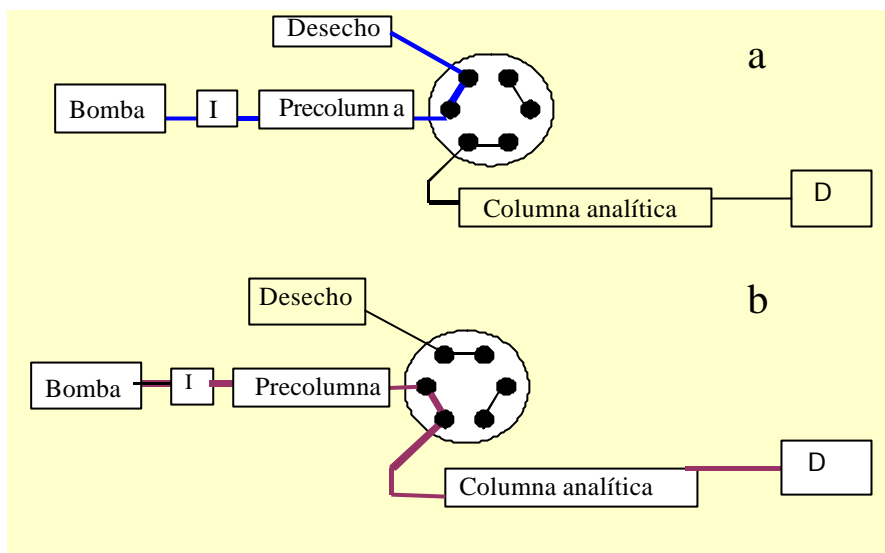


Figura 28. Esquema de SPME en tubo con columna empaquetada acoplada a la CL capilar utilizado en la determinación de triazinas (**Apéndice 10**); posición (a) extracción y (b) separación y detección.

- El montaje utilizado en la determinación de triazinas y compuestos organofosforados mediante la SPME en tubo con una columna capilar abierta acoplada al sistema de CL capilar (**Apéndices 10 y 11**) se muestra en la **Figura 29**.

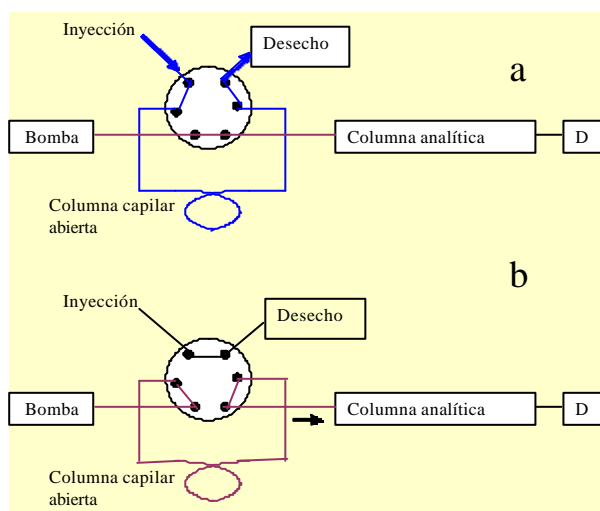


Figura 29. Esquema de SPME en tubo acoplada a CL capilar utilizada en el screening de triazinas y compuestos organofosforados (**Apéndices 10 y 11**); (a) extracción y (b) desorción.

3. RESULTADOS OBTENIDOS Y DISCUSIÓN

3.1. ACOPLAMIENTO MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA-CROMATOGRAFÍA CONVENCIONAL Y DERIVATIZACIÓN LÍQUIDA

3.1.1. DETERMINACIÓN DE METILAMINA

Este apartado se desarrolla en un único capítulo:

- Se propone un método para la determinación de metilamina (MA) en matrices acuosas mediante SPME para el enriquecimiento y la derivatización del analito seguida de CL. El reactivo fluorogénico empleado para la derivatización fue el FMOC. Las fibras se sumergieron sucesivamente en la muestra y en la disolución del reactivo para extraer la MA y formar el derivado con FMOC, respectivamente. Después de un tiempo de reacción, el analito derivatizado fue desorbido dentro del sistema cromatográfico, y cromatografiado utilizando detección fluorescente. Los resultados se han comparado con los obtenidos mediante un método previamente validado para aminas alifáticas [1], en el cual la extracción y la derivatización se llevan a cabo dentro de cartuchos de SPE de tipo C₁₈. Se ha establecido la utilidad del procedimiento propuesto para la cuantificación de MA en diferentes tipos de aguas.

3.1.1.1. ANÁLISIS DE METILAMINA MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DESPUÉS DE LA DERIVATIZACIÓN SOBRE LA FIBRA CON 9-FLUORENILMETIL CLOROFORMIATO

En este capítulo se han ensayado diferentes fibras, diferentes condiciones de derivatización y diferentes configuraciones cromatográficas, utilizando el reactivo 9-fluorenilmetil cloroformiato (FMOC).

La señal fue registrada con el detector de fluorescencia fijando las longitudes de onda de excitación y de emisión a 264 y 313 nm, respectivamente. También se utilizó un detector de UV registrando la señal a 230 nm. El esquema empleado para el acoplamiento SPME en fibra-CL convencional se presenta en la **Figura 24** del *Capítulo 2-Reactivos e Instrumentación* (pág. 69). Más información acerca de las condiciones experimentales se incluye en el **Apéndice 1**.

Elección de la fibra

De acuerdo con estudios previos, la fase móvil seleccionada para la separación del derivado MA-FMOC fue acetonitrilo-agua en modo gradiente. El porcentaje de acetonitrilo se aumentó desde el 40% a los 0 min hasta el 70% a los 7 min, y después al 100% a los 15 min, y la velocidad de flujo de la fase móvil fue 1.0 mL/min [1]. Se ensayaron las diversas fibras disponibles para disoluciones estándar de MA (20.0 µg/mL), a diferentes tiempos de adsorción, reacción y desorción, y para una concentración de FMOC de 1 mM.

Se observó que los sorbentes de CW-TPR, CW-DVB y PDMS-DVB fueron los únicos que proporcionaron una extracción significativa de la MA y/o del derivado MA-FMOC (datos no presentados). En la **Figura 30 a-c** se representan los cromatogramas obtenidos con detección UV para los blancos de muestra (agua) con las fibras de CW-TPR, CW-DVB y PDMS-DVB. Todos los cromatogramas presentaban picos adicionales al pico del reactivo ($t_r = 4.4$ min). El espectro de dichos picos se registró entre 210 y 450 nm. Se observó que los compuestos que eluían entre 2.0 y 6.5 min presentaban espectros muy similares a aquellos correspondientes al FMOC sin reaccionar, lo que indicaba que correspondían a productos secundarios. Los otros picos fueron probablemente causados por contaminantes retenidos sobre las fibras. El cromatograma obtenido con el sorbente de CW-TPR mostró menor cantidad de productos secundarios, particularmente en la región del cromatograma donde eluyó el derivado MA-FMOC (tiempo de retención, $t_r = 5.2$ min). En la **Figura 30d** se representa el cromatograma obtenido para una disolución de MA con la fibra de CW-TPR. En consecuencia, el sorbente CW-TPR fue seleccionado para el resto de los experimentos. Debe remarcarse que no se observaron cambios en los tiempos de retención como consecuencia de la utilización de diferentes fibras.

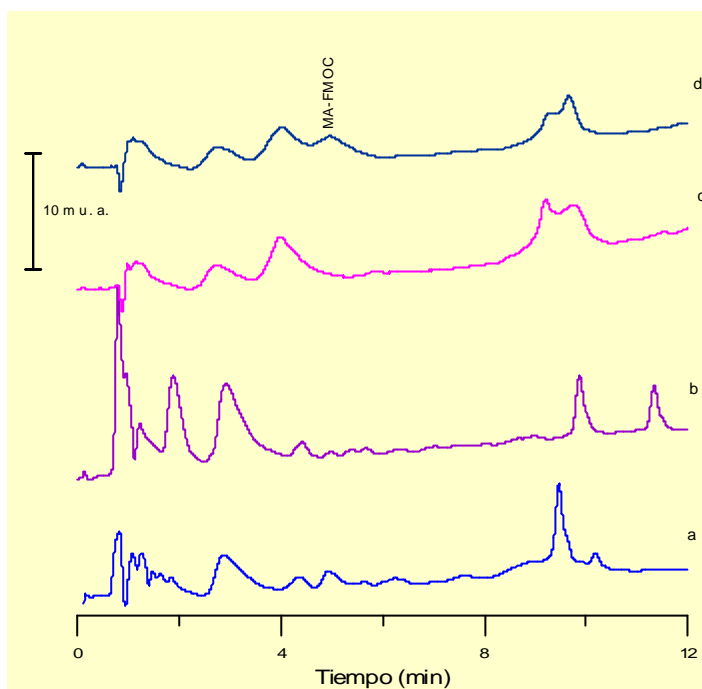


Figura 30. Cromatogramas obtenidos para un blanco de muestra (agua) con (a) fibra de PDMS/DVB de 60 μm , (b) fibra de CW/DVB y (c) fibra de CW/TPR, y (d) cromatograma obtenido para una disolución estándar de MA (20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con fibra de CW/TPR. Detección: UV a 230 nm. Para otros detalles experimentales, ver el **Apéndice 1**.

Optimización de las condiciones cromatográficas

De acuerdo con la **Figura 30d**, la resolución conseguida bajo las condiciones de elución propuestas en [1] fue adecuada para controlar la reacción entre MA y FMOC al utilizar FMOC 1 mM. Sin embargo, la resolución observada entre los picos del reactivo y del derivado fue inadecuada para concentraciones superiores de reactivo. Consecuentemente se evaluaron diferentes condiciones de elución con la finalidad de conseguir una señal adecuada para el derivado MA-FMOC. Los mejores resultados se obtuvieron al aumentar el porcentaje de acetonitrilo desde el 40% a los 0 min hasta el 70% a los 9.5 min y después hasta el 100% a los 17.5 min (ver **Figura 31**). Aunque bajo estas condiciones el derivado MA-FMOC eluyó a 8.2 min, el último paso en el programa de elución fue necesario para eluir algunos productos secundarios de FMOC de la columna analítica (ver **Figuras 30 y 31**).

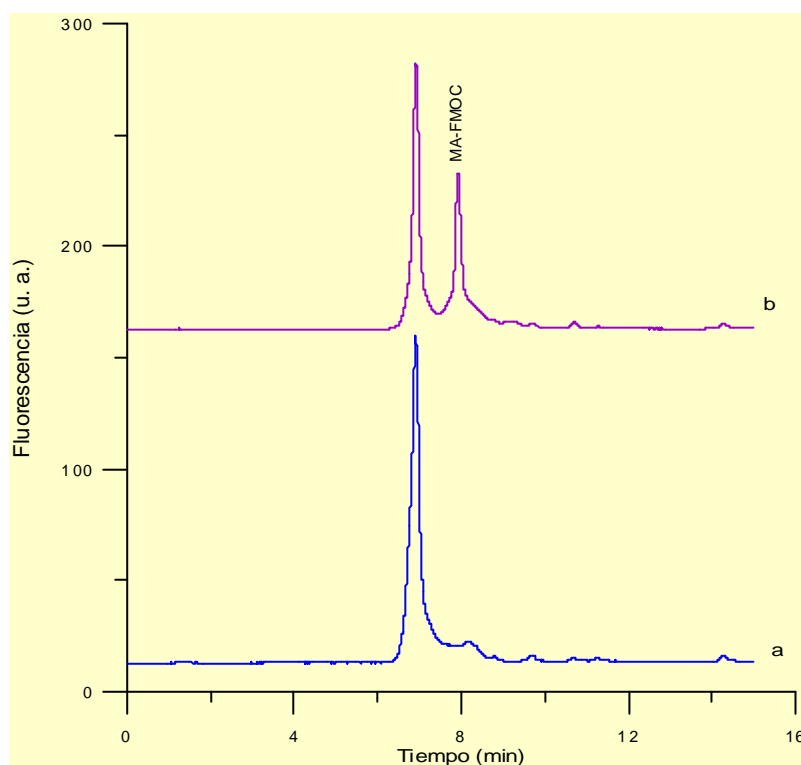


Figura 31. Cromatogramas obtenidos para (a) un blanco (agua), y (b) una disolución estándar de MA (40.0 mg/mL). Tiempo de adsorción, 15 min; tiempo de reacción, 2 min; concentración de FMOC, 1mM; tiempo de desorción, 5 min. Sorbente de la fibra, CW-TPR. Detección: fluorimétrica, $I_{excitación}$ $I_{emisión}$ 313 nm. Para otros detalles experimentales, ver el **Apéndice 1**.

Optimización del proceso de extracción/derivatización

En primer lugar, se estudió el efecto del tiempo de adsorción en el área del pico del analito. Se probaron diferentes tiempos en el intervalo 5-30 min para disoluciones estándar de MA (5.0 $\mu\text{g/mL}$) utilizando FMOC 1 mM para la derivatización. Los resultados de este estudio se presentan en la **Figura 32a**. Como se observa, las respuestas máximas se alcanzaron para tiempos de adsorción entre 15 y 30 min. De acuerdo con estos resultados, 15 min fue el tiempo de adsorción seleccionado para el resto del trabajo.

En cuanto al procedimiento de derivatización se optimizaron dos parámetros, la concentración de reactivo y el tiempo de reacción. La reacción entre los grupos amino y el FMOC requiere un medio básico [1, 2]. Por esta razón la disolución de reactivo consistió en una mezcla de FMOC y de tampón borato 0.05 M de pH 10.0. Debido a que a pHs básicos el FMOC se hidroliza lentamente, la disolución estándar de FMOC (preparada en acetonitrilo) y el tampón se mezclaron inmediatamente antes de la inmersión de la fibra. Se evaluaron diferentes concentraciones de FMOC en el intervalo 0.25-25 mM (ver **Figura 32b**). Se observó que las respuestas del analito aumentaron considerablemente con el incremento de la concentración de FMOC hasta 1 mM. Un incremento adicional de la concentración de reactivo apenas mejoró la señal. Además, con una concentración de FMOC 5 mM el pico correspondiente al reactivo solapó parcialmente con el pico correspondiente al derivado MA-FMOC; para una concentración de FMOC 25 mM se observó un solapamiento total. Por ello 1 mM fue la concentración de FMOC seleccionada. El efecto del tiempo de reacción para esa concentración de reactivo está representado en la **Figura 32c**. Los máximos rendimientos de conversión se alcanzaron en el intervalo 0.5-2.0 min, pero la reproducibilidad fue mejor utilizando un tiempo de reacción de 2.0 min. Consecuentemente, ese fue el valor seleccionado.

Finalmente, se ensayaron diferentes tiempos de desorción entre 0 y 10 min pero no se observaron diferencias significativas para tiempos de desorción superiores a 5.0 min (los datos no se han presentado).

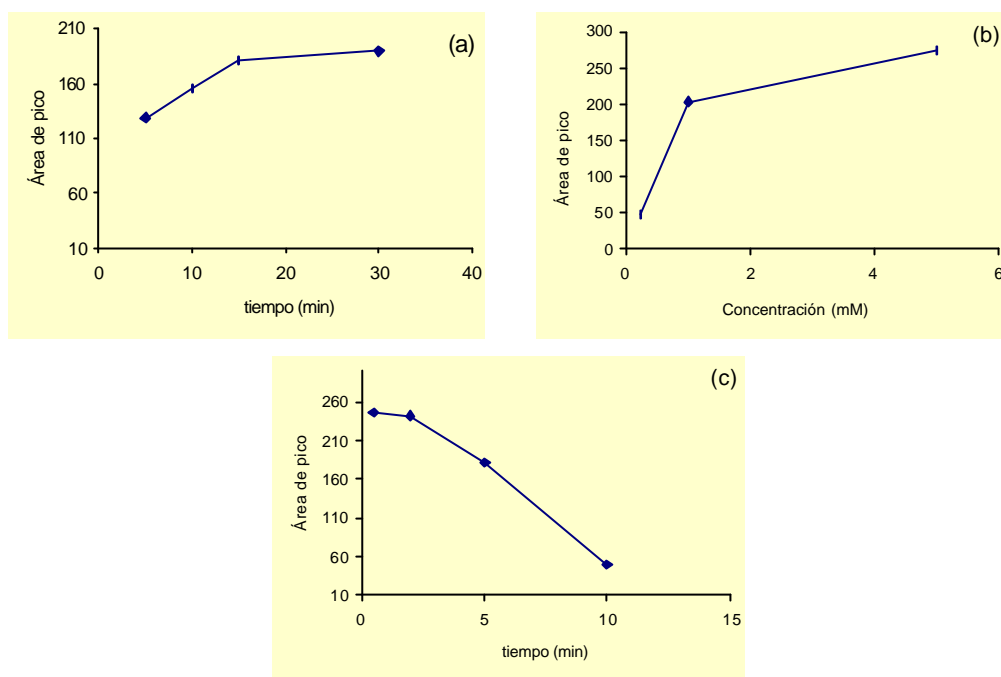


Figura 32. Efecto de las variables experimentales sobre las respuestas de MA-FMOC: (a) tiempo de adsorción, (b) concentración de FMOC y (c) tiempo de reacción. Concentración de MA en las muestras, 5.0 $\mu\text{g/mL}$. Sorbente de la fibra, CW-TPR. Detección: fluorimétrica, $I_{\text{excitación}}$ 264 nm y $I_{\text{emisión}}$ 313 nm. Para otros detalles experimentales, ver el **Apéndice 1**.

En la **Tabla 9** se comparan los procedimientos utilizados para la extracción y derivatización de la MA mediante las aproximaciones de SPME y derivatización asistida sobre soporte sólido de tipo C_{18} sin preconcentración, para el mismo intervalo de concentraciones de MA en las muestras. Debe destacarse que las cantidades de MA y FMOC que se pudieron extraer con las fibras de SPME fueron muy inferiores a las que se pudieron extraer con los cartuchos de SPE de tipo C_{18} . Por tanto, las condiciones experimentales utilizadas en los respectivos procedimientos optimizados no fueron comparables, sobretodo el volumen de muestra. Como se observa, aunque el tiempo requerido para la reacción en ambas aproximaciones es el mismo, el tiempo total implicado en la preparación de la muestra es mayor en el método de SPME debido a las etapas de adsorción y desorción. No obstante, la extracción y derivatización de una muestra puede llevarse a cabo durante la separación cromatográfica de la muestra previa, de modo que ambas modalidades proporcionan tiempos globales de análisis comparables. Las principales ventajas del método de derivatización sobre la fibra de SPME son: la reducción considerable de la manipulación de la muestra, el no utilizar disolventes orgánicos, y el que se pueda considerar una técnica no destructiva (inmersiones por triplicado de la fibra en las muestras o en los patrones proporcionaron la estimación de concentraciones similares de MA con desviaciones estándar relativas entre 2.8 y 9%).

Tabla 9. Comparación entre los procedimientos utilizados para la extracción y derivatización de MA con los métodos de derivatización sobre la fibra de SPME y de derivatización asistida sobre un soporte sólido.

Condiciones experimentales	Método de extracción/derivatización	
	SPME	Asistida en soporte sólido
Volumen de la muestra (mL)	25.0 (no destructiva)	0.5 (destructiva)
Reactivo derivatizante	1.0 mL de FMOC 1 mM	0.25 mL de FMOC 25 mM
Tiempo de reacción (min)	2	2
Manipulación de la muestra	Inmersión de la fibra en la muestra (15 min) Inmersión de la fibra en la disolución de FMOC (2 min) Colocación de la fibra en la interfase SPME-HPLC (transferencia tras 5 min)	Acondicionamiento de los cartuchos de SPE Secado de los cartuchos de SPE Carga de la muestra Carga del reactivo (esperar tiempo de reacción) Desorción del derivado MA-FMOC Inyección
Tiempo total (min)	23	5

Transferencia a la columna analítica

Se observó que la inclusión de la etapa de SPME resultó en un ensanchamiento significativo de los picos comparado con la inyección directa del derivado de MA-FMOC. Esto puede ser explicado por el hecho de que el compuesto de interés se transfirió desde la interfase SPME-HPLC a la columna analítica en un volumen relativamente grande (200 μ L) de un disolvente con elevada fuerza eluyente (acetonitrilo). Se realizaron varios intentos para reducir el ensanchamiento de los picos cambiando el disolvente utilizado para la desorción del derivado MA-FMOC de la fibra. Se probaron diferentes mezclas de acetonitrilo-agua, pero la mejoría en el perfil de los picos fue inapreciable. Además, el porcentaje de MA-FMOC desorbido de las fibras disminuyó a medida que se aumentó el porcentaje de agua en el disolvente.

Como alternativa se intentó efectuar la compresión de pico colocando una precolumna empaquetada con relleno de tipo C_{18} entre la interfase SPME-HPLC y la columna analítica. Para ello se colocó una válvula de conmutación adicional entre la precolumna y la columna analítica, de modo que el flujo de la fase móvil que salía de la precolumna podía ser enviado a desecho o a la columna analítica. Durante la etapa de transferencia el eluyente fue 100 % agua, de manera que el derivado MA-FMOC se retuvo en la precolumna durante un corto intervalo de tiempo, y después se transfirió a la columna analítica. La compresión del pico fue debida al hecho de que el derivado MA-FMOC fue transferido a la columna analítica con un disolvente de baja fuerza eluyente (agua) [3].

Por otro lado, con esta configuración la primera fracción del eluyente que emerge de la precolumna puede ser descartada. Los cromatogramas de la **Figura 31** sugieren que la primera fracción que eluye de la precolumna (también empaquetada con una fase C₁₈) debía contener FMOC no reaccionado. En otras palabras, la cantidad total de FMOC que no reacciona y que se envía a la columna analítica puede reducirse descartando la primera fracción que eluye de la precolumna. En este estudio se probaron diferentes tiempos de desconexión entre ambas columnas y los mejores resultados se obtuvieron con un tiempo de 0.5 min. Después de este tiempo la válvula de conmutación se cambió de posición y se inició el programa del gradiente de elución. Al final del ensayo la válvula se cambió a la posición original.

La **Figura 33** muestra los cromatogramas obtenidos para una disolución estándar de MA transferida directamente desde la interfase SPME-HPLC a la columna analítica (**33a**), o transferida a la precolumna y después a la columna analítica (**33b**). Como se observó, los perfiles de pico se mejoraron al utilizar la precolumna. Además, bajo las condiciones propuestas se redujo la señal correspondiente al exceso de reactivo, mientras que las áreas de pico de MA-FMOC no fueron sustancialmente afectadas, lo cual puede ser explicado por el hecho de que el FMOC se retiene menos en la precolumna que el derivado MA-FMOC. Por ejemplo, las áreas medidas para el FMOC no reaccionado cuando se utilizó la precolumna fueron alrededor del 86% de las observadas con una configuración convencional de CL. La inclusión de la precolumna conduce a picos del derivado MA-FMOC de área media de 96% de las obtenidas sin precolumna.

Por tanto, el empleo de la precolumna fue considerada una buena opción no sólo porque se mejoró el perfil de los picos, sino también porque se facilitó la medida de las áreas del pico de MA-FMOC. Hay que resaltar que la inclusión de la precolumna aumentó los tiempos de retención en 0.5 min, tiempo que corresponde al retraso introducido por la etapa de purificación.

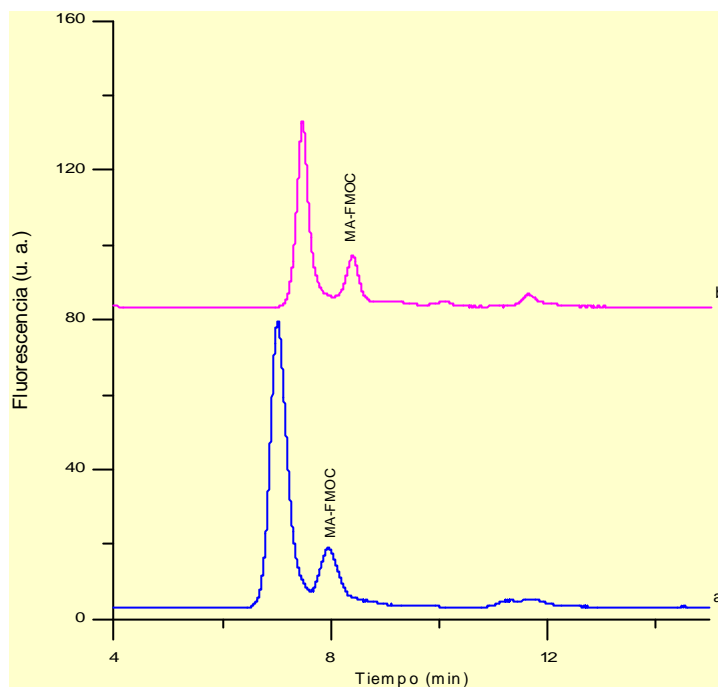


Figura 33. Cromatogramas obtenidos para la MA (a) transferida directamente desde la interfase SPME-HPLC a la columna analítica, y (b) transferida desde la interfase SPME-HPLC a la precolumna y después a la columna analítica. Concentración de MA, 5.0 mg/mL. Sorbente de la fibra, CW-TPR. Detección: fluorimétrica, $I_{excitación}$ 264 nm y $I_{emisión}$ 313 nm. Para otros detalles experimentales ver el **Apéndice 1**.

Características analíticas

Se evaluó la utilidad de las condiciones propuestas para la cuantificación de MA en agua. La linealidad se examinó en un intervalo de concentraciones entre 2.5 y 10.0 $\mu\text{g/mL}$. De acuerdo con la bibliografía este intervalo de concentraciones es adecuado para la mayoría de las aplicaciones relacionadas con la determinación de MA en aguas medioambientales y residuales [1, 4, 5]. La curva de calibrado obtenida fue $y = (35 \pm 1) + (35 \pm 2)x$, con un coeficiente de correlación medio, $R = 0.9990$ ($n = 10$). Estos valores indican que el método proporcionó una linealidad adecuada dentro del intervalo de concentración ensayado. Los coeficientes de variación intra e inter-día se calcularon para una disolución estándar que contenía 5.0 $\mu\text{g/mL}$ de MA. Los valores obtenidos fueron 7% ($n = 3$) y 15% ($n = 5$), respectivamente. Los LDC y LDD fueron 2.5 y 0.75 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. El LDD fue aproximadamente un orden de magnitud superior al obtenido con la aproximación de derivatización sobre soporte sólido [1]. Esto es porque, debido a las pequeñas dimensiones de la fibra, las cantidades de MA y FMOC que pueden ser extraídas/formadas sobre la fibra son significativamente menores que las cantidades que pueden ser procesadas con los cartuchos de SPE. Sin embargo, el LDD fue de aproximadamente un orden de magnitud menor al conseguido con la derivatización en disolución seguida de SPME y CG con detección de ionización en llama [6].

SPME-CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CONVENCIONAL

La exactitud del método se evaluó analizando disoluciones estándar que contenían MA a diferentes concentraciones dentro del rango de concentraciones examinado. Los resultados obtenidos están resumidos en la **Tabla 10**. Esta tabla también muestra los valores obtenidos para las mismas muestras mediante el método de derivatización asistida sobre soporte sólido. En todos los casos el método propuesto proporcionó valores próximos a las concentraciones reales. Además, los resultados obtenidos para cada muestra mediante los métodos de derivatización sobre una fibra de SPME y de derivatización asistida sobre soporte sólido fueron estadísticamente iguales (a un nivel de confianza de 95%).

Tabla 10. Exactitud para la determinación de MA mediante los métodos de derivatización sobre una fibra de SPME y de derivatización asistida sobre soporte sólido ($n = 3$).

Tipo de muestra	Concentración añadida de MA ($\mu\text{g/mL}$)	Método de derivatización sobre una fibra de SPME		Método de derivatización asistida sobre un soporte sólido	
		Concentración determinada de MA ($\mu\text{g/mL}$)	Error relativo (%)	Concentración determinada de MA ($\mu\text{g/mL}$)	Error relativo (%)
Patrón	2.5	2.5 ± 0.3	0	2.3 ± 0.6	-8
	5.0	4.5 ± 0.5	-10	4.8 ± 0.3	-4
	7.5	7.1 ± 0.6	-5	7.8 ± 0.5	+4
	2.5 + EA, PA, BuA, PenA, DMA, DEA y TMA (2.5 $\mu\text{g/mL}$ de cada una)	2.5 ± 0.2	0	2.3 ± 0.4	-8
	5.0 + EA, PA, BuA, PenA, DMA, DEA y TMA (5.0 $\mu\text{g/mL}$ de cada una)	4.6 ± 0.1	-8	4.7 ± 0.4	-10
Agua de consumo	2.5	2.3 ± 0.7	-8	2.43 ± 0.03	-3
	5.0	5.2 ± 0.4	+4	4.5 ± 0.3	-10
Agua subterránea	2.5	2.3 ± 0.2	-8	2.2 ± 0.4	-12
	5.0	4.9 ± 0.4	-2	5.1 ± 0.5	+2
Agua residual	-	4.6 ± 0.1	-	5.4 ± 0.4	-

EA: etilamina; PA: propilamina; BuA: *n*-butilamina; PenA: *n*-pentilamina; DMA: dimetilamina; DEA: dietilamina y TMA: trimetilamina.

La selectividad del método propuesto se evaluó procesando disoluciones estándar de diversas aminas alifáticas primarias y secundarias de cadena corta. Las aminas probadas fueron etilamina, propilamina, *n*-butilamina, *n*-pentilamina, dimetilamina, dietilamina y trimetilamina. Todos los compuestos ensayados excepto la trimetilamina fueron extraídos con las fibras y derivatizados con FMOC, pero sus respectivos derivados eluyeron a tiempos de retención superiores al del MA-FMOC, como se ilustra en la **Figura 34**. Para examinar posibles interferencias debidas al consumo de FMOC se procesaron muestras que contenían varias aminas alifáticas además de la MA, y la concentración de MA se calculó a partir de la ecuación de calibrado obtenida con disoluciones estándar de ésta. Los resultados obtenidos (ver **Tabla 10**) indican que la conversión del analito no estaba afectada significativamente por la presencia de otras aminas. Por tanto, las condiciones seleccionadas pueden utilizarse para la determinación selectiva de MA.

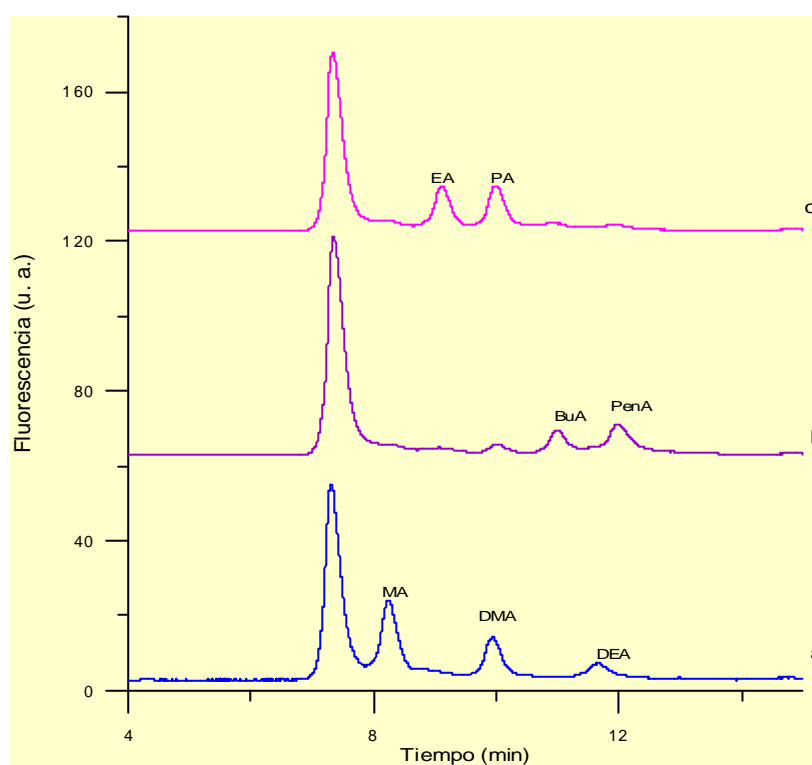


Figura 34. Cromatogramas obtenidos para disoluciones estándar que contienen mezclas de aminas alifáticas: (a) MA, dimetilamina (DMA) y dietilamina (DEA), (b) *n*-butilamina (BuA) y *n*-pentilamina (PenA) y (c) etilamina (EA), propilamina (PA) y trimetilamina. Concentración de cada amina en las muestras, 5.0 $\mu\text{g/mL}$. Sorbente de la fibra, CW/TPR. Detección: fluorimétrica, $I_{\text{excitación}}$ 264 nm y $I_{\text{emisión}}$ 313 nm. Para más detalles experimentales, ver el **Apéndice 1**.

Aplicación a muestras reales

Finalmente se evaluó la fiabilidad del método descrito analizando agua de consumo humano, agua subterránea y agua residual obtenida de una industria dedicada a la producción de fertilizantes. No se encontró MA en las muestras de agua de consumo y de agua subterránea. Estas muestras se fortificaron con MA produciendo concentraciones dentro del intervalo estudiado. Las concentraciones de MA en las muestras aditivadas se calcularon a partir de la ecuación de calibrado obtenida con disoluciones estándar de MA. Los valores obtenidos están resumidos en la **Tabla 10**. Al igual que para los patrones, los valores fueron equivalentes a los conseguidos reteniendo y derivatizando el analito en cartuchos de SPE de tipo C₁₈.

El cromatograma obtenido para el agua residual industrial reveló que esta muestra contenía MA. La concentración del analito (calculada a partir de la curva de calibrado obtenida con patrones) fue (4.61 ± 0.12) µg/mL (**Tabla 10**). La concentración de MA obtenida mediante el método de derivatización asistida sobre soporte sólido fue (5.4 ± 0.4) µg/mL. Ambos valores pueden considerarse estadísticamente iguales (a un nivel de confianza de 96%).

Conclusiones

Se ha propuesto un método basado en la CL para la determinación de MA en agua utilizando SPME con derivatización sobre la fibra. La inclusión de una precolumna en el sistema cromatográfico para efectuar la compresión de picos mejoró el perfil del pico del derivado de interés y redujo los picos correspondientes a productos indeseados en los cromatogramas finales. Los resultados obtenidos han sido comparados con los conseguidos mediante un método de derivatización asistida sobre soporte sólido con cartuchos de SPE de tipo C₁₈, el cual previamente fue validado para aminas alifáticas de cadena corta [1]. Ambos métodos proporcionaron exactitud y precisión comparables, pero la manipulación de la muestra implicada en los pasos de extracción y derivatización se redujo considerablemente con la aproximación de derivatización sobre una fibra de SPME.

La principal desventaja del método propuesto es que requiere instrumentación adicional comparada con el equipamiento convencional de CL (interfase SPME-HPLC, precolumna y válvula de conmutación). Otra limitación es que, debido a las pequeñas dimensiones de las fibras de SPME disponibles comercialmente, las cantidades totales de MA y/o de MA-FMOC que pueden ser extraídas/formadas sobre la fibra son menores que las que pueden ser extraídas/formadas en un cartucho de SPE. Como resultado, la sensibilidad lograda mediante la derivatización sobre una fibra de SPME es menor. No obstante, los resultados de este trabajo indican que el método basado en la SPME es una alternativa rápida y simple para la mayoría de las aplicaciones relacionadas con la determinación de MA a nivel de ppm en diferentes clases de muestras.

3.1.2. DETERMINACIÓN DE DIMETILAMINA

Este apartado se desarrolla en un único capítulo:

- Se presenta un nuevo método selectivo para la determinación de DMA en agua en forma de su derivado con FMOC, usando SPME y CL. La derivatización sobre la fibra se lleva a cabo en dos etapas, con el reactivo OPA-NAC en primer lugar y a continuación con FMOC. De este modo se evita la formación del derivado propilamina-FMOC durante la segunda etapa, ya que la propilamina es un interferente habitual en las determinaciones de DMA, y por tanto el método fue selectivo para la determinación de DMA. Este derivado formado se detectó mediante fluorescencia. Se discute la aplicabilidad de este método para la determinación de DMA en diferentes tipos de agua.

3.1.2.1. UN NUEVO MÉTODO SELECTIVO PARA EL ANÁLISIS DE DIMETILAMINA EN AGUA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA UTILIZANDO MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y DERIVATIZACIÓN EN DOS ETAPAS CON *o*-FTALALDIALDEHIDO Y 9-FLUORENILMETIL CLOROFORMIATO

La mayoría de los métodos desarrollados específicamente para el análisis de dimetilamina (DMA) implican la derivatización con FMOC [7, 8]. Sin embargo, a lo largo de nuestros estudios sobre la derivatización de aminas alifáticas hemos observado que el derivado DMA-FMOC tiende a coeluir con el derivado originado por la propilamina (PA). Esta interferencia no se ha tenido en consideración en métodos presentados previamente [7, 8]. El solapamiento de la DMA y la PA ocurre bajo una gran variedad de condiciones de CL [9]. Para solucionar este problema en este capítulo de la Tesis se ha propuesto una derivatización secuencial con *o*-ftaldialdehido y N-acetil-L-cisteína (OPA-NAC), y después con FMOC (ver **Figura 35**). El método está basado en el empleo de fibras de SPME recubiertas con CW-TPR para la extracción y derivatización del analito. Las fibras se sumergieron sucesivamente en las muestras, en una disolución de OPA-NAC y finalmente, en una disolución de FMOC. Como el OPA-NAC sólo reacciona con aminas primarias, en la primera etapa la PA es transformada en PA-OPA-NAC. En la segunda etapa FMOC sólo reacciona con DMA. Como los derivados PA-OPA-NAC y DMA-FMOC presentan características muy diferentes pueden resolverse satisfactoriamente bajo condiciones típicas de fase inversa. A partir de los resultados obtenidos se ha presentado un nuevo método para la determinación selectiva de DMA en agua.

El esquema empleado en el acoplamiento SPME con fibra-CL se presenta en la **Figura 24** del *Capítulo 2-Reactivos e Instrumentación* (pág. 69). Más información acerca de las condiciones experimentales se incluye en el **Apéndice 2**.

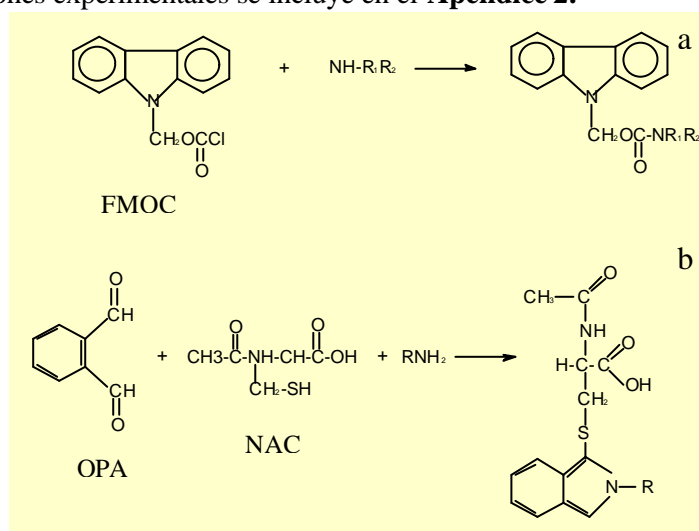


Figura 35. Esquemas de reacción para la derivatización de aminas (a) con FMOC (aminas primarias y secundarias), y (b) con OPA-NAC (sólo aminas primarias).

Derivatización de DMA con FMOC sobre la fibra

Las condiciones seleccionadas para la SPME de la DMA fueron las siguientes: volumen de muestra de 25.0 mL, tiempo de adsorción de 15.0 min, y tiempo de desorción de 5.0 min. En estas condiciones se encontró que las respuestas del analito dependían principalmente de los parámetros de reacción. Las condiciones de elución se ajustaron para conseguir una resolución completa entre DMA-FMOC y FMOC no reaccionado (el cual también fue extraído significativamente con las fibras).

El primer parámetro relacionado con la derivatización de DMA que fue estudiado fue la concentración de FMOC. Las fibras con la DMA extraída fueron sumergidas en una mezcla de 0.5 mL de tampón borato 0.05 M (pH 10.0) y 1.0 mL de FMOC de concentración variable entre 0.25 y 25.0 mM. La presencia del tampón es necesaria para que la amina se encuentre en la forma apropiada (desprotonada) para la reacción [2]. En este estudio la concentración de DMA fue 5 µg/mL, y el tiempo de reacción fue 5 min. A continuación, las fibras se colocaron en la interfase SPME-HPLC para la desorción y separación cromatográfica del derivado formado.

Como se observa en la **Figura 36a**, las áreas del pico obtenido para el derivado DMA-FMOC aumentaron al aumentar la concentración de FMOC dentro del intervalo ensayado, aunque la mejoría observada fue pequeña para las concentraciones más altas. Además, un gran exceso de reactivo dio como resultado el solapamiento entre el pico de DMA-FMOC y el pico del FMOC no reaccionado. Como compromiso, se seleccionó una concentración de FMOC 5.0 mM para el resto del estudio (dando una concentración final en la mezcla de reacción de 3.3 mM).

El efecto del tiempo de reacción se investigó entre 2.0 y 10.0 min. En este estudio la concentración de FMOC empleada para preparar la disolución de derivatización fue 5.0 mM, y las otras condiciones fueron las indicadas anteriormente. El tiempo de reacción óptimo resultó ser 5.0 min (ver **Figura 36b**). Consecuentemente, éste fue el tiempo de reacción seleccionado.

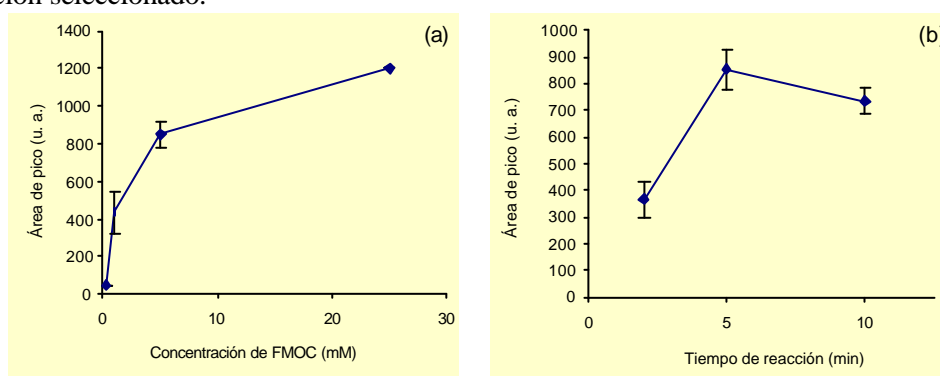


Figura 36. Optimización de las condiciones de reacción entre la DMA y el FMOC: (a) efecto de la concentración de reactivo, para un tiempo de reacción de 5 min; (b) efecto del tiempo de reacción, para una concentración de FMOC de 5 mM. Para otros detalles experimentales, ver el **Apéndice 2**

Los cromatogramas obtenidos para un blanco y para una disolución estándar de DMA bajo las condiciones seleccionadas están representados en la **Figura 37**. Puede observarse que el derivado DMA-FMOC (tiempo de retención, $t_r = 9.9$ min) está bien separado del FMOC no reaccionado ($t_r = 7.3$ min). A 11.4 min se detectó otro pico relacionado con el FMOC (probablemente correspondiente a un producto de condensación).

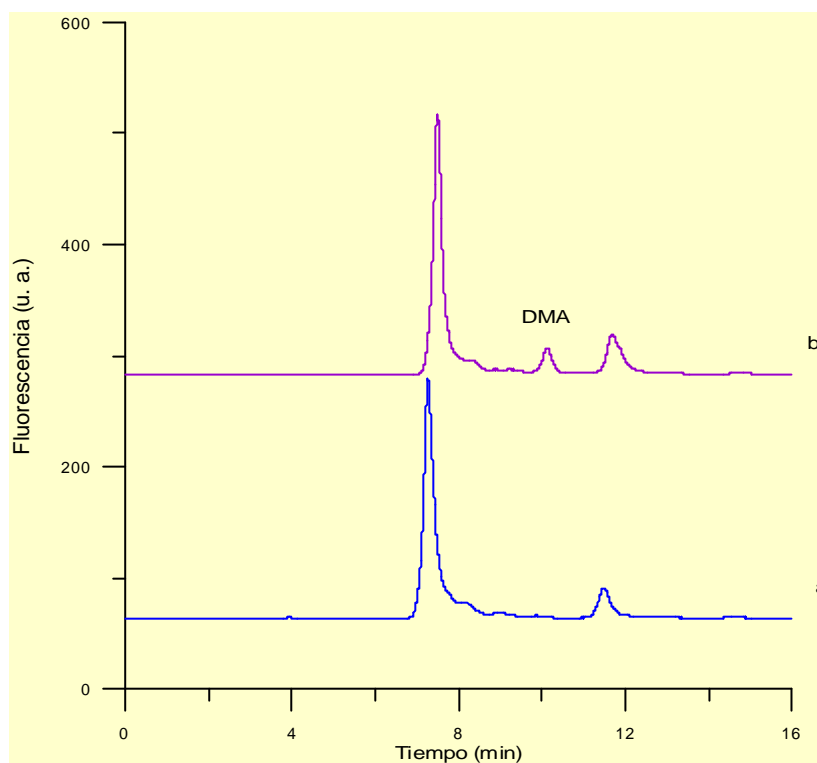


Figura 37. Cromatogramas obtenidos para (a) un blanco (agua) y (b) una disolución estándar de DMA (5 mg/mL) mediante el método de derivatización con FMOC sobre la fibra. Los picos a 7.1 y 11.6 min corresponden a FMOC no reaccionado y a un producto de condensación, respectivamente. Concentración final de FMOC en la mezcla de reacción 3.3 mM; tiempo de reacción, 5 min. Para otros detalles experimentales, ver el **Apéndice 2**.

Las condiciones propuestas también fueron aplicadas para analizar disoluciones estándar de otras aminas alifáticas de cadena corta. Los compuestos probados fueron metilamina, etilamina, PA, butilamina, pentilamina y dietilamina. Además de la DMA, todas las aminas probadas fueron extraídas significativamente sobre las fibras y reaccionaron con FMOC. Sin embargo, sus respectivos derivados podían ser resueltos del DMA-FMOC, con la única excepción del derivado formado por la PA, el cual también eluyó a 9.9 min (ver **Figura 38**). Por ello se intentó resolver los picos originados por DMA y PA probando varias composiciones de fase móvil y varios programas de elución,

pero en todas las condiciones ensayadas el derivado PA-FMOC eluyó a tiempos casi idénticos a los del DMA-FMOC.

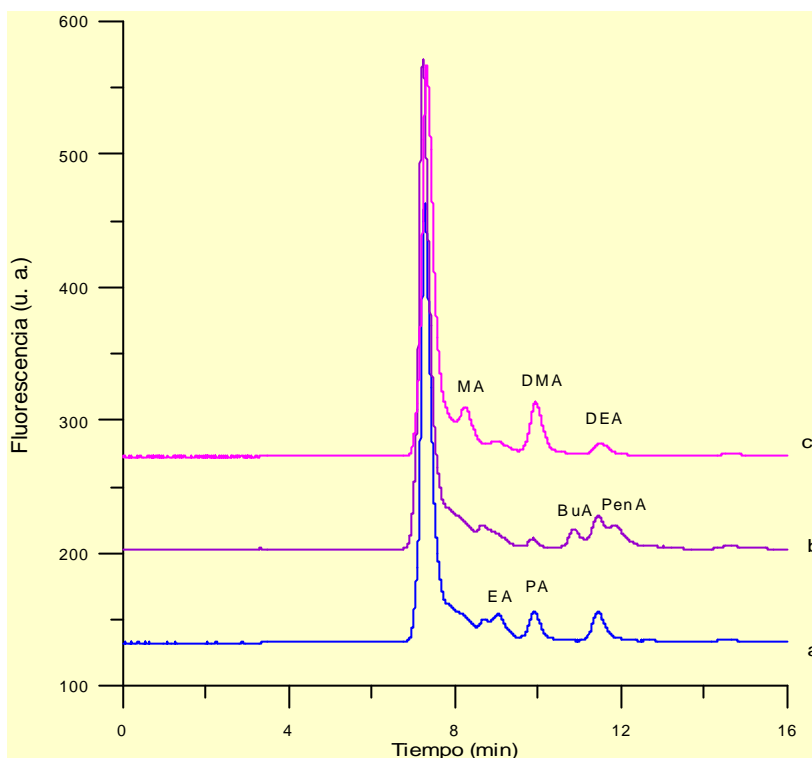


Figura 38. Cromatogramas obtenidos para disoluciones estándar conteniendo mezclas de las aminas alifáticas de cadena corta probadas: (a) etilamina (EA) y PA; (b) *n*-butilamina (BuA) y *n*-pentilamina (PenA); (c) metilamina (MA), DMA y dietilamina (DEA). Concentración de cada amina en las muestras, 5.0 $\mu\text{g/mL}$. Concentración final de FMOC en la mezcla de reacción 3.3 mM; tiempo de reacción, 5 min. Para otros detalles experimentales, ver el **Apéndice 2**.

Derivatización de PA con OPA-NAC sobre la fibra

El reactivo OPA es uno de los más utilizados para derivatizar compuestos que contienen grupos amino primarios. Esto es porque en presencia de un tiol (como la NAC) el OPA forma isoindoles altamente fluorescentes (ver **Figura 35b**). La utilidad de este reactivo para la determinación de aminas alifáticas primarias ha sido demostrada previamente [10]. También se ha descrito previamente el uso simultáneo de OPA y FMOC para la resolución de muestras que contienen un elevado número de compuestos a analizar, generalmente aminoácidos [11, 12]. En el estudio presente se ha evaluado la posibilidad de usar OPA-NAC para transformar la posible PA en su correspondiente derivado isoindólico, evitando por tanto la formación de PA-FMOC durante la derivatización de la DMA.

La PA se extrajo de las muestras bajo las condiciones empleadas para la DMA y después, las fibras fueron sumergidas en una disolución que contenía OPA-NAC. Al igual que en la derivatización con FMOC fue necesario un medio básico. Por esta razón, la disolución de derivatización fue una mezcla de tampón borato de pH 10.0 y de OPA-NAC. Tras un tiempo de reacción definido las fibras se extrajeron de la disolución de derivatización de OPA-NAC, y después fueron sumergidas en la disolución de derivatización con FMOC. Las condiciones de derivatización con FMOC fueron las propuestas para la DMA.

Con la finalidad de conseguir la máxima conversión de la PA se probaron diferentes disoluciones de OPA-NAC con concentraciones en el intervalo 3.7-15 mM (resultando concentraciones finales en la mezcla de derivatización de 3.33-13.5 mM). La concentración de PA en las muestras fue 5.0 µg/mL, y el tiempo de reacción fue 5.0 min. Los resultados obtenidos están representados en la **Figura 39**. Como se esperaba, el pico correspondiente al derivado PA-FMOC en el cromatograma resultante disminuyó a medida que se aumentó la concentración de OPA-NAC. Para una concentración de OPA-NAC de 15.0 mM el pico de PA-FMOC no se detectó. Esto queda ilustrado en la **Figura 40**, la cual compara los cromatogramas obtenidos para la PA después de la derivatización con FMOC y después del procedimiento optimizado de derivatización en dos etapas con OPA-NAC y con FMOC. Es de resaltar que para la misma concentración de OPA-NAC, el pico de PA-FMOC sí fue detectado cuando se emplearon tiempos de reacción con FMOC superiores a 5.0 min. Esto sugiere que el derivado PA-FMOC es más estable que el compuesto formado con OPA-NAC.

El tiempo de retención del derivado PA-OPA-NAC, establecido registrando los cromatogramas a las condiciones de detección apropiadas ($\lambda_{\text{excitación}} = 330 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 440 \text{ nm}$) fue 4.1 min. Este pico no se detectó bajo las condiciones de detección utilizadas para controlar los derivados de FMOC ($\lambda_{\text{excitación}} = 264 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 313 \text{ nm}$).

En la **Figura 40** también se ha representado el cromatograma obtenido para la DMA por el método del OPA-NAC/FMOC. La relación media

$$\frac{\text{Área del pico de la DMA por el método del OPA-NAC/FMOC}}{\text{Área del pico de la DMA por el método del FMOC}}$$

fue 0.95 ($n = 5$, 5.0 µg/mL de DMA). Esto indica que la cantidad de DMA en las fibras no fue alterada sustancialmente por la derivatización con OPA-NAC, lo cual puede ser explicado por la elevada afinidad de esta amina por el sorbente de CW-TPR. Por tanto, la inclusión del paso de derivatización con OPA-NAC no afectó significativamente a la sensibilidad obtenida en la medida del DMA-FMOC. Esta es una ventaja de las derivatizaciones mediante SPME respecto a las derivatizaciones convencionales en disolución, las cuales implican la dilución del analito debido a la adición sucesiva de los reactivos.

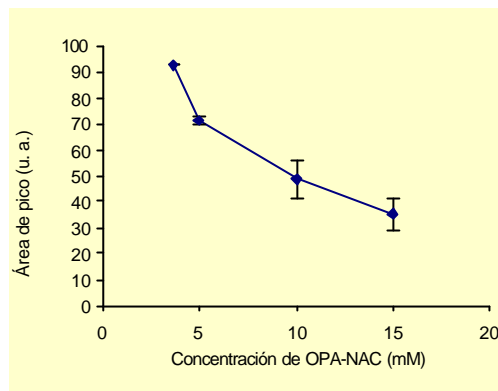


Figura 39. Efecto de la concentración de OPA-NAC sobre las respuestas obtenidas para la PA. Concentración de PA, 5 mg/mL; tiempo de reacción, 5 min. Para otros detalles experimentales, ver el Apéndice 2.

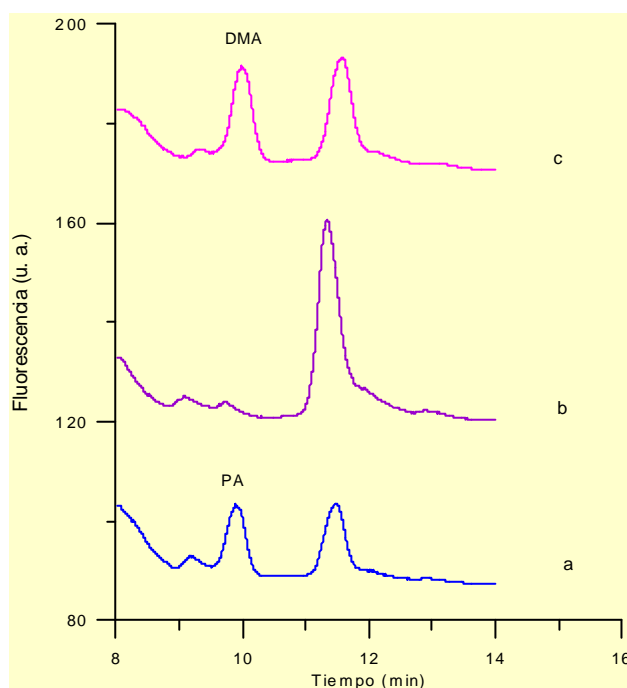


Figura 40. Cromatogramas obtenidos para la PA (5.0 mg/mL) (a) por el método del FMOC, y (b) por el método del OPA-NAC/FMOC; (c) cromatograma obtenido para la DMA (5.0 mg/mL) por el método del OPA-NAC/FMOC. Reacción con OPA-NAC: concentración final de OPA-NAC, 13.5 mM; tiempo de reacción, 5 min. Reacción con FMOC: concentración final de FMOC 3.3 mM; tiempo de reacción, 5 min. Para otros detalles experimentales, ver el Apéndice 2.

Determinación de DMA mediante el método de l OPA-NAC/FMOC

La fiabilidad del método descrito para la cuantificación de DMA en agua se evaluó procesando patrones que contenían el analito en el intervalo de concentraciones 1.0-10.0 µg/mL [1, 13]. La linealidad se examinó analizando muestras a cinco concentraciones diferentes dentro del intervalo estudiado. La ecuación de calibración obtenida fue $y = - (35 \pm 35) + (142 \pm 7)x$, con un coeficiente de correlación medio de $R = 0.990$ ($n = 10$). El método también proporcionó reproducibilidad adecuada, con coeficientes de variación intra-día e inter-día, establecidos para 5.0 µg/mL de DMA, de 7% ($n = 3$) y 16% ($n = 6$), respectivamente. Los LDC y LDD fueron 1.0 y 0.3 µg/mL, respectivamente.

La exactitud se evaluó procesando disoluciones estándar que contenían DMA a diferentes concentraciones dentro del intervalo de concentraciones evaluado. Como se observa en la **Tabla 11**, la exactitud obtenida fue adecuada, con errores relativos que oscilaban entre +12% (para una concentración equivalente al LDC) y +0.4%. En esta tabla también están resumidas las concentraciones calculadas de DMA en patrones que contenían mezclas de DMA y PA. Los resultados obtenidos confirmaron que la presencia de PA no afectaba a la cuantificación de la DMA. Por tanto, el método propuesto puede considerarse selectivo para la DMA.

Tabla 11. Exactitud para la determinación de DMA mediante el método optimizado del OPA-NAC/FMOC ($n = 3$)

Muestra	Concentración añadida (µg/mL)	Concentración determinada (µg/mL)	Error relativo (%)
Patrón	1.0	1.1 ± 0.3	+12
	5.0	5.0 ± 0.8	+0.4
	10	10.4 ± 1.3	+4
	5.0 + 5 µg/mL de PA	4 ± 1	-20
	5.0 + 10 µg/mL de PA	4.9 ± 0.5	-2
Agua de consumo	1.0	0.9 ± 0.3	-6
	5.0	5.17 ± 1.18	+3
Agua de riego	1.0	1.0 ± 0.4	0
	5.0	5.1 ± 0.4	+3
Agua de río	1.0	1.03 ± 0.4	+3
	5.0	4.3 ± 0.6	-15
Agua subterránea	1.0	0.9 ± 0.2	-8
	5.0	4.9 ± 1.9	-3

Aplicación a muestras reales de agua

Se analizaron diferentes muestras de agua para determinar DMA: agua de consumo humano, agua de riego, agua de río y agua subterránea. Las muestras fueron fortificadas a diferentes niveles de concentración dentro del intervalo ensayado. La concentración de DMA se estableció a partir de la ecuación de calibración obtenida con patrones. Los resultados de este estudio (ver también **Tabla 11**) indican que las concentraciones calculadas con el procedimiento propuesto fueron aproximadamente las reales.

Finalmente, el método descrito fue aplicado al análisis de agua residual obtenida de una industria dedicada a la producción de fertilizantes. Como ejemplo ilustrativo, en la **Figura 41** está representado el cromatograma obtenido para una de las muestras analizadas. La concentración determinada para DMA en dicha muestra fue 1.75 µg/mL.

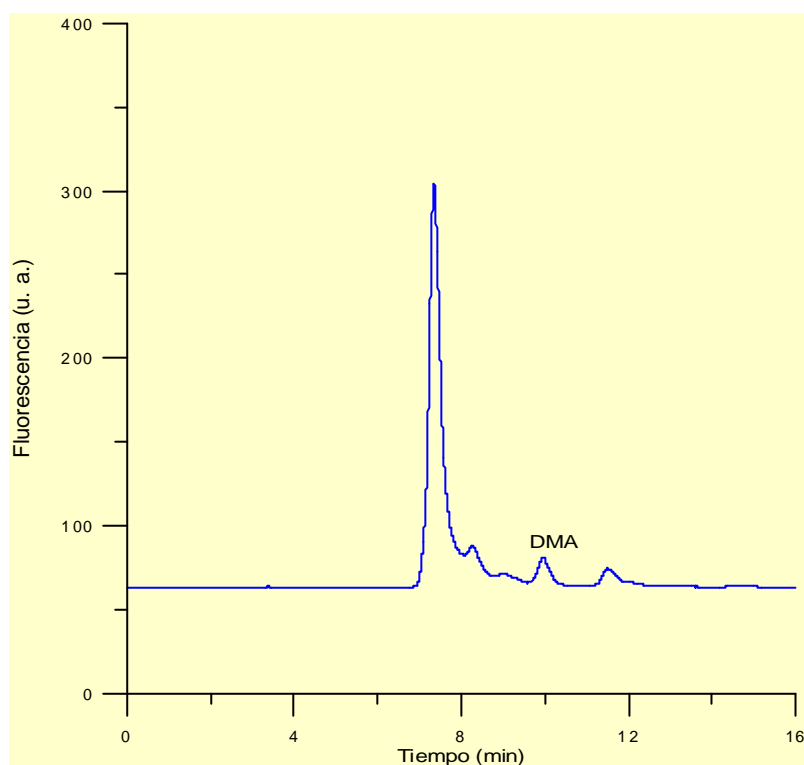


Figura 41. Cromatograma obtenido para una muestra de agua residual mediante el método optimizado del OPA-NAC/FMOC.

Conclusiones

El concepto de SPME con derivatización sobre la fibra ha sido ampliado a procedimientos de derivatización que implican el uso secuencial de diferentes reactivos. En este capítulo de la Tesis se ha desarrollado un método de derivatización en dos etapas para la DMA basado en su transformación en DMA-FMOC. Las fibras con el analito extraído fueron sumergidas sucesivamente en disoluciones de derivatización de OPA-NAC y de FMOC. Durante la primera etapa de derivatización las posibles aminas alifáticas primarias presentes en las muestras se transformaron en sus derivados de OPA-NAC. Las condiciones se ajustaron para transformar cuantitativamente la PA, que es un interferente directo en la determinación de DMA con FMOC. De este modo se evitó la formación de PA-FMOC durante la segunda etapa, y por tanto el método se puede considerar selectivo para la DMA.

Comparado con la derivatización convencional en disolución, la incorporación del proceso de derivatización en las fibras de SPME no sólo simplificó el esfuerzo experimental, sino que también evitó la dilución del analito como consecuencia de la adición de los reactivos. Esto resulta de interés sobretudo en procedimientos de derivatización que requieren el uso secuencial de dos o más reactivos para conseguir la selectividad deseada.

3.1.3. DETERMINACIÓN DE TRIMETILAMINA

Este apartado se ha desarrollado en tres partes:

- Determinación de TMA en agua mediante cromatografía líquida, empleando derivatización en línea con FMOC y detección UV.
- Determinación selectiva de TMA en aire mediante cromatografía líquida usando cartuchos de extracción en fase sólida para el muestreo, y derivatización en línea con FMOC y detección UV.
- Estudio comparativo de la determinación de TMA en agua y aire combinando la cromatografía líquida y microextracción en fase sólida con derivatización sobre la fibra, empleando FMOC como reactivo y detección fluorescente.

3.1.3.1. DETERMINACIÓN DE TRIMETILAMINA EN AGUA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

En un trabajo previo se demostró que el reactivo FMOC puede ser usado para derivatizar la anfetamina terciaria N-metilpseudoefedrina bajo condiciones suaves [14]. Este mismo reactivo ha sido utilizado con éxito para la determinación de trazas de aminas alifáticas primarias y secundarias de cadena corta, realizando su derivatización en soportes sólidos [1]. El reactivo dinitrobenzoilo (DNB) también proporcionó resultados favorables [15]. La finalidad del presente trabajo fue estudiar la utilidad del FMOC en la determinación de aminas alifáticas terciarias de cadena corta. Las derivatizaciones se llevaron a cabo en el interior de una precolumna con relleno C_{18} como fase estacionaria, conectada en línea a la columna analítica. La TMA se ha elegido como compuesto modelo, ya que su determinación en matrices acuosas tiene un interés cada vez mayor. Para dicho compuesto se ha propuesto la CG [16-19] que proporciona LDDs entre 4-50 ng/mL. También se ha propuesto la potenciometría [20] con LDDs entre 30-170 ng/mL. Sin embargo no se han publicado métodos de CL con derivatización precolumna.

Se propone un método selectivo para la determinación de TMA en presencia de otras aminas primarias y secundarias de cadena corta. El procedimiento está basado en la derivatización del analito con FMOC en el interior de una precolumna conectada en línea a la columna analítica. El derivado se registra a 262 nm con detección UV. El método ha sido aplicado a la determinación directa de TMA, aunque también puede incorporarse un paso de preconcentración con cartuchos de SPE de tipo C_{18} . La utilidad del procedimiento descrito se ha examinado a través de la determinación de TMA en diferentes muestras de agua.

El montaje usado para la derivatización en línea es el que se muestra en la **Figura 25 del Capítulo 2-Reactivos e Instrumentación (pág. 69)**. Más información acerca de las condiciones experimentales empleadas se refleja en el **Apéndice 3**.

Derivatización y condiciones de elución

De acuerdo con resultados previos se eligió una mezcla acetonitrilo/agua como fase móvil [15]. Sin embargo, como las derivatizaciones con FMOC requieren un medio básico, el pH dentro de la precolumna fue ajustado mediante el incremento del porcentaje de tampón borato (pH 9.0) en la fase móvil antes de la inyección de la muestra (ver **Tabla 12**). Se llevaron a cabo distintos experimentos bajo una variedad de condiciones de elución con la finalidad de que la TMA reaccionara con el FMOC produciendo una señal adecuada para controlar este compuesto. En este estudio la concentración de FMOC fue 25 mM, y el tiempo de desfase entre la inyección de la muestra y la inyección del reactivo (t_1) fue 0.5 min. El tiempo transcurrido entre la inyección del reactivo y la transferencia del derivado de TMA a la columna analítica (tiempo de reacción, t_2) también se fijó en 0.5 min (ver **Figura 25**). La concentración de TMA en las muestras fue 10.0 $\mu\text{g/mL}$.

En la mayoría de las condiciones probadas se observó que la reacción entre la TMA y el FMOC resultaba en un pico cromatográfico intenso y bien definido, mientras los picos correspondientes al exceso de reactivo y/o subproductos eluían a tiempos de retención más bajos que el del derivado TMA-FMOC. Las condiciones de elución bajo las que se obtuvo la mejor resolución del pico de interés en el mínimo tiempo de análisis se resumen en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Programa de tiempos y condiciones usadas en la determinación de TMA.

Tiempo (min)	Posición de la válvula	Acción	Condiciones de elución ^a	
-	1	Acondicionamiento de la precolumna y de la columna analítica	60:40 acetonitrilo-agua	
0	2	Inicio del gradiente de elución	a 0 min	60:40 (v/v) acetonitrilo-agua
			a 1.5 min	60:40 (v/v) acetonitrilo-0.05 M tampón borato (pH 9.0)
2.5	2	Inyección de la muestra (25 µL)		
2.5-3.0	2	Purificación del analito		
3.0	2	Inyección del reactivo (50 µL, 1 mM)		
3.-3.5	2	Reacción y eliminación del FMOC no reaccionado	a 3.5 min	60:40 (v/v) acetonitrilo-agua
3.5	1	Transferencia del producto de reacción		
3.5-15	1	Cromatografía y detección	a 10 min	70:30 (v/v) acetonitrilo-agua
15	1	Final	a 15 min	100% acetonitrilo

(a)– velocidad de flujo de la fase móvil, 1.0 mL/min

Se examinó el efecto de las variables experimentales sobre el rendimiento de la derivatización. En primer lugar se evaluó la concentración de FMOC en el intervalo 1-25 mM. Ambos tiempos, t_1 y t_2 , fueron 0.5 min. Aunque no disponíamos de los patrones externos de TMA-FMOC (y por tanto, no se pudo establecer el rendimiento absoluto de la conversión del analito), las respuestas obtenidas para el derivado de TMA fueron aproximadamente constantes dentro del intervalo probado. Esto indica que la conversión máxima de TMA se alcanzó incluso con FMOC 1 mM. Además, la mejor línea base se obtuvo con FMOC 1mM, y por tanto, ésta fue la concentración empleada en lo sucesivo. Para esta concentración de FMOC y para TMA 10 µg/mL (máxima concentración probada en este trabajo) la relación entre las concentraciones de reactivo y de analito fue alrededor de 6. A diferencia de la derivatización en disolución, esta proporción podría ser suficiente para obtener las máximas conversiones de los analitos en la derivatización en soporte sólido [2]. No se probaron concentraciones más bajas de reactivo para asegurar una proporción adecuada de FMOC respecto a la cantidad de amina dentro de la precolumna, principalmente en muestras en las que pudieran estar presentes otras aminas.

El efecto del tiempo de reacción se evaluó cambiando t_2 . El intervalo estudiado fue 0.5-1.5 min. Se observó que la señal del analito permanecía constante o incluso disminuía con el incremento de t_2 debido a su elución. Consecuentemente, se eligió 0.5 min de tiempo de reacción como la mejor opción para la derivatización de la TMA.

Selectividad

Para evaluar la selectividad del método propuesto se probaron distintas aminas primarias y secundarias de cadena corta en las condiciones de la **Tabla 12**. Las aminas examinadas fueron metilamina, etilamina, propilamina, *n*-butilamina, *n*-pentilamina, dimetilamina y dietilamina. Todas las aminas reaccionaron con el FMOC, pero sus derivados presentaron tiempos de retención diferentes al del derivado TMA-FMOC. No obstante, para prevenir un consumo excesivo de FMOC en presencia de otras aminas potencialmente presentes se incorporó al procedimiento analítico un paso de purificación. La purificación se efectuó limpiando la precolumna con la fase móvil durante un período de tiempo definido (t_1) antes de la inyección del reactivo FMOC. Se probaron distintos valores para t_1 dentro del intervalo 0.5-1.5 min. Todas las aminas estudiadas se eliminaron de la precolumna prácticamente en su totalidad después de 0.5 min, con la única excepción de la dietilamina. Además, para tiempos más largos se observó una pérdida de TMA. Por tanto, el tiempo de lavado escogido fue 0.5 min.

La **Figura 42** muestra los cromatogramas obtenidos para un blanco (agua) y una muestra que contiene TMA bajo las condiciones propuestas en la **Tabla 12**.

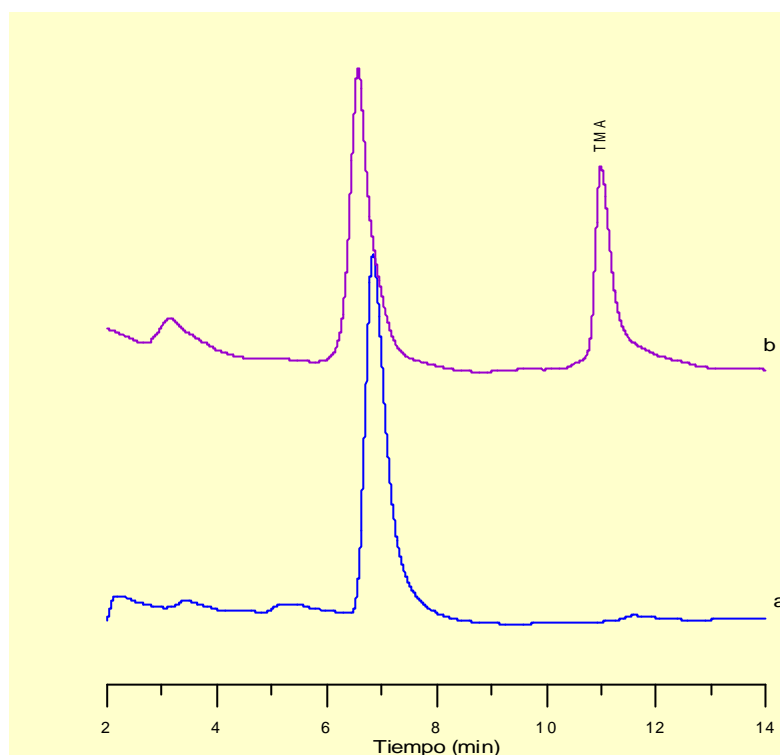


Figura 42. Cromatogramas obtenidos para (a) un blanco (agua) y (b) una disolución estándar que contiene 2.5 µg/mL de TMA.

Características analíticas

La fiabilidad del método descrito se evaluó procesando patrones en agua que contenían los analitos en el intervalo de concentraciones 0.25-10.0 µg/mL. La linealidad se estudió mediante el análisis de muestras a cuatro concentraciones dentro del intervalo estudiado. El procedimiento propuesto proporcionó una adecuada linealidad ($y = (942 \pm 42)x + (642 \pm 234)$, $R^2 = 0.98$). El método también proporcionó adecuada reproducibilidad, con coeficientes de variación intra-día e inter-día de 9 % (n=3) y 11 % (n=6), respectivamente (para una concentración de TMA de 5.0 µg/mL).

El LDD (establecido como la concentración necesaria para generar una relación señal/ruido de tres unidades) se estimó mediante el análisis de disoluciones de concentración cada vez menor de TMA. Antes de procesar estas disoluciones se procesó agua. De este modo se confirmó que no había contaminantes o efectos memoria. El valor obtenido fue de 50 ng/mL.

En principio, las condiciones descritas podrían ser adecuadas para muchas aplicaciones concernientes a la determinación de TMA en aguas industriales y residuales, o en muestras biológicas [20, 21]. Sin embargo en algunas aplicaciones se requieren métodos capaces de determinar concentraciones de TMA por debajo de 1.0 µg/mL, por ejemplo en el análisis de muestras de aguas medioambientales [18, 19]. Aunque el enriquecimiento del analito es posible mediante la inyección de grandes volúmenes de muestra en la precolumna, en el presente estudio la preconcentración en línea proporcionó resultados poco favorables. La razón es que, debido a la polaridad de la TMA y a las pequeñas dimensiones de la precolumna, se producen pérdidas de analito por autoelución incluso para volúmenes de muestra de 0.5 mL.

Como alternativa se efectuó el enriquecimiento del analito fuera de línea empleando cartuchos de SPE de acuerdo con el procedimiento descrito previamente para aminas primarias y secundarias [15]. El volumen de muestra fue 5 mL y la concentración de TMA se estudió dentro del intervalo 0.05-1.0 µg/mL. La recuperación de TMA obtenida en el intervalo de concentración evaluado fue (96±11) % (n=12); por tanto se obtuvo un factor de enriquecimiento de alrededor de 8. La linealidad fue adecuada ($y = (8729 \pm 182)x + (776 \pm 291)$, $R^2=0.97$), y los coeficientes de variación intra-día e inter-día fueron 11% (n=3) y 13% (n=6), respectivamente (para 0.05 µg/mL de TMA). El LDD fue 5 ng/mL. Es interesante observar que este valor es aproximadamente de un orden de magnitud mayor que los LDDs encontrados normalmente para aminas alifáticas primarias y secundarias [1]. Ello sugiere que el rendimiento de la reacción para esta amina terciaria es significativamente inferior a los rendimientos de conversión obtenidos para aminas alifáticas primarias y secundarias. Estos resultados son similares a los observados para la reacción entre el FMOC y diversas anfetaminas primarias, secundarias y terciarias [14].

La exactitud de los dos procedimientos propuestos se evaluó procesando disoluciones estándar que contenían TMA a diferentes concentraciones dentro del intervalo examinado. Como se observa en la **Tabla 13** se consiguió una exactitud adecuada, con errores relativos que oscilaban entre + 10 % y - 8 %. Para evaluar posibles interferencias por dietilamina (la única amina alifática que podría ser retenida en la precolumna bajo las condiciones utilizadas), se procesaron muestras que contenían 0.1 µg/mL de TMA y diferentes concentraciones de dietilamina. Las relaciones de concentraciones entre la dietilamina y la TMA en estas muestras fueron de 1 y 50. Finalmente, se procesó una muestra que contenía una mezcla de aminas alifáticas además de TMA. No se observaron interferencias significativas en ninguna de las muestras analizadas (ver **Tabla 13**).

Tabla 13. Exactitud para la determinación de TMA ($n= 3$)

Muestra	Concentración añadida ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración determinada ($\mu\text{g/mL}$)	Error relativo (%)
Patrón*	5.0	5.03	+ 0.6
Patrón	0.1	0.11	+10
Patrón	0.2	0.195	- 3
Patrón	0.5	0.46	- 8
Patrón	0.1 + 0.1 $\mu\text{g/mL}$ de dietilamina	0.11	+10
Patrón	0.1 + 5.0 $\mu\text{g/mL}$ de dietilamina	0.11	+10
Patrón	1.0 + metilamina + etilamina + propilamina + butilamina + pentilamina + dietilamina + dimetilamina (1.0 $\mu\text{g/mL}$ de cada una)	0.84	- 16
Agua de consumo	0.1	0.11	+10
Agua de consumo	0.5	0.52	+ 4
Agua del mar	0.5	0.55	+ 10
Agua subterránea	0.5	0.45	-10
Agua residual*	10.0	9.9	- 1

(*)- Obtenido por el método directo

Aplicación a muestras reales de agua

La fiabilidad del método descrito se estudió analizando agua de consumo, agua subterránea, agua del mar y agua residual. El agua subterránea, la del mar y la residual se filtraron previamente con membranas de nylon de 0.45 μm para eliminar cualquier partícula. El agua residual se analizó por el método directo, mientras que las otras muestras se sometieron previamente a SPE. Ninguna de las muestras analizadas contenía TMA. Como ejemplo ilustrativo, en la **Figura 43** se presentan los cromatogramas obtenidos para agua de mar y para agua de mar fortificada con TMA.

Se procesaron las muestras fortificadas con TMA, y la concentración de TMA en la mismas se estableció a partir de las curvas de calibrado obtenidas a partir de las disoluciones estándar. Como se observó en la **Tabla 13**, los resultados obtenidos fueron comparables a aquellos obtenidos para las disoluciones estándar. Por tanto, el método se consideró adecuado para esta clase de muestras.

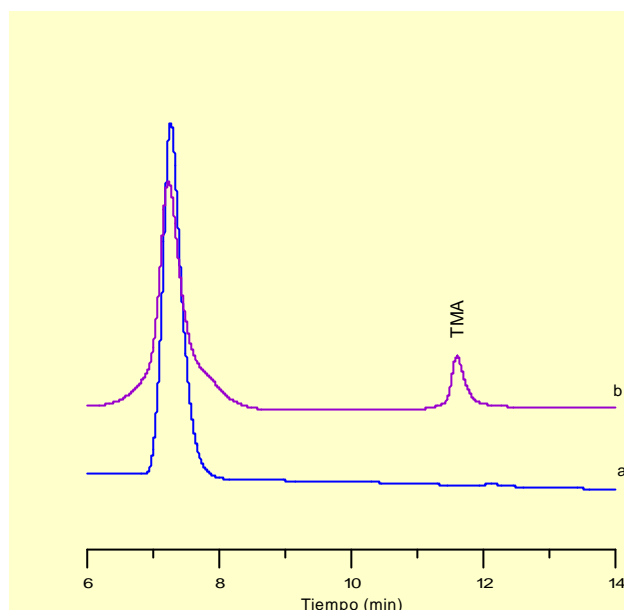


Figura 43. Cromatogramas obtenidos para (a) agua de mar, y (b) agua de mar fortificada con 1.0 $\mu\text{g/mL}$ de TMA, después de SPE.

Conclusiones

Los resultados de este estudio demuestran la utilidad del reactivo FMOC utilizando derivatización en soportes de tipo C_{18} para el análisis de TMA en muestras de agua. La reacción requiere tiempos de reacción muy cortos, y condiciones muy suaves (pH 9.0 y temperatura ambiente). Los LDDs son buenos ampliando las prestaciones del FMOC como reactivo de aminas. Según la base de datos *Web del Conocimiento (Ciencias)* sólo el 1% de los trabajos publicados sobre determinación de TMA se basan en su derivatización, y sólo en el 5% de los métodos de análisis de la TMA publicados se emplean técnicas cromatográficas.

El método descrito es muy simple, ya que las derivatizaciones se realizan en línea, y permite la determinación de TMA dentro del intervalo 0.25-10.0 $\mu\text{g/mL}$ en unos 15 min. Si es necesario, el método puede ser aplicado a la determinación de TMA a concentraciones más bajas (0.05-1.0 $\mu\text{g/mL}$) mediante la preconcentración del analito en cartuchos de SPE con relleno de tipo C_{18} . Los LDDs son comparables a los obtenidos por otros métodos que usan CG, y que según la base de datos *Web del Conocimiento (Ciencias)* representan el 50% de los métodos cromatográficos. Las ventajas adicionales respecto a métodos previos que implican derivatización son el hecho de que el reactivo está disponible comercialmente, y que la reacción puede llevarse a cabo en medio acuoso. Además, la presencia de otras aminas alifáticas primarias y/o secundarias de cadena corta no interfiere, con la dietilamina como única excepción. Concentraciones muy grandes de esta amina podrían interferir en la determinación de TMA debido al consumo de reactivo.

3.1.3.2. DETERMINACIÓN SELECTIVA DE TRIMETILAMINA EN AIRE MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA USANDO CARTUCHOS DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA MUESTREO

Se han propuesto varias alternativas para muestrear las aminas alifáticas presentes en el aire, como el empleo de sorbentes (gel de sílice, relleno ácido de tipo XAD-7) [22, 23] o de borboteadores que contienen disoluciones ácidas [24], pero la tendencia general es reemplazar los métodos de muestreo en disolución por técnicas de extracción sin disolventes. En este sentido, una de las aproximaciones más atractivas para el muestreo de compuestos volátiles es la microextracción en fase sólida (SPME). Sin embargo, la mayoría de los procedimientos de SPME descritos hasta ahora para la TMA están relacionados con la extracción de este compuesto de matrices acuosas [16].

El empleo de cartuchos de SPE para retener aminas volátiles es una alternativa rápida y simple como ha demostrado nuestro grupo de investigación para aminas primarias de cadena corta empleando cartuchos con rellenos de tipo C_{18} y OPA-NAC como reactivo derivatizante [10]. Las condiciones propuestas no pudieron aplicarse a la determinación de TMA porque el OPA-NAC sólo reacciona con aminas primarias. Esta es una limitación de los procedimientos de CL y CG que implican derivatización química, ya que la gran mayoría de reactivos disponibles reaccionan solamente con grupos amino primarios y secundarios.

En el capítulo anterior propusimos un método de CL para el análisis de TMA en agua basado en su derivatización con FMOC [25] (**Apéndice 3**). Aunque el FMOC es usado sobretodo como reactivo para aminas primarias y secundarias, el empleo de un soporte sólido para realizar la derivatización hizo posible la transformación de la TMA en su derivado de FMOC con un rendimiento de conversión adecuado para la cuantificación de este compuesto.

Continuando con el trabajo anterior, se propuso un método selectivo para la determinación de TMA en aire usando cartuchos de SPE para el muestreo y CL. Para obtener la sensibilidad requerida el analito fue sometido a derivatización con FMOC de acuerdo con el procedimiento propuesto en [25]. Se optimizaron las condiciones de muestreo de aire. Los derivados de FMOC se registraron a 262 nm con detección UV. Finalmente el método se aplicó a la determinación de TMA en diferentes muestras de aire.

El esquema empleado en la generación de patrones se muestra en la **Figura 26 del Capítulo 2-Reactivos e Instrumentación (pág. 70)**, y el esquema empleado para la generación de muestras sintéticas se presenta en la **Figura 27** de ese mismo capítulo (pág. 70). Más información acerca de las condiciones experimentales empleadas, se refleja en el **Apéndice 4**.

Procedimiento de muestreo

Con la finalidad de simplificar el muestreo de patrones se colocaron 50 μL de disolución de 50 $\mu\text{g/mL}$ de TMA en un tubo de plástico que actuó como cámara de volatilización [10] (ver **Figura 26** pág. 70). La salida de los cartuchos con relleno C_{18} se conectó a la bomba de aire, mientras que la entrada se conectó a la cámara de volatilización. Antes de iniciar el proceso de muestreo se añadió a la disolución de TMA una alícuota de 50 μL de disolución 0.5 M de NaOH con la finalidad de facilitar la volatilización de la amina. Se llevaron a cabo varios ensayos a diferentes tiempos de muestreo y velocidades de flujo. La eficacia de muestreo se estableció comparando las áreas del pico obtenido para el analito con las obtenidas mediante la inyección directa de una disolución estándar que contenía una cantidad equivalente del analito (4.16 $\mu\text{g/mL}$).

Los mejores resultados se obtuvieron al utilizar una velocidad de muestreo de 15 mL/min. A valores mayores se observó que la reproducibilidad empeoraba debido a que la bomba no funcionaba a una velocidad de flujo constante, lo que puede explicarse por las variaciones en la porosidad de los cartuchos de SPE entre los ensayos (datos no mostrados). A una velocidad de flujo de 15 mL/min la volatilización del analito se completó en menos de 15 min. La recuperación media de la TMA resultó ser $(95 \pm 6) \%$, $n=3$. Por ello para el resto del trabajo se eligió una velocidad de muestreo de 15 mL/min y una duración de 15 min (equivalente a muestrear un volumen de 225 mL de aire).

Como un ejemplo ilustrativo en la **Figura 44** se presentan los cromatogramas obtenidos para la TMA en aire y para un blanco bajo las condiciones propuestas.

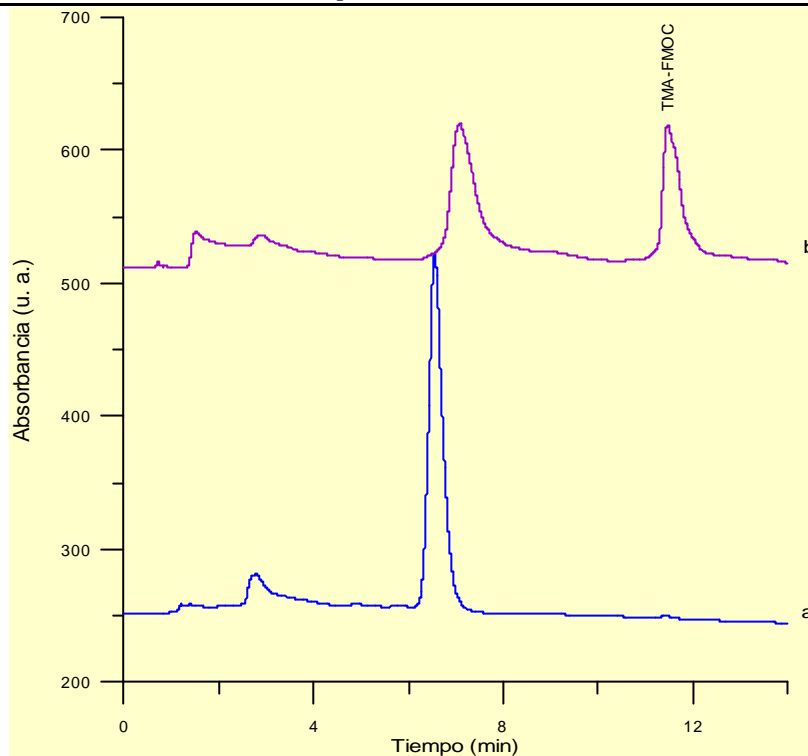


Figura 44. Cromatogramas obtenidos para (a) un blanco de aire, y (b) aire que contiene 11.1 mg/m^3 de TMA. El pico que aparece a aproximadamente 7.8 min (reactivo) disminuye en muestras que contienen TMA debido al consumo de reactivo. Para más detalles, ver el **Apéndice 4**

Parámetros analíticos

La fiabilidad del método descrito se evaluó procesando muestras que contenían el analito en el intervalo de concentraciones $1.1\text{-}11.1 \text{ mg/m}^3$ (equivalente a cantidades de TMA de $10.4\text{-}104 \text{ ng}$). Los resultados de este estudio se resumen en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Datos analíticos obtenidos para la TMA en aire.

Linealidad ($y = a + bx$)	Recuperación (%) (n= 12)	Reproducibilidad C. V. (%) ^a		LDD	Exactitud		
		Intra-día (n= 3)	Inter-día (n= 6)		Conc. añadida (mg/m ³)	Conc. determ. (mg/m ³)	Er (%)
$a \pm s_a =$ 652 ± 125	(96 ± 7)	7	15	0.05 µg	5.56	5.33	-4
$b \pm s_b =$ 35131 ± 2011					11.1	11.2	1
$R^2 = 0.990$				5.56 + una mezcla de otras aminas alifáticas ^b (5.56 mg/m ³ de cada una)	5.91	6	
				11.1 + una mezcla de otras aminas alifáticas ^b (11.1 mg/m ³)	11.9	9	

^a Determinado para 1.25 µg de TMA.

^b Metilamina, etilamina, propilamina, butilamina, n-pentilamina, dimetilamina y dietilamina.

Como se observa en esta tabla, se obtuvo buena linealidad en el intervalo estudiado. La ecuación de calibrado fue comparable a la obtenida con disoluciones estándar de TMA conteniendo las mismas cantidades de analito e inyectadas directamente al sistema cromatográfico, $y = (36900 \pm 1671)x + (642 \pm 235)$, ($R^2 = 0.98$, $n = 12$). La recuperación de TMA en muestras de aire, calculada como relación entre las pendientes de los calibrados, fue del 95 %, valor consistente con el obtenido en la sección anterior.

El método propuesto proporcionó una reproducibilidad adecuada, con coeficientes de variación intra-día e inter-día del 7 y 15 %, respectivamente (para una cantidad de TMA de 1.25 µg). El LDD (establecido como la concentración requerida para generar una relación señal-ruido de 3) fue 0.05 µg de TMA, equivalente a una concentración en aire de 0.22 mg/m³. Este valor es comparable a los LDDs alcanzados por otros métodos propuestos para el análisis de TMA en aire [19, 22]. Sin embargo, el volumen de muestra requerido en este trabajo (y por tanto, el tiempo de muestreo) se ha reducido significativamente.

Se evaluó la selectividad del método analizando disoluciones estándar que contenían mezclas de TMA y de otras aminas alifáticas de cadena corta (metilamina, etilamina, propilamina, *n*-butilamina, dimetilamina y dietilamina). Ninguna de las aminas probadas se detectó en los cromatogramas correspondientes a las muestras de aire (**Figura 45a**), ya que éstas fueron eliminadas durante el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la inyección del reactivo (0.5 min) [25]. Al reducir dicho intervalo de tiempo se identificaron todas las aminas en los cromatogramas resultantes (**Figura 45b**), lo cual indica que también se retuvieron en los cartucho de SPE durante el muestreo. Sin embargo, sus derivados con FMOC presentaron tiempos de retención inferiores al del TMA-FMOC. Por tanto, bajo las condiciones propuestas el método se puede considerar selectivo para TMA. Esto se confirmó determinando la concentración de TMA en muestras que contenían mezclas de todas las aminas ensayadas (ver **Tabla 14**).

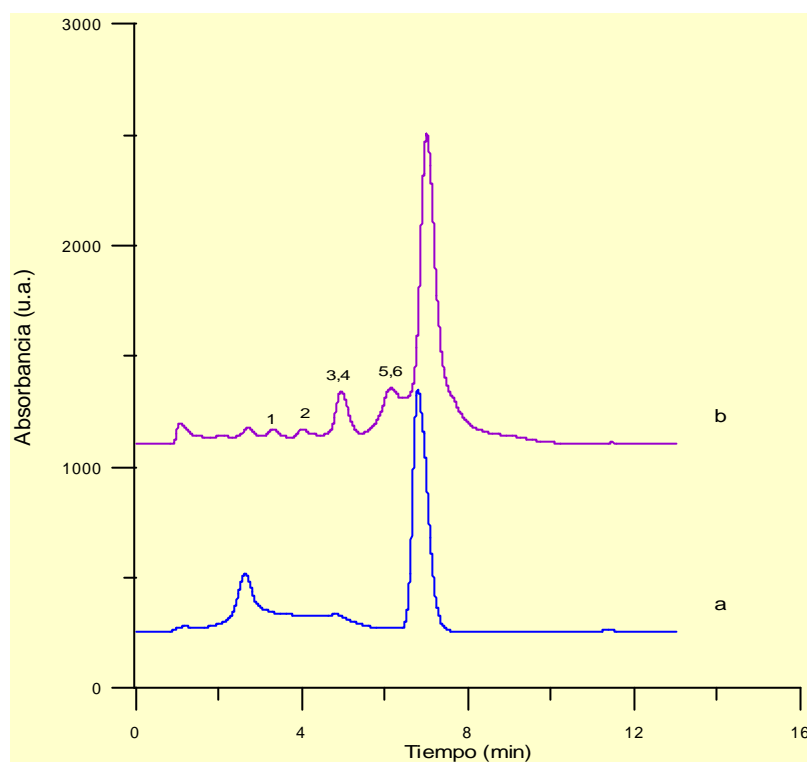


Figura 45. (a) Cromatograma obtenido para una mezcla de (1) metilamina, (2) etilamina, (3) propilamina, (4) dimetilamina, (5) butilamina, y (6) dietilamina bajo las condiciones propuestas, y (b) cromatograma obtenido para la misma mezcla inyectando el reactivo 0.1 min después de la inyección de la muestra. La concentración de cada amina en las muestras fue de 11.1 mg/m^3 .

Aplicación

El procedimiento se aplicó al análisis de aire contenido en una cámara cerrada de PVC y contaminado con TMA (ver **Figura 27**). Para ello se colocó dentro de la cámara un frasco abierto que contenía TMA pura. La concentración media del analito en estas muestras se estableció a diferentes tiempos tras la introducción de la TMA en la cámara a partir de la curva de calibrado obtenida para TMA en muestras de aire. Los resultados obtenidos fueron ($0.568 \pm 0.008 \text{ mg/m}^3$), ($0.85 \pm 0.09 \text{ mg/m}^3$) y ($1.64 \pm 0.04 \text{ mg/m}^3$) para tiempos de 10 min, 20 min y 4h (equilibrio), respectivamente (n= 3). Además, las cantidades de TMA medidas bajo las condiciones de equilibrio en días diferentes fueron similares, con un coeficiente de variación de 9% (n= 9). Esto confirmaría que el procedimiento propuesto ofrece una reproducibilidad adecuada.

Conclusiones

En esta parte de la Tesis se demostró que los cartuchos convencionales de SPE con fases de tipo C_{18} pueden usarse para muestrear TMA del aire. La aproximación propuesta evita el uso de disoluciones para retener el analito, y por tanto, es muy adecuada para sistemas de muestreo portátil. Comparado con los procedimientos descritos anteriormente, el tiempo necesario para el muestreo se ha reducido significativamente porque la derivatización de la TMA con el FMOC aumenta la sensibilidad. De hecho, este es, según la bibliografía consultada, el primer método propuesto para el análisis de TMA en aire basado en su derivatización química. La mayoría de los métodos existentes para el análisis de aminas alifáticas en aire no pueden aplicarse a la TMA porque se utilizan reactivos capaces de reaccionar únicamente con aminas primarias y secundarias [23, 26].

La sensibilidad, exactitud y reproducibilidad conseguidas con el método propuesto son adecuadas para controlar la exposición ocupacional de TMA [22]. Además, la presencia de otras aminas alifáticas primarias y/o secundarias de cadena corta no interfiere, y por tanto, el método puede considerarse selectivo para TMA.

3.1.1.3. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA DETERMINACIÓN DE TRIMETILAMINA EN AGUA Y AIRE COMBINANDO CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA Y MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA CON DERIVATIZACIÓN SOBRE LA FIBRA

En esta tercera parte del capítulo se evaluó la posibilidad de simplificar el análisis de la TMA combinando la SPME y la derivatización química con el reactivo FMOC. La determinación está basada en el empleo de una fibra de SPME para llevar a cabo el muestreo y la derivatización del analito. La fibra utilizada fue de CW-TPR de 50 μm , que se sumergió en primer lugar en la disolución de reactivo. Una vez cargada con el reactivo, la fibra se sumergió en las muestras de agua o se expuso a las muestras de aire para extraer y derivatizar al analito. Finalmente, la fibra se introdujo en la interfase de HPLC-SPME para desorber y transferir el derivado TMA-FMOC al equipo de CL. Se llevó a cabo un estudio comparativo de las características analíticas de los procedimientos para las dos matrices, aire y agua. Se destacan las ventajas y desventajas de este método respecto al procedimiento en fase sólida propuesto previamente [25, 27] (**Apéndices 3 y 4**).

El esquema empleado en la desorción estática se presenta en la **Figura 24 del Capítulo 2-Reactivos e Instrumentación (pág.69)**. Para más detalles experimentales ver el **Apéndice 5**.

Optimización del procedimiento de extracción/derivatización mediante SPME en muestras acuosas

Entre los sorbentes para fibras que se encuentran disponibles comercialmente el de CW-TPR es el que retuvo menos productos no deseados al utilizar FMOC como reactivo derivatizante [28] como se ha puesto de manifiesto en los capítulos anteriores, y por tanto éste fue el seleccionado en el presente estudio. Las condiciones utilizadas para la extracción/derivatización del analito se seleccionaron de acuerdo con un estudio previo [29]. Los resultados se compararon con los obtenidos mediante la derivatización de la TMA en disolución.

Inicialmente se evaluó el efecto de la concentración de reactivo. El tiempo de adsorción para el reactivo fue 5 min, mientras que el tiempo para la extracción/reacción de la amina fue 15 min. El pH de la disolución de derivatización fue 9.0, y el tiempo de desorción del derivado TMA-FMOC fue 5 min. Como se observa en la **Figura 46a**, la respuesta obtenida para el derivado TMA-FMOC aumentó a medida que lo hizo la concentración de reactivo. Sin embargo, no pudieron utilizarse concentraciones mayores de 25 mmol/L porque el pico cromatográfico correspondiente al reactivo se solapaba con el pico del derivado TMA-FMOC. Por tanto, se seleccionó una concentración de 25 mmol/L para el resto del trabajo. El pH óptimo fue 9.0 (**Figura 46b**).

Otro parámetro estudiado fue el tiempo de adsorción del reactivo. Este parámetro se modificó entre 1 y 55 min (**Figura 46c**) manteniendo los otros parámetros constantes, pero no se observó ninguna mejoría significativa al utilizar tiempos superiores a 5 min.

En cuanto al tiempo de extracción del analito, que también puede considerarse tiempo de reacción, se evaluó entre 0.5 y 45 min usando un tiempo de adsorción de 5 min para el reactivo. El resto de condiciones se mantuvieron constantes. Los resultados obtenidos (**Figura 46d**) indicaron que los máximos rendimientos de extracción/conversión se alcanzaron para tiempos superiores a 30 min. Finalmente, se ensayaron diferentes tiempos de desorción en el intervalo 5-30 min pero no se encontró una mejora significativa (**Figura 46e**).

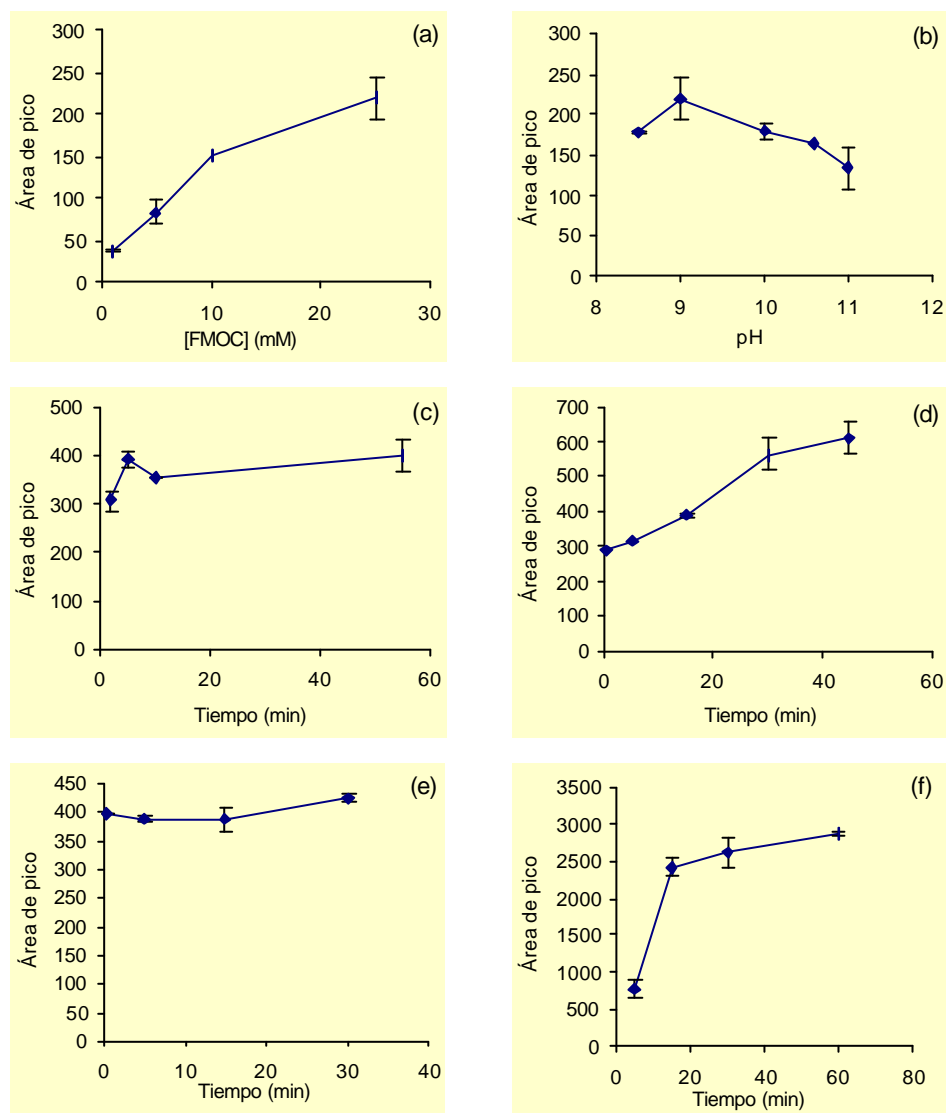


Figura 46. Efecto de las variables experimentales sobre las respuestas de TMA-FMOC (las barras de error significan $\pm 1S.D.$ desde la media $n = 3$): (a) concentración de FMOC, (b) pH, (c) tiempo de adsorción de FMOC, (d) tiempo de adsorción de TMA, (e) tiempo de desorción, y (f) tiempo de volatilización.

Partiendo de los resultados anteriores, las condiciones seleccionadas para la determinación de TMA fueron las que se encuentran resumidas en la **Tabla 15**. En la **Figura 47** están representados los cromatogramas obtenidos para un blanco (agua) y para un patrón de TMA procesado bajo las condiciones óptimas.

Tabla 15. Procedimiento optimizado para la extracción mediante SPME/derivatización sobre la fibra de TMA con FMOC

Acción	Condiciones
Pretratamiento de las fibras	Disolución de reacción: 1.0 mL de FMOC 25 mmol/L + 0.5 mL de tampón borato 0.05 mol/L de pH 9.0. Tiempo de adsorción: 5.0 min
Extracción/derivatización de TMA	Tiempo de adsorción/reacción: 30.0 min en agua, 15.0 min en aire
Desorción de TMA-FMOC	Tiempo de desorción: 5.0 min

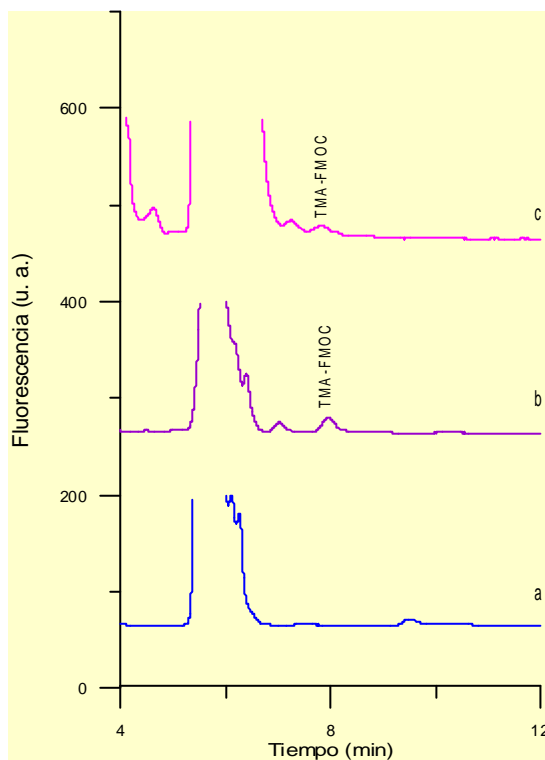


Figura 47. Cromatogramas obtenidos para: (a) blanco (agua) bajo las condiciones optimizadas, (b) un patrón de TMA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) bajo las condiciones optimizadas, y (c) un patrón de TMA (7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por el método de derivatización en disolución. Para otros detalles experimentales ver el **Apéndice 5**.

La derivatización mediante SPME proporciona respuestas más altas para el derivado TMA-FMOC que las obtenidas mediante la derivatización en disolución (ver **Figura 47**). Además, se observaron más productos no deseados (correspondientes a productos de condensación o degradación del FMOC) al utilizar la derivatización en disolución.

Procedimiento de extracción mediante SPME/derivatización en patrones gaseosos

La fibra de SPME se cargó con FMOC como se describe en la **Tabla 15** y se expuso a los vapores de TMA dentro de un vial de 25 mL durante diferentes tiempos en el intervalo 5-60 min. Se observó que tiempos superiores a 15 min no mejoraron sustancialmente la señal obtenida para el derivado TMA-FMOC, como se puede ver en la **Figura 46f**. Consecuentemente, el tiempo empleado para la extracción/derivatización del analito en los siguientes experimentos fue 15.0 min. Después de este tiempo la fibra se retiró del vial y se insertó en la interfase HPLC-SPME.

En la **Figura 48** se presentan los cromatogramas obtenidos para un blanco de aire y para aire que contiene TMA bajo las condiciones propuestas.

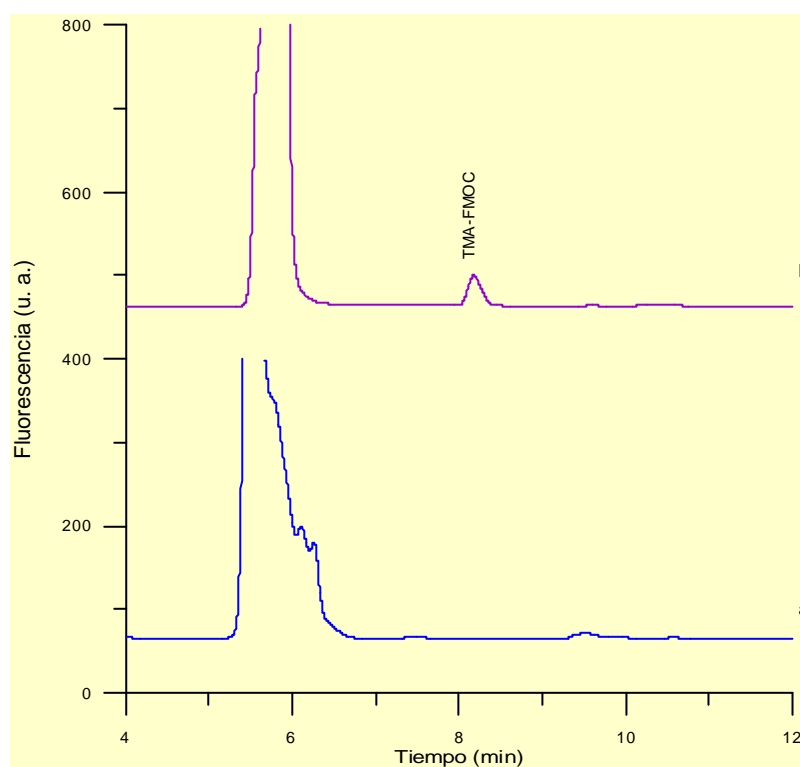


Figura 48. Cromatogramas obtenidos para (a) blanco de aire y (b) aire que contiene 200 mg/m³ de TMA. Para más detalles experimentales ver el **Apéndice 5**.

Características analíticas

Muestras de agua

Los resultados de la **Tabla 16** indicaron que el método proporcionaba linealidad adecuada dentro del intervalo de concentraciones examinado. Los coeficientes de variación intra-día e inter-día fueron establecidos a tres niveles de concentración dentro del intervalo estudiado. Los valores obtenidos fueron adecuados (ver **Tabla 16**). El LDD, establecido para una relación señal/ruido de 3, fue 0.25 µg/mL. Cabe destacar que estos valores son aproximadamente cinco veces mayores que los valores obtenidos mediante el método de derivatización asistida sobre soporte sólido utilizando una precolumna [25]. Esto es consecuencia de que, debido a las pequeñas dimensiones de las fibras disponibles comercialmente, las cantidades de TMA y FMOC que pueden ser extraídas con las fibras, y por tanto las cantidades que pueden formarse de TMA-FMOC, son menores que las que pueden extraerse/formarse en una precolumna. No obstante, la sensibilidad sería adecuada para la determinación de TMA en aguas residuales [4]. Al utilizar el procedimiento de SPME se ha reducido el trabajo experimental en relación con el necesario para el método de la precolumna. También es destacable que el muestreo en el método con SPME es no destructivo. El LDC, establecido para una relación señal/ruido de 10, fue 1 µg/mL.

Tabla 16. Datos analíticos para la determinación de TMA

Tipo de muestra	Intervalo	Linealidad Y = a + bx (n = 10)	Precisión			LDD
			Concentración	Intra-día C. V. (%) (n = 3)	Inter-día C. V. (%) (n = 6)	
Agua	1.0-10.0 µg/mL	a ± s _a : 37.3 ± 1.4	1.0 µg/mL	23	23	0.25 µg/mL
		b ± s _b : 47 ± 9	5.0 µg/mL	16	12	
		R ² : 0.98	10.0 µg/mL	7	16	
Aire	25-200 mg/m ³ (25°C, 1.013 × 10 ⁻⁵ Pa)	a ± s _a : 98 ± 12	25 mg/m ³	10	9	12 mg/m ³
		b ± s _b : 1.672 ± 0.102	100 mg/m ³	17	14	
		R ² : 0.97	200 mg/m ³	16	14	

Puesto que como ya se ha comentado el FMOC reacciona con aminas alifáticas primarias y secundarias de cadena corta potencialmente presentes en las muestras, se evaluó el efecto de estos compuestos. Las aminas ensayadas fueron metilamina, etilamina, *n*-butilamina, *n*-pentilamina y dietilamina. Todas ellas fueron extraídas y derivatizadas bajo las condiciones propuestas pero sus respectivos derivados de FMOC presentaron tiempos de retención diferentes al del TMA-FMOC. Para probar si estas aminas interferirían en la determinación de TMA debido al consumo de FMOC se ensayaron diferentes muestras que contenían el analito y una mezcla de las otras aminas. Los resultados obtenidos (**Tabla 17**) demostraron que la TMA se determinó con exactitud adecuada a los niveles de concentración ensayados.

La dimetilamina (DMA) y la propilamina (PA) se consideraron interferencias porque eluían al mismo tiempo de retención que la TMA [29]. Por ello, se evaluaron diferentes procedimientos con la finalidad de eliminar la DMA y la PA presentes en las muestras. El mejor procedimiento para eliminar las interferencias consistió en derivatizar 5 mL de muestra con DNB 40 mmol/L; después los derivados fueron retenidos en un cartucho de SPE de tipo C₈ y a continuación fueron desorbidos pasando 0.5 mL de acetonitrilo a su través. La TMA fue desorbida con 5 mL de ácido fosfórico 0.1 mol/L, después se basificaron los extractos. Finalmente, se efectuó la SPME. Se evaluaron los niveles de tolerancia para DMA y PA. Éstos fueron 0.25 y 0.5 µg/mL, respectivamente. A estos valores de concentración no se observaron picos para ninguna de las dos aminas. La recuperación obtenida para la TMA en presencia de DMA y PA a los respectivos niveles de tolerancia fue 100% (s = 5, n = 4). Si las muestras reales contuvieran niveles de DMA y PA superiores a los de tolerancia, sería necesario realizar la derivatización en una precolumna conectada en línea a la columna analítica [25]. Este procedimiento descrito en las secciones anteriores es selectivo para la determinar de TMA, ya que PA y DMA eluyeron a tiempos de retención diferentes. Por el método con SPME se determinarían PA, DMA y TMA conjuntamente.

La exactitud del método se evaluó analizando patrones con diferentes concentraciones de TMA dentro del intervalo de concentración examinado. Los resultados de este estudio están resumidos en la **Tabla 17**. Se observó que las concentraciones obtenidas estaban próximas a las concentraciones reales en todas las muestras ensayadas.

Se fortificaron varias muestras con TMA y se analizaron por el método propuesto. Las concentraciones de TMA presentes en estas muestras se calcularon a partir de la ecuación de calibrado obtenida con patrones de TMA (**Tabla 16**). Los valores obtenidos en este estudio están resumidos en la **Tabla 17**. Las incertidumbres expandidas con un factor de K= 2 se presentan en la **Tabla 17**. El cálculo está conforme con la guía EURACHEM/CITAC [30], y es un cálculo completo basado en los datos de validación del método. La variación total de un procedimiento analítico entre medidas (precisión) fue la principal contribución a la incertidumbre. Se obtuvieron valores de precisión comparables al procesar patrones y muestras. Al igual que para los patrones, el método propuesto proporcionó valores próximos a las concentraciones fortificadas, excepto en el agua de mar. En dicha muestra las respuestas obtenidas fueron significativamente inferiores a las correspondientes a patrones. Las áreas de pico observadas en agua de mar fueron aproximadamente el 38% de las observadas para patrones que contenían la misma concentración de amina. Al procesar un patrón acuoso que contenía 5.0 µg/mL de TMA y 35 g/L de NaCl, el área media obtenida para el compuesto TMA-FMOC fue el 41% (s = 3, n = 3) de la obtenida con patrones sin NaCl. Por tanto, en la cuantificación de TMA en agua de mar se requeriría del empleo de patrones fortificados con NaCl para construir la curva de calibrado.

Tabla 17. Exactitud para la determinación de TMA en diferentes tipos de muestras

Tipo de muestra	TMA añadida	TMA determinada
Patrón en disolución	5.0 µg/mL	6 ± 1 µg/mL
Patrón en disolución que contiene una mezcla de TMA y otras aminas alifáticas	1.0 µg/mL ^a , 5.0 µg/mL ^b	1.2 ± 0.4 µg/mL, 4 ± 1 µg/mL
Agua de consumo	5.0 µg/mL	4.7 ± 0.9 µg/mL
Agua subterránea	5.0 µg/mL	6 ± 1 µg/mL
Agua de río	1.0 µg/mL	0.84 ± 0.15 µg/mL
Aire	25 mg/m ³	32 ± 8 mg/m ³
	100 mg/m ³	90 ± 20 mg/m ³

^a Una mezcla que contiene 1.0 µg/mL de cada amina (metilamina, etilamina, *n*-butilamina, *n*-pentilamina y dietilamina).

^b Una mezcla que contiene 5.0 µg/mL de cada amina (metilamina, etilamina, *n*-butilamina, *n*-pentilamina y dietilamina). Para otros detalles ver el **Apéndice 5**.

Muestras de aire

Los resultados presentados en la **Tabla 16** indicaron que el método proporcionaba una linealidad adecuada. Se obtuvieron los coeficientes de variación a diferentes niveles de concentración dentro del intervalo examinado. Como podemos ver en la mencionada tabla se puede considerar que la precisión es adecuada para este tipo de muestras.

La ecuación de calibración obtenida para aire, $y = (98 \pm 12) + (67 \pm 4)x$ (µg), se comparó con la obtenida con patrones acuosos de TMA, $y = (47 \pm 9) + (1.49 \pm 0.06)x$ (µg). A partir de la relación entre las pendientes de las ecuaciones de calibración, expresando las concentraciones en valores absolutos (µg) se observó que las señales correspondientes a los patrones de aire eran aproximadamente 50 veces mayores que las señales obtenidas para patrones acuosos. Este hecho puede ser debido a la mayor facilidad de las moléculas de TMA en fase gaseosa por alcanzar la superficie porosa de la fibra respecto de las moléculas en disolución. Por tanto, para cuantificar la TMA en muestras de aire no pueden emplearse patrones acuosos, contrariamente al método basado en el muestreo dinámico propuesto previamente [27].

La OSHA (Administración Ocupacional de la Seguridad y la Salud) estableció que la máxima concentración permitida para un tiempo de exposición largo (VLA-ED) para la TMA es 12 mg/m³ [22] y el nivel para un tiempo de exposición corta (VLA-EC) es 24 mg/m³. El LDD, establecido para una relación señal/ruido de 3, fue 12 mg/m³ y el LDC, establecido para una relación señal/ruido de 10, fue 20 mg/m³. Por tanto este método sería adecuado para controlar la exposición durante un tiempo de corta duración.

Es interesante resaltar que el LDD es aproximadamente 55 veces mayor que el valor obtenido mediante el método de muestreo dinámico utilizando un cartucho de SPE y derivatización en una precolumna conectada en línea con la columna analítica [27]. Esto es debido a las pequeñas dimensiones de la fibra comparadas con las dimensiones del cartucho de SPE, y también al muestreo pasivo realizado por el procedimiento de SPME. Sin embargo, al igual que en el caso del análisis de agua, el método basado en la SPME optimizó el esfuerzo experimental. También es destacable el hecho de que los métodos de muestreo pasivo no requieren mantenimiento, mientras que los métodos de muestreo activo necesitan el control y mantenimiento de una bomba.

La exactitud del método se evaluó generando patrones de aire que contenían dos concentraciones diferentes de TMA dentro del intervalo de concentración evaluado. Como se puede ver en la **Tabla 17**, las concentraciones obtenidas estaban próximas a las concentraciones reales. Se obtuvieron valores de precisión comparables a los obtenidos al procesar patrones acuosos. Las incertidumbres se calcularon del mismo modo indicado anteriormente para las muestras de agua.

Aplicación a muestras reales

Se analizó una muestra de agua procedente del lavado de pescado. Los resultados indicaron la ausencia de DMA y de PA. La TMA encontrada se expresó como el valor medio \pm la incertidumbre expandida utilizando un factor de $K=2$, y fue (2.48 ± 0.13) $\mu\text{g/mL}$. Este resultado se comparó con el obtenido mediante el procedimiento basado en la derivatización en línea en una precolumna conectada a la columna analítica [25] que fue (2.5 ± 0.3) $\mu\text{g/mL}$ de TMA. Ambos resultados son estadísticamente similares.

Finalmente, el procedimiento propuesto se aplicó a muestras de aire contaminado con el analito para evaluar los valores de VLA-EC (ver Sección 2 en el **Apéndice 5**). Con este propósito, se contaminó el aire encerrado en una cámara con TMA pura. Las concentraciones medias encontradas fueron (170 ± 40) y (190 ± 20) mg/m^3 después de contaminar la cámara durante 5 y 15 min, respectivamente. En otro conjunto de experimentos se colocaron diferentes disoluciones de TMA dentro de la cámara durante 5 min, y después se realizó el muestreo/derivatización. Las cantidades encontradas de TMA fueron (64 ± 13) , (104 ± 5) y (137 ± 2) mg/m^3 al utilizar disoluciones de 0.1, 5.0 y 10.0 g/L de TMA, respectivamente.

Otras muestras analizadas fueron aire del laboratorio, aire de un mercado de pescado y aire de dentro de una cámara 4h después de haber introducido un pescado en su interior. Las muestras fueron analizadas por los dos procedimientos (dinámico y estático). En todos los casos las concentraciones encontradas estaban por debajo del valor legislado para exposiciones de corta duración.

Conclusiones

En esta parte de la Tesis se describe la utilización de la SPME para el aislamiento y derivatización de la TMA con el reactivo FMOC previo a su análisis mediante CL. Los mejores resultados se obtuvieron cargando las fibras primero con el reactivo, y después extrayendo y derivatizado el analito simultáneamente sobre la fibra. Debe resaltarse que el método de derivatización convencional (en disolución) no es adecuado ya que con aminas terciarias se obtienen bajos rendimientos de conversión en condiciones de reacción suaves.

La aproximación propuesta puede ser usada para cuantificar TMA en aguas residuales. Los niveles de tolerancia para la PA y la DMA en muestras de agua fueron 0.5 y 0.25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Estas interferencias pueden ser eliminadas por medio de la derivatización en disolución con DNB seguida de la etapa de lavado a través del cartucho de SPE. También puede resultar interesante que el procedimiento propuesto sea un método de muestreo no destructivo. Además, se mejoró la selectividad, porque los compuestos más polares presentes en el agua no se extrajeron con el sorbente de la fibra.

El método también puede aplicarse a la cuantificación de TMA en aire. La sensibilidad lograda es adecuada para estimar los límites de exposición de corta duración en atmósferas laborales. Esto es especialmente importante en el análisis de TMA en aire porque el procedimiento con SPME supone un muestreo pasivo.

La principal ventaja de emplear la SPME en comparación con los procedimientos anteriores propuestos radica en que el esfuerzo experimental y la manipulación de la muestra se reducen significativamente.

3.1.4. DETERMINACIÓN DE AMINAS ALIFÁTICAS

Para completar los estudios anteriores, en este apartado se ha investigado la fiabilidad de la SPME combinada con una reacción química para el análisis de diferentes aminas alifáticas de cadena corta por cromatografía líquida. Se han ensayado y comparado diferentes opciones para acoplar la SPME y la derivatización:

- Derivatización de los analitos en disolución seguida de la extracción de los derivados.
- Extracción de los analitos y posterior derivatización al sumergir la fibra de SPME en una disolución del reactivo.
- Extracción/derivatización de los analitos usando fibras recubiertas previamente con el reactivo.

Estas opciones se han aplicado a la metilamina (**MA**), la dimetilamina (**DMA**) y la trimetilamina (**TMA**), seleccionadas como modelos de amina primaria, secundaria y terciaria, respectivamente. Los analitos se derivatizaron con el reactivo fluorogénico FMOC, y el sorbente de la fibra fue CW-TPR. El empleo de fibras recubiertas con FMOC resultó ser la mejor opción para extraer y derivatizar los analitos, ya que comparada con las otras aproximaciones ensayadas la sensibilidad fue considerablemente mejor. Partiendo de estos estudios se ha presentado un nuevo procedimiento para la determinación de MA, DMA y TMA en agua.

Para demostrar la utilidad de las condiciones propuestas se presentan las características analíticas y los resultados obtenidos de la determinación de aminas en agua de consumo humano, de río y residual.

3.1.4.1. EVALUACIÓN DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA AMINAS ALIFÁTICAS UTILIZANDO DERIVATIZACIÓN CON 9-FLUORENILMETIL CLOROFORMIATO Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

Para aumentar la sensibilidad en SPME se han propuesto dos alternativas: el desarrollo de nuevos sorbentes para las fibras, y la transformación química de los analitos en compuestos más adecuados para su extracción. La utilidad del acoplamiento de la derivatización a la SPME ha sido ampliamente documentada para una gran variedad de matrices y analitos. Sin embargo la gran mayoría de las aplicaciones descritas están relacionadas con la derivatización de los solutos antes de su separación y detección por CG, como se refleja en los artículos de revisión publicados recientemente sobre este tema [31, 32]. Por el contrario, la combinación de la SPME y una reacción química para CL ha recibido una atención muy limitada, a pesar de que algunas determinaciones mediante CL requieren la derivatización previa de los analitos. Un ejemplo típico es la determinación de aminas alifáticas de cadena corta en agua. El análisis de estos compuestos supone generalmente la preconcentración seguida de su separación cromatográfica. La mayoría de los ensayos mediante CL propuestos para aminas alifáticas incorporan una derivatización química para transformar los analitos en sus derivados, que así pueden ser aislados, resueltos y detectados más fácilmente [4, 13, 15, 21, 33].

La combinación de la SPME y la derivatización química para aminas alifáticas fue presentada en primer lugar por Pawliszyn y colaboradores [26]. Los autores demostraron que la transformación de los analitos en derivados menos polares reducía considerablemente los LDDs respecto a la SPME directa. La derivatización también ha sido usada para aumentar la eficacia de extracción con sorbentes de la fibra diseñados especialmente para aminas alifáticas de cadena corta [34]. En ambos estudios se utilizó la CG para separar y cuantificar las aminas derivatizadas.

En este trabajo se evalúan y comparan diferentes opciones de acoplamiento entre derivatización y SPME para aminas alifáticas de cadena corta usando CL: *i*) derivatización en disolución seguida de la extracción de los derivados, *ii*) extracción del analito y posterior derivatización por inmersión de la fibra en una disolución de reactivo, y *iii*) extracción de los analitos usando fibras previamente cargadas con el reactivo. Se eligió FMOC como reactivo derivatizante porque es capaz de reaccionar también con aminas terciarias [14].

Con la finalidad de mejorar la comprensión de los procesos implicados, los resultados se han comparado con los obtenidos al procesar directamente muestras sometidas a derivatización convencional, esto es, en disolución.

El montaje correspondiente al acoplamiento SPME con fibras – CL se presenta en la **Figura 24** del *Capítulo 2-Reactivos e Instrumentación* (pág. 69). Para más detalles experimentales ver el **Apéndice 6**.

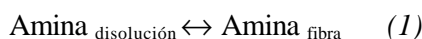
Comparación de las diferentes aproximaciones de extracción/derivatización estudiadas

De acuerdo con el esquema de reacción propuesto en [14] el producto de la reacción entre la TMA y el FMOC es muy probablemente DMA-FMOC. Esto se confirmó por el hecho de que los picos originados por DMA y TMA eluyeron a los mismos tiempos de retención bajo una amplia variedad de condiciones de elución. Por ello, la composición de la fase móvil se seleccionó para conseguir una resolución completa entre MA-FMOC y DMA-FMOC en el mínimo tiempo de análisis.

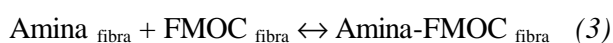
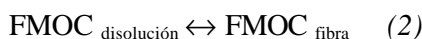
Derivatización en disolución y CL directa. Los principales parámetros que influyen sobre los rendimientos de conversión en la reacción en disolución entre aminas y FMOC son la concentración de reactivo y el tiempo de reacción [1, 2]. Los máximos rendimientos de conversión para la MA y la DMA se alcanzaron usando una concentración de reactivo de 1 mM y un tiempo de reacción de 10 min. Sin embargo, para la misma concentración de reactivo (1 mM) fueron necesarios tiempos de reacción de 30-45 min para conseguir máximas conversiones de la TMA (datos no presentados). En consecuencia, el tiempo de reacción utilizado para la TMA fue 30 min. Se derivatizaron patrones que contenían diferentes concentraciones de cada amina bajo sus respectivas condiciones óptimas, y se inyectaron directamente en el equipo de CL. Las concentraciones ensayadas y los parámetros de calibración obtenidos para las tres aminas probadas bajo las condiciones seleccionadas se presentan en la **Tabla 18**.

Como se observa en la **Tabla 18**, las pendientes de las curvas de calibración obtenidas para la MA y la DMA (expresadas como L/mol) fueron estadísticamente equivalentes revelando que bajo las condiciones experimentales usadas los rendimientos de conversión obtenidos para ambas aminas fueron comparables (no se establecieron los rendimientos de conversión absolutos porque no estaban disponibles los patrones externos de los derivados del analito-FMOC). Por el contrario, la pendiente de la curva de calibración de la TMA fue unas 80 veces inferior a la de la MA y la DMA. Esto indica que tal como se esperaba, el rendimiento de conversión para esta amina terciaria fue mucho menor a los obtenidos para las aminas primaria y secundaria.

SPME de la amina y posterior derivatización (Método 1). En esta aproximación la extracción y derivatización de las aminas puede resumirse en dos pasos. Primero, se extrajeron las aminas de la muestra:



A continuación la fibra fue retirada de la muestra y se sumergió en un vial que contenía el reactivo. De ese modo se extrajo el reactivo, y la reacción con los analitos tuvo lugar en la fibra simultáneamente, o bien algo después:

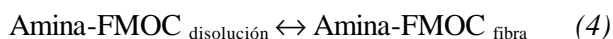


En este estudio los parámetros de la SPME para extraer las aminas fueron un volumen de muestra de 25 mL y un tiempo de adsorción de 30 min. Después del muestreo la fibra se introdujo en un vial que contenía la disolución derivatizante (1 mL de FMOC 25 mM y 0.5 mL de tampón borato). Las máximas respuestas de los tres analitos se obtuvieron al utilizar un intervalo de tiempo para la extracción del reactivo y la reacción sobre la fibra de 30 min. Para tiempos más largos las áreas de los picos de los derivados formados se mantuvieron constantes dentro de las variaciones experimentales. Por tanto, para el resto del trabajo se seleccionó un tiempo de adsorción/reacción de 30 min.

Bajo las condiciones anteriores los principales factores determinantes de la cantidad formada de amina-FMOC en la fibra puede esperarse que sean la cantidad de amina extraída en (1), la cual está determinada por la concentración de amina en la muestra, y la eficacia de la reacción entre la amina y FMOC en la fibra (equilibrio (3)). Si asumimos que las reacciones en la fibra y en disolución presentan tendencias similares, las diferencias en las respuestas observadas entre las aminas (a concentraciones equivalentes) tienen que ser explicadas en base a sus respectivas afinidades por el sorbente de la fibra, esto es, mediante el equilibrio (1). En otras palabras, las diferencias en las respuestas observadas para las aminas fueron determinadas por sus respectivas polaridades. Esto es consistente con los resultados presentados en la **Tabla 18**. La pendiente de la curva de calibración obtenida para la MA fue menor que la de la DMA (los coeficientes de partición octanol/agua expresados como $\log P_{ow}$ son, -0.71 y -0.38 para MA y DMA, respectivamente). Aunque la TMA es la menos polar de las aminas ensayadas ($\log P_{ow} = 0.27$), la pendiente de la curva de calibración para este compuesto fue ligeramente inferior a las obtenidas para la MA y la DMA. Esto confirmó que, al igual que en disolución, la TMA reaccionó sobre la fibra menos eficazmente que la MA y la DMA.

Cabe resaltar que los valores absolutos de los parámetros de calibración obtenidos bajo la presente aproximación (u otros procedimientos de SPME) no pueden ser comparados con aquellos obtenidos mediante la inyección directa de los derivados formados en disolución, ya que las cantidades absolutas de analito-FMOC inyectadas en el sistema cromatográfico no son comparables.

Derivatización en disolución seguida de la SPME del derivado (Método 2). En el método presente la cantidad de FMOC-analito en la fibra queda determinado por la concentración máxima de derivado que puede formarse en disolución:

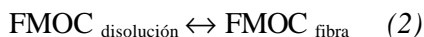


En primer lugar, los derivados se formaron en disolución bajo las condiciones optimizadas previamente. Tras un tiempo de reacción (10 min para la MA y la DMA, y 30 min para la TMA) la fibra se sumergió en la disolución de reacción durante otros 30 min con la finalidad de extraer los compuestos de interés. Finalmente, la fibra se retiró del vial de reacción y se colocó en la interfase SPME-HPLC. Los resultados se compararon con los obtenidos colocando la fibra en el vial de reacción tras la adición de reactivo, es

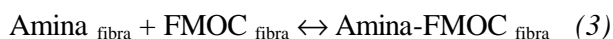
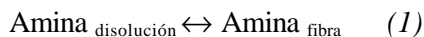
decir, considerando el mismo tiempo para la reacción y para la extracción. Puesto que las áreas de los picos obtenidos para todos los analitos mediante los dos procedimientos fueron estadísticamente equivalentes (para un nivel de confianza del 99%), se adoptó el último método para simplificar el procedimiento analítico. Las ecuaciones de calibración obtenidas para las tres aminas bajo las condiciones ensayadas también están indicadas en la **Tabla 18**.

Las pendientes de las ecuaciones de calibración obtenidas para los derivados de la MA y la DMA con la presente aproximación de derivatización/SPME fueron comparables. Los rendimientos de la reacción en disolución para ambas aminas fueron similares (ver **Tabla 18**), lo que indica que ambos derivados FMOC-amina presentan coeficientes de partición agua/fibra similares. El parámetro principal que afecta a la eficacia de extracción mediante las fibras usadas en este estudio es la polaridad de los compuestos a extraer. La MA es más polar que la DMA. Sin embargo, la derivatización de estas aminas con un reactivo de elevado peso molecular como el FMOC hace que las diferencias relativas entre los derivados (esto es, entre sus polaridades) sean significativamente más pequeñas que entre las aminas sin derivatizar. Por esta razón las eficacias de extracción observadas para MA-FMOC y DMA-FMOC fueron bastante similares. La pendiente obtenida para la TMA fue notablemente inferior porque, como se ha expuesto anteriormente, la concentración de derivado formada en disolución también fue menor.

Derivatización con fibras recubiertas con reactivo (Método 3). Primero la fibra fue recubierta con el reactivo:



Y después la fibra se sumergió en las muestras para extraer y derivatizar la amina:



De acuerdo con este esquema y para una concentración dada de amina en la muestra, la cantidad de derivado amina-FMOC que puede formarse en la fibra podría aumentarse al aumentar la concentración de FMOC en la fibra a través del equilibrio (2). Debe destacarse que el esquema de reacción entre los analitos y FMOC en la fibra fue idéntico en los métodos 1 y 3. Sin embargo, la cantidad máxima de amina-FMOC que podía formarse en el Método 1 estaba determinada por la concentración de amina en la muestra, mientras que en el Método 3 la cantidad máxima de derivado depende de la cantidad de FMOC en el vial del reactivo. En otras palabras, la cantidad de amina-FMOC que podría formarse en la fibra con el Método 1 está limitada por la concentración de amina en la muestra, mientras que la cantidad de amina-FMOC formada en el Método 3 podría ser aumentada, bien aumentando la concentración de FMOC en la mezcla del reactivo o bien prolongando el tiempo de adsorción para el equilibrio (2). Obviamente, la situación más favorable correspondería al empleo de fibras saturadas con el reactivo.

En el estudio presente la fibra fue recubierta con FMOC al sumergirla en la disolución del reactivo durante 5 min. Después la fibra fue retirada del vial y sumergida en 25 mL de muestra durante otros 30 min. Como se representa en la **Figura 49**, las señales analíticas observadas mediante esta aproximación fueron mucho mayores que las obtenidas con los otros métodos de SPME/derivatización. De hecho, los gráficos *áreas de pico vs concentración de amina* obtenidos para la MA y la DMA revelaron que la fibra estaba saturada en sus respectivos derivados de FMOC para concentraciones de amina en las muestras superiores a 5 mg/L (ver **Figura 50**). Las respuestas de estas aminas sólo fueron lineales en el intervalo 0.1-1.0 mg/L (**Tabla 18**). Aunque no se ensayó, el intervalo lineal podría ser extendido muy probablemente al reducir el tiempo de extracción/reacción de la amina.

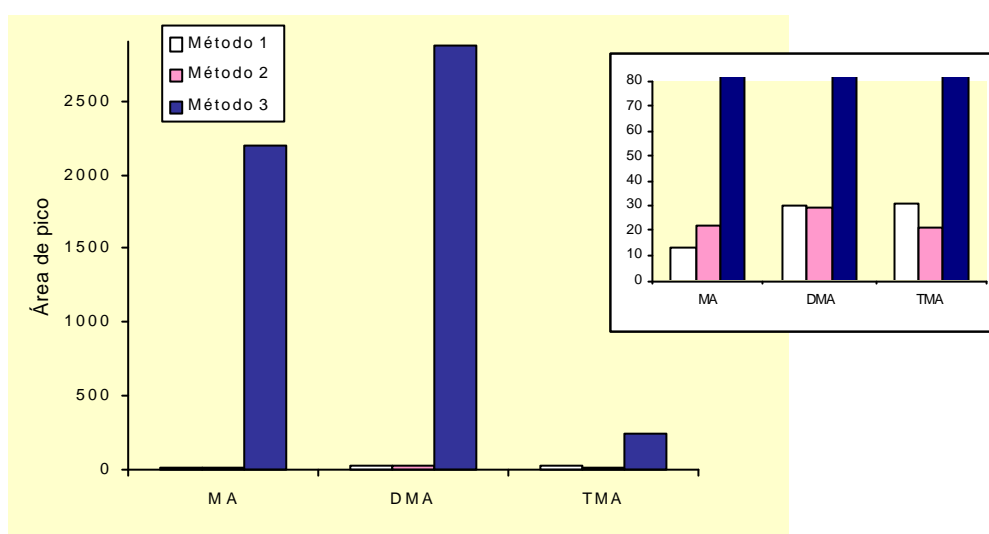


Figura 49. Áreas medias de pico obtenidas para las aminas con los tres métodos de SPME/derivatización probados. Método 1: extracción de la amina seguida de la derivatización sobre la fibra; Método 2: derivatización en disolución seguida de la extracción del derivado; Método 3: extracción/derivatización sobre la fibra recubierta de reactivo. Concentración de MA y DMA, 1 mg/L; concentración de TMA, 5 mg/L. Para otros detalles ver el **Apéndice 6**.

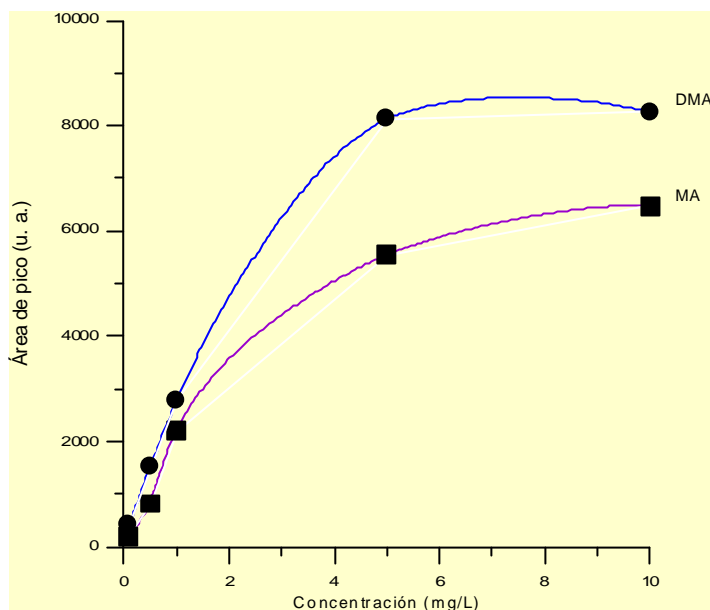


Figura 50. Perfiles de área de pico vs concentración de amina para la MA y la DMA obtenidos mediante el método de extracción/derivatización sobre la fibra recubierta de reactivo. Para otros detalles, ver el **Apéndice 6**.

Las respuestas en el Método 3 también dependen, hasta cierto punto, de las afinidades de los analitos por el sorbente de la fibra a través del equilibrio (1). Esto es consistente con el hecho de que la pendiente de calibración obtenida para la DMA fuera mayor que la de la MA (ver **Tabla 18**). Finalmente, la pendiente de la curva de calibración obtenida para la TMA confirmó que la velocidad de reacción para esta amina en la fibra (equilibrio (3)) era menor que las de la MA y la DMA. La linealidad para la TMA fue adecuada hasta una concentración de 10.0 mg/L (**Tabla 18**).

La elevada cantidad de reactivo no reaccionado sobre las fibras no interfirió en la medida de las señales analíticas obtenidas para los analitos. Esto está representado en la **Figura 51**, la cual muestra los cromatogramas obtenidos con el Método 3 para las tres aminas probadas. Por otro lado, no se detectó un pico significativo correspondiente al FMOC no reaccionado cuando se inyectaron directamente a la columna analítica muestras sujetas previamente a extracción/derivatización. Esto significa que la constante del equilibrio (2) fue muy alta, y por tanto, la presente aproximación puede ser considerada un tratamiento de muestra no destructivo.

Tabla 18. Comparación de las ecuaciones de calibración obtenidas para la MA, la DMA y la TMA por los diferentes procedimientos ensayados.

Método	MA		DMA		TMA	
	Ecuación Calibrado*	Intervalo concentración (µg/mL)	Ecuación Calibrado*	Intervalo concentración (µg/mL)	Ecuación Calibrado*	Intervalo concentración (µg/mL)
Derivatización disolución	$Y = 5,868.10^3x - 21.46$ $R^2 = 0.997$ (n = 8)	0.5–10.0	$Y = 5,789.10^3x - 12.39$ $R^2 = 0.9993$ (n = 8)	0.5 – 10.0	$Y = 6,771.10^3x + 71.67$ $R^2 = 0.97$ (n = 7)	5.0 – 25.0
SPME amina/derivatización sobre fibra	$Y = 1,593.10^3x + 9.44$ $R^2 = 0.98$ (n = 7)	1.0–15.0	$Y = 4,275.10^3x + 8.86$ $R^2 = 0.98$ (n = 7)	1.0 – 15.0	$Y = 1,334.10^3x + 22$ $R^2 = 0.98$ (n = 7)	5.0 – 25.0
Derivatización disolución/SPME	$Y = 2,830.10^3x + 11$ $R^2 = 0.98$ (n = 8)	1.0–15.0	$Y = 2,848.10^3x + 37$ $R^2 = 0.97$ (n = 7)	1.0 – 15.0	$Y = 1,30.10^3x + 9$ $R^2 = 0.99$ (n = 7)	5.0 – 25.0
Recubrimiento fibras SPME/muestreo	$Y = 3,56.10^3x + 475$ $R^2 = 0.98$ (n = 7)	0.1–1.0	$Y = 7,369.10^3x + 156$ $R^2 = 0.98$ (n = 7)	0.1 – 1.0	$Y = 2,169.10^3x + 49.17$ $R^2 = 0.98$ (n = 7)	1.0 – 10.0

(*) – Pendientes expresadas como L/mol.

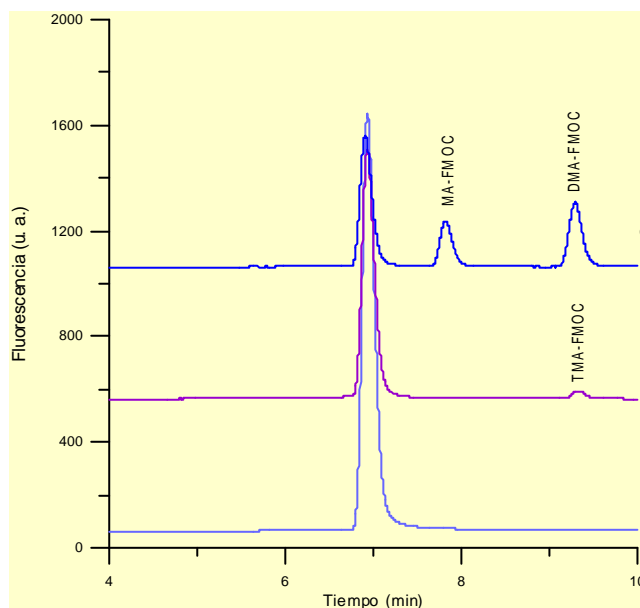


Figura 51. Cromatogramas obtenidos para: (a) un blanco (agua), (b) una disolución que contiene 10 mg/L de TMA, y (c) una disolución que contiene una mezcla de MA y DMA (1 mg/L, de cada una). El pico de 6.9 min corresponde a FMOC no reaccionado. Para otros detalles experimentales, ver el Apéndice 6.

Optimización del procedimiento de extracción/derivatización con fibras recubiertas de FMOC

Se optimizó la aproximación propuesta de extracción/derivatización (Método 3) utilizando diseños experimentales. En primer lugar, se evaluó el efecto de los parámetros experimentales sobre las áreas de los picos mediante el diseño de Plackett-Burman [35]. Con ocho experimentos se analizaron seis factores a dos niveles cada uno. Las variables experimentales y los valores ensayados fueron seleccionados de acuerdo con las observaciones de las secciones anteriores (ver **Tabla 19**). El análisis estadístico de los resultados obtenidos mostró tendencias similares para las tres aminas estudiadas. En todos los casos, al aumentar el tiempo de adsorción para los analitos, la concentración de FMOC, el volumen de muestra y el pH, se encontró un efecto positivo sobre las respuestas de los analitos. El tiempo para recubrir la fibra de reactivo y la temperatura de reacción no afectaron significativamente a las conversiones de los analitos a los niveles ensayados. Consecuentemente, se tomaron como valores óptimos un tiempo de adsorción para el FMOC de 3 min y una temperatura de 20°C.

Podría esperarse que un aumento de los valores de las otras cuatro variables resultara en un incremento de las áreas de los picos. Sin embargo, en un conjunto previo de experimentos se observó que concentraciones de FMOC mayores de 30 mM proporcionalaban perfiles cromatográficos inadecuados, porque el intenso pico correspondiente al FMOC no reaccionado dificultaba la medida del área del pico de MA-FMOC. Del mismo modo, el aumento del pH de la muestra dio como resultado peores perfiles cromatográficos debido a la presencia de varios picos probablemente correspondientes a productos de degradación del FMOC. Consecuentemente, los máximos valores ensayados fueron una concentración de FMOC de 30 mM y un pH de muestra de 11. Estos valores se seleccionaron como valores óptimos.

Para los otros dos factores, se realizó un diseño experimental 2^2 completo empleando las variables experimentales indicadas en la **Tabla 19**. Con los mayores valores probados se observó una mejora de la señal. Por tanto, se tomaron un tiempo de adsorción de 30 min para los analitos y un volumen de muestra de 5 mL como la mejor opción para la determinación de MA, DMA y TMA.

Tabla 19. Optimización del método seleccionado de SPME/derivatización. Los valores subrayados corresponden a los valores seleccionados en el procedimiento final.

Diseño experimental	VARIABLES ESTUDIADAS	Valores ensayados
Packett-Burman	Tiempo de adsorción para FMOC	<u>3 min</u> y 7 min
	Tiempo de adsorción para los analitos	10 min y 20 min
	Concentración de FMOC	20 mM y <u>30 mM</u>
	Volumen de muestra	1 mL y 3 mL
	pH de la muestra	9.0 y <u>11.0</u>
	Temperatura para la SPME/derivatización	<u>20 °C</u> y 25 °C
2^2 completo	Tiempo de adsorción para los analitos	20 min y <u>30 min</u>
	Volumen de muestra	3 mL y <u>5 mL</u>

Características analíticas del procedimiento propuesto

Las condiciones optimizadas se aplicaron a patrones de los analitos con la finalidad de examinar el rendimiento cuantitativo del método. Las concentraciones ensayadas así como los resultados obtenidos están indicados en la **Tabla 20**. Los resultados de esta tabla indican que las condiciones propuestas proporcionaron linealidad satisfactoria dentro de los intervalos de concentración estudiados. La repetibilidad a estos niveles de concentración también puede considerarse adecuada. En cuanto a la sensibilidad, los LDDs y LDCs obtenidos para la MA y la DMA fueron comparables con los presentados por ensayos que implican el enriquecimiento del analito mediante LLE o SPE [4, 15]. El LDD obtenido para la TMA fue mayor que el presentado en [25]. Sin embargo, en dicho método fue necesaria una preconcentración previa de TMA en cartuchos de SPE de tipo C₁₈. Por tanto, la aproximación propuesta de extracción/derivatización mediante SPME puede ser considerada una alternativa válida cuando la simplicidad del análisis es más importante que la sensibilidad.

Tabla 20. Datos analíticos para la determinación de MA, DMA y TMA por el método propuesto de derivatización sobre la fibra de SPME.

Compuesto	Intervalo concentración (µg/mL)	Linealidad ^a Y = a + b x (n = 8)	Repetibilidad ^b		LDC (ng/mL)	LDD (ng/mL)
			Precisión intra-día (%) (n = 3)	Precisión inter-día (%) (n = 6)		
MA	0.1 – 1.0	Y = 6,80.10 ⁷ x – 110 R ² = 0.98	2	14	20	5
DMA	0.1 – 1.0	Y = 7,20.10 ⁷ x – 217 R ² = 0.98	12	24	20	5
TMA	0.1 – 1.0	Y = 2,2.10 ⁶ x – 56 R ² = 0.98	16	12	1000	250

(a)- Pendientes expresadas como L/mol

(b)- Determinada a mitad de la concentración más elevada del intervalo estudiado

Aplicación a muestras reales de agua

La utilidad del método propuesto se examinó analizando muestras de agua de consumo, de río y residual. No se detectó ninguna de las aminas ensayadas en las muestras de consumo y de río. Dichas muestras fueron fortificadas con concentraciones conocidas de los analitos y sometidas al procedimiento de SPME/derivatización propuesto. Los resultados de este estudio se pueden ver en la **Tabla 21**, de la cual puede deducirse que la exactitud para esta clase de muestras fue adecuada.

Finalmente, el método propuesto se aplicó al análisis de una muestra de agua residual de origen industrial. En los cromatogramas obtenidos para esta muestra se

observaron dos picos correspondientes a los derivados MA-FMOC y DMA-FMOC. Para comprobar si el pico de DMA-FMOC era debido a la presencia de DMA o TMA (o ambas), la muestra también se procesó mediante un método selectivo para TMA [25]. Puesto que no se detectó la TMA por dicho método se concluyó que la muestra contenía MA y DMA. Las concentraciones de MA y DMA medidas tras la dilución de la muestra fueron (0.149 ± 0.007) y (0.122 ± 0.008) $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, equivalentes a concentraciones en la muestra de (7.4 ± 0.4) y (6.1 ± 0.4) $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Tabla 21. Resultados obtenidos en el análisis de agua de consumo y agua de río fortificadas con MA, DMA y TMA ($n = 3$).

Analito	Concentración añadida ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	
		Agua de consumo	Agua de río
MA	0.5	0.49 ± 0.04	0.51 ± 0.04
DMA	0.5	0.55 ± 0.12	0.49 ± 0.04
TMA	5.0	4.8 ± 0.8	4.1 ± 0.5

Conclusiones

Diversos estudios han demostrado la utilidad de la derivatización en disolución de los analitos antes de la SPME con el fin de aumentar la sensibilidad para muchos tipos de compuestos, incluidas algunas aminas alifáticas de cadena corta. Sin embargo, en este trabajo se ha demostrado que la mejor opción es utilizar fibras recubiertas con el reactivo para llevar a cabo la extracción/derivatización de los analitos. Esto es debido a que las fibras pueden ser recubiertas con una gran cantidad de reactivo dando como resultado una extracción exhaustiva de los analitos durante la etapa de muestreo, y por tanto, la formación de mayores cantidades de derivado amina-FMOC en la fibra. Como resultado, la sensibilidad se mejora considerablemente respecto a los otros métodos probados. Por ejemplo, la pendiente de calibración obtenida para la MA por la aproximación recomendada fue 126 y 223 veces mayor que los valores obtenidos mediante los métodos de derivatización en disolución/SPME y SPME de la amina/derivatización sobre la fibra, respectivamente.

Al igual que en los métodos que implican derivatización en disolución, la sensibilidad alcanzable mediante la aproximación recomendada depende de la estructura de la amina derivatizada. La sensibilidad para la amina terciaria TMA es mucho menor que para las aminas primarias y secundarias. No obstante, el método propuesto puede ser considerado una alternativa simple a aquellos procedimientos que usan LLE o SPE, combinada a menudo con una derivatización química, para alcanzar la sensibilidad requerida. También puede ser una alternativa a los métodos basados en SPME empleando fibras con sorbentes diseñados especialmente para aminas alifáticas de cadena corta. A diferencia de estos métodos, la aproximación propuesta no requiere la síntesis de nuevos sorbentes sino solamente el tratamiento de las fibras disponibles comercialmente con el reactivo, que además es muy simple y rápido.

3.1.5. DETERMINACIÓN DE ANFETAMINAS

En esta parte de la Tesis se ha profundizado en el análisis de anfetaminas en dos direcciones:

- En un primer trabajo se ha evaluado la utilidad de la SPME combinada con dos procedimientos diferentes de derivatización para la determinación de anfetaminas en matrices acuosas y en orina mediante cromatografía líquida. Las dos aproximaciones comparadas han sido:

i) SPME seguida de la derivatización sobre la fibra de las anfetaminas extraídas.

ii) Derivatización en disolución seguida de SPME de los derivados formados.

El reactivo derivatizante empleado fue el FMOC y las fibras utilizadas estaban recubiertas de CW-TPR. La detección fue fluorescente. Ambos métodos se aplicaron a distintos tipos de muestras, como preparados farmacéuticos y orina.

- En el segundo trabajo se propone un método para la determinación enantiomérica de anfetaminas primarias. Se ha investigado la utilidad de una derivatización quiral combinada con la SPME y CL. Se han estudiado y comparado diferentes estrategias de derivatización/extracción usando el reactivo quiral OPA/NAC y fibras de CW-TPR.

A partir de los resultados obtenidos se ha presentado un nuevo método basado en la derivatización en disolución de los analitos, seguida de la SPME de los derivados de OPA-NAC. Las condiciones propuestas han sido aplicadas a la determinación de anfetaminas en preparados farmacéuticos y orina.

3.1.5.1. APLICACIÓN DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA COMBINADA CON LA DERIVATIZACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE ANFETAMINAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

En este trabajo se evalúa la posibilidad de utilizar una derivatización química en combinación con la SPME para el análisis de anfetaminas mediante CL. Para la derivatización se eligió el reactivo fluorogénico FMOC, ya que ha proporcionado resultados excelentes para anfetaminas tanto mediante la derivatización en disolución [36] como para derivatización en fase sólida [37]. Se han examinado y comparado dos alternativas, la SPME seguida por la derivatización sobre la fibra, y la derivatización en disolución seguida por la SPME de los derivados anfetamina-FMOC. Como compuestos modelo se han seleccionado la anfetamina (AP), la metanfetamina (MA) y la 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA). Los dos métodos propuestos se han aplicado al análisis de diferentes tipos de muestras.

Aunque en la mayoría de los trabajos publicados se emplean fibras de polidimetilsiloxano (PDMS) [38, 39], en este estudio sólo se utilizaron fibras recubiertas con CW-TPR. La razón es que, como se demostró en los apartados anteriores [28], la afinidad del FMOC y de los productos secundarios por el sorbente CW-TPR es significativamente menor que la observada para el sorbente de PDMS. Como resultado, los cromatogramas obtenidos con las fibras de CW-TPR presentaron menos picos no deseados.

El montaje correspondiente al acoplamiento entre la SPME con fibras y la CL se presenta en la **Figura 24** del *Capítulo 2-Reactivos e Instrumentación* (pág. 69).

SPME seguida de la derivatización sobre la fibra

Los parámetros seleccionados para la SPME fueron los siguientes: tiempo de adsorción de 15.0 min, tiempo de desorción de 5.0 min y volumen de muestra de 25.0 mL. Bajo estas condiciones resultó que las respuestas de los analitos dependían principalmente de los parámetros de reacción [28]. Se investigaron los parámetros experimentales que afectan a la reacción sobre la fibra entre los analitos y el FMOC utilizando disoluciones estándar acuosas de cada anfetamina (a una concentración de 10.0 µg/mL). Las variables investigadas fueron la concentración de reactivo, el pH de la reacción, el tiempo de reacción y la temperatura.

En primer lugar, se evaluó el efecto de la concentración de FMOC en el intervalo 0.5-25 mM utilizando un tiempo de reacción de 5 min y un tampón borato de pH 10.0; los ensayos se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Las áreas de los picos aumentaron considerablemente al aumentar la concentración de reactivo hasta una concentración de 10 mM. Un incremento de la concentración por encima de este valor resultó en un modesto aumento de las áreas de los picos de los analitos. Con la finalidad de reducir la intensidad de los picos correspondientes al FMOC que queda sin reaccionar en los cromatogramas, se seleccionó una concentración de 10 mM. El efecto del pH se estudió entre 9.0 y 11.5. En este estudio se empleó FMOC 10 mM, el tiempo de reacción fue 5.0

min, y las reacciones se realizaron a temperatura ambiente. Con todos los tampones probados se verificó que el pH de la disolución de derivatización fue adecuado para la reacción (≥ 9.0). Sin embargo, las mayores áreas de pico se obtuvieron a pH 11.0 (datos no presentados), y por tanto, éste fue el pH seleccionado para el resto del trabajo.

Se ensayaron diferentes tiempos de reacción entre 2.0 y 15.0 min usando las condiciones optimizadas de concentración de FMOC y pH, y temperatura ambiente. Se observó que la señal aumentó hasta 5.0 min, y después permaneció constante o disminuyó ligeramente, sobre todo para el derivado FMOC-MDMA. Consecuentemente, se seleccionó un tiempo de reacción de 5.0 min como la mejor opción. Finalmente, se estudió el efecto de la temperatura de reacción mediante la inmersión del vial que contenía la mezcla de reacción y la fibra en un baño de agua. Se probaron diferentes temperaturas entre 40 y 70°C, pero no se observó una mejoría significativa comparada con las señales obtenidas a temperatura ambiente.

Partiendo de los resultados anteriores, las condiciones de reacción seleccionadas finalmente fueron las siguientes: FMOC 10 mM en tampón borato de pH 11.0, y reacción durante 5 min a temperatura ambiente. En la **Figura 52** se representan los cromatogramas obtenidos bajo las condiciones optimizadas para un blanco (agua) y para una disolución estándar de los analitos. El pico observado a 7.6 min correspondía al FMOC no reaccionado, lo que indicó que el reactivo fue significativamente extraído con la fibra. Los cromatogramas también presentaron otros picos secundarios correspondientes al reactivo y/o sus productos de degradación o hidrólisis. Ninguno de estos picos interfirió en la medida de los picos de los analitos.

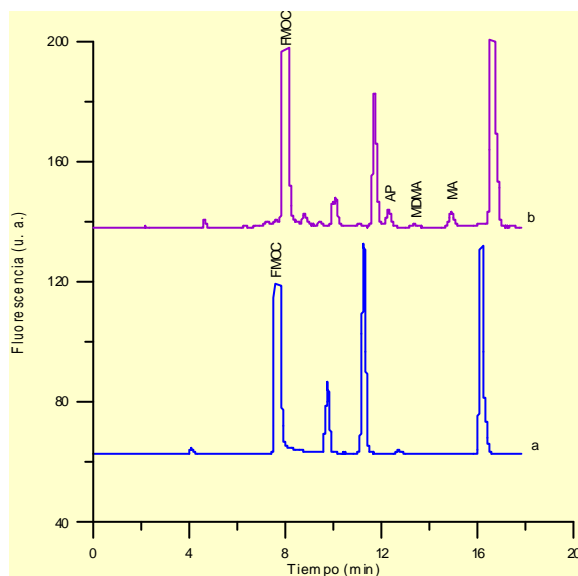


Figura 52. Cromatogramas obtenidos para (a) un blanco (agua), y (b) un patrón de AP, MA y MDMA (5.0 $\mu\text{g/mL}$ de cada una) por el método de SPME seguida de derivatización sobre la fibra. Para otros detalles experimentales ver el **Apéndice 7**.

SPME-CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CONVENCIONAL

No se establecieron los rendimientos absolutos de extracción/conversión de los analitos porque no se disponía de los patrones externos de los derivados anfetamina-FMOC. En su lugar, se estimó la eficacia de la aproximación ensayada comparando las áreas de los picos obtenidos para los analitos con las conseguidas mediante la inyección directa de patrones sometidos a derivatización en disolución. Las condiciones experimentales empleadas para la derivatización de las anfetaminas en disolución fueron seleccionadas de acuerdo con los resultados obtenidos en trabajos previos [37, 40]. En la **Tabla 22** se presentan las cantidades de los derivados FMOC-analito encontradas en los cromatogramas resultantes. Esta tabla también presenta los porcentajes de anfetaminas en los cromatogramas finales. Estos valores fueron calculados por comparación de las áreas obtenidas para los analitos con las obtenidas después de la inyección directa de los patrones derivatizados en disolución. Debe tenerse en cuenta que esos porcentajes corresponden a la fracción de cada droga que fue primero extraída y después derivatizada. Como se observa en dicha tabla, las cantidades extraídas y derivatizadas de MDMA fueron significativamente inferiores a las de las otras anfetaminas.

Tabla 22. Eficacias de los métodos de SPME/derivatización sobre la fibra y derivatización en disolución/SPME (n= 3)

Método	Tipo de muestra	Conc. µg/mL	AP		MA		MDMA	
			Cantidad inyectada (µg)	% medio ^a	Cantidad inyectada (µg)	% medio ^a	Cantidad inyectada (µg)	% medio ^a
SPME/derivatización sobre la fibra	Disolución acuosa	5.0	0.0033 ± 0.0013	0.0026	0.0096 ± 0.0015	0.0047	0.006 ± 0.001	0.0010
		10.0	0.006 ± 0.002		0.0211 ± 0.0012		0.012 ± 0.003	
Derivatización disolución/SPME	Disolución acuosa	5.0	0.014 ± 0.003	0.59	0.0140 ± 0.0019	0.57	0.00472 ± 0.00017	0.19
		10.0	0.032 ± 0.007		0.0293 ± 0.0019		0.0090 ± 0.0018	
	Orina fortificada	5.0	0.015 ± 0.003	0.63	0.011 ± 0.003	0.47	0.0035 ± 0.0018	0.17
		10.0	0.034 ± 0.003		0.026 ± 0.003		0.010 ± 0.004	

^aPorcentaje de droga extraída y derivatizada

La fiabilidad del procedimiento descrito se ensayó analizando disoluciones acuosas que contenían AP y MA en el intervalo de concentraciones 1.0-10.0 µg/mL, y MDMA en el intervalo 2.5-25 µg/mL. Los resultados están resumidos en la **Tabla 23**. Esta tabla muestra que el método propuesto proporcionó linealidad, reproducibilidad, y exactitud adecuadas dentro de los intervalos de concentración examinados. Los LDDs y los LDCs obtenidos para la MDMA fueron superiores a los valores obtenidos para la AP y la MA, lo que es consistente con los resultados de la **Tabla 22**. Los LDDs son aproximadamente un orden de magnitud superiores a los obtenidos previamente utilizando cartuchos de SPE de tipo C₁₈ para efectuar la derivatización [2]. En dicho

método los analitos fueron retenidos en el relleno de SPE y después fueron derivatizados haciendo pasar a través de los cartuchos una alícuota de la disolución de FMOC (método de derivatización asistida sobre soporte sólido). Después de un tiempo de reacción dado, los analitos derivatizados fueron desorbidos de los cartuchos y cromatografiados. Debido a las pequeñas dimensiones de las fibras disponibles comercialmente, las cantidades de anfetaminas y de FMOC que pueden ser extraídas sobre las fibras (y por tanto, las cantidades de los derivados analito-FMOC que pueden formarse) son menores que aquellas que pueden ser retenidas/formadas en los cartuchos de SPE. Sin embargo el procedimiento presente es más simple, ya que la manipulación de la muestra se ha reducido significativamente. Además la técnica de derivatización sobre una fibra de SPME es no destructiva.

Tabla 23. Datos analíticos para la determinación de AP, MA y MDMA en agua por el método de SPME/derivatización sobre la fibra.

Analito	Linealidad ^a y = a + bx (n = 12)	Reproducibilidad			Exactitud (n = 3)			LDD µg/mL	LDC µg/mL
		Conc. µg/mL	Precisión intra-día, CV (%) (n = 3)	Precisión inter-día, CV (%) (n = 6)	Conc. añadida µg/mL	Conc. calculada µg/mL	E _r (%)		
AP	a±s _a : -2±13	1	12	18	1	1.0 ± 0.3	+3	0.1	1
	b±s _b : 41±2	5	11	15	5	5.0 ± 0.9	-0.16		
	r= 0.990	10	6	11					
MA	a±s _a : 0 ±14	1	4	21	1	0.84 ± 0.01	-16	0.1	1
	b±s _b : 51±2	5	7	14	5	4.2 ± 0.3	-16		
	r= 0.991	10	1	4					
MDMA	a±s _a : 11±5	2.5	4	18	2.5	2.7 ± 0.9	+10	1	2.5
	b±s _b : 8.8±0.4	10	4	10	10	7.7 ± 0.8	-23		
	r= 0.990	25	5	6					

^aIntervalo de concentración: AP y MA, 1.0-10.0 µg/mL; MDMA, 2.5-25 µg/mL.

Derivatización en disolución seguida de SPME

Tras la derivatización en disolución bajo las condiciones optimizadas los derivados de FMOC se extrajeron utilizando un tiempo de adsorción de 15.0 min y un tiempo de desorción de 5.0 min. Por lo tanto, los parámetros de la SPME fueron los mismos que para el método de derivatización sobre la fibra con la única excepción del volumen de muestra, que en este método fue 0.5 mL. Como ejemplo ilustrativo, en la **Figura 53** se muestran los cromatogramas obtenidos con las condiciones propuestas. Dichos cromatogramas fueron similares a los obtenidos mediante el método de derivatización sobre la fibra de SPME (ver **Figura 52**). Sin embargo, las áreas de los derivados FMOC-anfetamina fueron superiores con la aproximación de derivatización en disolución seguida de SPME. Esto indica que los derivados FMOC-anfetamina presentan mayor afinidad por el sorbente CW-TPR que las anfetaminas no derivatizadas. A partir de los resultados de la **Tabla 22** se pueden extraer las mismas conclusiones. Al igual que en el método de derivatización sobre la fibra, la menor eficacia se obtuvo para la MDMA.

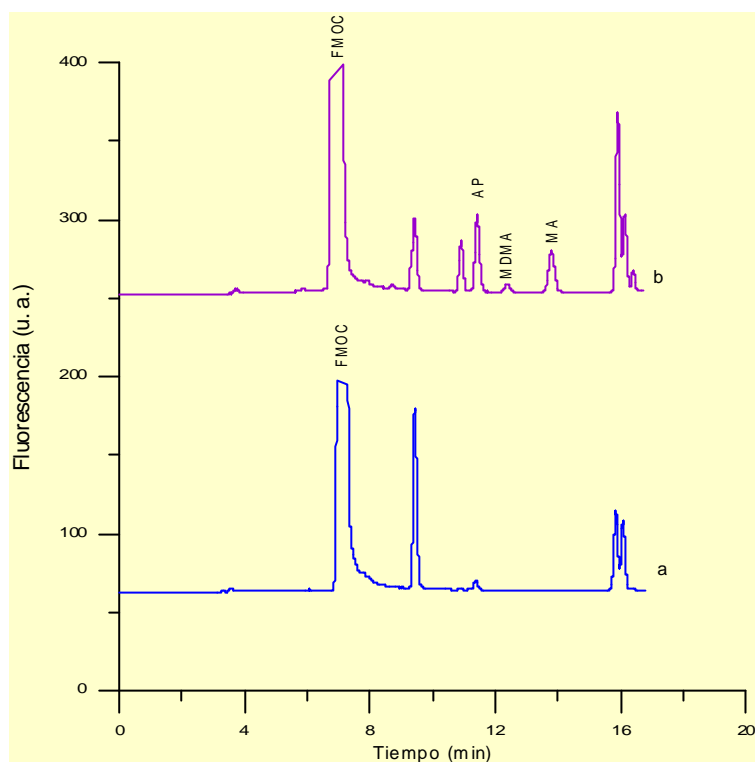


Figura 53. Cromatogramas obtenidos para (a) un blanco (agua), y (b) un patrón que contenía AP, MA y MDMA (5.0 mg/mL de cada una) por el método de derivatización en disolución/SPME. Para más detalles experimentales, ver el **Apéndice 7**.

El método descrito se aplicó a la cuantificación de las tres anfetaminas ensayadas en el intervalo 1.0-10.0 $\mu\text{g/mL}$. Los datos correspondientes están resumidos en la **Tabla 24**. Se observó que esta aproximación proporcionó linealidad, reproducibilidad y exactitud comparables a las del método de SPME seguida de derivatización sobre la fibra, pero la sensibilidad fue mejor, lo cual está de acuerdo con los valores de la **Tabla 22**.

El método propuesto es menos sensible que los métodos basados en el empleo de cartuchos de SPE para aislar y concentrar los derivados de FMOC-anfetamina [36]. De nuevo, esto puede ser explicado por el hecho de que las cantidades de anfetaminas y FMOC que pueden ser extraídas con la fibra son menores.

Tabla 24. Datos analíticos obtenidos en la determinación de AP, MA y MDMA en agua y en orina por el método de derivatización/SPME.

Tipo muestra	Analito	Linealidad ^a y = a + bx (n = 10)	Reproducibilidad			Exactitud (n = 3)			LDD µg/mL	LDC µg/mL
			Conc. µg/mL	intra-día CV (%) n = 3	inter-día CV (%) n = 6	Conc. añadida µg/mL	Conc. calculada µg/mL	E _r (%)		
Patrón acuoso	AP	a±s _a :69 ±8	1	13	22	2.5	2.73 ± 0.06	9	0.05	0.25
		b±s _b :74±2	5	8	14	7.5	7.1 ± 1.9	-5		
		r= 0.998	10	12	10					
	MA	a±s _a :35±9	1	13	13	2.5	2.93 ± 1.04	17	0.1	0.25
		b±s _b :47±2	5	5	5	7.5	8 ± 3	8		
		r= 0.994	10	14	11					
	MDMA	a±s _a :15±1	1	14	18	2.5	1.96 ± 1.13	-22	0.5	1
		b±s _b :7.3±0.2	5	18	23	7.5	7 ± 3	-4		
		r= 0.996	10	19	18					
Orina	AP	a±s _a :65±11	1	21	21	2.5	2.3 ± 0.4	-8	0.1	0.5
		b±s _b :85±2	5	16	15	7.5	8 ± 1	2		
		r= 0.998	10	8	9					
	MA	a±s _a :1±17	1	21	27	2.5	2.42 ± 0.11	-3	0.25	0.5
		b±s _b :61±3	5	22	15	7.5	8.23 ± 1.09	10		
		r= 0.991	10	9	20					
	MDMA	a±s _a :7±3	5	22	20	2.5	3.0 ± 0.5	19	1	2.5
		b±s _b :6.2±0.6	10	28	26	7.5	8 ± 3	7		
		r= 0.996								

^aIntervalo de concentración: AP y MA, 1.0-10.0 µg/mL; MDMA, 1.0-10.0 µg/mL en agua y 2.5-10.0 µg/mL en orina

Aplicación a muestras reales

Para probar su fiabilidad, los dos métodos optimizados se aplicaron al análisis de pastillas ilícitas y de orina fortificada con los analitos.

Los cromatogramas obtenidos para pastillas ilícitas revelaron que la MDMA fue el único compuesto presente. La concentración de esta droga se calculó a partir de las curvas de calibrado obtenidas con patrones acuosos (**Tablas 23 y 24**). Los valores encontrados fueron (10.0±0.4) y (10±1) µg/mL por los métodos de SPME/derivatización sobre la fibra y derivatización en disolución/SPME, respectivamente. Por tanto, puede concluirse que las dos aproximaciones proporcionaron resultados comparables.

La aplicación del método de SPME/derivatización sobre la fibra a las muestras de orina fortificadas con los analitos proporcionó resultados poco satisfactorios. Las señales de las tres anfetaminas fueron <5% de aquellas observadas para patrones acuosos. Se hicieron varios intentos para aumentar el porcentaje de la extracción/reacción añadiendo NaOH o NaCl a las muestras [41], pero las recuperaciones no aumentaron significativamente. Estos resultados sugieren que los componentes de la matriz se extrajeron significativamente en la fibra, limitando por tanto la cantidad de anfetaminas y FMOC que podían extraerse.

Por otro lado, las respuestas conseguidas para orina por el método de derivatización en disolución seguida de SPME fueron comparables a las obtenidas con disoluciones acuosas (ver también **Tabla 22**). Se puede concluir, por tanto, que la afinidad de los derivados de FMOC por el sorbente de la fibra era mayor que la afinidad de la mayoría de los componentes de la matriz.

Las recuperaciones medias de los analitos en las muestras de orina se calcularon por comparación de las áreas de los picos en dichas muestras con las áreas de los picos obtenidos en patrones acuosos que contenían una cantidad equivalente de droga. Los valores obtenidos fueron 106% para AP, 93% para MDMA, y 84% para MA (n = 6). La linealidad y exactitud en orina también fueron comparables con las conseguidas para patrones acuosos, aunque los LDDs y LDCs fueron 2-2.5 veces superiores. No obstante, la sensibilidad conseguida es adecuada para la cuantificación de las anfetaminas en muestras reales, esto es, en muestras tomadas después de la ingestión de pastillas ilícitas [42]. La reproducibilidad observada para muestras de orina aditivadas fue peor que para los patrones acuosos, lo que probablemente fue debido a la reutilización de las fibras. En este estudio las fibras se limpiaron después de cada ensayo sumergiéndolas en 2.0 mL de hexano durante 2.0 min. Si fuera necesario, se podría mejorar la reproducibilidad empleando volúmenes mayores de los disolventes y/o tiempos de lavado más largos para conseguir una limpieza más efectiva [40]. Como se observa en la **Figura 54**, la selectividad fue satisfactoria.

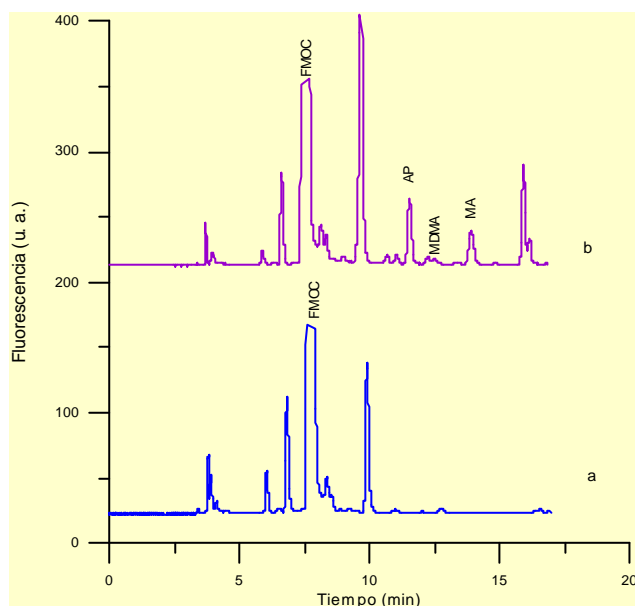


Figura 54. Cromatogramas obtenidos para (a) blanco de orina, y (b) orina fortificada con AP, MA y MDMA (10.0 mg/mL, de cada una) por el método de derivatización en disolución/SPME. Para otros detalles experimentales, ver **Apéndice 7**.

Conclusiones

Se han descrito dos métodos para la cuantificación de anfetaminas por CL utilizando SPME y derivatización con FMOC. La derivatización de los analitos en disolución seguida de la SPME de los derivados formados es una buena opción para el análisis de AP, MA y MDMA tanto en muestras acuosas como en orina. Esta aproximación combina la simplicidad de la SPME para el muestreo y aislamiento del analito, y las ventajas de la derivatización química. Por ello puede ser considerada una alternativa rápida y simple para la determinación de anfetaminas a niveles de ppm, que son las concentraciones encontradas típicamente en muestras reales, por ejemplo en orina de consumidores de estas drogas.

La SPME de las anfetaminas seguida de su derivatización sobre la fibra también es una metodología adecuada para la determinación de estos compuestos en muestras acuosas. Sin embargo esta alternativa no puede aplicarse a la cuantificación de anfetaminas en orina. La razón es que la extracción de los componentes de la matriz con el sorbente de la fibra dificulta la extracción del reactivo durante la etapa de derivatización. Como resultado, la cantidad total de analitos derivatizados sobre la fibra es inaceptablemente baja. La principal ventaja de este procedimiento comparado con el método de derivatización en disolución seguida de SPME es que las muestras no son alteradas por la derivatización. Este sería el método más adecuado para el análisis de formulaciones ilícitas que contengan anfetaminas.

Comparado con métodos descritos previamente que implican la LLE o SPE para aislar los derivados formados, los procedimientos presentes proporcionan peor sensibilidad, pero el tratamiento de la muestra se ha simplificado considerablemente. Los métodos propuestos también consumen menos tiempo y recursos que la mayoría de los métodos existentes, particularmente los que incluyen LLE. Por tanto, pueden considerarse una alternativa adecuada cuando se requiere simplicidad y rapidez en lugar de sensibilidad.

3.1.5.2. APLICACIÓN DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA COMBINADA CON LA DERIVATIZACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN ENANTIOMÉRICA DE ANFETAMINAS

La SPME con derivatización química ha sido usada ampliamente en el análisis quiral de algunas anfetaminas por CG [37, 43-45]. La derivatización está dirigida a la transformación de los analitos en compuestos más adecuados para CG. En el trabajo anterior se ha propuesto un método para el análisis (quiral) de algunas anfetaminas por CL, el cual combina SPME y derivatización con FMOC (**Apéndice 7**). Según el análisis bibliográfico realizado no existen antecedentes sobre la combinación de la SPME y de reactivos quirales para el análisis enantiomérico de anfetaminas.

En un intento por simplificar el análisis enantioselectivo de anfetaminas, en el presente trabajo se evalúa por primera vez la posibilidad de acoplar la SPME con la derivatización con un reactivo quiral. Para la derivatización se ha elegido OPA-NAC porque, de acuerdo con estudios previos realizados con aminas alifáticas, este reactivo presenta buena compatibilidad con sorbentes típicos de las fibras de SPME [29]. Además, la enantioresolución conseguida con OPA-NAC para anfetaminas primarias es adecuada para la mayoría de los propósitos [46]. La anfetamina, la 3,4-metilendioxianfetamina (MDA) y la norefedrina fueron los compuestos seleccionados como modelos, y el sorbente de la fibra fue CW-TPR [28]. Partiendo de los resultados obtenidos se ha propuesto un nuevo método para el análisis enantioselectivo de anfetaminas. Se han discutido las características analíticas y las posibles aplicaciones de las condiciones propuestas.

El montaje correspondiente al acoplamiento entre la SPME con fibras y la CL se muestra en la **Figura 24** del *Capítulo 2-Reactivos e Instrumentación* (pág. 69). Para más información experimental, ver el **Apéndice 8**.

Optimización del procedimiento de derivatización/SPME

La derivatización puede efectuarse antes, durante o después de la SPME de los compuestos de la muestra. En la primera opción los derivados se forman en disolución y después se extraen por inmersión de las fibras en el medio de reacción. En la segunda aproximación las fibras, previamente recubiertas con el reactivo, son sumergidas dentro de las muestras (o expuestas al espacio de cabeza de un vial que contiene la muestra), de modo que los analitos son extraídos y derivatizados simultáneamente. En la última opción las fibras son sumergidas sucesivamente en las muestras y en la disolución del reactivo. Sólo las últimas dos aproximaciones pueden ser consideradas procedimientos de derivatización sobre la fibra.

En este estudio, se han probado y comparado las tres posibilidades utilizando patrones de cada anfetamina (ver **Figura 55**). Se usaron condiciones de SPME equivalentes para los métodos de derivatización sobre la fibra: tiempos de adsorción para los analitos y el reactivo, de 30 y 5 min, respectivamente, y un tiempo de desorción para los derivados de OPA-NAC de 10 min. Las condiciones para la derivatización en disolución se seleccionaron de acuerdo con los resultados presentados en [46]; después,

los derivados formados se sometieron a SPME usando condiciones de adsorción y desorción equivalentes a las de los procedimientos de derivatización sobre la fibra.

Bajo las tres aproximaciones estudiadas se observaron picos de áreas equivalentes (dentro de las fluctuaciones experimentales) para los dos diastereómeros obtenidos a partir de disoluciones racémicas de cada anfetamina. Esto indica que al igual que en disolución, y dado que la SPME fue efectuada bajo condiciones de no equilibrio, los rendimientos de reacción obtenidos para cada enantiómero de un mismo par fueron idénticos. En otras palabras, a diferencia de otras reacciones que tienen lugar sobre resinas poliméricas [47], no se observaron diferencias en las constantes de reacción para cada par de enantiómeros en las derivatizaciones sobre la fibra, usando fibras de CW-TPR y OPA-NAC. Las mejores eficacias se observaron cuando la derivatización se llevó a cabo en disolución y después los derivados se sometieron a SPME. Esto está ilustrado para la anfetamina en la **Figura 56**. Las áreas de pico obtenidas para las tres anfetaminas probadas mediante la aproximación de derivatización en disolución/SPME fueron aproximadamente 615 veces mayores que las obtenidas con los otros métodos. Estos resultados indican que la afinidad de los derivados del OPA-NAC por el sorbente de la fibra es significativamente mayor que aquellas de las anfetaminas no derivatizadas y/o del OPA-NAC, lo cual puede ser explicado por las polaridades relativamente elevadas del OPA-NAC y de las anfetaminas comparadas con la polaridad de sus respectivos derivados isoindólicos.

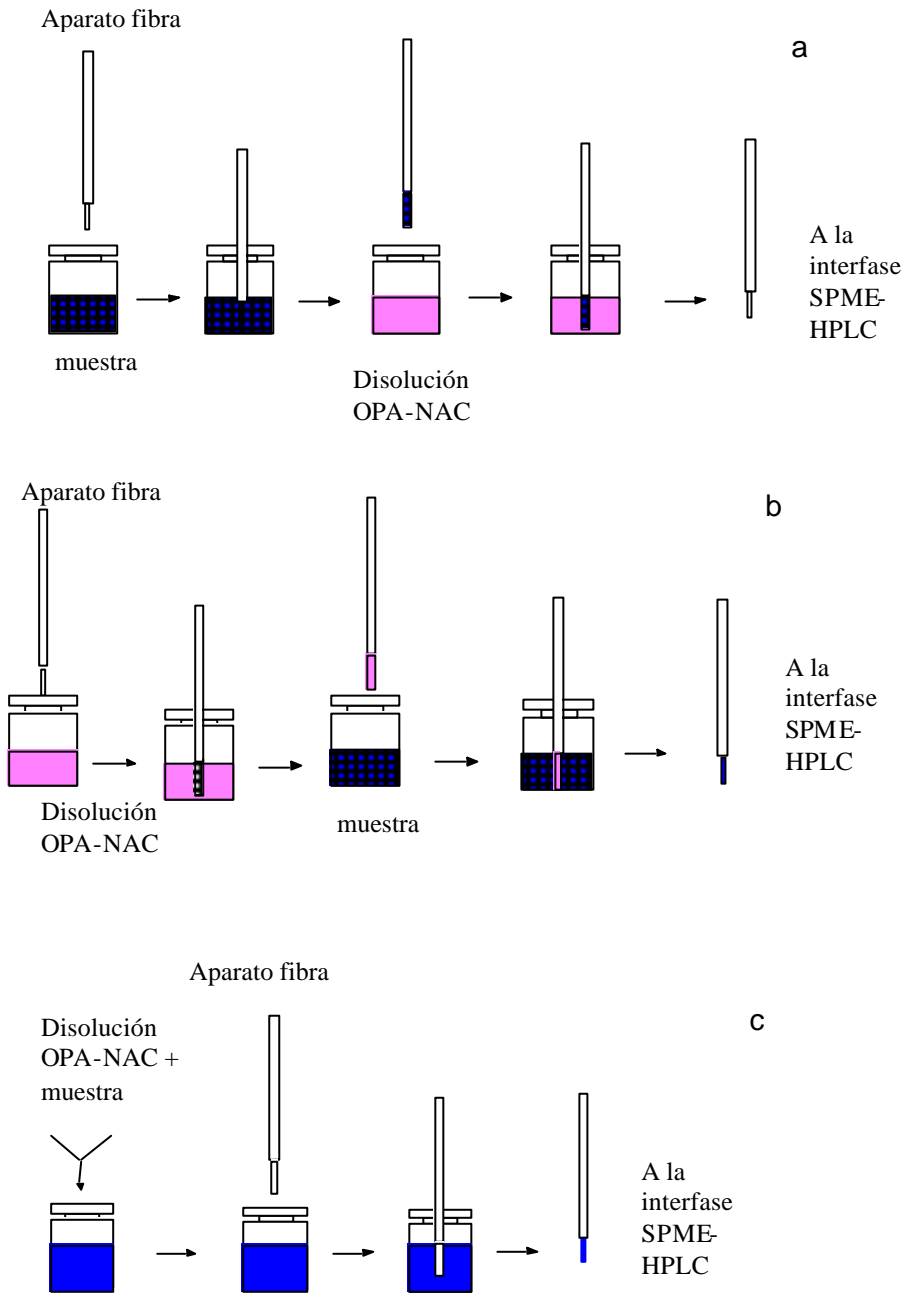


Figura 55. Esquemas de los procedimientos probados de extracción/derivatización: (a) SPME del analito seguida de la derivatización sobre la fibra, (b) extracción/derivatización de la anfetamina con fibras recubiertas de OPA-NAC y (c) derivatización en disolución seguida de SPME de los derivados formados. Para otros detalles ver el **Apéndice 8**.

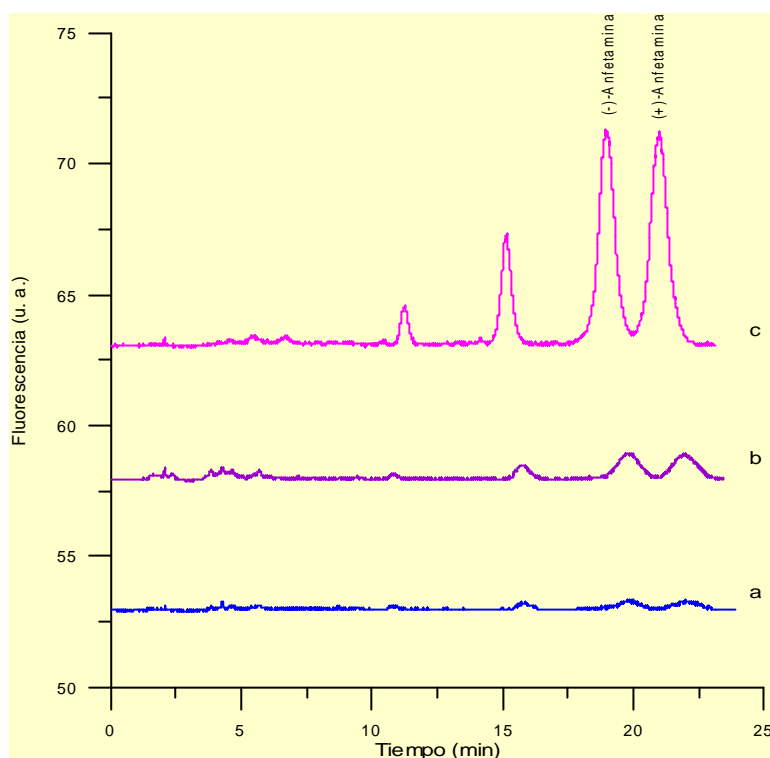


Figura 56. Cromatogramas obtenidos para anfetamina racémica (7.5 mg/mL, de cada isómero) por las diferentes aproximaciones de extracción/derivatización probadas: (a) SPME del analito seguida de la derivatización sobre la fibra, (b) extracción/derivatización de la anfetamina con fibras recubiertas de OPA-NAC y (c) derivatización en disolución seguida de SPME de los derivados formados. Orden de elución para los enantiómeros tomado de la Ref [46]. Para otros detalles ver el **Apéndice 8**.

De acuerdo con los resultados anteriores, la estrategia adoptada para el análisis enantiomérico de anfetaminas fue la derivatización seguida de la SPME de los derivados formados. Se optimizaron los principales parámetros que afectan al proceso de SPME. Se aplicaron diferentes tiempos de adsorción en el intervalo 5-45 min a disoluciones patrón de las anfetaminas. El tiempo de desorción fue 5 min. Las respuestas máximas de los analitos se observaron para tiempos de adsorción en el intervalo 30-45 min. A continuación, se ensayaron diferentes tiempos de desorción en el intervalo 2-15 min (para un tiempo de adsorción de 30 min). Las áreas máximas de pico se alcanzaron al utilizar un tiempo de desorción de 10 min. También se probaron diferentes volúmenes de muestra en el intervalo 0.25-1.25 mL. El aumento del volumen de muestra tuvo un efecto positivo sobre las respuestas de los analitos dentro del intervalo estudiado. Sin embargo, no se probaron volúmenes de muestra superiores ya que pocas veces se utilizan en análisis de muestras biológicas. Partiendo de los resultados anteriores, las condiciones seleccionadas para el análisis enantiomérico de anfetaminas fueron las siguientes: derivatización en

disolución (1.25 mL de muestra + 0.25 mL de OPA-NAC + 0.50 mL de tampón borato y un tiempo de reacción de 3 min) seguida de la adsorción de los derivados durante 30 min, y un tiempo de desorción de 10 min.

En la **Figura 57** están representados los cromatogramas obtenidos bajo las condiciones óptimas para un blanco (agua) y para disoluciones patrón de los analitos. A diferencia de los ensayos presentados previamente para anfetaminas usando la aproximación de derivatización en disolución convencional [46], no se observaron picos debidos al exceso de OPA-NAC en el cromatograma obtenido para un blanco. Esto es consistente con la baja afinidad de OPA-NAC por el sorbente de la fibra tal como se había observado previamente. No se observaron otros picos correspondientes a productos secundarios. La presencia de productos no deseados en los cromatogramas obtenidos mediante la metodología de derivatización asistida sobre soporte sólido es debida no sólo al reactivo sino también a las impurezas del soporte sólido [37, 48, 49]. Por tanto, comparado con otros procedimientos de derivatización/extracción, el presente método proporciona mejores cromatogramas. Esto es particularmente importante en el contexto del análisis quiral porque las separaciones quirales pueden aumentar drásticamente el número de picos en los cromatogramas finales.

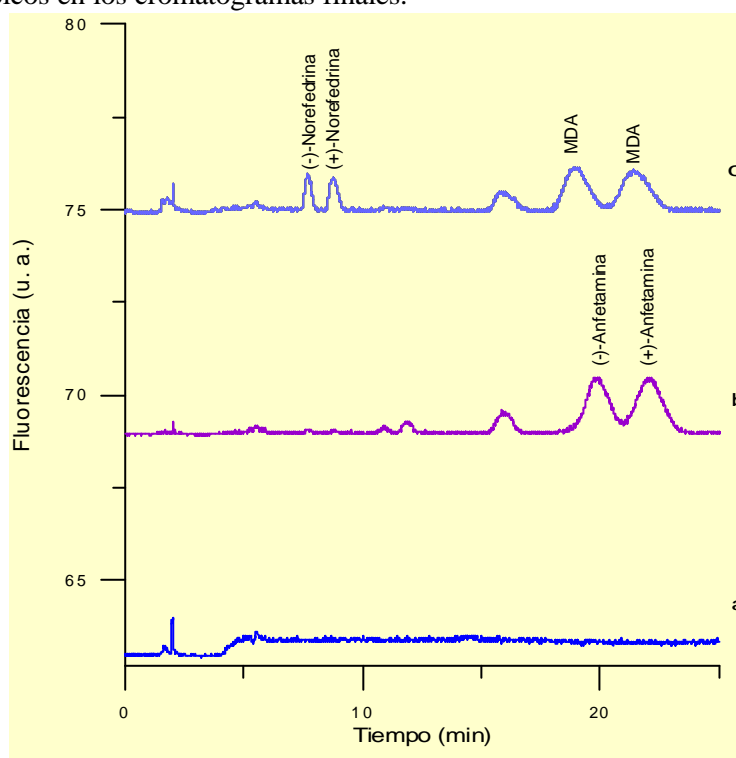


Figura 57. Cromatogramas obtenidos con el procedimiento propuesto de derivatización en disolución/SPME para: (a) un blanco (agua), (b) anfetamina en agua y (c) una mezcla de norefedrina y MDA en agua. Concentración de cada enantiómero, 2.5 $\mu\text{g/mL}$. Para otros detalles, ver el **Apéndice 8**.

Características analíticas

Se evaluó la utilidad del método optimizado de derivatización/SPME para la cuantificación de anfetamina, MDA y norefedrina en muestras de agua y de orina fortificada. Las ecuaciones de calibrado obtenidas para los analitos se muestran en la **Tabla 25**. Los resultados de esta tabla indican que el método propuesto proporcionó linealidad adecuada dentro de los intervalos de concentración ensayados. En todos los casos las pendientes de las curvas de calibración obtenidas para cada par de enantiómeros fueron estadísticamente equivalentes (a un nivel de confianza del 95%). Las pendientes obtenidas para los enantiómeros de la norefedrina fueron mucho menores que las obtenidas para los otros derivados. La explicación puede ser la mayor polaridad de la norefedrina, y por tanto, de los derivados norefedrina-OPA-NAC, comparada con las de los derivados de la anfetamina y la MDA. Esto está de acuerdo con la observación de que los tiempos de retención observados para los derivados de norefedrina-OPA-NAC bajo condiciones de elución en fase inversa son también mucho menores (ver **Figura 57**).

Los porcentajes de recuperación media en orina calculados a partir de las pendientes de las ecuaciones de calibración también están recogidos en la **Tabla 25**. La eficacia del proceso de derivatización/SPME obtenido para muestras de orina fue significativamente inferior a la de las muestras acuosas, sobre todo para los enantiómeros de la norefedrina y la anfetamina. Esto sugiere que algunos compuestos de la orina también fueron extraídos con las fibras, limitando por tanto la cantidad de derivados de OPA-NAC que pueden ser extraídos.

Los coeficientes de variación intra- e inter-día se calcularon a dos niveles de concentración de cada anfetamina. Como se muestra en la **Tabla 25**, los valores obtenidos fueron $\leq 20\%$, y no se encontraron diferencias significativas entre muestras acuosas y orina. Los LDDs y LDCs encontrados en patrones acuosos y en muestras de orina también se presentan en la **Tabla 25**.

Tabla 25. Datos analíticos para la determinación de anfetamina, MDA y norefedrina en agua y en orina por el método de derivatización en disolución/SPME.

Tipo muestra	Compuesto	LDD µg/mL	LDC µg/mL	Intervalo Conc. µg/mL	Linealidad Y = a + bx (n = 8)			Recuperación orina (%) (n = 16)	Reproducibilidad			
					a ± s _a	b ± s _b	R ²		Intra-día CV(%) (n = 3)		Inter-día CV(%) (n = 3)	
					2.5 µg/mL	7.5 µg/mL	2.5 µg/mL		7.5 µg/mL			
Patrones acuosos	(-)-Anfetamina	0.1	0.4	0.375-10	16 ± 3	24.4 ± 0.7	0.99	-	2	3	9	20
	(+)-Anfetamina	0.1	0.4	1-10	13 ± 4	25.8 ± 0.9	0.99	-	6	18	11	20
	(-)-Norefedrina	0.1	0.4	1-10	2 ± 2	6 ± 0.3	0.98	-	17	10	16	7
	(+)-Norefedrina	0.1	0.4	1-10	3 ± 2	6 ± 0.3	0.98	-	17	9	17	6
	Primer isómero MDA	0.1	0.4	1-10	8 ± 6	26 ± 1	0.98	-	4	11	19	15
	Último isómero MDA	0.1	0.4	1-10	7 ± 6	26 ± 1	0.98	-	17	11	20	16
Orina	(-)-Anfetamina	0.25	0.75	1-10	16 ± 4	12.2 ± 0.8	0.97	50	11	0.5	9	20
	(+)-Anfetamina	0.25	0.75	1-10	14 ± 5	13.6 ± 0.7	0.98	53	20	5	20	18
	(-)-Norefedrina	0.25	1	1-10	5.4 ± 1.2	3.4 ± 0.2	0.98	57	2	5	10	7
	(+)-Norefedrina	0.25	1	1-10	6.5 ± 1.2	3.9 ± 0.2	0.98	65	3	8	10	11
	Primer isómero MDA	0.25	1	1-10	-18 ± 6	26 ± 1	0.98	100	16	5	15	8
	Último isómero MDA	0.25	1	1-10	-7 ± 8	25 ± 1	0.97	104	7	14	9	14

La selectividad se evaluó procesando otras anfetaminas (racematos) así como diferentes compuestos encontrados comúnmente con la anfetamina y la MDA en preparaciones clandestinas. Los compuestos evaluados fueron: 3,4-metilendioxi metanfetamina (MDMA, Éxtasis), metanfetamina, efedrina, pseudoefedrina, *p*-metoxianfetamina, paracetamol, cafeína, ácido acetilsalicílico, sacarina, cloruro de sodio y lactosa. Ninguno de estos compuestos modificó la derivatización/extracción de los analitos. Sólo se observó *p*-metoxianfetamina en los cromatogramas resultantes, ya que era la única anfetamina con un grupo amino primario derivatizable. Sin embargo, los derivados formados eluyeron a 22.5 y 26.1 min, respectivamente, y por tanto no interfirieron. La ausencia de reacción para metanfetamina y MDMA es de particular interés, ya que estos compuestos son metabolizados principalmente a anfetamina y MDA, respectivamente. La selectividad observada para muestras de orina también fue adecuada. Como ejemplo ilustrativo, en la **Figura 58** se presentan los cromatogramas obtenidos para un blanco de orina y orina aditivada con los enantiómeros de norefedrina y MDA.

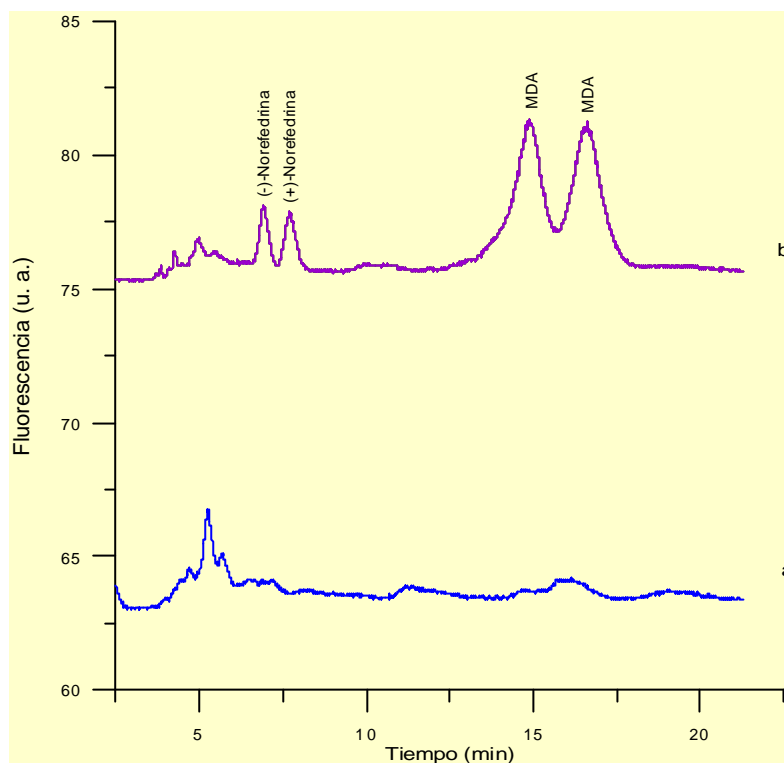


Figura 58. Cromatogramas obtenidos con el procedimiento propuesto de derivatización en disolución/SPME para: (a) blanco de orina y (b) orina fortificada con norefedrina y MDA (7.5 $\mu\text{g/mL}$, de cada isómero). Para otros detalles, ver el **Apéndice 8**.

La misma conclusión puede ser extraída de la **Figura 59**, que muestra los cromatogramas obtenidos de dos sujetos a diferentes tiempos tras la administración oral de norefedrina. Debe observarse que en todas las muestras de orina ensayadas los compuestos endógenos eluyeron a tiempos de retención entre 4-6 min.

Finalmente, la exactitud se investigó determinando las anfetaminas en muestras de orina fortificadas. Las muestras fueron aditivadas con los analitos a dos niveles de concentración dentro del intervalo de concentraciones estudiado, y procesadas bajo las condiciones propuestas. Las concentraciones de los analitos en dichas muestras se establecieron a partir de las ecuaciones de calibrado de la **Tabla 25**. En la **Tabla 26** se presentan los resultados obtenidos. En todos los casos las concentraciones calculadas estaban próximas a las concentraciones presentes. Las condiciones propuestas también se aplicaron a la cuantificación de norefedrina en un preparado farmacéutico. Los únicos picos detectados en los cromatogramas resultantes fueron los correspondientes a los enantiómeros de norefedrina. Las concentraciones de estos compuestos se calcularon a partir de las curvas de calibrado correspondientes a los patrones acuosos en la **Tabla 25**. Las cantidades de (-)- y (+)-norefedrina encontradas en las muestras (expresadas como hidroclouros) fueron (13 ± 2) y (15 ± 3) mg, respectivamente ($n = 3$). Por tanto, los

comprimidos contenían una mezcla racémica de norefedrina (a un nivel de confianza de 95%). Estos valores fueron consistentes con la cantidad total de hidrocloreto de norefedrina declarada por el fabricante (30 mg por comprimido). También fueron procesadas las muestras de orina recogidas de dos sujetos tras la administración de una de esas pastillas (**Figura 59**). Las concentraciones de (-)- y (+)-norefedrina se calcularon a partir de las curvas de calibración presentadas en la **Tabla 25**, correspondientes a las muestras de orina fortificadas. Los valores obtenidos en la muestra correspondiente a la **Figura 59b** fueron (5.5 ± 0.6) y (4.9 ± 0.3) $\mu\text{g/mL}$ para los enantiómeros (-)- y (+)-, respectivamente ($n = 3$). Puede deducirse que la orina también contenía proporciones iguales de los dos enantiómeros (a un nivel de confianza de 95%). El cromatograma de la **Figura 59d**, que fue obtenido de la orina recogida 11 horas después de la administración de la pastilla, presentó señales analíticas correspondientes a los enantiómeros de norefedrina próximas a los LDDs.

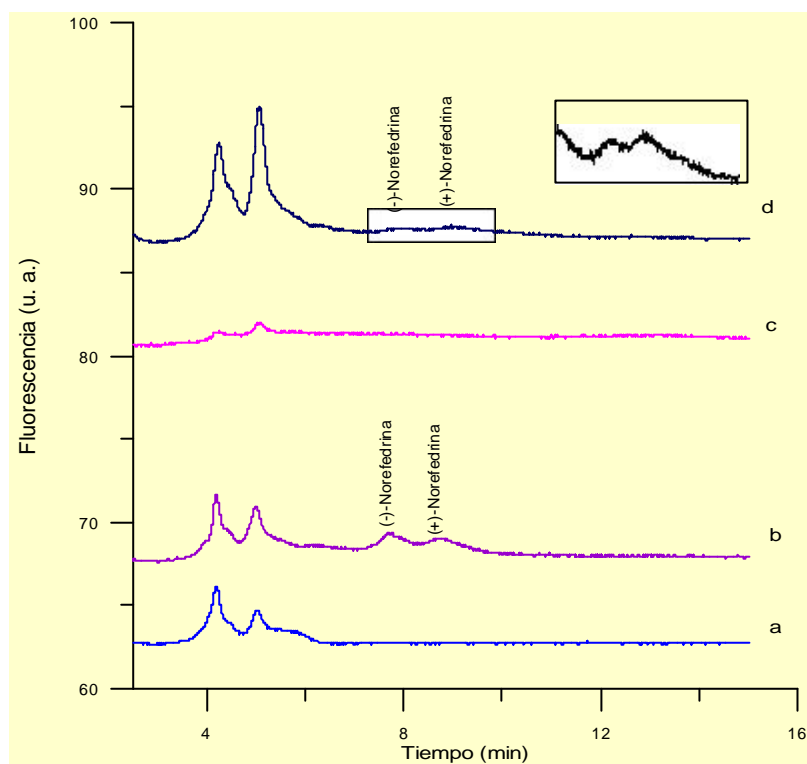


Figura 59. Cromatogramas obtenidos tras la administración de una dosis de 30 mg de hidrocloreto de norefedrina: sujeto 1 (a) inmediatamente y (b) 4.5 h después de la administración de la droga; sujeto 2 (c) inmediatamente y (d) 11 h después de la administración de la droga. Para otros detalles, ver el **Apéndice 8**.

Tabla 26. Exactitud en la determinación de anfetaminas en orina aditivada.

Analito	Concentración añadida ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración determinada ($\mu\text{g/mL}$) (n = 3)	Error relativo (%)
(-)-Anfetamina	2.5	2.6 ± 0.2	+5
	7.5	9 ± 2	+20
(+) -Anfetamina	2.5	2.4 ± 0.6	-3
	7.5	8 ± 2	+7
(-)-Norefedrina	2.5	2.3 ± 0.3	-8
	7.5	8.0 ± 0.5	+7
(+) -Norefedrina	2.5	2.22 ± 0.12	-11
	7.5	8.7 ± 0.8	+16
MDA (isómero menos retenido)	2.5	2.5 ± 0.3	0
	7.5	7.3 ± 0.6	+3
MDA (isómero más retenido)	2.5	2.48 ± 0.04	-0.6
	7.5	7.7 ± 0.6	+3

Comparación con otras aproximaciones de derivatización y tratamiento de muestras

Las características de este método se han comparado con las de otras aproximaciones propuestas para el análisis quiral de anfetaminas a través de la formación de sus respectivos derivados de OPA-NAC: método de derivatización convencional en disolución [46], y método de derivatización asistida sobre soporte sólido usando una precolumna conectada en línea a la columna analítica [49]. En el primero de ellos el análisis de muestras de orina requería la purificación del analito con cartuchos de SPE C_{18} antes de la derivatización. En la **Tabla 27** se compararon los datos analíticos más importantes de estos métodos. Esta tabla también muestra los datos obtenidos mediante un método presentado previamente para la determinación aquiral de algunas anfetaminas siguiendo un esquema de derivatización en disolución/SPME con el reactivo fluorogénico FMOC [50].

Los tres métodos de derivatización con OPA-NAC de la **Tabla 27** son adecuados para cuantificar los enantiómeros de las anfetaminas a niveles de ppm tanto en agua como en orina. Sin embargo la derivatización en disolución y los métodos de derivatización asistida sobre soporte sólido proporcionaron mejor reproducibilidad que el método propuesto de derivatización en disolución/SPME. No obstante, la precisión del método propuesto puede considerarse adecuada para el análisis de anfetaminas en muestras biológicas [51].

SPME-CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CONVENCIONAL

Los LDDs y LDCs conseguidos por el procedimiento de derivatización en disolución/SPME fueron aproximadamente 5-50 veces superiores que los conseguidos por otros procedimientos. Por tanto, el procedimiento propuesto es menos sensible. No obstante, la sensibilidad conseguida con este método es adecuada para el análisis enantiomérico de anfetaminas en muestras reales (por ejemplo, en la orina de consumidores de estas drogas) [39].

Tabla 27. Datos analíticos de las diferentes aproximaciones para determinar anfetaminas en agua y orina.

Metodología	Reactivo	Compuestos	Valores para el primer y el último isómero eluyente				Grado de manipulación de la muestra ^b	Selectividad	Ref.
			Reproducibilidad ^a		LDD ng/mL	LDC ng/mL			
			Intra-día CV (%)	Inter.-día CV (%)					
1. Derivatización en disolución	OPA-NAC	Anfetamina	1, 1 ^d	9, 7 ^d	50 ^{d,e}	250 ^{d,e}	*	*	[54]
		Norefedrina	1, 2 ^d	9, 6 ^d	25 ^{d,e}	100 ^{d,e}			
		MDA	2, 4 ^d	4, 7 ^d	50 ^{d,e}	250 ^{d,e}			
2. Derivatización en precolumna conectada a la columna analítica ^c	OPA-NAC	Anfetamina	5, 4 ^e	5, 7 ^e	50, 50 ^e	-	***	**	[57]
3. Derivatización en disolución seguida de SPME	OPA-NAC	Anfetamina	13, 18 ^d ;	20, 20 ^d ;	100,	400,	**	***	Este trabajo
			0.5, 5 ^e	20, 18 ^e	100 ^d ;	400 ^d ;			
					250,	750,			
		Norefedrina	10, 9 ^d ;	7, 6 ^d ;	100,	400,			
			5, 8 ^e	11 ^e	100 ^d ;	400 ^d ;			
					250,	1000,			
MDA			250 ^e	1000 ^e					
			100,	400,					
			100 ^d ;	400 ^d ;					
		250,	1000,						
		250 ^e	1000 ^e						
4. Derivatización en disolución seguida de SPME	FMOC	Anfetamina	8 ^d ; 16 ^e	14 ^d ; 15 ^e	50 ^d ;	250 ^d ;	**	***	[53]
				100 ^e	500 ^e				

^a Determinado a 0.5 µg/mL en los métodos 2 y 4, y a 7.5 µg/mL en los métodos 1 y 3.

^b Cuantos más asteriscos, mejor procedimiento

^c Se usaron cartuchos de SPE C₁₈ en el análisis de muestras de orina.

^d Agua

^e Orina

La aplicación del método de derivatización en disolución a muestras de orina requirió la purificación de los analitos. En el procedimiento 1 de la **Tabla 27** las muestras se cargaron en los cartuchos de SPE previamente acondicionados, que después fueron lavados con agua para eliminar los componentes de la matriz. A continuación, los cartuchos se secaron con aire, y los analitos fueron desorbidos con una mezcla de metanol/tampón fosfato. Finalmente, el extracto recogido fue derivatizado en disolución y cromatografiado. Con el método propuesto de derivatización/SPME (método 3) el tratamiento de las muestras se ha simplificado drásticamente: adición de los reactivos a las muestras seguida de la inmersión de las fibras en la disolución resultante. El método basado en la derivatización asistida sobre soporte sólido de la **Tabla 27** (método 2) es un

procedimiento en línea desarrollado para el análisis de los enantiómeros de la anfetamina. La purificación y la derivatización se efectuaron dentro de la precolumna mediante la inyección sucesiva de muestras y reactivo, y por tanto, la manipulación de la muestra fue mínima.

En cuanto a la selectividad, el método de derivatización en disolución/SPME es superior a los otros métodos. Esto está ilustrado en la **Figura 60**, que muestra los cromatogramas obtenidos para orina bajo las diferentes aproximaciones de derivatización/extracción. El número e intensidad de los picos en los cromatogramas finales es menor cuando se aplica la aproximación de derivatización en disolución/SPME. Por tanto, la última aproximación es claramente superior para análisis enantiométrico.

Por otro lado, las aproximaciones de derivatización en disolución/SPME tanto con reactivos quirales como aquirales (métodos 3 y 4) han mostrado la misma tendencia en términos de reproducibilidad, sensibilidad y selectividad.

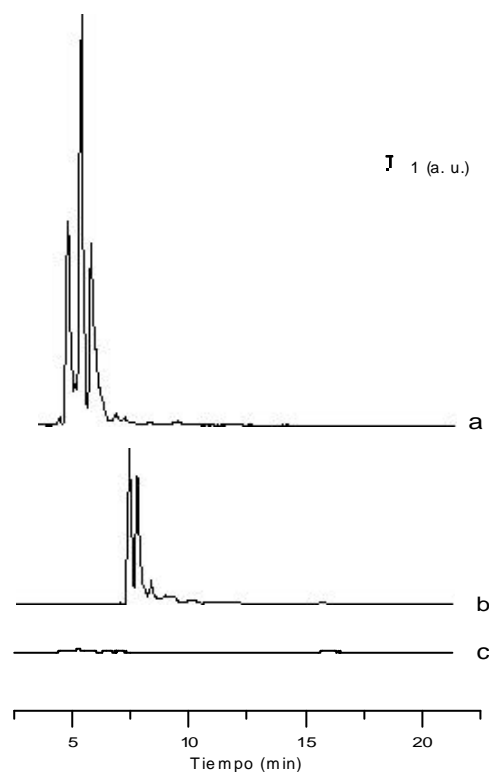


Figura 60. Cromatogramas obtenidos para orina bajo diferentes aproximaciones de extracción/derivatización: (a) SPE con un cartucho con fase C_{18} seguida de derivatización en disolución, (b) derivatización asistida en soporte sólido en una precolumna empaquetada con fase C_{18} y (c) el método propuesto de derivatización en disolución/SPME. El cambio de tiempo en la figura (b) es debido a las etapas de purificación y derivatización, las cuales son efectuadas en el mismo sistema cromatográfico antes de la transferencia de los derivados a la columna analítica. Para otros detalles experimentales, ver el **Apéndice 8**.

Conclusiones

Este estudio muestra por primera vez la posibilidad de combinar derivatizaciones con un reactivo quiral, como es el OPA-NAC, y la SPME con fibras de CW-TPR para el análisis enantiomérico de anfetaminas por CL. Las derivatizaciones sobre la fibra no modifican las velocidades de reacción entre los enantiómeros, lo cual es altamente deseable si el método tiene que ser usado con fines cuantitativos. Sin embargo, la derivatización en disolución seguida de SPME es la mejor opción ya que proporciona mejores eficacias de reacción/extracción.

La metodología propuesta permite el análisis enantiomérico de anfetaminas primarias a niveles de ppm en muestras acuosas y de orina con adecuadas linealidad, reproducibilidad y exactitud. La estrategia propuesta de derivatización/SPME es menos sensible y reproducible que los otros métodos indirectos que usan OPA-NAC, como aquellos que emplean derivatización en disolución o derivatización asistida sobre soporte sólido. Sin embargo el método propuesto es claramente superior en términos de selectividad, lo cual es particularmente importante en análisis enantiomérico cuando se procesan muestras biológicas. Además, comparado con los métodos quirales convencionales para anfetaminas, el procedimiento propuesto es muy simple y rápido, ya que en la mayoría de dichos procedimientos son necesarios tratamientos exhaustivos de la muestra mediante LLE o SPE para conseguir la selectividad requerida. Por tanto, el método propuesto puede considerarse una alternativa rápida y simple a los métodos convencionales para el análisis enantiomérico de anfetaminas primarias en diferentes clases de muestras. Si se requiere elevada precisión y/o sensibilidad, se debe considerar otro tratamiento de muestra.

3.2. ACOPLAMIENTO MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA-CROMATOGRAFÍA DE GASES

3.2.1. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES

Se propuso un procedimiento automatizado para la determinación de la concentración de los VOCs legislados mediante muestreo en HS-SPME acoplado a CG con detección de ionización en llama (FID). Los compuestos estudiados fueron: pentaclorobenceno, 1,2-dicloroetano, triclorometano, benceno, tetraclorometano, clorobenceno, etilbenceno, *m,p*-xileno, *o*-xileno, 1,3-diclorobenceno, 1,4-diclorobenceno y 1,2-diclorobenceno. Se estudió el efecto de la filtración del agua.

Se compararon dos columnas capilares de diferente diámetro interno y diferente espesor de sorbente, y se optimizó el procedimiento de HS-SPME para conseguir las mejores prestaciones analíticas.

3.2.1.1. PROCEDIMIENTO OPTIMIZADO PARA LA ESTIMACIÓN DE LOS PRINCIPALES VOCS LEGISLADOS EN MUESTRAS DE AGUA MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN ESPACIADO DE CABEZA ACOPLADA A CROMATOGRAFÍA DE GASES Y DETECTOR DE IONIZACIÓN DE LLAMA

De acuerdo con la legislación europea [52], por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas, los VOCs pueden clasificarse en Lista I: tetracloruro de carbono, tricloroetileno, cloroformo y 1,2-dicloroetano, Lista II: benceno, clorobenceno, diclorobenceno (isómeros orto, meta, para), etilbenceno, tolueno y xileno (isómeros orto, meta, para) y Lista Prioritaria: benceno, 1,2-dicloroetano, pentaclorobenceno y triclorometano. De acuerdo con la legislación referente a calidad ambiental, las concentraciones máximas permitidas de VOCs en aguas continentales superficiales se resumen en la **Tabla 28** [53].

Hoy en día la CG juega un papel importante en la identificación y cuantificación de contaminantes ubicuos en el medioambiente [54]. Algunos métodos analíticos están basados en la inyección directa de las muestras de agua [55], mientras que otros requieren un paso previo de extracción de los VOCs.

Alternativamente se ha propuesto el muestreo estático en el espacio de cabeza (HS) acoplado a la SPME [56], y el muestreo dinámico en el espacio de cabeza que puede acoplarse a la microextracción en fase líquida [57], a sistemas cromatográficos de purga y trampa [58] y a SPME [59, 60]. Los métodos basados en HS-SPME son más adecuados cuando la matriz puede afectar a la determinación [61, 62]. Existen diversas variables experimentales que afectan a los procedimientos de HS-SPME, como el tipo de fibra, la velocidad de agitación, la temperatura, el tiempo de extracción y la adición de sal [63].

En este trabajo se optimizó el procedimiento de HS-SPME para conseguir las mejores características analíticas para el screening de los principales VOCs legislados en muestras de agua y también se estudió la influencia de la etapa de filtrado en el análisis de muestras reales de agua. Más información acerca de las condiciones experimentales se puede encontrar en el **Apéndice 9**.

Tabla 28. Compuestos orgánicos volátiles seleccionados como analitos.


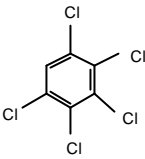
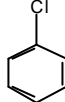
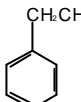
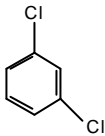
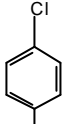
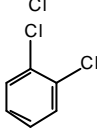
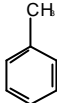
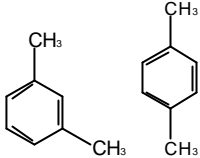
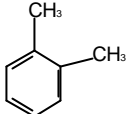
Compuestos orgánicos volátiles			
Compuesto (*)	Log K_{ow}	Norma de calidad ambiental (**)	Estructura
Triclorometano ¹	1.97	12 µg/L	CHCl ₃
1,2-Dicloroetano ¹	1.48	10 µg/L	ClCH ₂ CH ₂ Cl
Tetraclorometano ¹	2.64	12 µg/L	CCl ₄
Tricloroetileno ¹	2.42	10 µg/L	Cl ₂ C=CHCl
Tetracloroetileno	2.6		Cl ₂ C=CCl ₂
Benceno ²	2.13	30 µg/L	
Pentaclorobenceno	1,49		
Clorobenceno ²	2.18-2.84	20 µg/L	
Etilbenceno ²	3.2	30 µg/L	
1,3-Diclorobenceno ²	3.53	20 µg/L (suma de isómeros)	
1,4-Diclorobenceno ²	3.37		
1,2-Diclorobenceno ²	3.38		

Tabla 28 (Continuación).

Compuesto (*)	Log K_{ow}	Norma de calidad ambiental (**)	Estructura
Tolueno ²	2.69	50 µg/L	
<i>m, p</i> -Xileno ²	3.20-3.15	30 µg/L (suma de isómeros)	
<i>o</i> -Xileno ²	3.12		

(*) Directiva 2000/60/CEE del Parlamento Europeo y Consejo de 23 Octubre 2000

1 Sustancias en Lista I

2 Sustancias prioritarias

(**) Directiva 86/280/CEE. R.D. 995/2000 (España)

Optimización del procedimiento de SPME-CG

En la **Tabla 28** se presentan los analitos seleccionados para este estudio. Se ensayaron dos disoluciones conteniendo distintas mezclas de los analitos, MIX 1 y MIX 2. La disolución MIX 1 contenía benceno, tolueno, clorobenceno, etilbenceno, *m,p*-xileno, *o*-xileno, 1,3-diclorobenceno, 1,4-diclorobenceno y 1,2-diclorobenceno. Por su parte la disolución MIX 2 contenía 1,2-dicloroetano, triclorometano, benceno, tetraclorometano, tricloroetileno, tolueno, tetracloroetileno, clorobenceno, etilbenceno, 1,3-diclorobenceno, 1,4-diclorobenceno y 1,2-diclorobenceno. La HS-SPME se ensayó como una alternativa a la inyección directa en el sistema de CG. Las columnas empleadas fueron C1 (30m × 0.32 mm d. i. × 0.5 μm) y C2 (30m × 0.25 mm d.i. × 0.25 μm) con un 5% de *df*enil y un 95 % de dimetilpolisiloxano. Esta técnica aportó algunas ventajas como, una mejor selectividad y sensibilidad como se puede ver en la **Figura 61**. En el método de inyección directa los analitos más volátiles quedaron solapados por el pico del disolvente; además, la resolución de los últimos picos no fue adecuada.

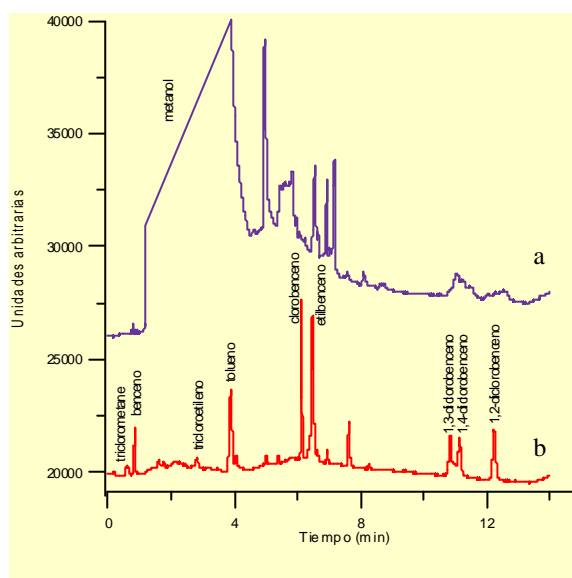


Figura 61. Cromatogramas obtenidos con C1 para la disolución MIX 2: (a) inyección directa (2 mL) y (b) HS-SPME (10 min de adsorción y 2 min de desorción). Concentración de cada VOC, 1 μg/mL. Para otros detalles experimentales, ver el **Apéndice 9**.

En la optimización del muestreo mediante HS el tiempo de adsorción fue el primer parámetro estudiado, manteniendo agitación constante. No se observó ninguna influencia significativa del tiempo de adsorción sobre la intensidad de los picos (**Figura 62a**). Por tanto el tiempo seleccionado para volatilizar los analitos a temperatura ambiente fue 5 min y el tiempo de muestreo fue 10 min. Al aumentar la temperatura no se consiguió mejorar la volatilización (**Figura 62b**). Por ello el resto del estudio se realizó a temperatura ambiente. El volumen de muestra se estudió entre 10 y 20 mL, y como se

puede ver en la **Figura 62c** no se observaron diferencias significativas en las señales. Se seleccionó 10 mL como volumen de muestra.

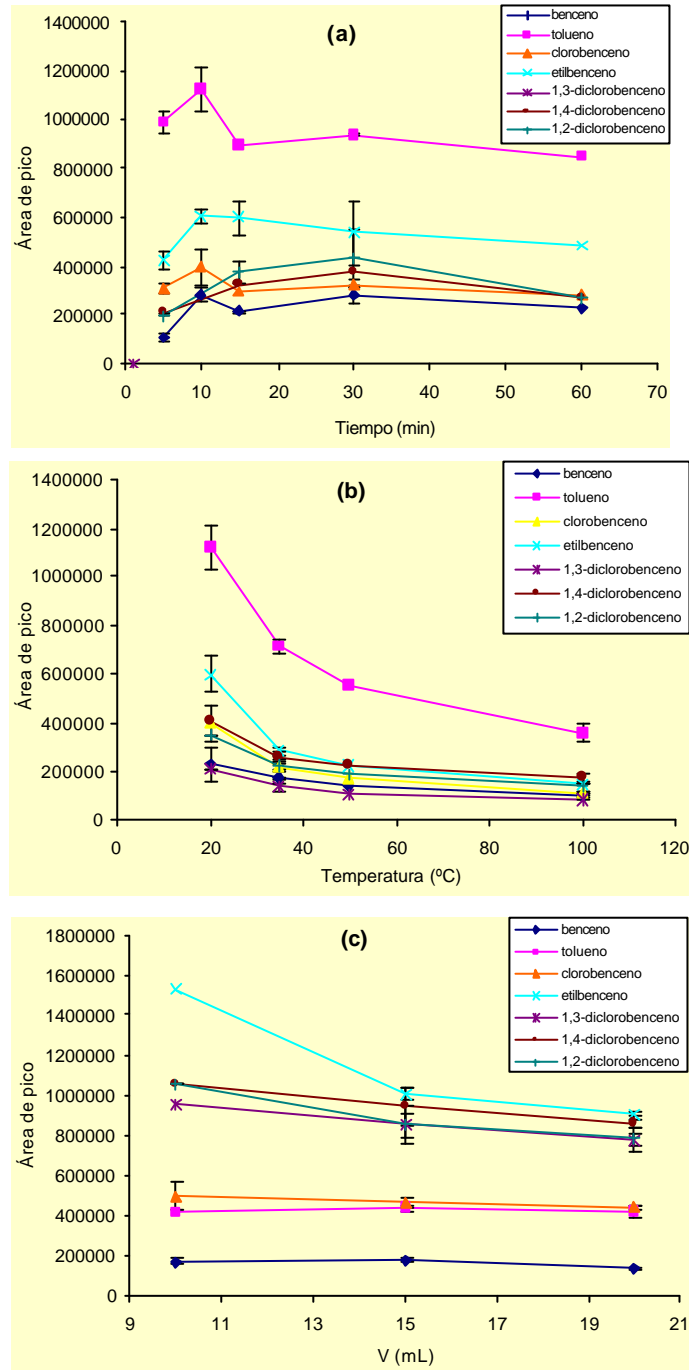


Figura 62. Optimización de los parámetros relacionados con el muestreo en el espacio de cabeza de la muestra: (a) tiempo de adsorción, (b) temperatura de extracción y (c) volumen de muestra.

En relación con la desorción se estudiaron dos parámetros, tiempo y temperatura del puerto de desorción. Los valores óptimos fueron 1 min y 250 °C, respectivamente. Mediante la reducción del tiempo de desorción hasta 1 min se consiguió la separación de los compuestos más volátiles. Sin embargo la sensibilidad para el resto de compuestos disminuyó, probablemente debido a que no se consiguió la desorción total de los analitos retenidos en la fibra. Para obtener la mejor recuperación de la fibra fue necesario un tiempo de desorción de 2.5 min.

Bajo las condiciones de trabajo usadas en este estudio los LDDs, establecidos como la concentración necesaria para producir una relación señal/ruido de 3 unidades, obtenidos con las columnas C1 y C2 fueron similares. Estos valores son inferiores a los presentados en trabajos publicados que también implicaban el acoplamiento HS-SPME-CG [64]. Con la columna C2 los LDDs fueron 1 µg/L para triclorometano y 1,2-dicloroetano, 0.1 µg/L para clorobenceno y tetracloroetileno, e inferiores a 0.025 µg/L para el resto de los analitos (**Tabla 29**). De acuerdo con la legislación Europea la sensibilidad es adecuada para el análisis de aguas de consumo.

En la **Tabla 29** también se presentan los intervalos de concentraciones ensayadas y las correspondientes curvas de calibración. Como se puede ver la linealidad fue satisfactoria. La reproducibilidad se evaluó para una mezcla de 10 µg/L de cada VOC bajo las condiciones óptimas. Los coeficientes de variación intra-día obtenidos estaban en el intervalo 1-18 % (**Tabla 29**). Ambas columnas proporcionaron reproducibilidades similares.

La exactitud del método se evaluó mediante el análisis de agua de consumo aditivada con 10 µg/L de cada VOC. Las concentraciones se calcularon a partir de las ecuaciones de calibrado obtenidas con patrones de los VOCs. Los resultados obtenidos están resumidos en la **Tabla 30**. Como puede observarse las recuperaciones fueron próximas al 100 %. Por tanto, el método proporcionó valores próximos a las concentraciones reales con ambas columnas.

Tabla 29. Datos analíticos obtenidos para los VOCs mediante las dos columnas evaluadas.

Analito	C1			C2		
	Intervalo de concentraciones (µg/L) 1-1000			Intervalo de concentraciones (µg/L) 0.01-10		
	Ecuación de calibración *	Reprod. intra-día (10 µg/L) (n=3) CV(%)	LDD µg/L	Ecuación de calibración *	Reprod. intra-día 10 µg/L (n=3) CV(%)	LDD µg/L
Benceno	$Y = 2290.3 x + 4.5 \cdot 10^5$ $R^2 = 0.97$ (n=8)	16.09	0.025	$Y = 149230 x + 35499$ $R^2 = 0.96$ (n=4)	12.3	0.01
Tolueno	$Y = 5708.9 x + 9.1 \cdot 10^5$ $R^2 = 0.97$ (n=8)	7.89	0.01	$Y = 38111 x + 6113$ $R^2 = 0.998$ (n=8)	12.6	0.01
Clorobenceno	$Y = 9834 x + 10^6$ $R^2 = 0.99$ (n=8)	11.98	0.025	$Y = 52559 x - 9507$ $R^2 = 0.998$ (n=4)	11.5	0.1
Etilbenceno	$Y = 10030 x + 5.10^6$ $R^2 = 0.999$ (n=6)	18 (n= 2)	0.025	$Y = 65586 x - 14554$ $R^2 = 0.99$ (n=7)	13.6	0.01
<i>m,p</i> -Xileno	$Y = 12005 x + 10^7$ $R^2 = 0.99$ (n=6)	7.29	0.025	$Y = 131839 x + 224873$ $R^2 = 0.93$ (n=7)	14.5	0.01
<i>o</i> -Xileno	$Y = 7951 x + 5.10^6$ $R^2 = 0.99$ (n=4)	3.56	0.025	$Y = 86851 x + 888$ $R^2 = 0.997$ (n=7)	9.8	0.01
1,3-Diclorobenceno	$Y = 16265 x + 12.10^5$ $R^2 = 0.98$ (n=8)	15.5	0.025	$Y = 22281 x + 3820$ $R^2 = 0.99$ (n=7)	2.08 (n= 2)	0.01
1,4-Diclorobenceno	$Y = 16213.6 x + 10^6$ $R^2 = 0.97$ (n=9)	13.07	0.025	$Y = 43260 x + 3305$ $R^2 = 0.99$ (n=7)	14.9	0.01
1,2-Diclorobenceno	$Y = 21219 x + 10^6$ $R^2 = 0.98$ (n=10)	6.42	0.025	$Y = 43802 x + 21602$ $R^2 = 0.997$ (n=7)	7.2	0.01

Tabla 29 (Continuación).

Analito	C1			C2		
	Intervalo de concentraciones (µg/L) 1-1000			Intervalo de concentraciones (µg/L) 0.01-10		
	Ecuación de calibración *	Reprod. intra-día (10 µg/L) (n=3) CV(%)	LDD µg/L	Ecuación de calibración *	Reprod. intra-día 10 µg/L (n=3) CV(%)	LDD µg/L
Pentaclorobenceno	$Y = 241219 x + 2.10^7$ $R^2 = 0.999$ (n=5)	7.13	0.001	$Y = 324687 x + 4.10^6$ $R^2 = 0.997$ (n=7)	1.31	0.001
1,2-Dicloroetano	$Y = 10976 x - 232789$ $R^2 = 0.99$ (n=4)		1	$Y = 658.88 x - 157538$ $R^2 = 0.998$ (n=4)	6.42	1
Triclorometano	$Y = 2618.5 x + 28973$ $R^2 = 1$ (n=3)		0.05	$Y = 11644 x + 5628$ $R^2 = 0.9999$ (n=3)	3.93	1
Tetraclorometano	$Y = 4028.8 x + 24688$ $R^2 = 1$ (n=3)		0.025	$Y = 4128 x + 65875$ $R^2 = 0.997$ (n=5)	18	0.025
Tricloroetileno	$Y = 747.47 x + 39441$ $R^2 = 0.99$ (n=3)		1	$Y = 4831.8 x + 15047$ $R^2 = 0.9998$ (n=4)	15.2 (n=2)	0.05
Tetracloroetileno	$Y = 843.05 x + 9871.9$ $R^2 = 1$ (n=3)		1	$Y = 7444.6 x + 52149$ $R^2 = 0.99$ (n=3)	12.12	0.1

(*) – Pendientes expresadas como L/µg

Tabla 30. Exactitud para la determinación de VOCs en agua destinada al consumo humano mediante las dos columnas evaluadas.

Analito	C 1			
	(10 µg/L, de cada VOC)			
	Reproducibilidad (n= 3) C.V. (%)	Recuperación (%)	Concentración determinada (µg/L) (n= 3)	Error relativo (%)
Benceno	13	79	7.9 ± 0.4 (n= 2)	-21
Tolueno	10	80	8.0 ± 0.3 (n= 2)	-19
Clorobenceno	12	84	8 ± 1	-16
Etilbenceno	25	89	9 ± 2	-11
<i>m,p</i> -Xileno	18	97	10 ± 2	-3
<i>o</i> -Xileno	14	96	9.6 ± 1.4	-4
1,3-Diclorobenceno	8	84	8.4 ± 0.7	-16
1,4-Diclorobenceno	7	107	11 ± 2	+7
1,2-Diclorobenceno	17	114	10.7 ± 0.8	+14
Analito	C 2			
	(10 µg/L, de cada VOC)			
	Reproducibilidad (n= 3) C.V. (%)	Recuperación (%)	Concentración determinada (µg/L) (n= 3)	Error relativo (%)
Benceno	12	99	9.88 ± 1.16	-1
Tolueno	7	103	10.3 ± 0.7	+3
Clorobenceno	3	103	10.3 ± 0.3	+3
Etilbenceno	15	103	10.3 ± 1.6	+3
<i>m,p</i> -Xileno	14	105	10.5 ± 1.5	+5
<i>o</i> -Xileno	11	110	11.0 ± 1.2	+10
1,3-Diclorobenceno	9	117	11.7 ± 0.5 (n= 2)	+17
1,4-Diclorobenceno	9	109	10.95 ± 1.02	+9
1,2-Diclorobenceno	22	120	12 ± 3 (n= 2)	+18

Las **Figuras 63 y 64** muestran los cromatogramas obtenidos para patrones con las dos columnas ensayadas bajo las condiciones óptimas.

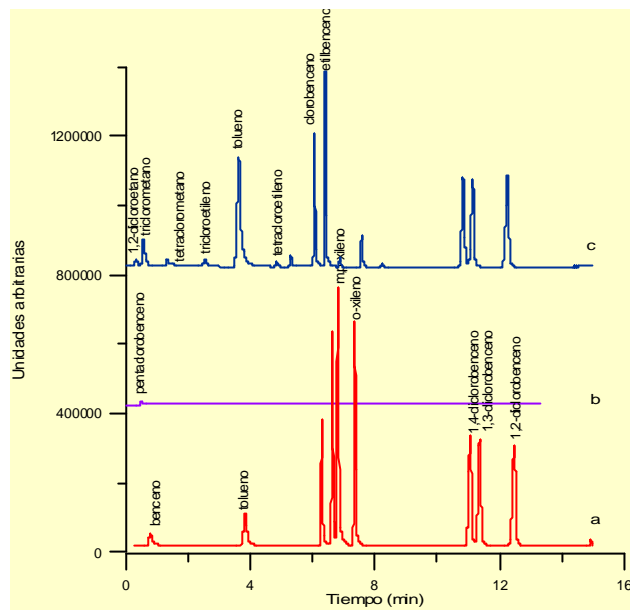


Figura 63. Cromatogramas obtenidos para los distintos VOCs con C1: (a) MIX 1 con 1 mg/mL de cada compuesto, (b) patrón de 0.01 mg/mL de pentaclorobenceno y (c) MIX 2 con 0.5 mg/mL de cada compuesto. Para más detalles experimentales, ver el **Apéndice 9**.

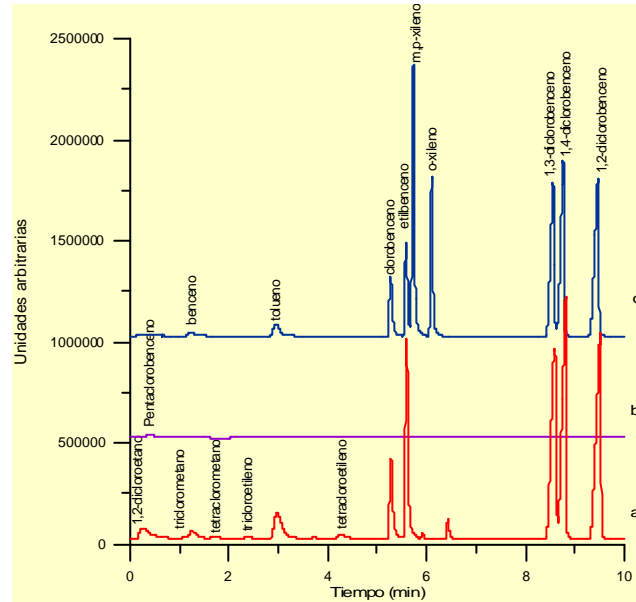


Figura 64. Cromatogramas obtenidos para los distintos VOCs con C2: (a) MIX 2 con 1 mg/mL de cada compuesto, (b) patrón de 0.001 mg/mL de pentaclorobenceno y (c) MIX 1 con 1 mg/mL de cada compuesto. Para más detalles experimentales, ver el **Apéndice 9**.

Se seleccionó la columna C2 para analizar las muestras reales de agua porque la duración de los cromatogramas era menor que con la columna C1. Como se puede observar en la **Figura 65**, los tiempos de retención obtenidos para los distintos analitos están relacionados con los coeficientes de partición octanol-agua. La relación lineal obtenida se describió con la siguiente ecuación: $\log \text{ tiempo de retención (min)} = 0.6512 (\log K_{ow}) - 1.2256$, $R^2 = 0.90$.

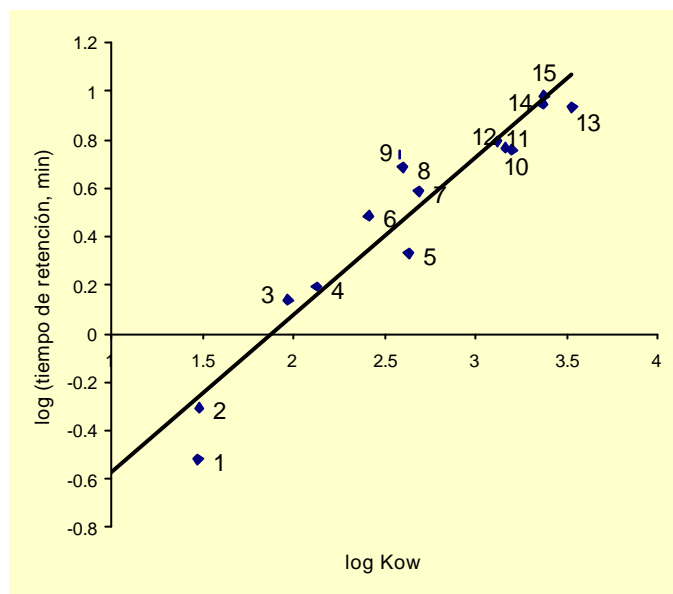


Figura 65. Representación de $\log K_{ow}$ frente al \log del tiempo de retención (min) obtenido con la columna C2 para cada analito: (1) 1,2-dicloroetano, (2) pentaclorobenceno, (3) triclorometano, (4) benceno, (5) tetraclorometano, (6) tricloroetileno, (7) tolueno, (8) tetracloroetileno, (9) clorobenceno, (10) etilbenceno, (11) m,p-xileno, (12) o-xileno, (13) 1,3-diclorobenceno, (14) 1,4-diclorobenceno y (15) 1,2-diclorobenceno.

Influencia de la filtración de la muestra

El procedimiento de filtración consistió en filtrar dos fracciones de aproximadamente 100 mL de cada muestra y tomar 10 mL de cada una de ellas para llevar a cabo el análisis por duplicado. La variable más importante del proceso de filtración fue el tiempo de filtrado, el cual dependió del tipo de muestra. Las muestras 1-14 requirieron entre 2 y 4 horas hasta conseguir las fracciones filtradas, mientras que las muestras 15-22 necesitaron entre 5 y 30 min. La **Figura 66** presenta los diferentes tiempos de filtrado requeridos para ambas fracciones de cada muestra considerando $t = 0$ el instante en que se empieza la filtración.

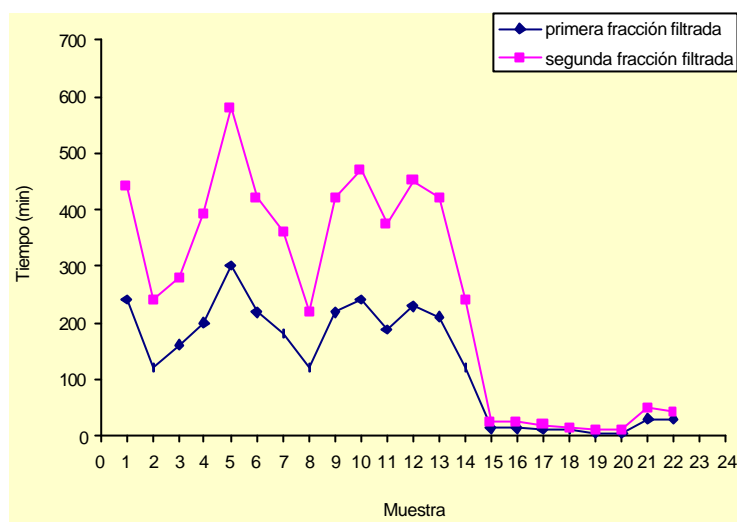


Figura 66. Representación del tiempo de filtrado requerido para las dos fracciones de cada muestra.

Los resultados obtenidos del análisis de 22 muestras de aguas residuales recogidas en diferentes puntos de la costa de la Comunidad Valenciana y filtradas por el procedimiento descrito, se compararon con los resultados obtenidos de las fracciones no filtradas. Para no perder los compuestos más volátiles potencialmente presentes en las muestras el tiempo de desorción se fijó en 1 min. Las concentraciones encontradas se resumen en la **Tabla 31**. Se puede observar que para algunas muestras se encontraron los mismos analitos en las fracciones filtradas y no filtradas. En la mayoría de los casos las concentraciones encontradas en las fracciones filtradas presentaban desviaciones estándar relativas (d.s.r.) $> 60\%$. La baja precisión encontrada en algunas muestras (3,7,8,15,21) puede ser debida a las diferencias en sus respectivos tiempos de filtrado. En algunas muestras filtradas las concentraciones encontradas fueron similares (muestras 2,13,18), y en la mayoría de ellas inferiores a las concentraciones encontradas en las fracciones no filtradas (muestras 4,6,9,10,12,14,16,17,19,22). Esto puede explicarse por el hecho de que los VOCs son compuestos muy volátiles y tienden a escapar a la atmósfera durante la filtración. En la **Figura 67** se presentan los diferentes cromatogramas obtenidos para una muestra real (muestra 16). Las fracciones no filtradas presentaron más analitos y en concentraciones más altas que las fracciones filtradas, excepto para el tetracloroetileno. Además los resultados obtenidos para las fracciones filtradas fueron irreproducibles. En consecuencia se eliminó la etapa de filtración.

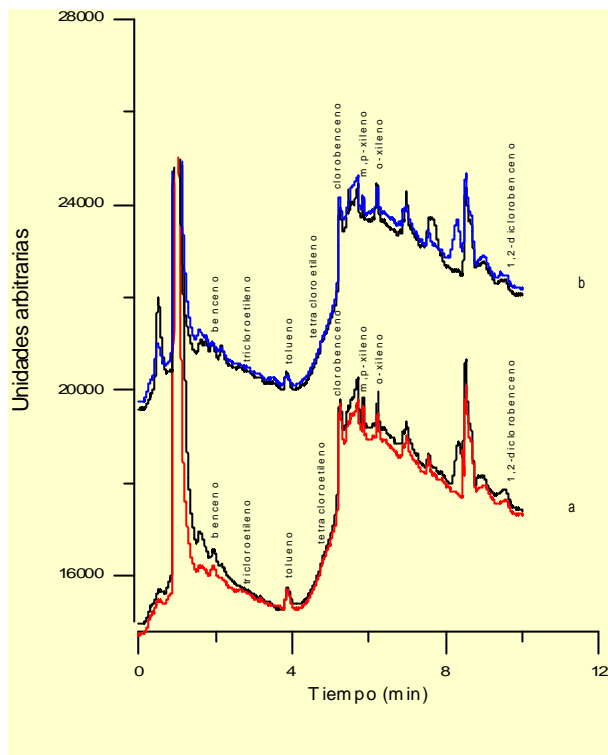


Figura 67. Cromatogramas obtenidos con la columna C2 para una muestra real de agua (a) fracciones no filtradas y (b) fracciones filtradas, en las condiciones óptimas.

Los valores de concentración de los VOCs obtenidos del análisis de screening de las 22 muestras reales no filtradas se resumen en la **Figura 68**. En la **Tabla 31** se presentan las incertidumbres expandidas usando un factor de $K=2$. De acuerdo con la legislación de calidad ambiental, la muestra 10 tenía una concentración alta de tetraclorometano y la muestra 21 tenía una concentración ligeramente alta de tricloroetileno. El 1,2-dicloroetano sólo se encontró en la muestra 3, el tetraclorometano se encontró en nueve de las muestras, el tricloroetileno en cinco, el tetracloroetileno en diez, el benceno en dieciocho, el pentaclorobenceno en seis, el clorobenceno en tres, el etilbenceno en cinco, el 1,3-diclorobenceno en doce, el 1,4-diclorobenceno en nueve, el 1,2-diclorobenceno en ocho, el *m,p*-xileno en veintiuna, y el tolueno y el *o*-xileno se encontraron en todas las muestras analizadas.

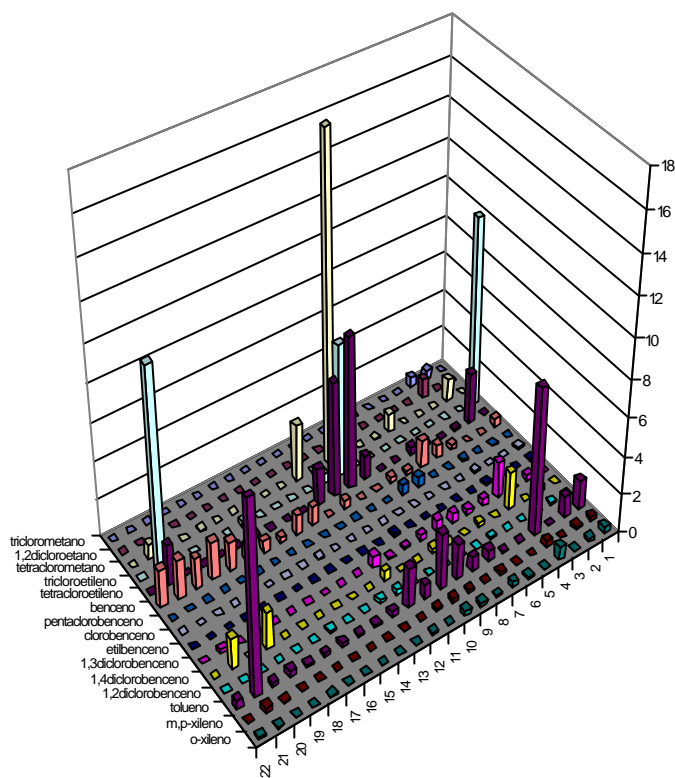


Figura 68. Concentraciones determinadas (mg/L) de VOCs en las diferentes muestras de agua analizadas en las condiciones óptimas.

SPME-CROMATOGRAFÍA GASES

Tabla 31. Resumen de las concentraciones encontradas ($\mu\text{g/L}$) en el análisis de muestras reales ($n= 2$).

ANALITO	*	MUESTRAS**				
		1	2	3	4	5
pentaclorobenceno	NF		0.034 ± 0.015		0.121 ± 0.006	
	F		R. I.		0.08 ± 0.03	
1,2-dicloroetano	NF			~1 (LDD)		
	F			N.D.		
triclorometano	NF					
	F					
benceno	NF	0.4 ± 0.2			0.29 ± 0.16	0.70 ± 0.15
	F	R. I.			R. I.	R. I.
tetraclorometano	NF		1.2 ± 0.6			
	F		N.D.			
tricloroetileno	NF	10 ± 3				
	F	N.D.				
tolueno	NF	1.5 ± 0.3	1.143 ± 0.102	~ 0.01 (LDD)	7.7 ± 0.7	0.06 ± 0.02
	F	N.D.	0.8 ± 0.2	R. I.	R. I.	R. I.
tetracloroetileno	NF		2.7 ± 0.6	~ 0.1 (LDD)		~ 0.1 (LDD)
	F		0.14 ± 0.13	R. I.		0.9 ± 0.1
clorobenceno	NF	~ 0.1 (LDD)			~ 0.1 (LDD)	
	F	N.D.			N.D.	
etilbenceno	NF	0.03 ± 0.02		~ 0.01 (LDD)	0.12 ± 0.02	
	F	N.D.		R. I.	N.D.	
<i>m,p</i> -xileno	NF	0.20 ± 0.03	0.17 ± 0.06	~ 0.01 (LDD)	0.34 ± 0.09	
	F	N.D.	R. I.	R. I.	R. I.	
<i>o</i> -xileno	NF	0.34 ± 0.07	0.20 ± 0.04	~ 0.01 (LDD)	0.70 ± 0.05	~ 0.01 (LDD)
	F	R. I.	R. I.	R. I.	0.230 ± 0.102	R. I.
1,3-diclorobenceno	NF		0.29 ± 0.07	~ 0.01 (LDD)	1.89 ± 0.11	0.35 ± 0.08
	F		0.24 ± 0.03	N.D.	0.034 ± 0.005	0.45 ± 0.01
1,4-diclorobenceno	NF		0.3 ± 0.1		2.02 ± 0.16	
	F		0.15 ± 0.02		N.D.	
1,2-diclorobenceno	NF		0.09 ± 0.03			
	F		R. I.			

(*) F: Muestra filtrada; NF: Muestra no filtrada.

(**) R.I.: Resultado irreproducible. Correspondiente a C.V.>60% .

 Incertidumbre expandida ($K= 2$) estimada con EURACHEM/CITAC Guía de Cuantificación de la Incertidumbre en Medidas Analíticas, segunda edición QUAM: 2000 P1.

N.D. No detectado.

Capítulo 3. RESULTADOS OBTENIDOS Y DISCUSIÓN

Tabla 31 (Continuación).

ANALITO	*	MUESTRAS**				
		6	7	8	9	10
pentaclorobenceno	NF		0.5 ± 0.1	0.52 ± 0.06		
	F		0.60 ± 0.05	0.57 ± 0.01		
1,2-dicloroetano	NF					
	F					
triclorometano	NF					
	F					
benceno	NF	1.4 ± 0.1	0.20 ± 0.06	0.29 ± 0.08	~ 0.01 (LDD)	
	F	R. I.	R. I.	R. I.	N.D.	
tetraclorometano	NF	0.97 ± 1.13	~ 0.025 (LDD)	N.D.	~ 0.025 (LDD)	17 ± 1
	F	0.6 ± 0.3	R. I.	R. I.	N.D.	R. I.
tricloroetileno	NF					7 ± 1
	F					N.D.
tolueno	NF	~ 0.01 (LDD)	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	1.9 ± 0.4	2.9 ± 0.1
	F	R. I.	0.63 ± 0.04	R. I.	R. I.	1.36 ± 1.05
tetracloroetileno	NF	0.4 ± 0.1			1.26 ± 0.06	8 ± 1
	F	N.D.			N.D.	0.081 ± 0.004
clorobenceno	NF					
	F					
etilbenceno	NF					0.17 ± 0.01
	F					N.D.
<i>m,p</i> -xileno	NF	~ 0.01 (LDD)	0.12 ± 0.06	0.06 ± 0.02	0.16 ± 0.06	0.20 ± 0.03
	F	R. I.	R. I.	R. I.	0.04 ± 0.02	0.023 ± 0.007
<i>o</i> -xileno	NF	0.11 ± 0.12	0.30 ± 0.05	0.06 ± 0.02	0.20 ± 0.04	0.26 ± 0.03
	F	0.065 ± 0.012	0.29 ± 0.04	R. I.	0.251 ± 0.108	R. I.
1,3-diclorobenceno	NF	0.34 ± 0.12	0.52 ± 0.19	0.63 ± 0.08	0.29 ± 0.06	0.10 ± 0.03
	F	0.25 ± 0.03	R. I.	0.54 ± 0.04	0.10 ± 0.02	0.09 ± 0.06
1,4-diclorobenceno	NF	0.20 ± 0.08			0.26 ± 0.04	~ 0.01 (LOD)
	F	N.D.			N.D.	N.D.
1,2-diclorobenceno	NF	0.11 ± 0.03				~ 0.01 (LOD)
	F	N.D.				N.D.

(*) F: Muestra filtrada; NF: Muestra no filtrada.

(**) R.I.: Resultado irreproducible. Correspondiente a C.V.>60% .

Incertidumbre expandida (K= 2) estimada con EURACHEM/CITAC Guía de Cuantificación de la Incertidumbre en Medidas Analíticas, segunda edición QUAM: 2000 P1.

N.D. No detectado.

Tabla 31 (Continuación).

ANALITOS	*	MUESTRAS**				
		11	12	13	14	15
Pentaclorobenceno	NF		~ 0.001 (LDD)			
	F		R. I.			
1,2-dicloroetano	NF					
	F					
triclorometano	NF					
	F					
benceno	NF	0.4 ± 0.1		1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.2	0.307 ± 0.107
	F	R. I.		R. I.	R. I.	R. I.
tetraclorometano	NF		3 ± 1			
	F		1.9 ± 0.6			
tricloroetileno	NF	0.5 ± 0.1				
	F	N.D.				
tolueno	NF	0.7 ± 0.2	2.1 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.14 ± 0.05	0.07 ± 0.03
	F	R. I.	R. I.	R. I.	0.06 ± 0.05	R. I.
tetracloroetileno	NF	6 ± 1	1.9 ± 0.6			
	F	5.2 ± 0.4	1.2 ± 0.2			
clorobenceno	NF				~ 0.1 (LDD)	
	F				N.D.	
etilbenceno	NF				~ 0.01 (LDD)	
	F				R. I.	
<i>m,p</i> -xileno	NF	0.14 ± 0.03	0.045 ± 0.018	0.04 ± 0.02	~ 0.01 (LDD)	~ 0.01 (LDD)
	F	0.131 ± 0.003	R. I.	0.042 ± 0.019	R. I.	R. I.
<i>o</i> -xileno	NF	0.05 ± 0.01	0.13 ± 0.03	~ 0.01 (LDD)	~ 0.01 (LDD)	~ 0.01 (LDD)
	F	0.09 ± 0.02	0.22 ± 0.08	R. I.	R. I.	R. I.
1,3-diclorobenceno	NF	0.040 ± 0.013	0.6 ± 0.1			
	F	0.11 ± 0.03	R. I.			
1,4-diclorobenceno	NF	~ 0.01 (LDD)	0.5 ± 0.1			
	F	R. I.	0.43 ± 0.14			
1,2-diclorobenceno	NF	~ 0.01 (LDD)	0.23 ± 0.05	0.2 ± 0.1		
	F	R. I.	R. I.	R. I.		

(*) F: Muestra filtrada; NF: Muestra no filtrada.

(**) R.I.: Resultado irreproducible. Correspondiente a C.V. > 60% .

Incertidumbre expandida (K= 2) estimada con EURACHEM/CITAC Guía de Cuantificación de la Incertidumbre en Medidas Analíticas, segunda edición QUAM: 2000 P1.

N.D. No detectado.

Tabla 31 (Continuación)

ANALITOS	*	MUESTRAS**				
		16	17	18	19	20
Pentaclorobenceno	NF					
	F					
1,2-dicloroetano	NF					
	F					
triclorometano	NF					
	F					
benceno	NF	0.60 ± 0.15	0.8 ± 0.2	1.5 ± 0.3	2.0 ± 0.4	1.6 ± 0.4
	F	0.33 ± 0.04	R. I.	R. I.	0.8 ± 0.2	R. I.
tetraclorometano	NF		~ 0.025 (LDD)	0.07 ± 0.01		
	F		R. I.	N.D.		
tricloroetileno	NF	0.315 ± 0.106				
	F	0.20 ± 0.05				
tolueno	NF	0.17 ± 0.04	0.15 ± 0.05	0.15 ± 0.03	0.29 ± 0.17	0.20 ± 0.06
	F	0.08 ± 0.05	0.10 ± 0.05	R. I.	0.26 ± 0.06	0.4 ± 0.2
tetracloroetileno	NF	0.19 ± 0.04				
	F	R. I.				
clorobenceno	NF					
	F					
etilbenceno	NF					
	F					
<i>m,p</i> -xileno	NF	~ 0.01 (LDD)	~ 0.01 (LDD)	~ 0.01 (LDD)	~ 0.01 (LDD)	~ 0.01 (LDD)
	F	N.D.	R. I.	R. I.	R. I.	R. I.
<i>o</i> -xileno	NF	~ 0.01 (LDD)	~ 0.01 (LDD)	~ 0.01 (LDD)	~ 0.01 (LDD)	~ 0.01 (LDD)
	F	N.D.	R. I.	R. I.	R. I.	R. I.
1,3-diclorobenceno	NF					
	F					
1,4-diclorobenceno	NF				1.9 ± 0.7	
	F				1.3 ± 0.3	
1,2-diclorobenceno	NF	0.09 ± 0.02				
	F	0.035 ± 0.007				

(*) F: Muestra filtrada; NF: Muestra no filtrada.

(**) R.I.: Resultado irreproducible. Correspondiente a C.V.>60% .

Incertidumbre expandida (K= 2) estimada con EURACHEM/CITAC Guía de Cuantificación de la Incertidumbre en Medidas Analíticas, segunda edición QUAM: 2000 P1.

N.D. No detectado.

Tabla 31 (Continuación)

ANALITOS	*	MUESTRAS**	
		21	22
pentaclorobenceno	NF	~ 0.001 (LDD)	
	F	R. I.	
1,2-dicloroetano	NF		
	F		
triclorometano	NF		
	F		
benceno	NF	2.0 ± 0.5	2.01 ± 0.04
	F	0.93 ± 0.04	R. I.
tetraclorometano	NF	0.75 ± 0.05	
	F	R. I.	
tricloroetileno	NF	10.6 ± 0.6	
	F	R. I.	
tolueno	NF	10 ± 1	0.42 ± 0.16
	F	4.1 ± 0.8	R. I.
tetracloroetileno	NF	2.1 ± 0.2	
	F	0.8 ± 0.1	
clorobenceno	NF		
	F		
etilbenceno	NF		
	F		
<i>m,p</i> -xileno	NF	0.26 ± 0.07	0.05 ± 0.01
	F	0.12 ± 0.04	R. I.
<i>o</i> -xileno	NF	2.6 ± 0.5	0.10 ± 0.03
	F	2.53 ± 1.24	R. I.
1,3-diclorobenceno	NF	0.22 ± 0.07	
	F	N.D.	
1,4-diclorobenceno	NF	1.6 ± 0.3	
	F	R. I.	
1,2-diclorobenceno	NF		0.06 ± 0.02
	F		N.D.

(*) F: Muestra filtrada; NF: Muestra no filtrada.

(**) R.I.: Resultado irreproducible, correspondiente a C.V.>60% .

Incertidumbre expandida (K= 2) estimada con EURACHEM/CITAC Guía de Cuantificación de la Incertidumbre en Medidas Analíticas, segunda edición QUAM:2000 P1.

N.D. No detectado.

Conclusiones

Las principales ventajas del muestreo mediante HS-SPME acoplado a CG en la determinación de VOCs en muestras de agua respecto a la inyección directa son el aumento de la sensibilidad y la mejor selectividad. La filtración de la muestra tiene una influencia importante sobre los resultados obtenidos, dando resultados irreproducibles en la mayoría de los casos. Además, en algunas muestras los analitos se perdieron durante la etapa de filtrado y en unos pocos casos se observó un efecto de contaminación.

Esta metodología es adecuada para el análisis de rutina de muestras de agua. La principal ventaja de este procedimiento es el corto tiempo de análisis; de hecho, se pudieron analizar cuatro muestras por hora. La sensibilidad conseguida fue satisfactoria para el análisis de muestras de agua destinadas al consumo humano. Se han mejorado los límites de detección respecto a los publicados en la literatura [63].

En este trabajo se han estudiado todos los principales VOCs que están legislados en aguas de consumo, sin embargo en trabajos previos esta investigación se limitaba a los compuestos que constituyen el índice BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno).

3.3. ACOPLAMIENTO MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN LÍNEA-CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR

3.3.1. DETERMINACIÓN DE TRIAZINAS Y COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS

El acoplamiento SPME en línea-cromatografía líquida capilar se ha estudiado en dos trabajos de esta Tesis:

- En el primero se han comparado las ventajas y desventajas de dos configuraciones diferentes para la extracción de triazinas de las muestras de agua, la SPME en fibra acoplada a CL convencional y la SPME en tubo acoplada a CL capilar. A su vez, en la segunda configuración se estudiaron dos modalidades, la SPME en tubo con una columna capilar empaquetada y la SPME en tubo con una columna capilar abierta. En los dos métodos la detección fue UV ($\lambda = 230$ nm). En la configuración de SPME con fibra se emplearon fibras de PDMS-DVB, mientras que en las dos modalidades de la configuración de SPME en tubo se emplearon una columna capilar empaquetada con fase de tipo C_{18} y una columna capilar abierta de 95% PDMS-5% polidifenilsiloxano, respectivamente.
- En el segundo trabajo se describe un método para el screening de triazinas y pesticidas organofosforados en muestras de agua empleando la configuración de SPME en tubo con columna capilar abierta acoplada a CL capilar y detección UV ($\lambda = 230$ nm). El sorbente del capilar usado fue 95% PDMS-5% polidifenilsiloxano.

3.3.1.1. ANÁLISIS DE SCREENING DE TRIAZINAS EN MUESTRAS DE AGUA MEDIANTE SPME SOBRE FIBRA Y SPME EN TUBO

Las triazinas suelen usarse como herbicidas, y debido a su elevada toxicidad sus niveles en agua están estrictamente controlados por las autoridades. En la **Tabla 32** se resume la legislación aplicable a los distintos tipos de aguas.

En la **Tabla 33** se resumen los procedimientos para la extracción de triazinas de las muestras de agua que pueden encontrarse en la bibliografía, así como algunas de sus características analíticas (volumen de muestra, LDDs). El volumen de muestra depende apreciablemente del método empleado. Los procedimientos basados en la SPE fuera de línea son los que requieren mayores volúmenes. Los procedimientos basados en la SPME requieren volúmenes hasta 100 veces menores para conseguir LDDs adecuados. Otros procedimientos de extracción son la inmunoextracción [65] y la extracción con agua subcrítica (SWE) [66], que también proporcionaron LDDs satisfactorios para el análisis de muestras de agua residual.

Se han presentado muy pocos métodos para la determinación de triazinas empleando SPME y CL. Así, se han analizado diversos pesticidas en aguas medioambientales con una columna convencional de CL y detección UV [67], y también con CL capilar acoplada a espectrometría de masas [68].

Tabla 32. Concentraciones máximas permitidas por la legislación europea y americana para triazinas en función del tipo de agua

Tipo de agua	Legislación Europea Directiva 2000/60	US EPA Legislación
Agua de consumo	98/83/EEC Triazina individual (0.1 µg/L) Triazinas en total (0.5 µg/L)	1985/US/EPA/ Atrazina (3 µg/L)
Agua superficial y subterránea (Norma de calidad ambiental))	86/280/EEC Simazina (1 µg/L)* Atrazina (1 µg/L)*	
Agua residual	91/271/EEC 98/15/EEC Valores no especificados	1994/419/EPA Valores no especificados

*R.D. 995/2000 (España)

Tabla 33. Características de los procedimientos de extracción de triazinas descritos en la bibliografía.

Analito	Procedimiento		Medida de la señal analítica	Límite de detección (mg/L)	Ref.
	Extracción	Volumen de muestra (mL)			
<i>Simazina</i>	* SPE/HPLC fuera línea	250	detección UV	0.012	[69]
	* SPE/HPLC en línea	10	MS	0.0016	[70]
	* SPE/HPLC fuera línea	2	detección UV	0.003	[71]
	* SPE/GC fuera línea	1000	trampa iones MS	0.012	[72]
	*SPME/GC	3	ECD or TSD	0.05	[73]
	*Inmunoeextraccion/RPLC	0.05	detección UV/V	0.25	[65]
	* SWE/SWC en línea	sólido	detección UV	1.4 µg/g	[66]
	*SPME/GC	2	MS	0.013	[74]
	*SPME/HPLC	3	UV	1.5	[67]
	* SPE/HPLC fuera línea	50	MS(ESI)	0.1	[75]
	* Fibra protegida LPME/GC	3	MS	0.063	[76]
	*SPME/GC	3	MS	0.06	[77]
	* SPE/RPLC-TOTAD-GC fuera línea	1000	detección UV	0.00033	[78]
	*SPE-micro LLME/RPLC	1000	DAD	0.1	[79]
	SPE(nanotubos)/HPLC fuera línea	500	DAD	0.009	[80]
* SPE(propazin a-MIP)/HPLC fuera línea	100	DAD	0.1	[81]	
<i>Atrazina</i>	* SPE/HPLC fuera línea	250	detección UV	0.018	[69]
	* SPE/HPLC en línea	10	MS	0.001	[70]
	* SPE/HPLC fuera línea	2	detección UV	0.002	[71]
	* SPE/GC fuera línea	1000	trampa iones MS	0.00075	[72]
	*SPME/GC	3	ECD or TSD	0.03	[73]
	*Inmunoeextraccion/RPLC	0.05	detección UV/V	0.25	[65]
	* SWE/SWC en línea	sólido	detección UV	1.4 µg/g	[66]
	*SPME/GC	2	MS	0.006	[74]
	SPE/GC fuera línea	500	MS	0.0017	[82]
	*SPME/HPLC	3	detección UV	1.65	[67]
	* SPE/HPLC fuera línea	500	DAD	0.004	[83]
	* SPE/HPLC fuera línea	50	MS(ESI)	0.1	[75]
	* Fibra protegida LPME/GC	3	MS	0.014	[76]
	*SPME/GC	11	NPD	0.03	[84]
	*SPME/GC	3	MS	0.04	[77]
	* SPE/RPLC-TOTAD-GC fuera línea	1000	detección UV	0.00017	[78]
	*SPE-micro LLME/RPLC	1000	DAD	0.1	[79]
	SPE(nanotubos) /HPLC fuera línea	500	DAD	0.033	[80]
* SPE(propazin a-MIP)/HPLC fuera línea	100	DAD	0.1	[81]	
<i>Propazina</i>	* SPE/HPLC fuera línea	2	detección UV	0.0033	[71]
	*SPME/GC	3	ECD or TSD	0.025	[73]
	* SWE/SWC en línea	sólido	detección UV	1.4 µg/g	[66]
	*SPME/GC	2	MS	0.007	[74]
	* SPE/HPLC fuera línea	50	MS(ESI)	0.1	[75]
	* Fibra protegida LPME/GC	3	MS	0.01	[76]
* SPE(propazin a-MIP)/HPLC fuera línea	100	DAD	0.1	[81]	
<i>Ametrin</i>	* SPE/HPLC fuera línea	250	detección UV	0.034	[69]
	* SPE/HPLC fuera línea	2	detección UV	0.033	[71]
	* SWE/SWC en línea	sólido	detección UV	1.4 µg/g	[66]
	*SPME/GC	2	MS	0.01	[74]
*SPME/HPLC	3	detección UV	2.64	[67]	

Tabla 33 (Continuación).

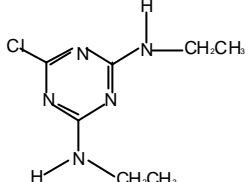
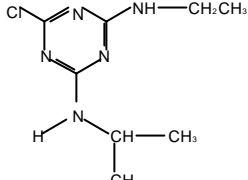
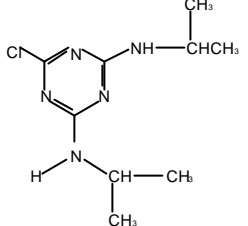
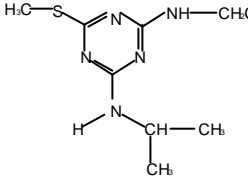
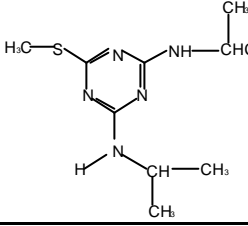
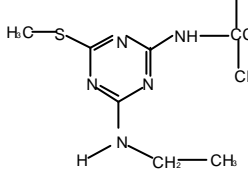
Analito	Extracción	Volumen de muestra (mL)	Medida de la señal analítica	Límite de detección (mg/L)	Ref.
<i>Prometrin</i>	* SPE/HPLC en línea	10	MS	0.0005	[70]
	* SPE/HPLC fuera línea	2	detección UV	0.0025	[71]
	*SPME/GC		MS	0.01	[74]
	*Fibra protegida LPME/GC	3	MS	0.007	[76]
	*SPE-micro LLME/RPLC	1000	DAD	0.1	[79]
<i>Terbutrin</i>	* SPE/HPLC fuera línea	2	detección UV	0.0019	[71]
	*SPME/GC		MS	0.014	[74]
	* SPE/HPLC fuera línea	500	DAD	0.006	[83]
	*SPME/GC	11	NPD	0.03	[84]
	*SPME/GC	3	MS	0.02	[77]
	* SPE/RPLC-TOTAD-GC fuera línea	1000	detección UV	0.00012	[78]
<i>Suma de triazinas</i>	Test de evaluación in situ	0.1	detección UV	0.5	[85]

(*) screening de triazinas

En este apartado de la Tesis se han evaluado los acoplamientos SPME en fibra-CL convencional y SPME en tubo-CL capilar para la determinación de los compuestos mostrados en la **Tabla 34**. La segunda configuración permite la automatización del procedimiento de SPME. Se destacan las ventajas e inconvenientes de los dos acoplamientos en el análisis de triazinas en agua. Se establecen, además de las propiedades analíticas clásicas, el coste y el número de muestras procesadas por hora.

El montaje correspondiente a la configuración SPME en fibra-CL convencional se presenta en la **Figura 24**, el del acoplamiento SPME en tubo con una columna empaquetada-CL capilar en la **Figura 28**, y el del acoplamiento SPME en tubo con una columna abierta-CL capilar en la **Figura 29 del Capítulo 2-Reactivos e Instrumentación (págs. 69 y 71)**. Más información acerca de las condiciones experimentales se incluye en el **Apéndice 10**.

Tabla 34. Triazinas seleccionadas como analitos.

Compuesto	Log K_{ow}	Estructura química
Simazina*	4.7	
Atrazina*	2.34	
Propazina	2.55	
Ametrin	2.81	
Prometrin	3.52	
Terbutrin	3.70	

(*) Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y Decisión 2455/2001/CE Sustancias en Lista II y Lista Prioritaria

Optimización de l proceso de extracción

(a) Procedimiento de SPME sobre la fibra

Se probaron fibras con tres sorbentes diferentes: PDMS, PDMS-DVB y CW-TPR, pero no se observaron diferencias significativas en cuanto a la cantidad extraída con cada una de ellas. Por tanto, de acuerdo con trabajos previos con triazinas en muestras de agua [86], se eligió la fibra de PDMS-DVB como la mejor opción.

En un trabajo previo de la Tesis se estudió cómo reducir el ensanchamiento de pico debido al gran volumen en que se desorben los analitos en el interior de la cámara de desorción de la interfase SPME-HPLC [28]. El ensanchamiento de pico puede minimizarse colocando una precolumna y una válvula de conmutación de 6 vías entre la interfase SPME-HPLC y la columna analítica, y por tanto ésta fue la configuración usada en el presente trabajo (**Figura 24**, pág. 69).

Se probaron diferentes tiempos de adsorción en el intervalo 5-65 min para una disolución patrón que contenía una mezcla de las triazinas (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada compuesto). El tiempo de desorción fue 5 min. Se observó que las áreas de los picos obtenidos para simazina y propazina apenas aumentaron al aumentar el tiempo de adsorción de 5 a 65 min. Sin embargo, las respuestas de atrazina, ametrin, prometrin y terbutrin aumentaron significativamente al alargar el tiempo de adsorción hasta 45 min. La mejoría observada para tiempos de adsorción más largos fue pequeña. Consecuentemente, se seleccionó un tiempo de adsorción de 45 min para el resto del trabajo.

El efecto del pH de la muestra en el intervalo 4-10 se evaluó para una disolución estándar que contenía una mezcla de triazinas (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada). Los tiempos de adsorción y de desorción fueron 45 y 10 min, respectivamente. No se observaron diferencias significativas dentro del intervalo de pH estudiado. Por ello el pH de la muestra no se modificó, es decir, no se ajustó antes de la SPME.

La influencia de la temperatura en el proceso de extracción se estudió entre 20 y 70 °C usando una disolución estándar que contenía una mezcla de las triazinas (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada). Los tiempos de adsorción y de desorción fueron 15 y 5 min, respectivamente. Dado que no se observaron diferencias significativas sobre las respuestas de los analitos los siguientes experimentos se realizaron a temperatura ambiente.

El tiempo de desorción se evaluó entre 5 y 25 min usando una disolución estándar de las triazinas (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada). El tiempo de adsorción fue 15 min. Los resultados obtenidos indicaron que las máximas respuestas para la mayoría de las triazinas pueden alcanzarse usando tiempos de desorción de 10 min. Sólo para la atrazina la señal analítica aumentó al prolongar el tiempo de desorción hasta 25 min. Finalmente se seleccionó un tiempo de desorción de 10 min.

Por último se evaluó el efecto del volumen de muestra entre 10 y 50 mL. El tiempo de adsorción fue 15 min y el tiempo de desorción fue 10 min. No se obtuvieron diferencias significativas para los diferentes volúmenes de muestra. Se eligió 25 mL como volumen de muestra para el resto del estudio.

Las **Figuras 69a y 69b** muestran los cromatogramas obtenidos bajo las condiciones seleccionadas en la SPME sobre la fibra para un blanco (agua) y una disolución estándar que contenía las triazinas investigadas a una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ (en cada compuesto), respectivamente.

Con la finalidad de investigar si la presencia de ácidos húmicos en la muestra afectaba a las recuperaciones de los analitos se analizaron patrones que contenían 1 $\mu\text{g/mL}$ de cada triazina y concentraciones variables de ácido húmico. Las concentraciones de ácido húmico variaban entre 5 y 100 $\mu\text{g/mL}$, y las condiciones de la SPME fueron las que se optimizaron previamente. Sin embargo, tras la etapa de adsorción el sorbente de la fibra presentaba un aspecto oscurecido debido a la presencia de ácido húmico, siendo necesario un paso adicional para limpiar la fibra. Con este propósito, la fibra se sumergió en 10 mL de agua durante 3 min bajo agitación. Como se puede ver en la **Figura 70**, no se encontró ningún efecto matriz. Puede concluirse que el método propuesto de SPME sobre la fibra es un procedimiento útil para aguas naturales con elevado contenido en materia orgánica disuelta.

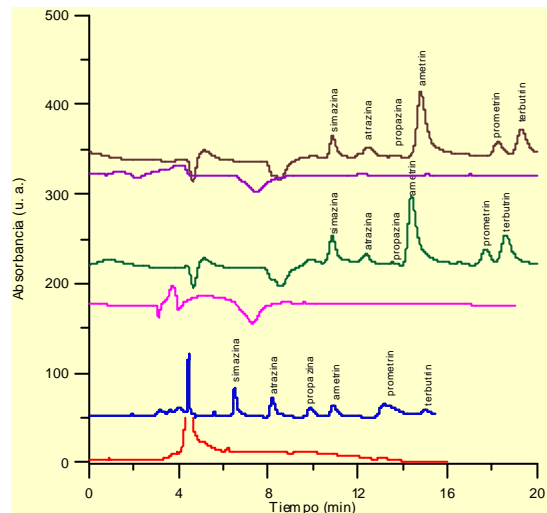


Figura 69. Cromatogramas obtenidos mediante el procedimiento de SPME sobre la fibra-CL convencional para (a) blanco (agua) y (b) disolución acuosa conteniendo 1 $\mu\text{g/mL}$ de cada triazina; cromatogramas obtenidos mediante el procedimiento de SPME en tubo con una columna empaquetada-CL capilar para (c) blanco (agua) y (d) disolución acuosa conteniendo 0.1 $\mu\text{g/mL}$ de cada triazina; cromatogramas obtenidos mediante el procedimiento de SPME en tubo con una columna abierta de 0.25 mm de espesor de capa-CL capilar para (e) blanco y (f) disolución acuosa conteniendo 0.1 $\mu\text{g/mL}$ de cada triazina.

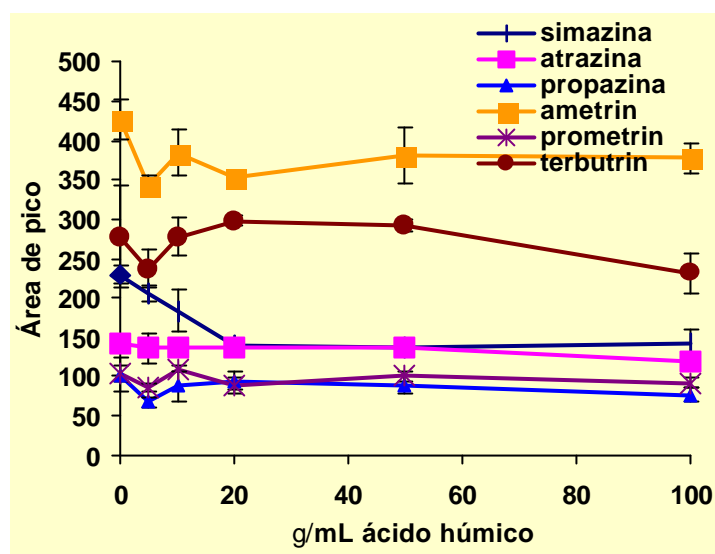


Figura 70. Efecto de la presencia de ácido húmico en la adsorción de triazinas sobre la fibra (1 mg/mL de cada una). Tiempo de adsorción 45 min y tiempo de desorción 10 min.

Las cantidades absolutas de analitos extraídas mediante el procedimiento de SPME sobre la fibra se estimaron a partir de las áreas de pico en los cromatogramas resultantes y de las ecuaciones de calibración construidas a partir de la inyección directa de 100 μ L de disoluciones estándar de los analitos en el intervalo 0.1-2 μ g/mL (de cada triazina). Las recuperaciones fueron establecidas por comparación entre las cantidades extraídas y la cantidad de analito en las muestras (25 mL). Los resultados se presentan en la **Tabla 35**. Como se puede ver, los porcentajes de extracción con la fibra oscilaron entre el 0.27 y el 2.9%. Esta baja recuperación puede explicarse por las pequeñas dimensiones del sorbente de la fibra. El volumen de la fase de SPME fue de 0.510 μ L. Por tanto, el procedimiento propuesto puede ser considerado un método de muestreo no destructivo.

(b) Procedimiento de SPME en tubo

Las **Figuras 69c y 69d** presentan los cromatogramas obtenidos al usar la columna capilar empaquetada con relleno de tipo C_{18} para llevar a cabo la SPME en tubo. El volumen de muestra procesado se estudió entre 2 y 100 μ L (ver sección experimental del **Apéndice 10**). Se seleccionó 100 μ L y una sola inyección como la mejor opción, y la SPME se efectuó en la columna empaquetada durante 5 min usando una velocidad de flujo de 20 μ L/min y elución isocrática (ver **Figura 28**, pág. 71 del **Capítulo 2-Reactivos e Instrumentación**). Las recuperaciones obtenidas para un patrón que contenía 10 μ g/L de cada triazina se estimaron a partir de las áreas de pico en los cromatogramas resultantes y de las ecuaciones de calibración obtenidas a partir de la inyección directa de 2 μ L de patrones con concentraciones entre 0.01 y 1 μ g/mL de cada triazina. Los porcentajes

absolutos de extracción oscilaron entre 41 y 131 % (ver **Tabla 35**). En esta modalidad de SPME el volumen de fase fue de 6.87 μL .

Los volúmenes internos de las dos columnas de CG probadas como columnas abiertas para la SPME en tubo fueron 2.35 y 14.7 μL , respectivamente. Estas columnas también se usaron como *loops* de inyección de la muestra (ver **Figura 29**, pág. 71). La **Figura 71** muestra la influencia del volumen de muestra pasado a través de las columnas de CG. De acuerdo con esta figura, se seleccionó 1 mL como volumen óptimo. Las recuperaciones obtenidas con columnas capilares abiertas para una disolución estándar de 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada triazina se estimaron comparando la cantidad de analito extraído con la cantidad total de analito inyectado en el capilar de extracción. La cantidad de analito extraído se estableció a partir de las áreas de los picos en los cromatogramas resultantes y de las ecuaciones de calibración construidas mediante la inyección directa de 2 μL de patrones de los analitos con concentraciones entre 0.01 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada triazina. Las recuperaciones obtenidas estaban comprendidas en el intervalo 0.74-9.1 % (ver **Tabla 35**). Los porcentajes de analito extraídos con la columna de CG de 0.25 μm de espesor (C1) fueron ligeramente superiores a los obtenidos con la columna de CG de 0.1 μm de espesor (C2). Este hecho puede ser explicado por el volumen de la fase de SPME que para C1 fue 0.0589 μL y para C2 fue 0.0236 μL . De acuerdo con estos resultados, la columna de 0.25 μm de espesor de sorbente fue la que se usó en el resto del estudio. Por otra parte se observó una relación lineal entre las recuperaciones obtenidas para las dos columnas de CG empleadas ($R_{C1} = 1.5576 * R_{C2} - 0.8186$, $R^2 = 0.9915$).

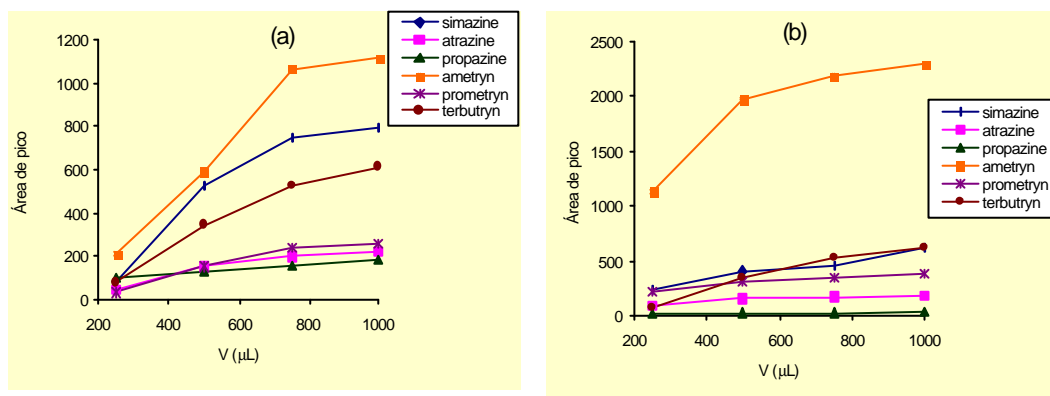


Figura 71. Optimización del volumen de muestra para un patrón de 100 mg/L de cada triazina en el método de SPME en tubo con una columna abierta (a) columna de 0.1 mm de d. i. (C2) y (b) columna de 0.25 mm de d. i. (C1).

Tabla 35. Recuperaciones de los procedimientos de SPME sobre la fibra y SPME en tubo.

Analito	SPME sobre la fibra-CL convencional	SPME en tubo con columna empaquetada-CL capilar.	SPME en tubo con columna abierta-CL capilar	
			0.1 µg/mL de cada triazina	
			Recuperación (n= 3)	
	Recuperación (%)± s	Recuperación (n=6) (%)± s	Columna 30 cm × 0.1 mm d.i. × 0.1 µm	Column 30 cm × 0.25 mm d.i. × 0.25 µm
Simazina	0.27 ± 0.02 (n= 7)	59 ± 8	1.6 ± 0.2	1.8 ± 0.3
Atrazina	2.9 ± 0.1 (n=5)	79 ± 4	6.2 ± 0.7	9.1 ± 1.9
Propazina	1.96 ± 0.14 (n=9)	131 ± 3	0.84 ± 0.09	0.74 ± 0.06
Ametrin	0.27 ± 0.02 (n= 5)	114 ± 5	4.7 ± 0.7	6.6 ± 0.5
Prometrin	1.23 ± 0.09 (n=10)	49 ± 2	4.5 ± 0.3	5.9 ± 0.6
Terbutrin	1.87 ± 0.17 (n=7)	41 ± 1	2.66 ± 0.04	2.88 ± 0.07

Características analíticas

Los LDDs (determinados como la concentración necesaria para producir un pico con una relación señal-ruido de 3) conseguidos por los distintos métodos examinados se presentan en la **Tabla 36**. Se puede ver que el método de SPME en tubo con una columna empaquetada-CL capilar proporcionó los LDDs más bajos (0.025-0.5 µg/L) dado que el volumen de fase para la microextracción era mayor. Mediante el método de SPME en tubo con una columna abierta-CL capilar se obtuvieron LDDs entre 0.1 y 1 µg/L. Aunque el volumen de fase de SPME fue menor que en la opción de SPME en tubo con una columna empaquetada, se procesaron mayores volúmenes de muestra. Sin embargo, los métodos de SPME sobre la fibra-CL convencional, de inyección directa-CL convencional y de inyección directa-CL capilar proporcionaron LDDs superiores (5-250 µg/L). La preconcentración de la muestra en la fase de SPME es menos efectiva, a pesar de que el volumen de fase usado es intermedio (0.5 µL). El LDD es el factor más importante para seleccionar un método apropiado para realizar el screening de triazinas en cada tipo de muestra de agua, como se puede ver en la **Figura 72**. Los métodos de SPME sobre la fibra-CL convencional y de inyección directa-CL capilar pueden aplicarse al análisis de muestras de agua residual. Los métodos de SPME en tubo-CL capilar pueden aplicarse también a muestras de agua destinadas al consumo humano (ver **Tabla 32**).

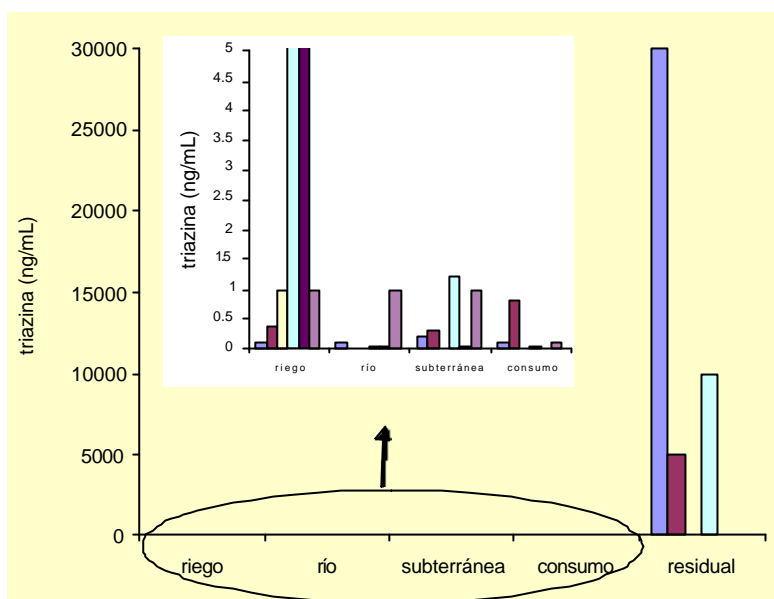


Figura 72. Concentraciones de triazinas encontradas en diferentes tipos de aguas analizadas en la bibliografía: [69-72, 77, 83] y legislación Europea (columna rayada).

Los intervalos de trabajo y las curvas de calibración también se presentan en la **Tabla 36**. La repetibilidad y la reproducibilidad se evaluaron mediante los coeficientes de variación intra-día e inter-día, respectivamente. Como se puede ver en la **Tabla 36**, la mejor precisión se obtuvo mediante el método de SPME en tubo con una columna empaquetada-CL capilar. Los métodos basados en SPME sobre la fibra y SPME en tubo con una columna abierta presentan igualmente coeficientes de variación satisfactorios.

El método de SPME en tubo con una columna empaquetada-CL capilar fue bastante rápido aunque requiere mayor tiempo de análisis que los métodos basados en la inyección directa. Sin embargo, presenta el mismo alto grado de automatización. El método de SPME sobre la fibra fue el que consumió mayor tiempo de análisis y tenía el menor grado de automatización (**Tabla 36**). Los tiempos de retención fueron bastante similares para las dos opciones estudiadas de SPME en tubo.

También se evaluó el coste del análisis. El método de SPME en tubo con columna empaquetada incorpora una precolumna y una válvula de conmutación que suben el precio del equipo; sin embargo, el procedimiento de SPME en tubo con una columna abierta sólo necesita una columna capilar de CG conectada a la válvula de inyección. En el procedimiento de SPME sobre la fibra acoplada a CL convencional se requirió una interfase de SPME-HPLC, aunque el sistema de CL capilar es más caro que el sistema de CL convencional.

SPME-CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR

Tabla 36. Características analíticas de los procedimientos estudiados.

Método	Analito	LDD ($\mu\text{g/L}$)	Linealidad				
			Intervalo de trabajo ($\mu\text{g/mL}$)	n	$a \pm s_a$	$b \pm s_b$	R^2
SPME sobre la fibra/CL convencional (25 mL)	Simazina	50	0.1-1	12	5 ± 4	346 ± 6	0.997
	Atrazina	50	0.1-1	9	92 ± 50	1680 ± 90	0.98
	Propazina	125	0.25-2.5	12	6 ± 18	343 ± 11	0.99
	Ametrin	25	0.05-1	9	65 ± 30	1265 ± 40	0.99
	Prometrin	25	0.05-0.5	11	-26 ± 20	1820 ± 70	0.99
	Terbutrin	35	0.05-0.5	7	80 ± 70	4100 ± 200	0.98
Inyección directa/CL convencional (100 μL)	Simazina	100	0.25-4	4	27 ± 8	135 ± 4	0.99
	Atrazina	250	0.25-4	4	20 ± 25	33 ± 10	0.91
	Propazina	250	0.25-4	4	15 ± 2	3.4 ± 0.9	0.94
	Ametrin	25	0.25-4	4	105 ± 46	471 ± 22	0.99
	Prometrin	150	0.25-4	4	0 ± 17	167 ± 8	0.99
	Terbutrin	150	0.25-4	4	13 ± 21	185 ± 10	0.99
Inyección directa/CL capilar (2 μL)	Simazina	2.5	0.1-1	4	52 ± 6	171 ± 15	0.99
	Atrazina	5	0.01-1	4	17 ± 5	211 ± 6	0.99
	Propazina	25	0.25-2.5	4	4 ± 14	85 ± 17	0.96
	Ametrin	6.25	0.01-1	4	7 ± 75	220 ± 46	0.96
	Prometrin	50	0.05-1	4	9 ± 1	135 ± 5	0.99
	Terbutrin	20	0.05-1	4	-1.5 ± 0.7	279 ± 2	0.99
SPME en tubo con columna empacotada/CL capilar (100 μL)	Simazina	0.025	0.0001-0.1	14	22 ± 6	12540 ± 180	0.997
	Atrazina	0.05	0.0001-0.1	14	5 ± 8	16900 ± 190	0.998
	Propazina	0.1	0.001-0.1	10	-19 ± 4	14600 ± 103	0.999
	Ametrin	0.0625	0.0001-0.1	16	-54 ± 21	33000 ± 500	0.996
	Prometrin	0.5	0.001-0.1	13	25 ± 3	4330 ± 70	0.996
	Terbutrin	0.2	0.001-0.1	13	-5 ± 11	9400 ± 200	0.992
SPME en tubo con columna abierta/CL capilar (0.1 μm espesor) (1 mL)	Simazina	0.1	0.01-0.5	5	60 ± 30	2620 ± 120	0.99
	Atrazina	0.1	0.01-0.5	5	156 ± 5	550 ± 20	0.99
	Propazina	1	0.01-0.5	5	33 ± 3	317 ± 13	0.99
	Ametrin	0.1	0.01-0.5	5	270 ± 90	7500 ± 400	0.99
	Prometrin	0.1	0.01-0.5	5	90 ± 16	1230 ± 70	0.99
	Terbutrin	0.1	0.01-0.5	5	140 ± 50	3500 ± 200	0.99
SPME en tubo con columna abierta/CL capilar (0.25 μm espesor) (1 mL)	Simazina	0.1	0.01-0.5	5	-6 ± 10	3450 ± 40	0.99
	Atrazina	0.1	0.01-0.5	5	107 ± 16	1500 ± 70	0.99
	Propazina	0.5	0.01-0.5	5	18 ± 4	257 ± 15	0.99
	Ametrin	0.1	0.01-0.5	5	540 ± 140	11200 ± 600	0.99
	Prometrin	0.1	0.01-0.5	5	109 ± 30	1600 ± 130	0.98
	Terbutrin	0.1	0.01-0.5	5	290 ± 70	3000 ± 300	0.98

n: número de patrones usados

a: ordenada en el origen de la ecuación de calibración.

b: pendiente de la ecuación de calibración

Tabla 36 (Continuación).

Método	Analito	*Precisión (C.V. %)		Coste por muestra	Rapidez s	Grado de automatización
		Intra-día (n=3)	Inter-día (n= 6)			
SPME sobre la fibra/CL convencional (25 mL)	Simazina	6	4	3	1 muestra/h	2
	Atrazina	4	7			
	Propazina	8	7			
	Ametrin	10	22			
	Prometrin	21	19			
	Terbutrin	5	14			
Inyección directa/CL convencional (100 µL)	Simazina			2	4 muestras/h	5
	Atrazina					
	Propazina					
	Ametrin					
	Prometrin					
	Terbutrin					
Inyección directa/CL capilar (2 µL)	Simazina			3	4 muestras/h	5
	Atrazina					
	Propazina					
	Ametrin					
	Prometrin					
	Terbutrin					
SPME en tubo con columna empaquetada/CL capilar (100 µL)	Simazina	1.6	10	5	3 muestras/h	5
	Atrazina	3	2			
	Propazina	5	12			
	Ametrin	4	4			
	Prometrin	3	6			
	Terbutrin	7	6			
SPME en tubo con columna abierta/CL capilar (0.1 µm espesor) (1 mL)	Simazina	12	13	3	2 muestras/h	5
	Atrazina	0.9	10			
	Propazina	8	23			
	Ametrin	8	17			
	Prometrin	4	9			
	Terbutrin	4	6			
SPME en tubo con columna abierta/CL capilar (0.25 µm espesor) (1 mL)	Simazina	17	16	3	2 muestras/h	5
	Atrazina	16	19			
	Propazina	20	21			
	Ametrin	10	8			
	Prometrin	6	13			
	Terbutrin	4	8			

(*) estudiado a mitad del intervalo de concentraciones.

5: procedimiento más caro y más adecuado para la automatización del análisis .

La exactitud de los métodos se evaluó analizando diferentes muestras (S1-S4) bien directamente o bien tras su fortificación a diferentes concentraciones dentro de los intervalos de concentración estudiados. Los resultados obtenidos están resumidos en la

Tabla 37. No se detectó efecto matriz. Las concentraciones de triazinas en las muestras fortificadas se calcularon a partir de las ecuaciones de calibración obtenidas con patrones de triazinas. En todos los casos los métodos propuestos proporcionaron valores próximos a las concentraciones reales.

Aplicación a muestras reales

Finalmente, la fiabilidad de los métodos descritos se comprobó mediante el análisis de agua de campo (S1), agua de río (S2), agua de riego (S3a, S3b), agua subterránea (S4), agua residual obtenida de una industria (S5), agua de consumo (S6), agua de depuradora (S7), agua de balsa (S8), agua natural (S9) y varias muestras de aguas residuales vertidas al mar (S10-S31). La concentración encontrada siempre está caracterizada por la incertidumbre expandida ($K=2$) estimada de acuerdo con EURACHEM/CITAC Guía de Cuantificación de la Incertidumbre en Química Analítica, segunda edición QUAM: 2000. P1 [30].

(a) Configuración de SPME sobre la fibra-CL convencional

No se encontraron triazinas en las muestras S1-S4 mediante el método de SPME sobre fibra. La principal ventaja de este procedimiento es la reducción de los picos correspondientes a algunos componentes de la matriz, es decir, que se obtuvieron cromatogramas más limpios como se puede observar en la **Figura 73**. El cromatograma obtenido para S5 reveló que esta muestra contenía atrazina. Para cuantificar su concentración fue necesario diluir la muestra 20 veces. La concentración del analito (calculada con la ecuación de calibrado obtenida a partir de los patrones) fue (5.3 ± 1.8) $\mu\text{g/mL}$.

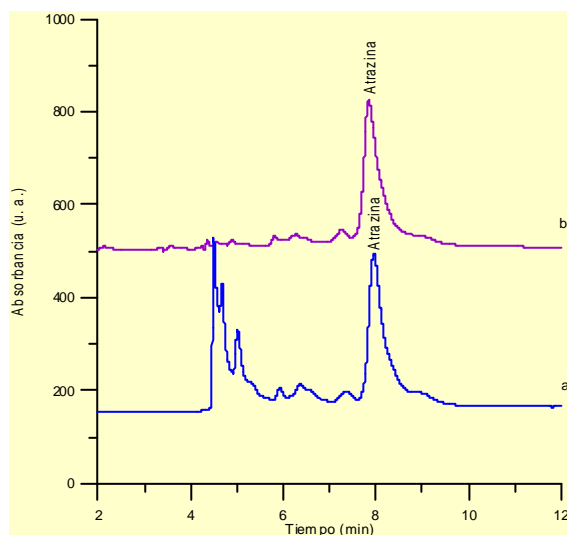


Figura 73. Cromatogramas obtenidos para (a) agua residual (S5) diluida 5 veces e inyectada directamente, y (b) agua residual (S5) no diluida, analizada mediante el procedimiento basado en SPME sobre la fibra.

Tabla 37. Concentraciones encontradas de triazinas y exactitud en diferentes tipos de muestras analizadas mediante los procedimientos estudiados (n= 3).

Tipo de agua		Procedimiento de SPME sobre la fibra			Procedimiento de SPME en tubo con una columna empaquetada		
		Conc. añad. µg/mL	Concentración determinada µg/mL	Error relativo (%)	Conc. añad. µgm/L	Concentración determinada µg/mL	Error relativo (%)
S1	Simazina	0.1	0.098 ± 0.007	-1	0.01	0.010 ± 0.001	0
		0.5	0.48 ± 0.08	-4	0.05	0.0430 ± 0.0012	-14
	Atrazina	0.1	0.1067 ± 0.0005	+7	0.01	0.0087 ± 0.0004	-13
		0.5	0.49 ± 0.08	-1	0.05	0.0464 ± 0.0013	-7
	Propazina	0.25	0.23 ± 0.08	-6	0.01	0.0106 ± 0.0006	+6
		1.25	1.51 ± 0.12	21	0.05	0.0542 ± 0.0013	+8
	Ametrin	0.05	0.048 ± 0.008	-5	0.01	0.0115 ± 0.0006	+15
		0.25	0.24 ± 0.02	-3	0.05	0.0472 ± 0.0006	-6
	Prometrin	0.05	0.048 ± 0.009	-3	0.01	0.008 ± 0.002	-20
		0.25	0.27 ± 0.04	+7	0.05	0.0456 ± 0.0015	-9
	Terbutrin	0.05	0.042 ± 0.007	-17	0.01	0.0119 ± 0.0002	+19
		0.25	0.23 ± 0.11	-9	0.05	0.0500 ± 0.0005	+0
S2	Simazina	0.1	0.09 ± 0.04	-11	0.01	0.0090 ± 0.0006	-10
		0.5	0.45 ± 0.06	-9	0.05	0.040 ± 0.003	-20
	Atrazina	0.1	0.09 ± 0.03	-15	0.01	0.0100 ± 0.0001	0
		0.5	0.58 ± 0.02	+17	0.05	0.0485 ± 0.0013	-3
	Propazina	0.25	0.211 ± 0.106	-15	0.01	0.0011 ± 0.0004	+10
		1.25	1.45 ± 0.20	+16	0.05	0.058 ± 0.003	+16
	Ametrin	0.05	0.05 ± 0.03	+9	0.01	0.0122 ± 0.0004	+22
		0.25	0.26 ± 0.05	+5	0.05	0.0478 ± 0.0016	-4
	Prometrin	0.05	0.053 ± 0.005	+6	0.01	0.0081 ± 0.0003	-19
		0.25	0.21 ± 0.03	-16	0.05	0.046 ± 0.002	-8
	Terbutrin	0.25	0.25 ± 0.04	+2	0.01	0.0118 ± 0.0002	+18
					0.05	0.0506 ± 0.0011	+1.2
S3	Simazina	0.1	0.118 ± 0.016	+18	0.05	0.0526 ± 0.0012	+5
		0.5	0.48 ± 0.04	-5	0.091	0.0971 ± 0.0018	+7
	Atrazina	0	No detectada	-	0	0.0020 ± 0.0002	-
		0.1	0.114 ± 0.012	+14	0.05	0.0514 ± 0.0011	+3
	Propazina	0.5	0.49 ± 0.07	-1	0.091	0.0929 ± 0.0015	+2
		0.25	0.23 ± 0.03	-7	0.05	0.062 ± 0.003	+24
	Ametrin	1.25	1.27 ± 0.03	+2	0.091	0.098 ± 0.005	+8
		0.05	0.06 ± 0.02	+17	0.01	0.0117 ± 0.0001	+17
	Prometrin	0.25	0.314 ± 0.010	+25	0.05	0.0465 ± 0.0007	-7
		0.05	0.066 ± 0.001	+30	0.01	0.0074 ± 0.0002	-25
	Terbutrin	0.25	0.234 ± 0.014	-6	0.05	0.0465 ± 0.0011	-7
		0	No detectada	-	0	0.008 ± 0.002	-
		0.05	0.04 ± 0.01	-12	0.01	0.0148 ± 0.0006	-19
		0.25	0.25 ± 0.05	+2	0.05	0.0578 ± 0.0016	+4

Tabla 37 (Continuación)

S4	Simazina	0.1	0.088 ± 0.018	-12	0.01	0.0088 ± 0.0002	-12	
		0.5	0.52 ± 0.04	+5	0.05	0.0417 ± 0.0011	-20	
	Atrazina	0.1	0.12 ± 0.02	+18	0.01	0.0098 ± 0.0005	-2	
		0.5	0.51 ± 0.03	+1.5	0.05	0.0484 ± 0.0023	-3	
	Propazina	0.25	0.19 ± 0.03	-23	0.01	0.0093 ± 0.0002	-7	
		1.25	1.21 ± 0.03	-3	0.05	0.054 ± 0.003	+8	
	Ametrin	0.05	0.054 ± 0.017	+8	0.01	0.0117 ± 0.0001	+17	
		0.25	0.29 ± 0.07	+17	0.05	0.0477 ± 0.0006	-5	
	Prometrin	0.05	0.058 ± 0.015	+16	0.01	0.0084 ± 0.0009	-16	
		0.25	0.27 ± 0.02	+9	0.05	0.0464 ± 0.0008	-7	
	Terbutrin				0.01	0.0114 ± 0.0004	+14	
					0.05	0.049 ± 0.003	-2	
	S5. (diluída 20 veces)	Atrazina	0	0.27 ± 0.09	-	0	0.25 ± 0.02	-
			0.45	0.55 ± 0.04	-21	-	-	-

Tabla 37 (Continuación).

Procedimiento de SPME en tubo con una columna abierta 0.1 (µg/mL) de cada triazina					
Tipo de agua	Analito	0.1 µm espesor del capilar		0.25 µm espesor del capilar	
		Concentración determinada (µg/L)	Error relativo (%)	Concentración determinada (µg/L)	Error relativo (%)
S1	Simazina	0.093 ± 0.017	-7	0.091 ± 0.008	-9
	Atrazina	0.10 ± 0.02	0	0.093 ± 0.012	-7
	Propazina	0.08 ± 0.03	-20	0.08 ± 0.03	-20
	Ametrin	0.115 ± 0.007	+15	0.093 ± 0.017	-7
	Prometrin	0.116 ± 0.007	+14	0.11 ± 0.02	+10
	Terbutrin	0.118 ± 0.009	+18	0.117 ± 0.019	+17
S2	Simazina			0.083 ± 0.005	-17
	Atrazina	0.12 ± 0.06	+20	0.08 ± 0.02	-20
	Propazina	0.119 ± 0.012	+19	0.08 ± 0.01	-20
	Ametrin	0.083 ± 0.004	-17	0.080 ± 0.017	-20
	Prometrin	0.089 ± 0.009	-11	0.112 ± 0.003	+12
	Terbutrin	0.090 ± 0.003	-10	0.12 ± 0.01	+20
S3	Simazina	0.08 ± 0.01	-20	0.085 ± 0.003	-15
	Atrazina	0.083 ± 0.003	-17	0.09 ± 0.02	-10
	Propazina	0.085 ± 0.006	-15	0.082 ± 0.018	-18
	Ametrin	0.110 ± 0.016	+10	0.078 ± 0.006	-22
	Prometrin	0.096 ± 0.017	-4	0.083 ± 0.008	-17
	Terbutrin	0.11 ± 0.02	+10	0.115 ± 0.002	+15
S4	Simazina	0.09 ± 0.01	-10	0.093 ± 0.008	-7
	Atrazina	0.12 ± 0.03	+20	0.08 ± 0.02	-20
	Propazina	0.11 ± 0.06	+10	0.08 ± 0.01	-20
	Ametrin	0.093 ± 0.015	-7	-	-
	Prometrin	0.086 ± 0.008	-14	0.085 ± 0.008	-15
	Terbutrin	0.087 ± 0.002	-13	0.08 ± 0.03	-16

(b) Configuración de SPME en tubo-CL capilar

Las muestras de agua S1-S9 se analizaron mediante el procedimiento de SPME en tubo con una columna empaquetada acoplada a CL capilar. Estas muestras se obtuvieron de una zona con gran actividad agrícola donde los principales cultivos son los cítricos. No se encontraron triazinas en S1, S2, S4, S6, S7 y S9. El análisis de S3a reveló la presencia de atrazina y terbutrin, a concentraciones de (2.0 ± 0.2) $\mu\text{g/L}$ y (8 ± 2) $\mu\text{g/L}$, respectivamente. La muestra S5 se diluyó 340 veces, encontrándose una concentración de (5.0 ± 0.3) $\mu\text{g/mL}$ de atrazina; este valor fue estadísticamente comparable al obtenido mediante el procedimiento de SPME sobre fibra. El análisis de la muestra S8 mostró la presencia de atrazina a una concentración de (0.46 ± 0.08) $\mu\text{g/L}$.

Las muestras S1, S2 y S4 también fueron analizadas mediante el procedimiento de SPME en tubo con una columna abierta, no detectándose ninguna triazina. El análisis de la muestra S3b empleando el capilar de 0.25 mm de d. i. y 0.1 μm de espesor de sorbente reveló la presencia de atrazina a un nivel de concentración próximo a su LDD. El alto grado de automatización y las satisfactorias selectividad y sensibilidad obtenidas, hicieron que este procedimiento con capilar de 0.25 μm de espesor fuera el elegido para el análisis de las muestras S10-S31 recogidas en diferentes puntos de la costa de la Comunidad Valenciana. Los análisis se llevaron a cabo por duplicado ($n= 2$). Las concentraciones encontradas de cada analito fueron: (29 ± 6) $\mu\text{g/L}$ de atrazina en la muestra S10; las muestras S12, S15 y S30 presentaron ametrin a concentraciones (0.7 ± 0.1) $\mu\text{g/L}$, (5.5 ± 0.6) $\mu\text{g/L}$ y (4 ± 1) $\mu\text{g/L}$, respectivamente; las muestras S13-S15 y S17 presentaron propazina a concentraciones (33 ± 8) $\mu\text{g/L}$, (16 ± 5) $\mu\text{g/L}$, (3 ± 1) $\mu\text{g/L}$ y (28 ± 8) $\mu\text{g/L}$, respectivamente. Las desviaciones estándar relativas oscilaron entre el 11 y el 33 %. En las muestras S11, S16, S18-S28, S30 y S31 no se encontraron triazinas.

En la **Figura 74** se presentan como ejemplo los cromatogramas obtenidos para muestras reales de agua (muestras S15 y S17) conteniendo algunas de las triazinas estudiadas.

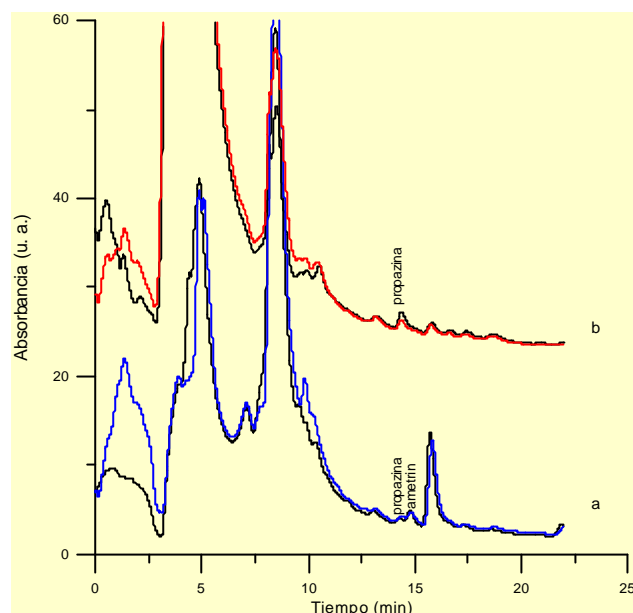


Figura 74. Cromatogramas obtenidos mediante el procedimiento de SPME en tubo con una columna abierta de 0.25 mm de espesor de capa, para las muestras (a) S15 y (b) S17.

Conclusiones

Los procedimientos de SPME sobre fibra y SPME en tubo con una columna empaquetada y SPME en tubo con una columna abierta fueron aplicados con éxito a la determinación de las triazinas más comunes en muestras de agua usando fibras de PDMS-DVB, una precolumna C₁₈ y columnas de CG de PDMS, respectivamente. La exactitud y la precisión obtenidas fueron adecuadas en todos los métodos.

La principal ventaja del método de SPME sobre fibra en la determinación de triazinas es que se eliminan gran parte de los productos presentes en las muestras de aguas residuales. Este método es adecuado para estimar el contenido en triazinas en muestras de agua residual teniendo en cuenta las concentraciones encontradas (este trabajo y **Figura 72**).

El procedimiento de SPME en tubo con una columna empaquetada fue asimismo adecuado para determinar triazinas en aguas de consumo. El procedimiento de SPME en tubo con una columna capilar abierta-CL capilar proporcionó buenos límites de detección y permitió analizar la mayor parte de las muestras de agua medioambientales (ver **Figura 72** y **Tabla 32**).

Considerando el coste por muestra, el método de SPME en tubo con columna empaquetada es el más caro, pero puede procesar hasta 3 muestras/hora en lugar de las 2 muestras/hora conseguidas mediante SPME en tubo con una columna abierta o 1 muestra/hora mediante SPME sobre fibra. Este último método de SPME generó más residuos que los procedimientos en tubo.

3.3.1.2. SCREENING DE TRIAZINAS Y PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS USANDO MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN TUBO ACOPLADA EN LÍNEA A CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR

En este estudio se ha aplicado el método de SPME en tubo acoplada a un sistema de CL capilar para el screening de triazinas y pesticidas organofosforados mediante detección UV. Se ha optimizado un procedimiento de elución en gradiente. Se han evaluado como posibles interferentes otros contaminantes potencialmente presentes en agua como hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), nonilfenol, pesticidas organoclorados o éteres difenil polibromados (PBDEs). Los PAHs se identificaron mediante detección fluorescente, estableciendo un programa con las longitudes de onda óptimas para cada uno de ellos (**Tabla 38**). La fiabilidad del método se demostró mediante el análisis de varias muestras reales de agua. Estas muestras de agua se obtuvieron de un área con gran actividad agrícola, donde los principales cultivos son los cítricos, y por tanto las triazinas y los compuestos organofosforados se usan habitualmente como herbicidas.

El montaje correspondiente a la configuración SPME en tubo con columna capilar abierta-CL capilar se presenta en la **Figura 29** de la *Pág. 71 del Capítulo 2 Reactivos e Instrumentación*. Más información acerca de las condiciones experimentales se incluye en el **Apéndice 11**.

Tabla 38. Programa de longitudes de onda de excitación y de emisión para el detector de fluorescencia.

Tiempo (min)	Longitud de onda de excitación (nm)	Longitud de onda de emisión (nm)
0	275	300
15	280	330
25	250	375
29	280	420
35	290	430
42	300	500
47	290	410

Eficacia de la extracción

Para la extracción en tubo de las triazinas y compuestos organofosforados se probaron dos columnas capilares de CG de la misma longitud (30 cm) y diferente diámetro interno y espesor de sorbente, un capilar de 0.25 mm de d.i. y 0.25 μm de espesor de fase, y un capilar de 0.1 mm de d.i. y 0.1 μm de espesor de fase. Para ello se procesaron disoluciones estándar que contenían una mezcla de las seis triazinas estudiadas o una mezcla de los nueve pesticidas organofosforados (a una concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada compuesto). De acuerdo con el apartado anterior se ensayaron diferentes volúmenes de muestra en el intervalo 0.25-1.0 mL. Puesto que las máximas respuestas se obtuvieron para la mayor parte de los analitos al utilizar 1.0 mL, éste fue el volumen de muestra seleccionado para el resto del trabajo.

Las eficacias de la SPME en tubo se calcularon comparando la cantidad de analito extraído, que es la cantidad de analito transferido a la columna analítica, con la cantidad total de analito inyectado en el capilar de extracción. La cantidad de analito extraído se estableció a partir de las áreas de los picos en los cromatogramas resultantes y de las ecuaciones de calibración construidas mediante la inyección directa de 2 μL de disoluciones estándar de los analitos con concentraciones en el intervalo 1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La **Tabla 39** compara las recuperaciones obtenidas para las triazinas y compuestos organofosforados mediante las dos opciones ensayadas. Como se observa en esta tabla, las mejores eficacias se obtuvieron generalmente con el capilar de 0.25 mm de d.i. y 0.25 μm de espesor de sorbente. La misma conclusión se puede extraer de la **Figura 75**, que muestra los cromatogramas obtenidos para disoluciones estándar de los pesticidas organofosforados (**75a y 75b**) y de las triazinas (**75c y 75d**) con los dos capilares probados. Como se observa en esta figura, los tiempos de retención de los compuestos estudiados fueron independientes del capilar usado.

SPME-CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR

Tabla 39. Eficacias obtenidas con las dos columnas capilares de CG evaluadas para la SPME en tubo ($n=6$). Los datos correspondientes a las triazinas se han extraído del trabajo anterior (apartado Optimización del proceso de extracción de la pág. 184).

Compuesto	Recuperación* (%)	
	Capilar de 0.1 mm d.i.-0.1 μm espesor de sorbente	Capilar de 0.25 mm d.i.-0.25 μm espesor de sorbente
Simazina	1.6 \pm 0.2	1.8 \pm 0.3
Atrazina	6.2 \pm 0.7	9.1 \pm 1.9
Propazina	0.84 \pm 0.09	0.74 \pm 0.06
Ametrin	4.7 \pm 0.7	6.6 \pm 0.5
Prometrin	4.5 \pm 0.3	5.9 \pm 0.6
Terbutrin	2.66 \pm 0.04	2.88 \pm 0.07
Fensulfotion	1.96 \pm 0.04	1.72 \pm 0.05
Fenamifos	2.29 \pm 0.08	2.61 \pm 0.08
Paration	0.50 \pm 0.03	0.136 \pm 0.016
Fenitrotion	9.5 \pm 1.4	13 \pm 2
Clorfenvinfos	2.9 \pm 0.7	2.5 \pm 0.5
Fention	12 \pm 2	26 \pm 2
Fonofos	12.4 \pm 1.5	43 \pm 7
Clorpirifos	2.6 \pm 0.3	4 \pm 0.5
Trifluralina	9.6 \pm 1.3	28 \pm 4

(*) – Valores establecidos para disoluciones estándar con 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada analito; volumen de muestra, 1 mL.

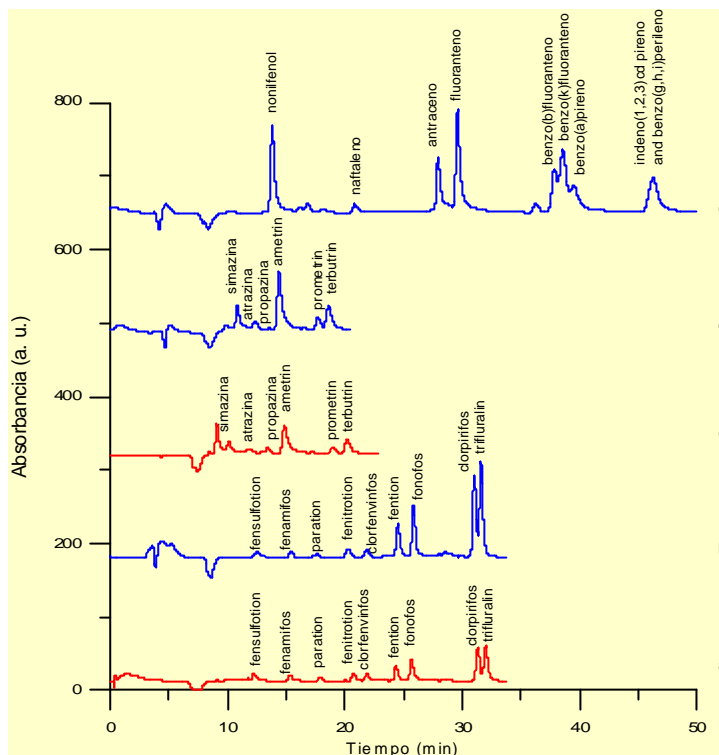


Figura 75. Cromatogramas obtenidos en las condiciones óptimas para los compuestos organofosforados con (a) capilar de 0.1 mm de d.i y 0.1 mm de espesor de capa, y (b) capilar de 0.25 mm de d.i y 0.25 mm de espesor de capa; para las triazinas con (c) capilar de 0.1 mm de d.i. y 0.1 mm de espesor de capa, y (d) capilar de 0.25 mm de d.i. y 0.25 mm de espesor de capa; (e) para los PAHs y nonilfenol con capilar de 0.25 mm de d.i. y 0.25 mm de espesor de capa. Concentración de triazinas y pesticidas organofosforados, 0.1 mg/mL (cada compuesto); concentración de PAHs y nonilfenol, 0.05 mg/mL. Para otros detalles experimentales, ver el Apéndice 11.

Características analíticas

Se estudió la linealidad para las triazinas y los compuestos organofosforados en los intervalos de concentraciones (10-500 µg/L) y (50-500 µg/L), respectivamente. Las ecuaciones de calibración obtenidas con los dos capilares probados para la SPME en tubo se presentan en la **Tabla 40**. Los valores de esa tabla indicaron que el método proporcionó una linealidad adecuada dentro de los intervalos de concentración examinados.

La repetibilidad y la reproducibilidad se evaluaron calculando los coeficientes de variación intra-día e inter-día, respectivamente. Estos coeficientes se establecieron procesando patrones de las triazinas y de los pesticidas organofosforados que contenían 100 µg/L de cada analito. En todos los casos los valores obtenidos fueron $\leq 20\%$ (ver también **Tabla 40**), y por tanto pueden considerarse aceptables.

Los LDDs se determinaron experimentalmente procesando patrones de concentraciones cada vez menores de los analitos. Entre dos inyecciones consecutivas de los analitos se procesó un blanco para detectar la existencia de posibles efectos memoria o de contaminantes. Los LDDs se establecieron como las concentraciones que produjeron picos con una relación señal-ruido de 3. Los valores obtenidos también están comparados en la **Tabla 40**. Como se observa en dicha tabla, los LDDs obtenidos con ambos capilares fueron comparables, aunque el capilar de 0.25 mm de d.i. y 0.25 μm de espesor de capa proporcionó valores inferiores, sobretodo para los compuestos organofosforados.

En la **Tabla 40** también se indican los LDDs establecidos a través de la inyección directa de 2 μL de disoluciones estándar en la columna de CL. Puede deducirse que para la mayoría de los analitos los LDDs se redujeron significativamente mediante las aproximaciones de SPME en tubo respecto al método de inyección directa.

La exactitud de los procedimientos de SPME en tubo descritos en el **Apéndice 11** se estudió procesando patrones de los analitos (100 $\mu\text{g/L}$ de cada uno). A partir de las ecuaciones de calibración indicadas en la **Tabla 40** se establecieron las concentraciones de los analitos en esas disoluciones. Se observaron errores relativos $\leq 20\%$, y por tanto se puede concluir que los métodos proporcionaron adecuada exactitud.

Tabla 40. Datos analíticos obtenidos con las dos columnas ensayadas (los datos correspondientes a las triazinas se han extraído del trabajo anterior, apartado Características analíticas, página 186).

Analito	LDD ^a Inyec. direct. ng/mL	Capilar de 0.1 mm d.i. - 0.1 μm espesor de sorbente				Capilar 0.25 mm d.i. - 0.25 μm espesor de sorbente			
		Linealidad (n=5) $y = a + bx$	Reproducib. ^b C.V.(%)		LDD ng/mL	Linealidad (n=5) $y = a + bx$	Reproducib. ^b C.V.(%)		LDD ng/mL
			Intra- día (n=3)	Inter- día (n=6)			Intra- día (n=3)	Inter- día (n=6)	
Simazina	2.5	$a \pm s_a: 60 \pm 30$ $b \pm s_b: 2620 \pm 120$ $R^2 = 0.99$	12	13	0.1	$a \pm s_a: -6 \pm 10$ $b \pm s_b: 3450 \pm 40$ $R^2 = 0.99$	17	16	0.1
Atrazina	5	$a \pm s_a: 156 \pm 5$ $b \pm s_b: 550 \pm 20$ $R^2 = 0.99$	0.9	10	0.1	$a \pm s_a: 107 \pm 16$ $b \pm s_b: 1500 \pm 70$ $R^2 = 0.99$	16	19	0.1
Propazina	25	$a \pm s_a: 33 \pm 3$ $b \pm s_b: 317 \pm 13$ $R^2 = 0.99$	8	23	1	$a \pm s_a: 18 \pm 4$ $b \pm s_b: 257 \pm 15$ $R^2 = 0.99$	20	21	0.5
Ametrin	6.25	$a \pm s_a: 270 \pm 90$ $b \pm s_b: 7500 \pm 400$ $R^2 = 0.99$	8	17	0.1	$a \pm s_a: 540 \pm 140$ $b \pm s_b: 11200 \pm 600$ $R^2 = 0.99$	10	8	0.1
Prometrin	50	$a \pm s_a: 90 \pm 16$ $b \pm s_b: 1230 \pm 70$ $R^2 = 0.99$	4	9	0.1	$a \pm s_a: 109 \pm 30$ $b \pm s_b: 1600 \pm 130$ $R^2 = 0.98$	6	13	0.1
Terbutrin	20	$a \pm s_a: 140 \pm 50$ $b \pm s_b: 3500 \pm 200$ $R^2 = 0.99$	4	6	0.1	$a \pm s_a: 290 \pm 70$ $b \pm s_b: 3000 \pm 300$ $R^2 = 0.98$	4	8	0.1

Tabla 40 (Continuación).

Analito	LDD ^a Inyec. direct. ng/mL	Capilar de 0.1 mm d.i. - 0.1 µm espesor de sorbente			Capilar 0.25 mm d.i. - 0.25 µm espesor de sorbente			LDD ng/mL	
		Linealidad (n= 5) y= a + bx	Reproducib. ^b C.V.(%)		LDD ng/mL	Linealidad (n= 5) y= a + bx	Reproducib. ^b C.V.(%)		
			Intra- día (n= 3)	Inter- día (n= 6)			Intra- día (n= 3)		Inter- día (n= 6)
Fensulfotión	50	a ± s _a : 40 ± 6 b ± s _b : 780 ± 30 R ² = 0.99	7	10	1	a ± s _a : 2 ± 20 b ± s _b : 880 ± 90 R ² = 0.97	29	28	1
Fenamifos	100	a ± s _a : 52 ± 5 b ± s _b : 970 ± 20 R ² = 0.99	4	12	1	a ± s _a : 74 ± 17 b ± s _b : 900 ± 70 R ² = 0.98	4	9	1
Paration	100	a ± s _a : 30 ± 10 b ± s _b : 680 ± 30 R ² = 0.99	11	15	1	a ± s _a : 10 ± 14 b ± s _b : 900 ± 60 R ² = 0.99	18	13	1
Malation	1000	a ± s _a : 3.6 ± 1.1 b ± s _b : 91 ± 5 R ² = 0.99	8	18	10	a ± s _a : 7.3 ± 0.5 b ± s _b : 45.2 ± 1.7 R ² = 0.99	12	25	10
Fenitrotión	100	a ± s _a : 70 ± 30 b ± s _b : 1075 ± 115 R ² = 0.97	4	19	5	a ± s _a : 30 ± 40 b ± s _b : 1800 ± 160 R ² = 0.97	9	16	0.1
Clorfenvinfos	100	a ± s _a : 100.5 ± 14.5 b ± s _b : 731 ± 61 R ² = 0.98	3	14	5	a ± s _a : 104 ± 17 b ± s _b : 1120 ± 70 R ² = 0.99	3	11	1
Fention	100	a ± s _a : 150 ± 50 b ± s _b : 2100 ± 200 R ² = 0.97	4	17	1	a ± s _a : 270 ± 50 b ± s _b : 5100 ± 200 R ² = 0.97	9	8	0.1
Fonofos	50	a ± s _a : 140 ± 30 b ± s _b : 3070 ± 119 R ² = 0.99	4	10	0.1	a ± s _a : 350 ± 40 b ± s _b : 8900 ± 200 R ² = 0.99	7	16	0.1
Clorpirifos	50	a ± s _a : -40 ± 20 b ± s _b : 5158.5 ± 100.9 R ² = 0.99	11	25	1	a ± s _a : 60 ± 30 b ± s _b : 15000 ± 120 R ² = 0.99	4	16	0.1
Trifluralina	50	a ± s _a : -90 ± 50 b ± s _b : 6700 ± 200 R ² = 0.99	19	14	1	a ± s _a : -200 ± 100 b ± s _b : 20800 ± 400 R ² = 0.99	8	15	0.1

(a)- obtenido de la inyección directa de 2 µL de patrones en la columna de CL capilar

(b)- establecido a una concentración de 0.1 µg/mL

Además, diferentes muestras reales de agua, agua de campo (S1), agua de río (S2), agua subterránea (S3) y agua de riego (S4) fueron aditivadas con las triazinas y los pesticidas organofosforados a una concentración de 100 µg/L de cada compuesto, y se procesaron en las condiciones descritas para evaluar posibles errores sistemáticos. Las concentraciones de los analitos, calculadas a partir de las ecuaciones de calibración de la **Tabla 40**, estaban próximas a las concentraciones reales, lo que confirmó que los métodos propuestos proporcionaron exactitud adecuada. Además no se detectó efecto matriz en ninguna de las muestras de agua analizadas.

La selectividad se estudió procesando disoluciones estándar de otros contaminantes potencialmente presentes en agua, como PAHs, nonilfenol, pesticidas organoclorados y PBDEs. Los compuestos ensayados están resumidos en la **Tabla 41**. Todos los compuestos probados se detectaron en los cromatogramas, lo que significa que también fueron extraídos mediante la aproximación de SPME en tubo. Sin embargo, la mayoría de ellos fueron eluidos a tiempos de retención diferentes a los de los analitos (ver **Tabla 41**), y por tanto no interfirieron en la determinación de las triazinas y los pesticidas organofosforados. Como ejemplo, en la **Figura 75e** se presenta el cromatograma obtenido para una mezcla de PAHs y nonilfenol. Puesto que los PAHs y el nonilfenol presentan fluorescencia natural, fue posible la identificación selectiva de los analitos mediante el acoplamiento en serie de un detector de fluorescencia.

Aplicación a muestras reales

Se ensayaron diversas muestras de agua residual (S5-S26) recogidas en diferentes puntos a lo largo de la costa de la Comunidad Valenciana, usando la columna capilar de 0.25 mm de d.i. y 0.25 µm de espesor de sorbente para realizar la SPME en tubo. Las concentraciones de los analitos en estas muestras se caracterizaron por la incertidumbre expandida ($K=2$) calculada con la Guía de Cuantificación de la Incertidumbre en Medidas Analíticas EURACHEM/CITAC, segunda edición QUAM. P1 [30]. Los resultados obtenidos están resumidos en la **Tabla 41**. Como se observa en esta tabla, se encontró atrazina en S5 a un nivel de concentración superior al fijado por las Normas de Calidad Ambiental. La propazina se encontró en las muestras S8-S10 y S12, y ametrin se encontró en las muestras S7, S10 y S24. Los pesticidas organofosforados fenamifos y paration se encontraron en la muestra S12, el fenitrotion se encontró en la muestra S10, y el fention se encontró en las muestras S5-S7 y S10. El fonofos fue el compuesto más comunmente encontrado, ya que se detectó en doce de las muestras ensayadas (S6, S8, S9, S10, S14, S15, S16, S18, S19, S22, S24 y S26). Como ejemplo, en la **Figura 76** se muestran los cromatogramas obtenidos para la muestra S10, que contenía algunas de las triazinas y compuestos organofosforados incluidos en este estudio. En la **Figura 77** se presentan los cromatogramas obtenidos para distintas muestras que contenían algunos de los analitos estudiados.

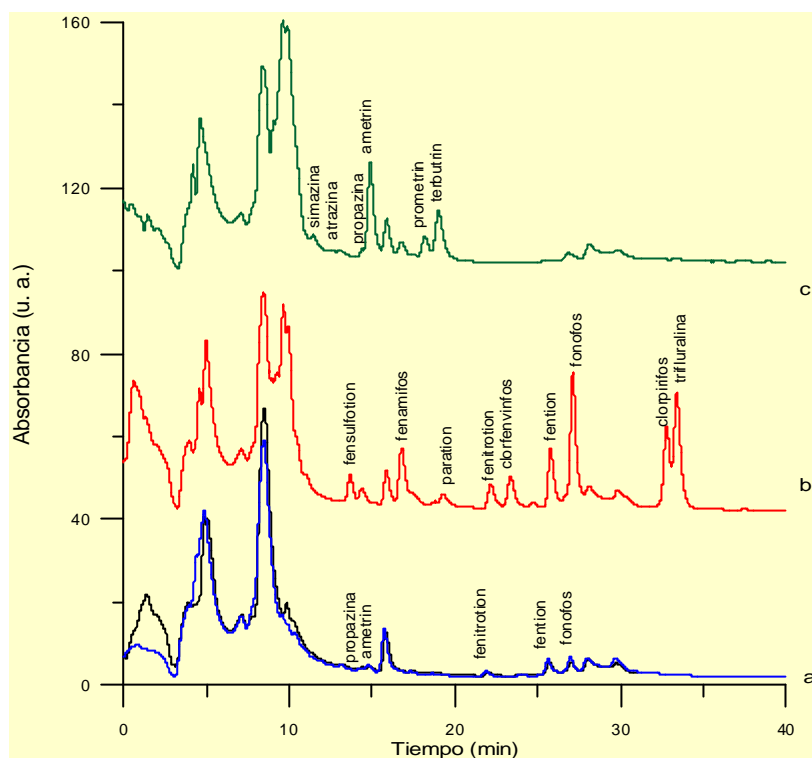


Figura 76. Cromatogramas obtenidos en las condiciones óptimas con el capilar de 0.25 mm de d.i. y 0.25 mm de espesor de capa para (a) dos réplicas de la muestra S10, (b) muestra S10 aditivada con los pesticidas organofosforados (0.1 mg/mL de cada uno), y (c) muestra S10 aditivada con las triazinas (0.05 mg/mL de cada una). Para más detalles experimentales, ver el **Apéndice 11**.

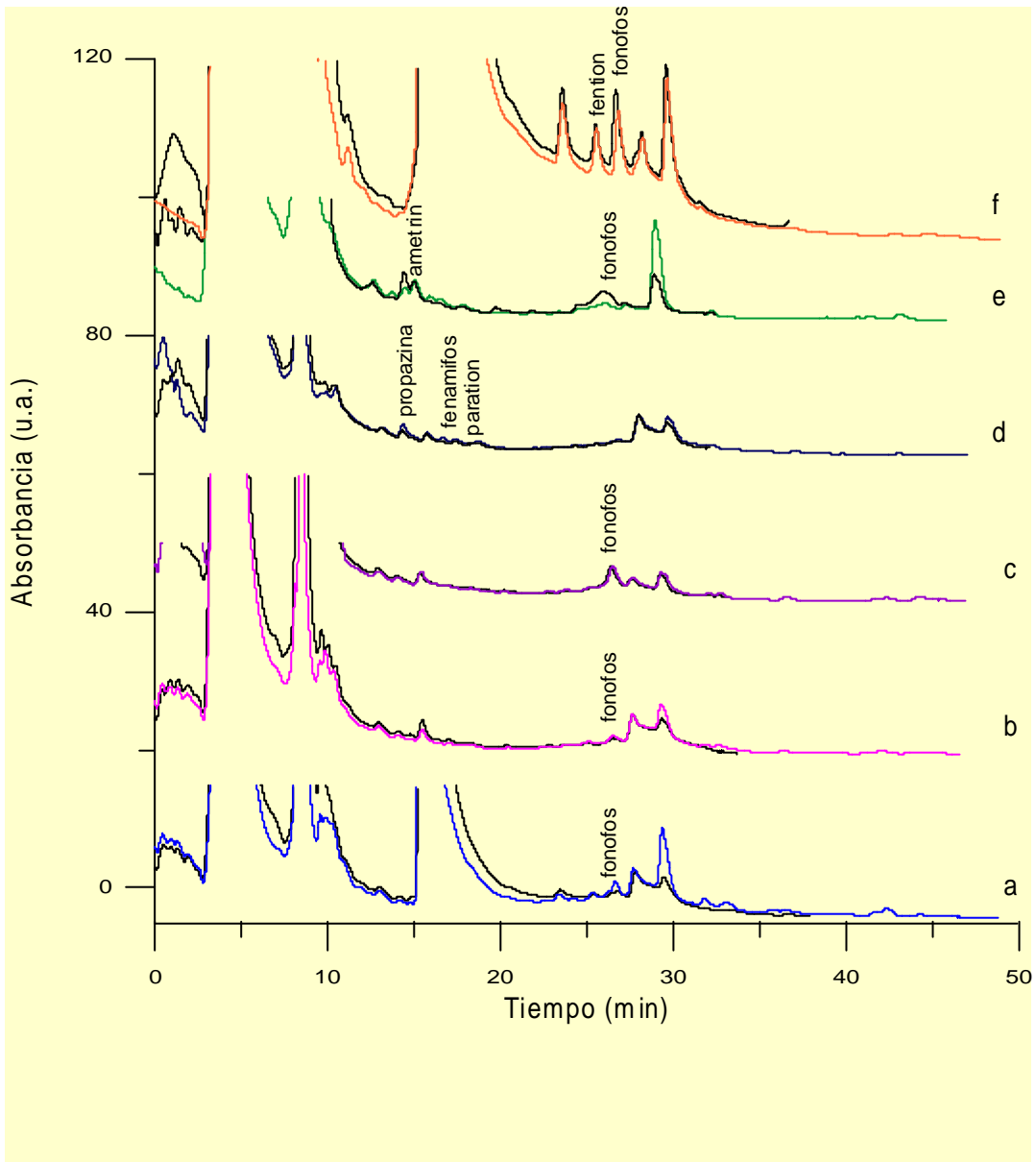


Figura 77. Cromatogramas obtenidos en las condiciones óptimas para diferentes muestras de agua residual: (a) S14, (b) S16, (c) S18, (d) S12, (e) S24 y (f) S6

Tabla 41. Resumen de los tiempos de retención y concentraciones encontradas de los analitos y otros contaminantes potenciales en muestras reales de agua mediante el método de SPME en tubo con una columna capilar abierta de 0.25 mm de d.i. y 0.25 mm de espesor de sorbente.

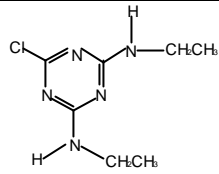
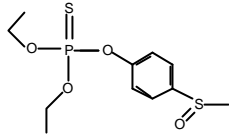
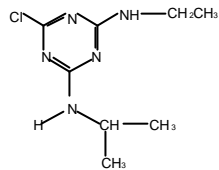
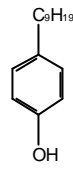
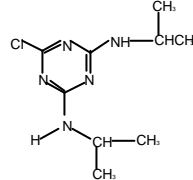
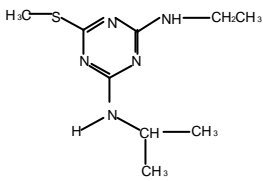
Compuesto	t _R (min)	Concentración encontrada en muestras (µg/L)	Estructura
Simazina ^{2,3,*}	10,9	-	
Fensulfotión	11,86	-	
Atrazina ^{2,3,*}	12,39	S5: 29 ± 6	
Nonilfenol ³	12,87	-	
Propazina	13,54	S8: 33 ± 8 S9: 16 ± 5 S10: 3 ± 1 S12: 28 ± 8	
Ametrin [*] (fluorescente)	14,57	S7: 0.70 ± 0.1 S10: 5.5 ± 0.6 S24: 4 ± 1	

Tabla 41 (Continuación).

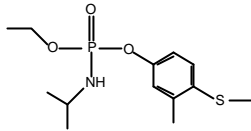
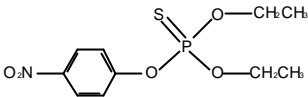
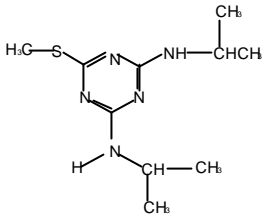
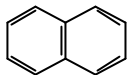
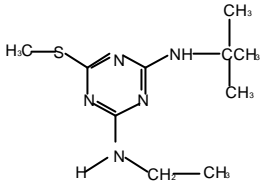
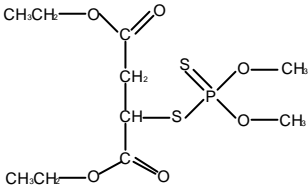
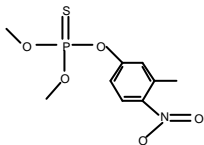
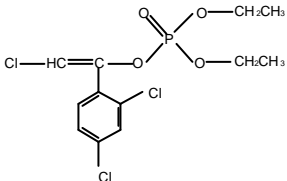
Compuesto	t _R (min)	Concentración encontrada en muestras (µg/L)	Estructura
Fenamifos ^	14,97	S12: 4 ± 1	
Paration *	17,60	S12: 28 ± 8	
Prometrin	17,84	-	
Naftaleno ^{2,3} (fluorescente)	18,59	-	
Terbutrin *	18,83	-	
Malation ^	19,80	-	
Fenitrothion ^	20,58	S10: 23 ± 8	
Clorfenvinfos ^{3,*}	21,74	-	

Tabla 41 (Continuación).

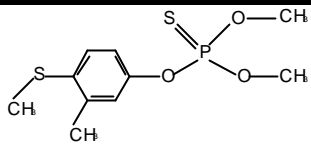
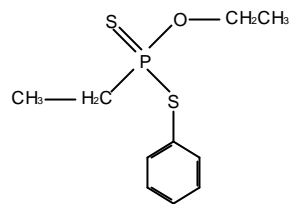
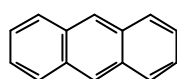
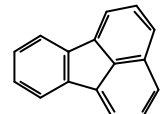
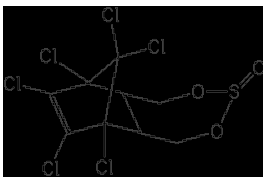
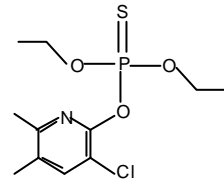
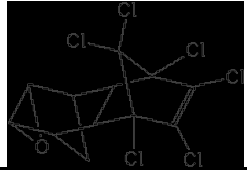
Compuesto	t _R (min)	Concentración encontrada en muestras (µg/L)	Estructura
Fention [*]	24,25	S5: 16 ± 2 S6: 136 ± 15 S7: 2.9 ± 0.3 S10: 34 ± 4	
Fonofos [*]	25,59	S6: 33 ± 7 S8: 8 ± 3 S9: 6 ± 2 S10: 1.0 ± 0.4 S14: 0.8 ± 0.3 S15: 16 ± 5 S16: 15 ± 5 S18: 22 ± 6 S19: 18 ± 6 S22: 2.3 ± 0.7 S24: 4 ± 1 S26: 5 ± 1	
Antraceno ³ (fluorescente)	26,6	-	
Fluoranteno ³ (fluorescente)	28,33	-	
Endosulfan ^{3,*}	29,48	-	
Clorpirifos ^{1,3,*}	31,24	-	
Dieldrin	31,50	-	

Tabla 41 (Continuación).

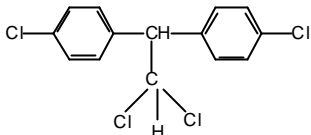
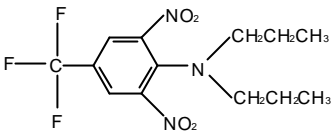
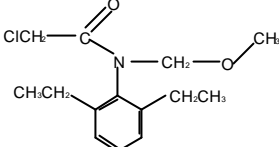
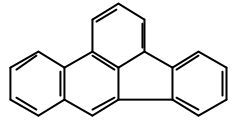
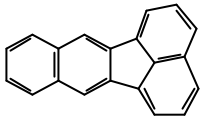
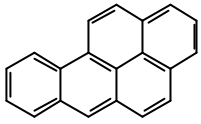
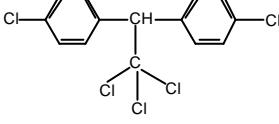
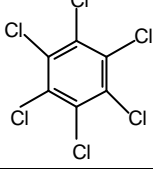
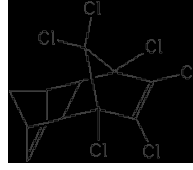
Compuesto	t _R (min)	Concentración encontrada en muestras (µg/L)	Estructura
DDD	31,87	-	
Trifluralina ³	31,93	-	
Alaclor ³	32,82	-	
Benzo(b)fluoranteno ³ (fluorescente)	36,20	-	
Benzo(k)fluoranteno ³ (fluorescente)	37,15	-	
Benzo(a)pireno (fluorescente)	37,74	-	
DDT	38,06	-	
Hexaclorobenceno ³	39,44	-	
Isodrin	40,16	-	

Tabla 41 (Continuación).

Compuesto	t _R (min)	Concentración encontrada en muestras (µg/L)	Estructura
DDE	40,51	-	
Lindano *	40,56	-	
BDE-47	41,36	-	
Aldrin	43,86	-	
Indeno(1,2,3-cd)pireno ³ (fluorescente)	44,22	-	
Benzo(g,h,i)perileno ³ (fluorescente)	46,50	-	
BDE-100	48,54	-	
BDE-99	50,91	-	

¹ Sustancia activa incluida en anexo 1 de la Directiva 91/414/CEE, modificada por la Directiva 2005/53/CE

* Sustancia activa excluida del Anexo 1 de la Directiva 91/414/CEE, modificada por la Directiva 2005/53/CE

^ Sustancia activa pendiente de la revision de la comunidad de la Directiva 91/414/CEE, modificada por la Directiva 2005/53/CE

² II List: Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y Decisión 2455/2001/CE

³ Lista Prioritaria: Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y Decisión 2455/2001/

Conclusiones

Este trabajo describe un método en línea para llevar a cabo el screening de triazinas y pesticidas organofosforados en agua usando SPME en tubo y CL capilar. El montaje de SPME en tubo usado permite el enriquecimiento en línea de los analitos con las ventajas de requerir una mínima manipulación de la muestra, bajo coste, un reducido tiempo de análisis y una elevada sensibilidad (los LDDs se han reducido considerablemente respecto al método de inyección directa de los analitos). Además con las condiciones propuestas no se observaron efectos de la matriz ni interferencias debidas a otros contaminantes potencialmente presentes en agua, como PAHs, nonilfenol, pesticidas organoclorados o PBDEs.

El procedimiento propuesto es muy simple y permite la identificación y la cuantificación de los analitos en concentraciones del orden de las ppb. Por tanto, es adecuado para controlar la calidad del agua por lo que se refiere a la presencia de triazinas y de pesticidas organofosforados de acuerdo con los máximos niveles de concentración establecidos en las regulaciones de la UE.

3.4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] J. Verdú-Andrés, P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández, *Chromatographia* 55 (2002) 129.
- [2] P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández, A. Sevillano-Cabeza, I. Trümpler, *Analytica Chimica Acta* 344 (1997) 125.
- [3] P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández, I. D. Wilson (Ed.), *Encyclopedia of Separation Science*, Academic Press (2000) 743.
- [4] B. Sahasrabudhey, A. Jain, K. Verma, *The Analyst* 124 (1999) 1017.
- [5] H. Gu, H.-M. Ma, S.-C. Liang, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 371 (2001) 570.
- [6] F. Sacher, S. Lenz, H.-J. Brauch, *Journal of Chromatography A* 764 (1997) 85.
- [7] M. Rodríguez, M. J. González, A. J. Miranda, P. Muñón, *Journal of Chromatography A* 721 (1996) 231.
- [8] T. Teerlink, M. W. T. Hennekes, C. Mulder, H. F. H. Brulez, *Journal of Chromatography B* 691 (1997) 269.
- [9] I. Poels, L. J. Nagels, *Analytica Chimica Acta* 440 (2001) 89.
- [10] Y. Moliner-Martínez, P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández, J. Verdú-Andrés, *Analytica Chimica Acta* 502 (2004) 235.
- [11] D. Heems, G. Luck, C. Fraudeau, E. Vérette, *Journal of Chromatography A* 798 (1998) 9.
- [12] P. Herbert, P. Barros, N. Ratola, A. Alves, *Journal of Food Science* 65 (2000) 1130.
- [13] Z. M. Siddiqi, D. Pathania, *Talanta* 60 (2003) 1197.
- [14] R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, *The Analyst* 125 (2000) 1071.
- [15] J. Verdú-Andrés, P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández, *The Analyst* 126 (2001) 1683.
- [16] G. A. Mills, V. Walker, H. Mughal, *Journal of Chromatography B* 723 (1999) 281.
- [17] T. Mushiroda, T. Yokoi, E. Takahara, O. Nagata, H. Kato, T. Kamataki, *J. Chromatography B* 734 (1999) 319.
- [18] C. Aguilar, H.-G. Janssen, C. A. Cramers, *Journal of Chromatography A* 867 (2000) 207.
- [19] Y.-C. Chien, S.-N. Uang, C.-T. Kuo, T.-S. Shih, J.-F. Jen, *Analytica Chimica Acta* 419 (2000) 73.
- [20] N. Adhoum, L. Monser, S. Sadok, A. El-Abed, G. M. Greenway, R. F. Uglow, *Analytica Chimica Acta* 478 (2003) 53.
- [21] X. Liu, H. Wang, S.-C. Liang, H.-S. Zhang, *Analytica Chimica Acta* 441 (2001) 45.
- [22] OSHA, Method Number PV 2060, Organic Service Branch I, Salt Lake City, UT, 1993.
- [23] N. A. Santagati, E. Bousquet, A. Spadaro, G. Ronsisvalle, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 29 (2002) 1105.
- [24] L. Groenberg, P. Loevkvist, J. A. Joensson, *Chemosphere* 24 (1992) 1533.
- [25] C. Cháfer-Pericás, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, *Journal of Chromatography A* 1023 (2004) 27.
- [26] L. Pan, M. Chong, J. Pawliszyn, *Journal of Chromatography A* 773 (1997) 249.
- [27] C. Cháfer-Pericás, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, *Journal of Chromatography A* 1042 (2004) 219.

- [28] R. Herráez-Hernández, C. Cháfer-Pericás, P. Campins-Falcó, *Analytica Chimica Acta* 513 (2004) 425.
- [29] C. Cháfer-Pericás, R. Herráez-Hernández, P. Campins-Falcó, *Talanta* 66 (2005) 1139.
- [30] EURACHEM/CITAC (1995), Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 2nd ed., 2000.
- [31] J. M. Rosenfeld, *Journal of Chromatography A* 843 (1999) 19.
- [32] E. E. Stashenko, J. R. Martínez, *Trends in Analytical Chemistry* 23 (2004) 553.
- [33] H. Wang, J. Li, X. Liu, H.-S. Zhang, *Analytica Chimica Acta* 423 (2000) 77.
- [34] L. Cai, Y. Zhao, S. Gong, L. Dong, C. Wu, *Chromatographia* 58 (2003) 615.
- [35] D. L. Massart, BGM Vandeginste, LMC Buydens, S. De Jong, P. J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*, Part A, Elsevier Science, Amsterdam, 1997.
- [36] R. Herráez-Hernández, P. Campins-Falcó, J. Verdú-Andrés, *The Analyst* 126 (2001) 581.
- [37] R. Herráez-Hernández, P. Campins-Falcó, A. Sevillano-Cabeza, *Analytical Chemistry* 68 (1996) 734.
- [38] H. Grefslie Ugland, M. Krogh, K. Rasmussen, *Journal of Chromatography B* 701 (1997) 29.
- [39] E. H. M. Koster, C. H. P. Bruins, G. J. de Jong, *The Analyst* 127 (2002) 598.
- [40] M.-R. Lee, Y.-S. Song, B.-H. Hwang, C.-C. Chou, *Journal of Chromatography A* 896 (2000) 265.
- [41] K. Okajima, A. Namera, M. yashiki, I. Tsukue, T. Kojima, *Forensic Science Internacional* 116 (2001) 15.
- [42] N. Samyn, G. De Boeck, M. Wood, C. Lamers, D. De Waard, K. Brookhuis, A. Verstraete, W. Riedel, *Forensic Science Internacional* 128 (2002) 90.
- [43] M.-K. Huang, C. Liu, S.-D. Huang, *The Analyst* 127 (2002) 1203.
- [44] M. Yonamine, N. Tawil, R. L. de Moraes Moreau, O. A. Silva, *Journal of Chromatography B* 789 (2003) 73.
- [45] M. Pujadas, S. Pichini, S. Poudevida, E. Menoyo, P. Zuccaro, M. Farré, R. de la Torre, *Journal of Chromatography B* 798 (2003) 249.
- [46] R. Herráez-Hernández, P. Campins-Falcó, J. Verdú-Andrés, *Chromatographia* 56 (2002) 559.
- [47] M. Pumera, M. Flegel, L. Lepsa, I. Jelinek, *Electrophoresis* 23 (2002) 2449.
- [48] R. Herráez-Hernández, P. Campins-Falcó, A. Sevillano-Cabeza, *Journal of Chromatography Science* 35 (1997) 169.
- [49] M. D. Pastor, R. Porras, R. Herráez-Hernández, P. Campins-Falcó, *The Analyst* 123 (1998) 319.
- [50] C. Cháfer-Pericás, R. Herráez-Hernández, P. Campins-Falcó, *Analytical Biochemistry* 333 (2004) 328.
- [51] T. Kraemer, H. H. Maurer, *Journal of Chromatography B* 713 (1998) 163.
- [52] R.D. 2000/60/CE modificado por la Decisión 2455/2001/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de Noviembre 2001, DOCE nº L 331 (2001).
- [53] Directiva 76/464/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 18 de Mayo de 1976, DO nº L 129 (1976) R.D. 995/2000.
- [54] F. J. Santos, M. T. Galceran, *Trends in Analytical Chemistry*, 21 (2002) 672.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [55] R. Kubinec, J. Adamuscin, J. Jurdáková, M. Foltin, I. Ostrovský, A. Kraus, L. Soják, *Journal of Chromatography A* 1084 (2005) 90.
- [56] J. C. Flórez, M. L. Fernández, J. E. Sánchez, E. Fernández, A. Sanz-Mendel, *Analytica Chimica Acta* 415 (2000) 9.
- [57] X. Jiang, C. Basheer, J. Zhang, H. Lee, *Journal of Chromatography A* 1087 (2005) 289.
- [58] K. L. Yang, C. H. Lai, J. L. Wang, *Journal of Chromatography A* 1027 (2004) 41.
- [59] A. Khaled, J. Pawliszyn, *Journal of Chromatography A* 892 (2000) 455.
- [60] J. Wu, J. Pawliszyn, *Journal of Chromatography A* 909 (2001) 37.
- [61] O. Ezquerro, G. Ortiz, B. Pons, M. T. Tena, *Journal of Chromatography A* 1035 (2004) 17.
- [62] O. Ezquerro, B. Pons, M. T. Tena, *Journal of Chromatography A* 1020 (2003) 189.
- [63] I. Arambari, M. Lasa, R. García, E. Millán, *Journal of Chromatography A* 1033 (2004) 193.
- [64] T. Nilsson, F. Pelusio, L. Montanarella, B. Larsen, S. Facchetti, J. Madsen, *Journal of high resolution chromatography*, 18 (1995) 617.
- [65] M. A. Nelson, A. Gates, M. Dodlinger, D. Hage, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 805.
- [66] R. Tajuddin, R. M. Smith, *Journal of Chromatography A* 1084 (2005) 194.
- [67] S-D. Huang, H-I. Huang, Y-H. Sung, *Talanta* 64 (2004) 887.
- [68] J. Hu, T. Aizawa, M. Asami, Y. Magara, *Water Science and Technology* 38 (1998) 169.
- [69] G. M. Pinto, I. C. Jardim, *Journal of Chromatography A* 869 (2000) 463.
- [70] A. Asperger, J. Efer, T. Koal, W. Engewald, *Journal of Chromatography A* 960 (2002) 109.
- [71] M. S. Dopico, M. V. González, J. M. Castro, E. González, J. Pérez, M. Rodríguez, A. Calleja, J. M. L. Vilariño, *Talanta* 59 (2003) 561.
- [72] Z. Cai, D. Wang, W. T. Ma, *Analytica Chimica Acta* 503 (2004) 263.
- [73] C. Gonçalves, M. F. Alpendurada, *Journal of Chromatography A* 963 (2002) 19.
- [74] S. Frías, M. A. Rodríguez, J. E. Conde, J. P. Pérez-Trujillo, *Journal of Chromatography A* 1007 (2003) 127.
- [75] J. M. Nogueira, T. Sandra, P. Sandra, *Analytica Chimica Acta* 505 (2004) 209.
- [76] G. Shen, H. K. Lee, *Analytical Chemistry* 74 (2002) 648.
- [77] F. Hernández, J. Beltran, F. J. López, J. V. Gaspar, *Analytical Chemistry* 72 (2000) 2313.
- [78] M. Pérez, J. Alario, A. Vázquez, J. Villén, *Analytical Chemistry* 72 (2000) 846.
- [79] K. Vandecasteele, I. Gaus, W. Debreuck, K. Walraevens, *Analytical Chemistry* 72 (2000) 3093.
- [80] Q. Zhou, J. Xiao, W. Wang, G. Liu, Q. Shi, J. Wang, *Talanta* 68 (2006) 1309.
- [81] R. Carabias, E. Rodríguez, E. Herrero, *Journal of Chromatography A* 1085 (2005) 199.
- [82] W. T. Ma, K. K. Fu, Z. Cai, G. B. Jiang, *Chemosphere* 52 (2003) 1627.
- [83] R. Carabias, E. Rodríguez, E. Fernández, F. J. Sánchez, *Journal of Chromatography A* 869 (2000) 471.
- [84] J. Dugay, C. Miêge, M. C. Hennion, *Journal of Chromatography A* 795 (1998) 27.
- [85] B. Ballesteros, D. Barceló, A. Dankwardt, P. Scheneider, M. P. Marco, *Analytica Chimica Acta* 475 (2003) 105.

4. CONCLUSIONES FINALES

4.1. CONCLUSIONES GENERALES

Los trabajos presentados en esta Tesis pretenden aportar nuevas metodologías basadas en tres diferentes tipos de acoplamiento entre la SPME y la cromatografía. Estos procedimientos se han aplicado al análisis de aminas alifáticas de cadena corta, triazinas, anfetaminas, VOCs y compuestos organofosforados en diferentes tipos de matrices (agua, aire, orina). Las características y los pasos analíticos cuyo estudio se ha resaltado en mayor medida, se reflejan en la **Tabla 42**.

Tabla 42. Principales características de los métodos propuestos en esta Tesis.

		TMA-FMOC-CL	MA-FMOC-CL	DMA-FMOC-CL	Aminas-FMOC-CL	Anfetaminas-FMOC-CL	Anfetaminas-OPA/NAC-CL	VOCs-CG	Triazinas-CL	Triazinas-CL capilar	Organofosforados-CL capilar
Tipo de muestra	Agua	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Aire	X									
	Orina					X	X				
Preconcentración SPME	Inmersión fibras	X	X	X	X	X	X		X		
	HS (espacio cabeza) fibras							X			
	En tubo abierto									X	X
	En tubo empaquetado									X	
Preconcentración SPE	En línea	X	X	X	X	X	X		X		
	Fuera de línea	X									
Tipos de sorbentes	C ₁₈ (SPE)	X	X	X	X	X	X		X	X	
	CW-TPR	X	X	X	X	X	X				
	PDMS-DVB							X			
	PDMS-PDFS									X	X
Tipo de derivatización	En línea	X									
	En disolución				X	X	X				
	Sobre la fibra	X	X	X	X	X					
Detección	UV	X							X	X	X
	Fluorescencia	X	X	X	X	X	X				
	FID							X			
Interferentes	X		X								
Validación del método	Recuperación	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Método referencia		X								

CONCLUSIONES GENERALES

Se han analizado muestras cuyas matrices presentan características muy distintas. Las muestras de agua estudiadas abarcan una pequeña parte de la gran variedad que podemos encontrar: agua de consumo, de riego, de mar, de río, residual, industrial, subterránea, de campo y de depuradora. Las muestras reales de aire estudiadas fueron aire del laboratorio y aire de un mercado de pescado, y las muestras sintéticas se prepararon contaminando el aire encerrado en el interior de una cámara. Algunas muestras de orina fueron aditivadas con los analitos y otras fueron tomadas tras la ingestión de un medicamento.

La preconcentración mediante SPME puede realizarse a través de la inmersión de la fibra directamente en la muestra, como se hizo en la primera parte de la Tesis, mediante la exposición de la fibra en el espacio de cabeza de la muestra, como se hizo en la segunda parte de la Tesis, o bien en línea, como se presenta en la tercera parte de la Tesis.

En la primera parte de la Tesis se estudió la **derivatización** antes, durante o después de la SPME con fibras, acoplada a CL convencional. La derivatización proporcionó una fuente de señal detectable en fluorescencia o en UV. De este modo se mejoró la sensibilidad, la preparación de la muestra y la separación cromatográfica. Los reactivos con grupos fluoróforos o cromóforos que se emplearon fueron FMOC y OPA-NAC éste último sólo para grupos amino primarios. El tipo de derivatización se eligió en función de la polaridad del analito, del reactivo y del tipo de matriz. En esta Tesis se han presentado tres modos de derivatización:

- Derivatización sobre soporte sólido conectado en línea a la columna analítica. Se aplicó a la determinación de TMA en agua y en aire tras su preconcentración en cartuchos de SPE. Este tipo de derivatización tiene algunas ventajas respecto a la derivatización en disolución como son la reducción del tiempo de reacción (tiempo de análisis), la utilización de concentraciones más bajas de reactivo, y la mejora de la selectividad y de la sensibilidad.
- Derivatización en disolución seguida de la SPME de los derivados. Presentó buenos resultados en su aplicación a la determinación de anfetaminas en orina con FMOC y a la determinación de anfetaminas primarias tanto en agua como en orina con OPA-NAC. Los derivados FMOC-anfetamina presentan mayor afinidad por el sorbente que las anfetaminas no derivatizadas, incluso mayor que la mayor parte de los componentes de la orina. La afinidad de los derivados OPA-NAC por el sorbente de la fibra también es significativamente mayor que las de las anfetaminas no derivatizadas y/o que la del propio OPA-NAC, lo cual puede explicarse por las polaridades relativamente elevadas de las anfetaminas y del OPA-NAC comparadas con la polaridad de sus respectivos derivados isoindólicos.
- Derivatización sobre la fibra de SPME. Este tipo de derivatización puede llevarse a cabo de dos formas distintas. Efectuando la SPME del analito seguida de la derivatización sobre la fibra, o bien realizando el muestreo/derivatización sobre la fibra previamente cargada con el reactivo. El primer procedimiento se aplicó a la determinación de la MA,

la DMA y las anfetaminas con FMOC en agua, proporcionando resultados similares a los obtenidos mediante la derivatización en disolución seguida de la SPME. Sin embargo, el segundo procedimiento proporcionó mayor eficacia de extracción en la determinación de la MA, la DMA y la TMA, ya que las fibras pueden cargarse con una gran cantidad de reactivo FMOC como consecuencia de su baja polaridad.

En la segunda parte de la Tesis se estudió el acoplamiento de la **SPME con la CG**. Se determinaron los VOCs presentes en muestras de agua mediante muestreo en el espacio de cabeza. La principal ventaja de este tipo de muestreo es la ausencia de efecto matriz, así como la elevada selectividad y sensibilidad conseguidas. También se estudió el efecto de la etapa de filtrado de las muestras de agua. Se ha puesto de relieve la necesidad de no filtrar la muestra para obtener resultados adecuados para este tipo de compuestos.

En la tercera parte de la Tesis se estudió el acoplamiento de la **SPME en tubo con la CL capilar**. Este tipo de cromatografía permite la minimización del consumo de disolventes de la fase móvil y el aumento en la sensibilidad del procedimiento, especialmente si se acopla a una etapa de preparación de la muestra que permita la inyección de grandes volúmenes de muestra. En esta Tesis se presentan dos modos de SPME en tubo:

- SPME en precolumna capilar empaquetada conectada a la columna analítica capilar mediante una válvula de conmutación. Se aplicó a la determinación de triazinas en agua y permitió la inyección de 100 μL de muestra en el sistema, obteniendo una eficacia de entre el 40 y el 130 %.
- Preconcentración mediante SPME en tubo abierto. Se aplicó a la determinación de triazinas y compuestos organofosforados inyectando 1 mL de muestra. La eficacia de la extracción es mayor cuanto mayor es el espesor de la capa de sorbente que recubre el interior del capilar en el que se lleva a cabo la extracción.

Mediante este tercer tipo de acoplamiento estudiado se realizó un screening de triazinas y compuestos organofosforados en agua. Las principales ventajas de la SPME en tubo son el elevado grado de automatización, y el hecho de no ser un método caro.

Por último, los métodos propuestos se han validado mediante estudios de recuperación sobre muestras reales. Además, el procedimiento de determinación de MA mediante SPME-CL convencional se ha validado utilizando como método de referencia el de extracción y posterior derivatización fuera de línea empleando cartuchos de SPE de tipo C_{18} . En todos los casos se obtuvieron resultados exactos.

CONCLUSIONES GENERALES

Análisis de muestras líquidas

Las principales ventajas analíticas que presentan los métodos propuestos para el análisis de muestras de agua y de orina se reflejan en la **Tabla 43**.

*Tabla 43. Ventajas de los métodos propuestos para el análisis de muestras líquidas (a mayor número de asteriscos *, mejor condición).*

Características analíticas	TMA-FMOC-CL	MA-FMOC-CL	DMA-FMOC-CL	Aminas-FMOC-CL (óptimo)	Anfetaminas-FMOC-CL
Bajo consumo de reactivos	En línea: *** SPME:**	**	**	**	**
Sencillez de la instrumentación	En línea: *** SPME:**	**	**	**	**
Selectividad	En línea: Sí SPME: No	Sí	Sí	No	Sí
Precisión CV (%)	En línea: 11-13 SPME:7-23	7-15	7-16	2-24	1-21
Exactitud E_r (%)	En línea: 0.6-16 SPME:16-20	2-10	0-20	22-2	0.16-23
Límite de detección (mg/L)	En línea: 5 SPME:250	750	300	5-250	100-1000
Intervalo lineal (mg/L)	En línea: 50-1000 SPME:1000-10000	2500-10000	1000-10000	100-10000	1000-10000
Grado de automatización	En línea: ** SPME:***	***	***	***	***
Rapidez (muestras/hora)	En línea: 3 SPME:2	4	2	2	3

Tabla 43 (continuación). Ventajas de los métodos propuestos para el análisis de muestras líquidas (a mayor número de asteriscos *, mejor condición).

Características analíticas	Anfetaminas-OPA/NAC-CL	VOCs-CG	Triazinas-CL	Triazinas-CL capilar	Organofosforados-CL capilar
Bajo consumo de reactivos	***	*****	***	****	****
Sencillez Instrumentación	**	****	**	***	***
Selectividad	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Precisión CV (%)	0.5-20	3-25	SPME: 4-22	SPME tubo empaquetado: 1.6-12 SPME tubo abierto: 4-21	0.9-19
Exactitud E_r (%)	0.6-20	1-30	SPME: 1-23	SPME tubo empaquetado:0.38-28 SPME tubo abierto: 7-20	2-20
Límite de detección (mg/L)	100-250	0.001-10	25-50	SPME tubo empaqueta.:0.025-0.5 SPME tubo abierto: 0.05-1	0.05-10
Intervalo Lineal (mg/L)	1000-10000	2-10	50-1000	SPME tubo empaquetado:0.1-100 SPME tubo abierto: 10-500	50-500
Grado de automatización	***	****	***	SPME tubo empaquetado: ***** SPME tubo abierto: *****	*****
Rapidez (muestra/hora)	3	5	1	SPME tubo empaquetado: 3 SPME tubo abierto: 2	2

El consumo de reactivos fue menor y la instrumentación más sencilla en los métodos basados en el acoplamiento con la CG y con la CL capilar.

La mayor parte de los procedimientos propuestos resultaron selectivos para los analitos estudiados. Como excepción hay que destacar el procedimiento basado en la derivatización sobre una fibra de SPME para la determinación de aminas difámicas, puesto que DMA y TMA forman el mismo derivado, y por tanto coeluyen. Sin embargo, tiene la ventaja de que los compuestos más polares presentes en el agua no se extraen con el sorbente de la fibra. Por otra parte, en el primer capítulo de la Tesis se ha propuesto una metodología para la determinación selectiva de TMA.

CONCLUSIONES GENERALES

En cuanto a las medidas de precisión, los coeficientes de variación fueron similares en todos los métodos de SPME estudiados, e inferiores al 25%. Los métodos que incorporan la SPE en línea o la SPME en tubo con columna empacada presentan mayor precisión. Los valores de exactitud fueron similares para todos los procedimientos, y se consideraron adecuados.

Los métodos que incluyen una etapa de extracción acoplada a CG o a CL capilar alcanzan los límites de detección más bajos. En la determinación de triazinas y compuestos organofosforados mediante CL capilar se obtuvieron LDDs del mismo orden. Además, la sensibilidad obtenida para las triazinas tanto con SPME en tubo abierto como con SPME en tubo empacado fue similar. Sin embargo, los LDDs alcanzados para los estudios con amins alifáticas y anfetaminas son entre 100 y 1000 veces superiores a los anteriores. Esto puede explicarse por la pequeña cantidad de sorbente que tiene la fibra de SPME si se la compara con la cantidad de fase estacionaria que hay en una precolumna de SPE. Además, la preconcentración dinámica de la SPME en tubo con columna abierta puede favorecer la interacción de los analitos con el relleno, mientras que en la SPME con fibras la extracción es un proceso estático con las dificultades que ello conlleva.

Los procedimientos con mayor grado de automatización son los basados en el acoplamiento en línea de la técnica de extracción con la técnica de separación, los cuales corresponden al tercer tipo de acoplamiento estudiado en esta Tesis. Le sigue el acoplamiento SPME-CG. Los siguientes procedimientos en grado de automatización son los que se basan en el acoplamiento entre la SPME con fibras y la CL convencional. La determinación de TMA con derivatización en línea, especialmente en caso de que se requiera una etapa previa de preconcentración la cual se lleva a cabo fuera de línea, presenta un bajo grado de automatización.

La velocidad de muestreo fue mayor al utilizar métodos que no requerían derivatización como es el caso de la determinación de VOCs. Sin embargo, en el screening de triazinas y compuestos organofosforados fueron necesarios tiempos de adsorción de hasta 45 min y se obtuvieron cromatogramas de 45 min, respectivamente. Los siguientes procedimientos en rapidez son la determinación de MA, anfetaminas y TMA derivatizada en línea, ya que los tiempos de reacción fueron cortos para todos estos analitos. Por último, cabe mencionar los procedimientos de determinación de TMA y DMA mediante SPME con fibras, porque el tiempo de reacción es de 30 min en el primer caso y porque se necesita doble derivatización en el segundo.

A partir de los métodos propuestos para el análisis de screening de compuestos orgánicos volátiles, triazinas y pesticidas organofosforados en 22 muestras reales de agua tomadas en diferentes puntos de la costa de la Comunidad Valenciana se extrajeron 23 variables correspondientes a los analitos encontrados. La aplicación del análisis en componentes principales a la matriz formada por las 22 muestras y las 23 variables da como resultado un modelo de 8 componentes que explica el 87.8% de la varianza de los datos. La **Figura 78** muestra el gráfico de puntuaciones para las dos primeras componentes, la primera componente principal responde a la contaminación por hidrocarburos y por tanto las muestras que presentan una mayor abcisa (20, 1, 10 y 4)

corresponden a las que se aprecian como discrepantes en el gráfico de cajas correspondiente.

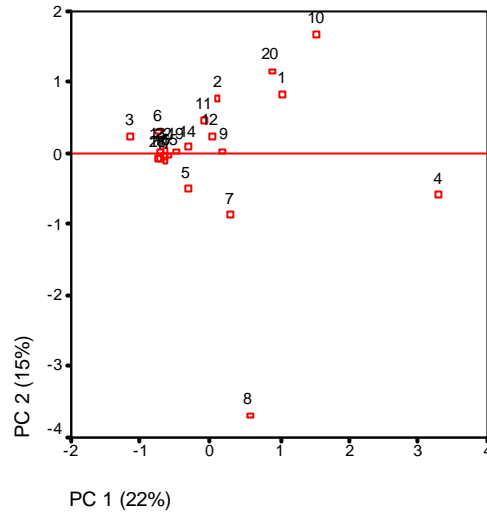


Figura 78. Gráfico de puntuaciones obtenido para las 22 muestras de agua analizadas.

La contaminación debida a pesticidas no aparece tan claramente relacionada con un componente principal determinado. En el gráfico de la **Figura 79** se observa que las muestras aparecen en un cluster, a excepción de las muestras 2, 4, 6, 8 y 20. La mayoría de estas últimas aparecen como discrepantes en un gráfico de cajas correspondiente a las concentraciones encontradas de pesticidas en las aguas analizadas, y además contienen más de un pesticida.

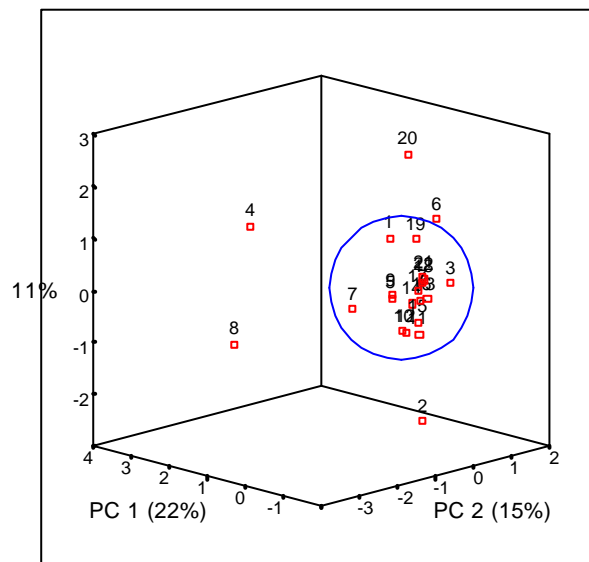


Figura 79. Gráfico de puntuaciones obtenido para las 22 muestras analizadas.

CONCLUSIONES GENERALES

Por último indicar que las siguientes variables están correlacionadas: propazina y 1,3-diclorobenceno ($r=0.806$), fenamifos y paration ($r=1$), tetracloruro de carbono y tetracloroetileno ($r=0.764$), *o*-xileno y 1,4-diclorobenceno ($r=0.778$), tolueno y 1,4-diclorobenceno ($r=0.711$), *m,p*-xileno y tolueno ($r=0.816$), y *o*-xileno y *m,p*-xileno ($r=0.782$).

Análisis de muestras gaseosas

La TMA es un analito volátil, y por ello se ha estudiado su determinación en muestras de aire. Las características analíticas que presentan los métodos propuestos para el análisis de muestras de aire se reflejan en la **Tabla 44**.

Tabla 44. Ventajas de los métodos propuestos para el análisis de muestras gaseosas (a mayor número de asteriscos *, mejor condición).

Características analíticas	TMA-FMOC-SPE-CL	TMA-FMOC-SPME-CL
Bajo consumo de reactivos	**	**
Sencillez instrumentación	**	***
Selectividad	Sí	No
Precisión CV (%)	7-15	9-17
Exactitud Er (%)	1-9	10-28
Límite de detección (mg/m^3)	0.22	12
Intervalo lineal (mg/m^3)	1.1-11	25-200
Grado de automatización	**	***
Rapidez (muestra/hora)	3	2

El consumo de reactivos es similar en los dos procedimientos empleados, ya que en ambos casos la derivatización se realiza sobre soporte sólido y se utiliza la CL convencional. La instrumentación empleada en la metodología que hace uso de la SPME es más sencilla porque en el muestreo estático sólo es necesario un soporte para la fibra, mientras que en el muestreo dinámico se requiere un medidor de flujo y una bomba para llevar a cabo la retención del analito.

El inconveniente que presenta el procedimiento de SPME con fibras es que no es selectivo, siendo la DMA su principal interferencia. Los valores de precisión fueron similares en ambos procedimientos. Sin embargo, el método de derivatización sobre la fibra es menos exacto que el de derivatización en el interior del sistema.

Los LDDs conseguidos con ambos procedimientos fueron adecuados para controlar la exposición ocupacional a la TMA mediante los valores de VLA-EC y VLA-ED establecidos en la legislación. No obstante, el LDD obtenido para el método de SPME fue 55 veces mayor al obtenido con el otro procedimiento. Esto es debido a las pequeñas dimensiones de la fibra comparadas con las dimensiones del cartucho de SPE.

El grado de automatización de la metodología basada en la SPME es mayor porque la desorción del analito se realiza en línea; además se reduce significativamente el esfuerzo experimental y la manipulación de la muestra.

La rapidez de la metodología de muestreo dinámico es mayor porque este tipo de muestreo favorece la volatilización del analito, y además la derivatización en línea requiere un tiempo de reacción de 0.5 min, que es 60 veces más corto que el necesario para la derivatización sobre la fibra.

Los métodos propuestos para la determinación de TMA en aire presentan ventajas respecto a los existentes en la bibliografía. En primer lugar, el uso de cartuchos con relleno de tipo C₁₈ de SPE o de fibras de SPME para el muestreo de TMA evita el empleo de disoluciones para la retención del analito, y por tanto estas aproximaciones son adecuadas para su uso junto con instrumentos de muestreo portátiles. Además, comparado con procedimientos descritos previamente el tiempo de muestreo se ha reducido significativamente. Esto es debido a que la derivatización de TMA con FMOC aumenta la sensibilidad, de modo que se reduce la cantidad de TMA necesaria para obtener resultados fiables. La mayoría de los métodos existentes para el análisis de aminas alifáticas en aire no pueden ser aplicados a la medida de TMA porque usan reactivos que sólo son capaces de reaccionar con aminas primarias y secundarias.

CONCLUSIONES GENERALES

Resumiendo, y de acuerdo con los objetivos específicos marcados en la Pág.4, esta Tesis contribuye a:

1. Mediante la derivatización sobre una fibra de SPME, minimizar la manipulación de la muestra implicada en los pasos de extracción y derivatización, evitar la dilución del analito y evitar la alteración de la muestra en la etapa de derivatización.
2. Mediante la derivatización en disolución seguida de SPME, determinar anfetaminas en orina a niveles de ppm, de forma rápida y simple.
3. Aumentar el conocimiento de los métodos de screening de muestras.
4. Estimar la influencia de la etapa de filtrado de las muestras de agua.
5. Mejorar la sensibilidad de la determinación de triazinas y compuestos organofosforados mediante SPME en tubo acoplada a la CL capilar y su análisis de screening.
6. Al desarrollo de los acoplamientos SPME-CL.

La principal contribución del grupo de investigación al desarrollo de la SPME corresponde al acoplamiento con la cromatografía líquida y con derivatización. Actualmente, el acoplamiento SPME-CL representa el 3% del total de publicaciones sobre SPME, y la combinación de la SPME con la derivatización representa el 10% del total de publicaciones sobre SPME. En cuanto a los trabajos publicados sobre aminas y anfetaminas, el 31 % y 6%, respectivamente, corresponden a trabajos incluidos en esta Tesis.

5. APÉNDICES

5. APÉNDICES

Apéndice 1.

R. Herráez-Hernández, C. Cháfer-Pericás, P. Campíns-Falcó.
 Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universitat de València.
Analysis of methylamine by solid-phase microextraction and HPLC after on-fibre derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate.
 Analytica Chimica Acta **513** (2004) 425-433.

Apéndice 2.

C. Cháfer-Pericás, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó.
 Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de València.
A new selective method for dimethylamine in water analysis by liquid chromatography using solid-phase microextraction and two-stage derivatization with o-phthalaldehyde and 9-fluorenylmethyl chloroformate.
 Talanta **66** (2005) 1139-1145.

Apéndice 3.

C. Cháfer-Pericás, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó.
 Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universitat de València.
Liquid chromatographic determination of trimethylamine in water.
 Journal of Chromatography A **1023** (2004) 27-31.

Apéndice 4.

C. Cháfer-Pericás, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó.
 Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universitat de València.
Selective determination of trimethylamine in air by liquid chromatography using solid phase extraction cartridges for sampling.
 Journal of Chromatography A **1042** (2004) 219-223.

Apéndice 5.

C. Cháfer-Pericás, P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández.,
 Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universitat de València.
Comparative study of the determination of trimethylamine in water and air by combining liquid chromatography and solid-phase microextraction with on-fiber derivatization.
 Talanta **69** (2006) 716-723.

Apéndice 6.

R. Herráez-Hernández, C. Cháfer-Pericás, J. Verdú-Andrés, P. Campíns-Falcó.
 Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universitat de València.
An evaluation of solid-phase microextraction for aliphatic amines using derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and liquid chromatography.
 Journal of Chromatography A **1104** (2006) 40.

Apéndice 7.

C. Cháfer-Pericás, P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández.
Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universitat de València.
Application of solid-phase microextraction combined with derivatization to the determination of amphetamines by liquid chromatography.
Analytical Biochemistry **333** (2004) 328-335.

Apéndice 8.

C. Cháfer-Pericás, P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández.
Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universitat de València.
Application of solid-phase microextraction combined with derivatization to the enantiomeric determination of amphetamines.
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **40** (2006) 1209.

Apéndice 9.

C. Cháfer-Pericás, P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández
Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universitat de València.
An optimized headspace-solid phase microextraction-gas chromatography-flame ionization detector procedure for the estimation of the main legislated volatile organic compounds in water samples.
Enviado a Analytica Chimica Acta.

Apéndice 10.

C. Cháfer-Pericás, P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández
Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universitat de València.
On-fibre solid-phase microextraction coupled to conventional liquid chromatography versus in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography for the screening analysis of triazines in water samples.
Aceptado en Journal of Chromatography A.

Apéndice 11.

C. Cháfer-Pericás, P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández.
Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universitat de València.
In tube – SPME-capillary liquid chromatography as a solution to the screening analysis of organophosphorous pesticides in untreated environmental water samples.
Enviado a Journal of Chromatography A.

Analysis of methylamine by solid-phase microextraction and HPLC after on-fibre derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate

R. Herráez-Hernández, C. Cháfer-Pericás, P. Campíns-Falcó*

Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Dr. Moliner 50, 46100-Burjassot, Valencia, Spain

Received 19 January 2004; received in revised form 28 February 2004; accepted 28 February 2004

Abstract

A method for the determination of methylamine (MA) in aqueous matrices is reported which uses solid-phase microextraction (SPME) for enrichment and derivatization of the analyte, and high performance liquid chromatography (HPLC). The fluorogenic reagent 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) has been used for derivatization. The SPME fibres were successively immersed in the samples and in the derivatization solutions to extract MA and FMOC, respectively. After a defined time of reaction, the derivatized analyte was desorbed into the chromatographic system, and chromatographed in a LiChrosphere 100 RP18, 125 mm × 4 mm i.d., 5 µm, column under gradient elution. In order to improve the MA-FMOC peak profile, a precolumn (20 mm × 2.1 mm i.d., packed with Hypersil C₁₈ phase, 30 µm) was connected on-line to the analytical column by means of a switching valve. The experimental conditions (including fibre coating, times of adsorption, reaction and desorption, and concentration of reagent) have been optimised, and the results have been compared with those achieved by using a method previously validated for aliphatic amines in which extraction and derivatization were carried into C₁₈ solid-phase extraction (SPE) cartridges. Although less sensitive, the SPME based method allowed the quantification of MA over the range 2.5–10.0 µg/ml with linearity, reproducibility and accuracy comparable to that of the SPE based method, the limit of detection being 0.75 µg/ml. The main advantages of the proposed SPME procedure are: sample handling involved in the extraction and derivatization steps was considerably reduced, it was free organic solvent and non-destructive. Moreover, the proposed conditions allowed the selective determination of MA in the presence of other primary and secondary short-chain aliphatic amines. The utility of the proposed procedure for the quantification of MA in different types of waters is discussed. © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Methylamine; Microextraction; HPLC

1. Introduction

Since its introduction by Pawliszyn and co-workers [1,2], SPME has grown enormously, and several applications have been reported in different fields, including environmental, pharmaceutical, biomedical, or food analysis [3]. SPME typically uses a polymeric-coated fused-silica fibre to extract the analytes from the samples. The extracted analytes are then desorbed and transferred to an analytical instrument for separation and detection. Desorption is normally attained by placing the fibre in a hot injector of a gas chromatograph (thermal desorption), or in the interface of a liquid chromatograph. Therefore, SPME integrates sampling, extraction, concentration and sample introduction in a single process.

SPME is often combined with chemical derivatization of the analyte to make it more amenable for chromatography, to increase its affinity for the fibre coating or to improve analyte detectability. Derivatization is typically carried out by adding the reagent to the samples before the SPME step [4,5]. The analyte can be also derivatized on the fibre coating either during or after its extraction (on-fibre derivatization). In the former approach, the fibre is loaded with the reagent, and then used to extract the analytes from the sample or from its headspace [6,7]. Alternatively, the analytes can be first extracted and then derivatized by (i) immersing the fibre into a solution containing the reagent [6], (ii) exposing the fibre to the headspace of vial containing the reagent [8], or (iii) dropping or spraying the reagent onto the fibre [9].

In previous works, we have developed a methodology which integrates purification, preconcentration and derivatization of the analytes before HPLC using solid-phase extraction (SPE) materials [10]. This approach consists in

* Corresponding author. Tel.: +34-96-3982968; fax: +34-96-3864402.
E-mail address: pilar.campins@uv.es (P. Campíns-Falcó).

retaining the analytes into a solid support, typically the packing of a SPE cartridge. Next, the analytes are derivatized by flushing the cartridge with an aliquot of the reagent solution. The analyte and the reagent are lead to react inside the cartridge for a defined period of time, and after elimination of the excess of reagent with the proper solvent (if necessary), the derivatives formed are desorbed and collected for subsequent analysis. The solid support-assisted derivatization approach can also be performed on-line by using a precolumn connected with the analytical column by means of a switching arrangement. This methodology drastically simplifies the analytical procedure and improves the sensitivity, making unnecessary re-extraction and/or solvent evaporation steps. Successful results have been obtained in the analysis of several aliphatic amines, amino acids and drugs with a variety of reagents [10–13].

The translation of the solid support-assisted derivatization methodology to SPME could be on-fibre derivatization immersing the fibre into a solution containing the reagent as described in [6]. However, a different device was used in this work and the method was used for the analysis of different target. Methylamine (MA) has been selected as a model of compound. The determination of this amine in environmental samples is of great relevance because, as many other short-chain aliphatic amines, MA is hazardous to human health. Since MA is increasingly used in several types of industries, considerably attention has been recently paid to its quantification in water samples [14]. In this respect, different methods exist using both gas chromatography (GC) [15–18] and HPLC [19–22]. Owing to the high polarity and water solubility of MA, most of those methods involve a precolumn chemical derivatization for the isolation and pre-concentration of the analyte. In HPLC methods derivatization is mandatory because aliphatic amines are insensitive towards UV or fluorimetric detectors.

In the present study we have optimised a procedure for the determination of MA in water samples using SPME with on-fibre derivatization. Different fibres, derivatization conditions and chromatographic configurations have been tested, using the fluorogenic reagent 9-fluorenyl-methyl chloroformate (FMOC). The results have been compared with those achieved by a solid support-assisted derivatization method previously validated for the determination of aliphatic amines (including MA) in water [13]. In such method, conventional C₁₈ SPE cartridges were used for the extraction and subsequent derivatization of the amines with FMOC. On the basis of the results obtained, a new method for the determination of MA in water samples is discussed.

2. Experimental

2.1. Apparatus and chromatographic conditions

The chromatographic system consisted of a quaternary pump (Hewlett-Packard, 1050 Series, Palo Alto, CA,

USA), a SPME–HPLC interface (Supelco, Bellefonte, PA, USA), and a fluorescence detector (Hewlett-Packard, 1050 Series) or a diode array detector (Hewlett-Packard, 1040 Series). The detectors were coupled to a data system (Hewlett-Packard, HPLC Chem Station) for data acquisition and calculation. In assays with fluorescence detection the excitation and emission wavelengths were 264 and 313 nm, respectively; unless otherwise stated the UV signal was monitored at 230 nm.

2.2. Reagents and solutions

All the reagents were of analytical grade. MA, ethylamine, propylamine, *n*-butylamine, *n*-pentylamine, dimethylamine, diethylamine and trimethylamine were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA), and 9-fluorenylmethyl chloroformate was purchased from Aldrich (Stenheim, Germany). Acetonitrile and methanol were of HPLC grade (Scharlau, Barcelona, Spain). Boric acid, sodium hydroxide, sodium carbonate and hydrochloric acid were obtained from Pan-reac (Barcelona, Spain).

Stock standard solutions of MA and the other amines (10,000 µg/ml) were prepared in water. Working solutions of these compounds were prepared by dilution of the stock solutions with water. Water was deionized and filtered through 0.45 µm nylon membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain). All solutions were stored in the dark at 2 °C.

2.3. Columns and mobile phases

A LiChrospher 100 RP18, 125 mm × 4 mm i.d. column (Merck, Darmstadt, Germany) was the analytical column. In the optimised procedure a precolumn and a high-pressure six-port valve (Hewlett-Packard) were inserted between the SPME–HPLC interface and the analytical column. The precolumn (20 mm × 2.1 mm i.d.) was dry-packed with a Hypersil C₁₈, 30 µm, stationary phase.

The mobile-phase was a mixture of acetonitrile–water in gradient elution mode at a flow rate of 0.95 ml/min. Unless otherwise stated, the elution program was as follows: the acetonitrile content was linearly increased from 0% at 0 min to 40% at 2.5 min, to 70% at 9.5 min and then to 100% at 17.5 min.

All solvents were filtered through 0.45 µm nylon membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain) and degassed with helium before use.

2.4. Sample processing

2.4.1. SPME method

A SPME assembly with replaceable extraction fibres was used for extraction of MA and FMOC. Fibres with five different coatings were tested: polydimethylsiloxane (PDMS, 100 µm), polydimethylsiloxane-divinylbenzene (PDMS-DVB, 60 µm and 65 µm), Carbowax-templated resin (CW-TPR, 50 µm), and polydimethylsiloxane-divi-

nylbenzene-Carboxen (PDMS-DVB-CAR, 50–30 μm). The SPME assembly and the fibres were obtained from Supelco.

The fibre was immersed into a glass vial containing the samples (25 ml) for a defined adsorption time. The fibre was then removed from the sample vial, and immersed into a 2 ml glass vial containing the derivatization solution. After the reaction time, the SPME device was placed into the SPME–HPLC interface, and the MA-FMOC derivative was desorbed from the fibre under static mode: the fibre was soaked with 200 μl of acetonitrile (unless otherwise stated) for a defined desorption time, and then the valve of the SPME–HPLC interface was rotated, so the MA-FMOC derivative was sent to the precolumn or to the analytical column. At the end of each run the fibres were cleaned by pumping through the interface 1 ml of acetonitrile at a flow rate of 0.95 ml/min.

The derivatization solution was a mixture of 0.5 ml of 0.05 M borate buffer (pH 10.0) and 1.0 ml of FMOC solutions. The 0.05 M borate buffer was prepared by dissolving boric acid in water; next, the pH was adjusted to 10.0 by adding 0.5 M NaOH. The FMOC solutions were prepared daily by dissolving the pure compound in acetonitrile.

Each sample was derivatized in triplicate and all assays were carried out at ambient temperature.

2.4.2. Solid support-assisted derivatization method

Conditions for the extraction and derivatization of MA in C_{18} SPE cartridges were those described in [13]. Briefly, 0.5 ml of the samples were loaded into the cartridges (Bond Elut C_{18} , 200 mg/3.0 ml, Varian, Harbor City, CA, USA), which were previously conditioned by drawing in succession 2.0 ml of methanol and 1.0 ml carbonate buffer of pH 10.0. The cartridges were then washed with 1.0 ml of carbonate buffer and dried with air under vacuum. Next, 0.25 ml of 25 mM FMOC were flushed through the cartridges, and the analyte and the reagent were lead to react for 2.0 min. Finally, the MA-FMOC derivative was desorbed from the cartridges with 0.25 ml of acetonitrile, and 20 μl of the collected extracts were injected into the analytical column.

The carbonate buffer (1%, m/m) was prepared by dissolving sodium carbonate in water; the pH was adjusted to 10.0 by adding 0.1 M hydrochloric acid. The 25 mM FMOC solutions were prepared daily by dissolving the pure compound in acetonitrile.

Each sample was derivatized in triplicate and all assays were carried out at ambient temperature.

2.5. Analysis of real waters

Different water samples were processed by the SPME-on-fibre derivatization and solid support-assisted derivatization methods to determine the concentration of MA. Tap water and ground water samples were directly processed. Industrial waste water were collected and acidified with 0.1 M hydrochloric acid to pH 2; before analysis, samples were adjusted to pH 10.0 with 0.05 M NaOH, and filtered through

0.45 μm nylon membranes (Teknokroma) in order to remove any particulate matter.

Each sample was derivatized in triplicate and all assays were carried out at ambient temperature.

3. Results and discussion

3.1. Choice of fibre

According to previous studies, the mobile phase selected for the separation of the MA-FMOC derivative was acetonitrile–water in gradient elution form. The percentage of acetonitrile was increased from 40% at 0 min to 70% at 7.0 min, and then to 100% at 15 min, and the mobile phase flow-rate was 1.0 ml/min [13]. Available fibres were tested for standard solutions of MA (5.0 $\mu\text{g/ml}$), using variable times of adsorption, reaction and desorption, and a concentration of FMOC 1 mM. In this study, less selective UV detection was used.

It was observed that the CW-TPR, CW-DVB and PDMS-DVB were the only coatings that provided significant extraction of MA and/or MA-FMOC (data not shown). In Fig. 1a–c are depicted the UV chromatograms obtained for blank samples (water) with the CW-TPR, CW-DVB and

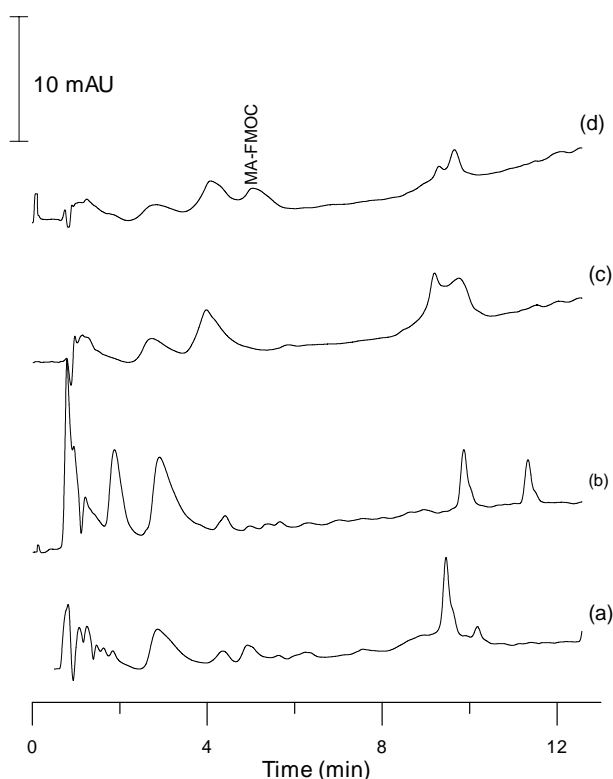


Fig. 1. Chromatograms obtained for blank (water) samples with the (a) PDMS/DVB–60 μm fibre, (b) CW/DVB fibre and (c) CW/TPR fibre, and (d) chromatogram obtained for an standard solution of MA (20.0 $\mu\text{g/ml}$) with the CW/TPR fibre. Detection: UV at 230 nm. For other experimental details, see text.

PDMS-DVB fibres. All the chromatograms showed different peaks besides the peak of the reagent ($t_r = 4.4$ min). The spectra of those peaks were registered between 210 and 450 nm. It was observed that compounds eluting between 2.0 and 6.5 min presented spectra very similar to that of unreacted FMOc, which indicated that they corresponded to side-products. The other peaks were most probably caused by contaminants on the fibres. The chromatogram obtained with the CW-TPR coating showed less quantities of side-products, particularly in the region of the chromatogram in which eluted the MA-FMOc derivative (retention time, $t_r = 5.2$ min). In Fig. 1d is depicted a chromatogram obtained for a solution of MA with the CW-TPR. Consequently, CW-TPR was the coating selected for further experiments. It should be remarked that no shifts in the retention times caused by the use of different fibres were observed.

3.2. Optimisation of the chromatographic conditions

According to Fig. 1d, the resolution achieved under the elution conditions proposed in [13] was adequate for monitoring the reaction between MA and FMOc when using 1 mM FMOc. However, unsuitable resolution between the peaks of MA-FMOc and unreacted FMOc was observed

with higher concentrations reagent assayed for optimising the derivatization process. Consequently, different elution conditions were assayed in order to achieve an adequate signal for the MA-FMOc derivative. Best results were obtained by increasing the percentage of acetonitrile from 0% at 0 min to 40% at 2.5 min, to 70% at 9.5 min and then to 100% at 17.5 min (see Fig. 2). Although under such conditions MA-FMOc eluted at 8.2 min, the later step in the gradient program was necessary to elute from the analytical column some FMOc side-products (see Figs. 1 and 2).

3.3. Optimisation of the extraction/derivatization process

Firstly, we studied the effect of the adsorption time on analyte peak areas. Different times in the 5–30 min interval were tested for standard solutions of MA (5.0 $\mu\text{g/ml}$) using 1.0 mM FMOc for derivatization. Both the derivatization time and the desorption time were 5 min. The results of this study are shown in Fig. 3a. As observed, maximal responses were reached for adsorption times of 15–30 min. According to these results, the adsorption time selected for further work was 15 min.

As regards the derivatization procedure two parameters were optimised, the concentration of reagent and the reaction time. Reaction between amine groups and FMOc re-

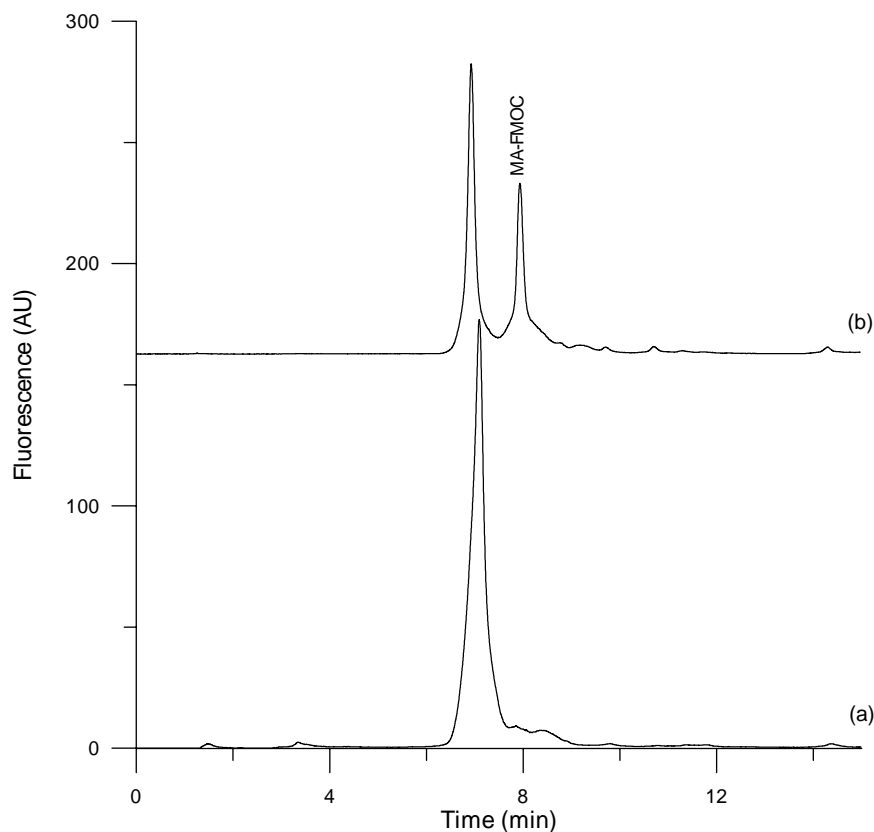


Fig. 2. Chromatograms obtained for (a) a blank (water), and for (b) a standard solution of MA (40.0 $\mu\text{g/ml}$). Adsorption time, 15 min; reaction time, 2 min; concentration of FMOc, 1 mM; desorption time, 5 min. Fibre coating, CW/TPR. Detection: fluorimetric, $\lambda_{\text{excitation}}$ 264 nm and $\lambda_{\text{emission}}$ 313 nm. For other experimental details, see text.

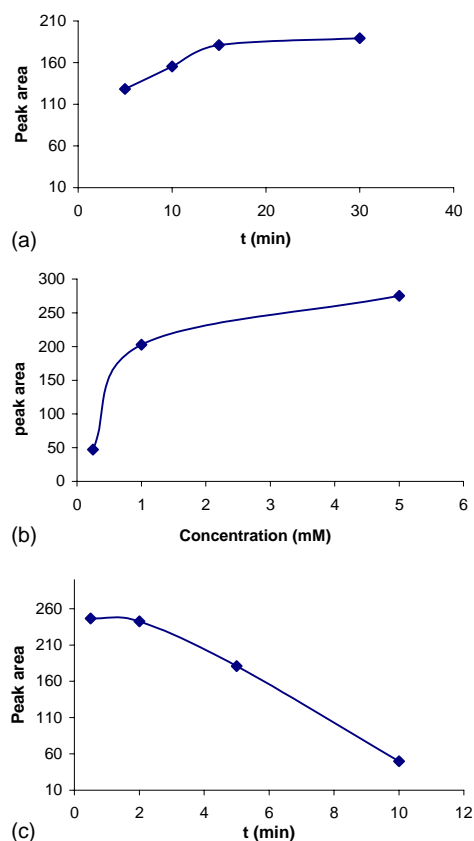


Fig. 3. Effect of experimental variables on MA-FMOC responses: (a) adsorption time, (b) FMOC concentration and (c) reaction time. Concentration of MA in the samples, 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Fibre coating, CW/TPR. Detection: fluorimetric, $\lambda_{\text{excitation}}$ 264 nm and $\lambda_{\text{emission}}$ 313 nm. For other experimental details, see text.

quire a basic medium [11,13]. For this reason, the reagent solution was a mixture of FMOC and 0.05 M borate buffer of pH 10.0. Since at basic pHs FMOC slowly hydrolyses, the standard solution of FMOC (prepared in acetonitrile) and the buffer were mixed immediately before immersing the fibre. Different concentrations of FMOC were evalu-

ated in the 0.25–25 mM range (see Fig. 3b). It was observed that analyte responses drastically increased with increasing the concentration of reagent up to 1 mM. A further increment on the reagent concentration resulted in limited improvement. Moreover, with a concentration of FMOC 5 mM the peak corresponding to unreacted reagent partially overlapped with that of the FMOC-MA derivative; for a concentration of FMOC 25 mM total overlapping was observed. Consequently, 1 mM was selected as the optimum concentration of FMOC. The effect of the reaction time for such concentration of reagent is depicted in Fig. 3c. Maximum conversion yields were reached in the 0.5–2.0 min interval, but the reproducibility was better by using a reaction time of 2.0 min. Consequently, this was the value selected.

Finally, different desorption times between 0 and 10 min were assayed but no significant differences were observed for desorption times higher than 5.0 min (data not shown).

In Table 1 are compared for the same sample MA concentration range the procedures used for MA extraction and derivatization by the SPME and solid support-assisted without preconcentration approaches. It should be remarked that the amounts of MA and FMOC that could be extracted in the SPME fibres were much lower than those that could be extracted with the C_{18} SPE cartridges. Therefore, the experimental conditions used in the respective optimised procedures were not comparable, especially the sample volume. As observed, although the time required for reaction in both approaches is the same, the total time involved in sample preparation is longer in the SPME method due to the adsorption and desorption stages. Nevertheless, extraction and derivatization of a sample can be carried out during LC performance of the previous one, so both modalities provide comparable sample output. The main advantages of the SPME-on-fibre derivatization method are: sample handling is considerably reduced, no organic solvent is used and it can be considered a non-destructive technique (triplicate immersions of the fibre in the samples or standards provided similar MA estimated concentrations with relative standard deviations between 2.8 and 9%).

Table 1

Comparison between the procedures used for the extraction and derivatization of MA with the SPME-on-fibre derivatization and solid support-assisted derivatization methods (see Section 2)

Experimental conditions	Extraction/derivatization method	
	SPME	Solid support-assisted
Sample volume (ml)	25.0 (non-destructive)	0.5 (destructive)
Derivatization reagent	1.0 ml of 1 mM FMOC	0.25 ml of 25 mM FMOC
Reaction time (min)	2	2
Sample handling	Immersion of the fibre into the sample (removal after 15 min) Immersion of the fibre into the FMOC solution (removal after 2 min) Placing of the fibre onto the SPME–HPLC interface (transfer after 5 min)	Conditioning of the SPE cartridges Drying of the SPE cartridges Loading of the sample Loading of the reagent (wait for reaction) Desorption of the MA-FMOC derivative Injection
Total time (min)	23	5

3.4. Transfer to the analytical column

It was observed that the inclusion of the SPME step resulted in significant band broadening compared to the direct injection of the MA-FMOC derivative. This can be explained by the fact that the compound of interest is transferred from the SPME–HPLC interface to the analytical column in a relatively large volume (200 μ l) of a high elution strength solvent (acetonitrile). Attempts were made to reduce peak broadening by changing the solvent used for desorption of MA-FMOC from the fibre. Different mixtures of acetonitrile–water were tested, but the improvement of peak profiles was negligible. In addition, the percentage of MA-FMOC desorbed from the fibres decreased as the percentage of water increased.

As an alternative, we tried to effect peak compression by placing a C_{18} packed precolumn between the SPME–HPLC interface and the analytical column. An additional switching valve was placed between the precolumn and the analytical column, so the mobile phase flow stream emerging from the precolumn could be sent to waste or to the analytical column. During the transfer stage the eluent was 100% water. In such a way, the MA-FMOC was retained in the precolumn for a short time, and then transferred to the analytical column. Peak compression was due to the fact that FMOC-MA was

transferred to the analytical column in a low strength elution solvent (water) [23].

On the other hand, with the present configuration the first-eluting fraction emerging from the precolumn can be discarded. The chromatograms in Fig. 2 suggest that the first-fraction eluting from the precolumn (also packed with a C_{18} phase) should contain unreacted FMOC. In other words, the total amount of unreacted FMOC sent to the analytical column can be reduced by discarding the first fraction eluting from the precolumn. In this study, different times of disconnection between both columns were tested, and best results were observed with 0.5 min. After this time the switching valve was rotated, and the gradient elution program was started. At the end of the assay the valve was changed to the original position.

Fig. 4 shows the chromatograms obtained for a standard solution of MA transferred directly from the SPME–HPLC interface to the analytical column (4a), or transferred to the precolumn and then to the analytical column (4b). As observed, the peak profiles were improved when using the precolumn. Moreover, under the proposed conditions the signal corresponding to the excess of reagent was reduced, whereas the peak areas of MA-FMOC were not substantially affected, which can be explained by the fact that FMOC is less retained in the precolumn than MA-FMOC. For example, the

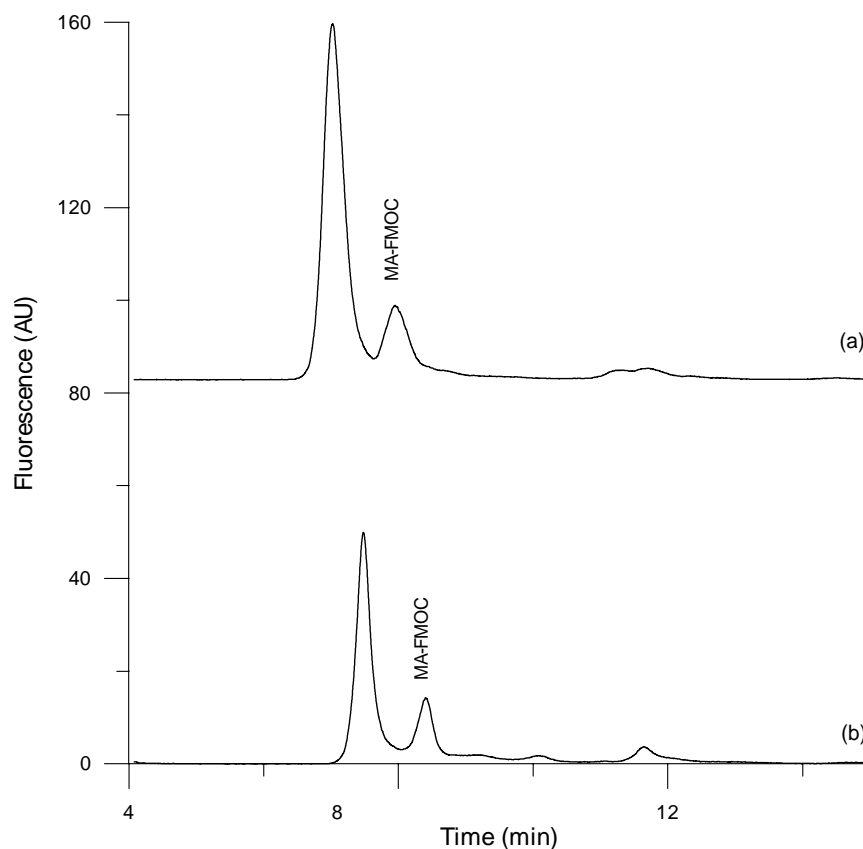


Fig. 4. Chromatograms obtained for MA (a) transferred directly from the SPME–HPLC interface to the analytical column and (b) transferred from the SPME–HPLC interface to the precolumn and then to the analytical column. Concentration of MA, 5.0 μ g/ml. Fibre coating, CW/TPR. Detection: fluorimetric, $\lambda_{\text{excitation}}$ 264 nm and $\lambda_{\text{emission}}$ 313 nm. For other experimental details, see text.

areas measured for unreacted FMOC with the precolumn were of about 86% of those observed with a conventional LC configuration. The inclusion of the precolumn lead to average peak areas for the MA-FMOC derivative of 96% of those measured without precolumn.

The employment of precolumn was therefore considered a good option not only because peak profiles were improved, but also because the measurement of MA-FMOC peak areas was facilitated. It should be noted that, the inclusion of the precolumn increased the retention times in 0.5 min, which is the delay time introduced by the purification stage.

3.5. Analytical performance

The utility of the proposed conditions for the quantification of MA in water was evaluated. The linearity was tested in a concentration range between 2.5 and 10.0 $\mu\text{g/ml}$. According to the literature, this concentration range is suitable for most applications concerning the determination of MA in environmental and waste waters [13,14,20]. The calibration graph obtained was $y = (35 \pm 11) + (35 \pm 2)x$, with a mean correlation coefficient, $R = 0.9990$ ($n = 10$). These values indicate that the method provided adequate linearity within the tested concentration interval. The intra- and inter-day coefficients of variation were calculated for a standard solution containing 5.0 $\mu\text{g/ml}$ of MA. The values obtained were 7% ($n = 3$) and 15% ($n = 5$), respectively. The LOQ and LOD were 2.5 and 0.75 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The LOD was of about one order of magnitude higher than that achieved with the solid support-assisted derivatization approach [13]. This is because, owing to the small dimensions of the fibre, the amounts of MA and FMOC that can be extracted/formed on the fibre is significantly lower than the amounts that can be processed with SPE cartridges. However, the LOD was of about one order of magnitude lower than achieved with so-

lution derivatization followed by SPME and GC-flame ionization detection [15].

The accuracy of the method was evaluated by analysing standard solutions containing MA at different concentrations within the tested concentration range. The results obtained are listed in Table 2. This table also shows the values obtained for the same samples by the solid support-assisted derivatization method. In all instances, the proposed method provided values close to the real concentrations. Moreover, the results obtained for each sample by the SPME-on-fibre derivatization and by the solid support-assisted derivatization methods were statistically equal (at a confidence level of 95%).

The selectivity of the proposed method was evaluated by processing standard solutions of different short-chain primary and secondary aliphatic amines. The amines tested were ethylamine, propylamine, *n*-butylamine, *n*-pentylamine, dimethylamine, diethylamine and trimethylamine. All compounds tested except trimethylamine were extracted into the fibres and reacted with FMOC, but their respective derivatives eluted at retention times higher than that of MA-FMOC, as illustrated in Fig. 5. In order to test possible interferences due to the consumption of FMOC, samples containing several aliphatic amines besides MA were processed, and the concentration of MA was calculated from the calibration equation obtained with standard solutions of MA. The results obtained (see also Table 2) indicate that the analyte conversion was not significantly affected by the presence of the other amines. Therefore, the selected conditions can be utilised for the selective determination of MA.

3.6. Application to real samples

Finally, the reliability of the described method was tested by analysing tap water, ground water and waste water obtained from an industry dedicated to the production of

Table 2
Accuracy for the determination of MA by the SPME-on-fibre derivatization and solid support-assisted derivatization methods ($n = 3$)

Sample type	Added concentration of MA ($\mu\text{g/ml}$)	SPME with on-fibre derivatization method		Solid support-assisted derivatization method	
		Determined concentration of MA ($\mu\text{g/ml}$)	Relative error (%)	Determined concentration of MA ($\mu\text{g/ml}$)	Relative error (%)
Standard	2.5	2.5 ± 0.3	0	2.3 ± 0.6	-8
	5.0	4.5 ± 0.5	-10	4.8 ± 0.3	-4
	7.5	7.1 ± 0.6	-5	7.8 ± 0.5	+4
	2.5 + EA + PA + BuA, PenA, DMA, DEA and TMA (2.5 $\mu\text{g/ml}$ each)	2.5 ± 0.2	0	2.3 ± 0.4	-8
	5.0 + EA + PA + BuA, PenA, DMA, DEA and TMA (5.0 $\mu\text{g/ml}$ each)	4.6 ± 0.1	-8	4.7 ± 0.4	-10
Tap water	2.5	2.3 ± 0.7	-8	2.43 ± 0.03	-3
	5.0	5.2 ± 0.4	+4	4.5 ± 0.3	-10
Ground water	2.5	2.3 ± 0.2	-8	2.2 ± 0.4	-12
	5.0	4.9 ± 0.4	-2	5.1 ± 0.5	+2
Waste water	-	4.6 ± 0.1	-	5.4 ± 0.4	-

EA: ethylamine; PA: propylamine; BuA: *n*-butylamine; PenA: *n*-pentylamine; DMA: dimethylamine; DEA: diethylamine and TMA: trimethylamine.

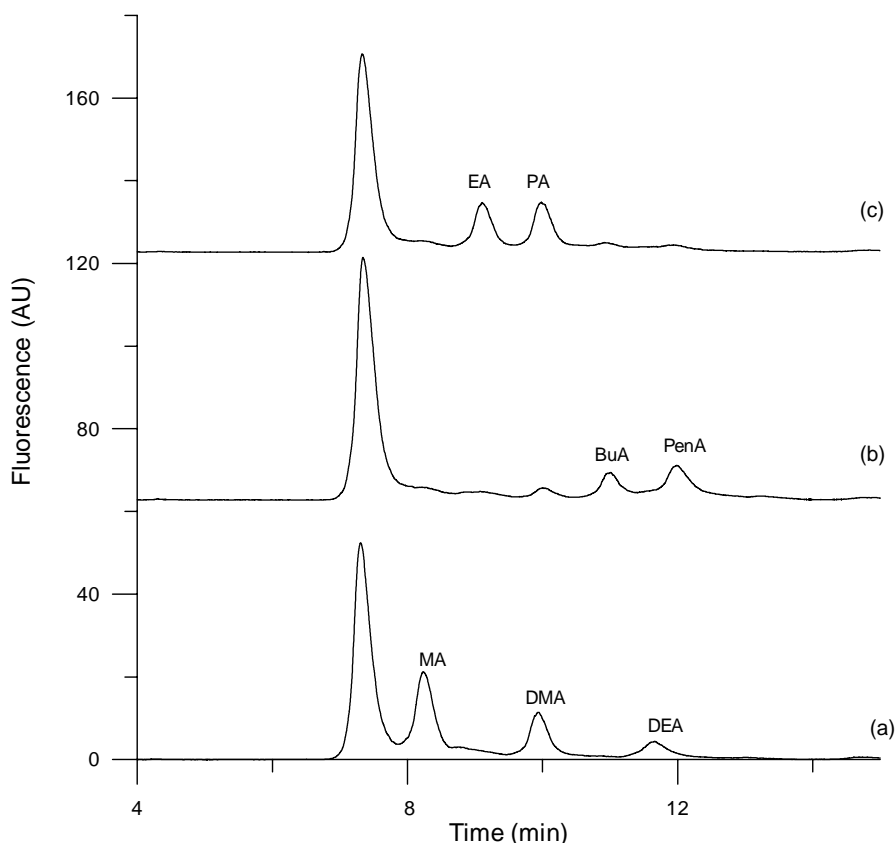


Fig. 5. Chromatograms obtained for standard solutions containing mixtures of aliphatic amines: (a) MA, dimethylamine (DMA) and diethylamine (DEA), (b) *n*-butylamine (BuA) and *n*-pentylamine (PenA) and (c) ethylamine (EA), propylamine (PA) and trimethylamine. Concentration of each amine in the samples, 5.0 $\mu\text{g/ml}$. Fibre coating, CW/TPR. Detection: fluorimetric, $\lambda_{\text{excitation}}$ 264 nm and $\lambda_{\text{emission}}$ 313 nm. For other experimental details, see text.

fertilisers. MA was not found in tap water and ground water samples. These samples were then fortified with MA producing concentrations within the tested interval. The concentrations of MA in the spiked samples was then calculated from the calibration equation obtained with standard solutions of MA. The values obtained are listed in Table 2. As for the standard samples, the values were equivalent to those achieved by retaining and derivatizing the analyte in C_{18} SPE cartridges.

The chromatogram obtained for the industrial waste water revealed that this sample contained MA. The concentration of the analyte (calculated from the calibration graph obtained from standard samples) was $4.61 \pm 0.12 \mu\text{g/ml}$ (Table 2). The concentration of MA obtained by the solid support derivatization method was $5.4 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$. Both values can be considered statistically equal (at a confidence level of 96%).

4. Conclusions

A LC method for the determination of MA in water using SPME with on-fibre derivatization is proposed. The inclusion of a precolumn in the chromatographic system to effect peak compression improved peak profiles and reduced unwanted products in the final chromatograms. The results

obtained have been compared with those achieved by a solid support-assisted derivatization method with C_{18} SPE cartridges, which was previously validated for short-chain aliphatic amines [13]. Both methods provided comparable accuracy and precision, sample handling involved in the extraction and derivatization steps was considerably reduced with in the SPME-on-fibre derivatization approach.

The main disadvantage of the proposed method is that additional instrumentation is required compared with a conventional LC equipment (SPME–HPLC interface, precolumn and a switching valve). Another limitation is that, owing to the small dimensions of commercially available SPME fibres, the total amounts of MA and/or MA-FMOC that can be extracted/formed on the fibre are lower than those that can be extracted/formed in a SPE cartridge. As a result, the sensitivity attainable by the SPME with on-fibre derivatization is lower. Nevertheless, the results of this work indicate that the SPME based method is a simple and rapid alternative for most applications concerning the determination of MA at ppm levels in different kind of samples.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project BQU2003-06138) for the financial

support received. C. Cháfer-Pericás expresses her gratitude to the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte of Spain for pre-doctoral grant.

References

- [1] C.L. Arthur, L.M. Killam, K.D. Buchholz, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1960.
- [2] D.W. Potter, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr.* 625 (1992) 247.
- [3] M. Alpendurada, *J. Chromatogr. A* 889 (2000) 3.
- [4] M. Llompert, M. Lourido, P. Landín, C. García-Jares, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 137.
- [5] L. Pan, M. Chong, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 773 (1997) 249.
- [6] E.H.M. Koster, C.H.P. Bruins, G.J. de Jong, *Analyst* 127 (2002) 598.
- [7] J.A. Koziel, J. Noah, J. Pawliszyn, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 1481.
- [8] F. Musshoff, H.P. Junker, D.W. Lachenmeier, L. Kroener, B. Madea, *J. Chromatogr. Sci.* 40 (2002) 359.
- [9] A. Namera, A. So, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 295.
- [10] R. Herráez-Hernández, P. Campins-Falcó, A. Sevillano-Cabeza, *Anal. Chem.* 68 (1996) 734.
- [11] P. Campins-Falcó, R. Herráez-Hernández, A. Sevillano-Cabeza, I. Trümpler, *Anal. Chim. Acta* 344 (1997) 125.
- [12] J. Verdú-Andrés, P. Campins-Falcó, R. Herráez-Hernández, *Analyst* 126 (2001) 1683.
- [13] J. Verdú-Andrés, P. Campins-Falcó, R. Herráez-Hernández, *Chromatographia* 55 (2002) 129.
- [14] H. Gu, H.-M. Ma, S.-C. Liang, *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001) 570.
- [15] F. Sacher, S. Lenz, H.-J. Brauch, *J. Chromatogr. A* 764 (1997) 85.
- [16] L. Pan, M. Chong, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 773 (1997) 249.
- [17] C. Maris, A. Laplanche, J. Morvan, M. Bloquel, *J. Chromatogr. A* 846 (1999) 331.
- [18] S. Mishra, V. Singh, A. Jain, K. Verma, *Analyst* 126 (2001) 1663.
- [19] M.I. Saleh, F.W. Pok, *J. Chromatogr. A* 763 (1997) 174.
- [20] B. Sahasrabudhay, A. Jain, K.K. Verna, *Analyst* 124 (1999) 1017.
- [21] J. You, W. Lao, J. You, G. Wang, *Analyst* 124 (1999) 1755.
- [22] X. Liu, H. Wang, S.-C. Liang, H.-S. Zhang, *Anal. Chim. Acta* 441 (2001) 45.
- [23] P. Campins, R. Herráez, in: I.D. Wilson (Ed.), *Encyclopedia of Separation Science*, Academic Press, 2000, p. 743.

A new selective method for dimethylamine in water analysis by liquid chromatography using solid-phase microextraction and two-stage derivatization with *o*-phthalaldehyde and 9-fluorenylmethyl chloroformate

C. Cháfer-Pericás, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó*

Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Dr. Moliner 50, 46100-Burjassot, Valencia, Spain

Received 3 September 2004; received in revised form 10 December 2004; accepted 11 January 2005

Available online 9 February 2005

Abstract

A new method is presented for the determination of DMA in water as its 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) derivative using solid-phase microextraction (SPME) and liquid chromatography. The method is based on the employment of SPME fibres coated with carbowax-templated resin (CW-TR) for analyte extraction and derivatization. The fibres were successively immersed in the samples, in a solution of *o*-phthalaldehyde and *N*-acetyl-L-cysteine (OPA–NAC) and finally, in a solution of FMOC. OPA–NAC reacted on the fibre with possible primary aliphatic amines present in the samples, particularly with PA which is a direct interferent in the determination of DMA with FMOC. In such a way, the formation of PA–FMOC during the second stage was prevented, and thus the method was selective for DMA. The proposed procedure was applied to the determination of DMA in the 1.0–10.0 µg/mL range. The method provided suitable linearity, accuracy and reproducibility, and limits of detection and quantification of 0.3 and 1.0 µg/mL, respectively. The applicability of the method for the determination of DMA in different types of water is shown.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Dimethylamine; Water; Solid-phase microextraction; On fibre two-stage derivatization

1. Introduction

Today, the potential of solid-phase microextraction (SPME) for sample preparation is widely recognized. SPME integrates sampling, extraction, preconcentration and sample introduction into a single process, resulting in high sample throughput. Moreover, it is an inexpensive, solvent-free and versatile technique that can be coupled to either gas chromatography (GC) or liquid chromatography (LC). SPME can also be combined with chemical derivatization to improve the extraction efficiency, or to make the analytes more amenable for chromatography and detection.

To date, derivatization has almost exclusively been used in SPME-GC [1]. Two alternatives have been described to perform derivatization: addition of the reagent to the samples and subsequent extraction of the derivatives formed, and extraction of the analytes onto the fibres and subsequent derivatization of the analytes (on-fibre derivatization). Some of the applications in this area are the determination of fatty acids in aqueous or gaseous phases [2], the determination of amphetamines in urine [3], the determination of aliphatic amines in water and urine [4], and the quantification of aldehydes in water [5].

More recently, attempts have been made to combine chemical derivatization with SPME/LC. In this sense, Pawliszyn and co-workers described a procedure for the analysis of anatoxin-a in aqueous samples based on its derivatization

* Corresponding author. Tel.: +34 963543002; fax: +34 963544436.

E-mail address: pilar.campins@uv.es (P. Campíns-Falcó).

on the surface of SPME fibres with the fluorogenic reagent 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole [6]. The reagent was dropped or sprayed onto the fibre containing the extracted analyte. The fibre was then heated to 70 °C for 10 min, and finally, the fibre was inserted into the interface of the LC equipment. We have recently described a method for the analysis of methylamine in water based on its on-fibre derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) [7]. Derivatization was accomplished by immersing the fibres with the extracted analyte into the reagent solution. The same reagent has been also used to derivatize amphetamines in an study aimed at comparing two extraction/derivatization strategies: SPME and subsequent on-fibre derivatization of the extracted amphetamines, and solution derivatization followed by SPME of the derivatives formed [8]. The latter approach was found to be the only option suitable for the analysis of urine samples. This was because the extraction of matrix components into the fibre coating prevented the extraction of the reagent. For the analysis of aqueous matrices, the SPME/on-fibre derivatization approach was preferable as the analysis did not modify sample composition.

The literature shows numerous LC assays which involve relatively complex derivatization procedures. This is the case of methods in which the analytes must be previously transformed into species capable of reacting with the selected derivatization agent. The simultaneous use of two reagents has been proposed to resolve samples containing a large number of target compounds. Other applications describe the use of an additional reaction aimed at eliminating from the reaction medium possible interferents before the derivatization of the compounds of interest.

In the present work we have evaluated the possibility of using SPME to effect two-stages derivatizations with two different reagents. The secondary amine dimethylamine (DMA) has been selected as a model compound. As many other short-chain aliphatic amines, DMA is a compound of environmental interest due to its toxicity, reactivity and likely occurrence as a result of its wide industrial use. Moreover, DMA may react with nitrosating agents giving the carcinogenic compound *N*-nitrosodimethylamine. For these reasons, there is an increasing demand of analytical methods for monitoring DMA in environmental waters.

Most LC methods specifically developed for the analysis of DMA entail derivatization with FMOC [9,10]. However, in the course of our studies on the derivatization of aliphatic amines we have observed that DMA–FMOC derivative tends to coelute with the derivative originated by propylamine (PA). This interference was not taken into consideration in previously reported methods. Overlapping of DMA and PA occurs under a variety LC conditions [11]. To overcome this problem, in the present study we propose a sequential derivatization with *o*-phthalaldehyde and *N*-acetyl-L-cysteine (OPA–NAC), and then with FMOC (see Fig. 1). Since OPA–NAC is only reactive towards primary amines, in the first stage PA is transformed into PA–OPA–NAC.

In the second stage FMOC only reacts with DMA. Since the PA–OPA–NAC and DMA–FMOC derivatives present very different features, they can be satisfactorily resolved under typical reversed phase conditions. On the basis of the results obtained a new method is presented for the selective determination of DMA in water.

2. Experimental

2.1. Apparatus and chromatographic conditions

The chromatographic system consisted of a quaternary pump (Hewlett-Packard 1050 Series, Palo Alto, CA, USA), a SPME–HPLC interface (Supelco, Bellefonte, PA, USA) and a fluorescence detector (Hewlett-Packard, 1050 series). The detector was coupled to a data system (Hewlett-Packard, HPLC Chem Station) for data acquisition and calculation. For measurement of the FMOC derivatives the excitation and emission wavelengths were 264 and 313 nm, respectively. The OPA–NAC derivatives were monitored at excitation and emission wavelengths of 330 and 440 nm, respectively.

2.2. Reagents and solutions

All the reagents were of analytical grade. Dimethylamine, methylamine, ethylamine, propylamine, *n*-butylamine, *n*-pentylamine and diethylamine were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). 9-Fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) and *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) were purchased from Aldrich (Stenheim, Germany). *o*-Phthalaldehyde (OPA) was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). Sodium hydroxide, boric acid and hydrochloric acid were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Acetonitrile was of HPLC grade (Scharlau, Barcelona, Spain).

Stock standard solutions of DMA and the other amines (10 000 µg/mL) were prepared in water. Working solutions of these compounds were prepared by dilution of the stock solutions with water. All solutions were stored in the dark at 2 °C.

2.3. Columns and mobile phases

A LiChrospher 100 RP18, 125 mm × 4 mm i.d. column (Merck, Darmstadt, Germany) was the analytical column. In the optimized procedure a precolumn and a high-pressure six-port valve (Hewlett-Packard) were inserted between the SPME–HPLC interface and the analytical column in order to effect peak compression [7]. The precolumn (20 mm × 2.1 mm i.d.) was dry-packed with a Hypersil C₁₈, 30 µm, stationary phase. At the beginning of each chromatographic run the precolumn and the analytical column were disconnected, so the eluent (water) was sent to waste. At 0.5 min, the valve was rotated, and the percentage of acetonitrile in the mobile-phase was progressively increased,

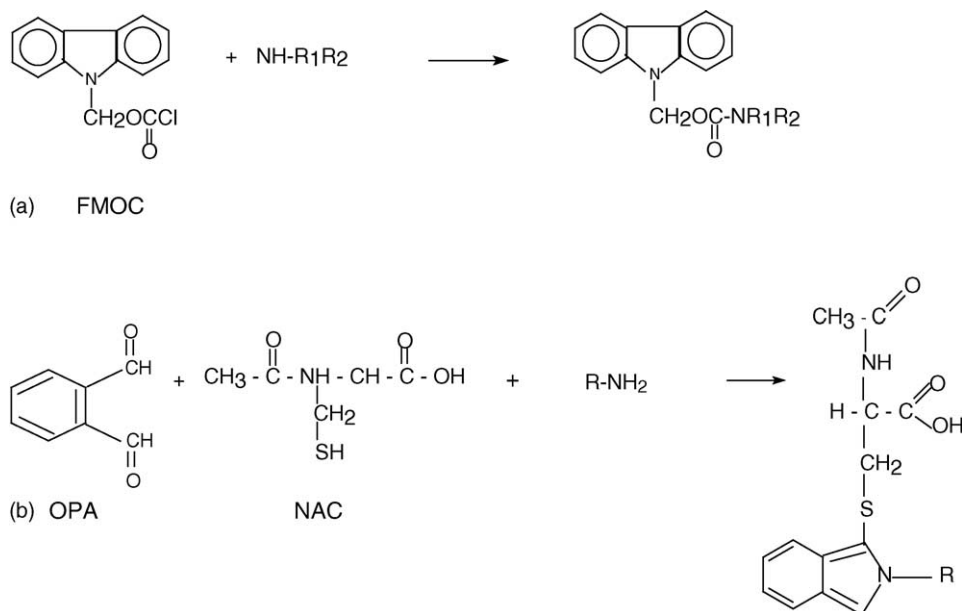


Fig. 1. Reaction schemes for the derivatization of amines (a) with FMOCl (primary and secondary amines), and (b) with OPA–NAC (only primary amines).

so the DMA–FMOCl derivative retained in the precolumn was transferred to the analytical column. The acetonitrile content in the mobile-phase was increased from 0% at 0 min to 40% at 2.5 min, to 70% at 9.5 min and then to 100% at 17.5 min. The mobile-phase flow rate was 0.95 mL/min.

All solvents were filtered through 0.45 μm nylon membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain) and degassed with helium before use.

2.4. SPME parameters

A SPME assembly with replaceable extraction fibre was used for extraction of DMA and the derivatization reagents. Carbowax-templated resin (CW-TR, 50 μm) were obtained from Supelco. The fibres were immersed into a glass vial containing the samples (25 mL) in order to extract DMA. The adsorption time was 15 min. After on-fibre derivatization, the fibres were placed into the SPME–HPLC interface device, and the DMA–FMOCl derivatives were desorbed from the fibre under static mode: the fibre was soaked with 200 μL of acetonitrile for 5 min (desorption time). Next, the valve of the interface was activated so DMA–FMOCl was sent to the precolumn, and the chromatographic run was started. At the end of each run, the fibres were cleaned and conditioned by immersing them into 10.0 mL water for 2.0 min, and then, into 10.0 mL of acetonitrile for other 2.0 min.

2.5. Derivatization procedures

2.5.1. On-fibre derivatization with FMOCl

Fibres with the extracted DMA (or other short-chain aliphatic amines tested) were immersed into a 2 mL glass vial containing the FMOCl derivatization solution for a defined

period of time (reaction time). This derivatization solution consisted in a mixture of 0.5 mL of 0.05 M borate buffer (pH 10.0) and 1.0 mL of FMOCl. The FMOCl solutions were prepared daily by dissolving the pure compound in acetonitrile. Different concentration of FMOCl in the 0.25–25.0 mM range were tested. The borate buffer was prepared by dissolving boric acid in water, and then the pH was adjusted to 10.0 by adding 0.5 M NaOH. After the reaction time, the fibres were removed from the vial, and placed into the SPME–HPLC interface.

Each sample was derivatized in triplicate and all assays were carried out at ambient temperature.

2.5.2. On-fibre derivatization with OPA–NAC and with FMOCl

Fibres with the extracted DMA (or other short-chain aliphatic amines tested) were immersed into a 2 mL glass vial containing the OPA–NAC derivatization solution. Unless otherwise stated, the derivatization time was 5 min. The derivatization solution consisted of 0.1 mL of 0.05 M borate buffer (pH 10.0) and 0.9 mL of OPA–NAC. The OPA–NAC solution was prepared daily by dissolving the pure compounds (at the same concentration) into the minimum volume of methanol (≈ 1.4 mL). The resulting solution was further diluted to 100 mL with water. Different concentrations of OPA–NAC in the 3.7–15.0 mM range were assayed. The borate buffer was prepared as described in the above section.

After the reaction time, the fibres were removed from the vial containing the OPA–NAC reagent, and subjected to derivatization with FMOCl. Derivatization with FMOCl was carried out according to the procedure described in the previous section.

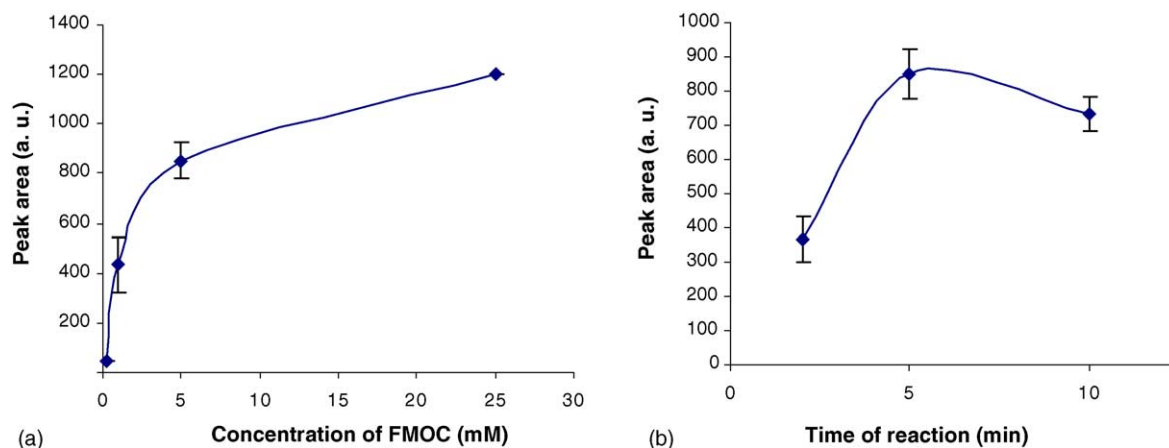


Fig. 2. Optimization of conditions in the reaction between DMA and FMOC: (a) effect of the concentration of reagent, for a time of reaction of 5 min; (b) effect of time of reaction, for a concentration of FMOC of 5 mM. Concentration of DMA, 5 $\mu\text{g/mL}$. For other experimental details, see text.

Each sample was derivatized in triplicate and all assays were carried out at ambient temperature.

2.6. Analysis of real water

Tap water, ground water, irrigation water and river water were spiked with DMA reproducing different concentrations within the tested range, and processed by the OPA–NAC/FMOC method under optimized conditions. In previous test it was verified that such samples did not contain DMA. Waste water were collected and acidified to pH 2.0 with concentrated hydrochloric acid for preservation. Before analysis, the pH was adjusted to pH 10.0 with 0.5 M NaOH, and samples filtered through 0.45 μm membranes (Teknokroma). Samples were then processed by the proposed OPA–NAC/FMOC method.

Each sample was derivatized in triplicate and all assays were carried out at ambient temperature.

3. Results and discussion

3.1. On-fibre derivatization of DMA with FMOC

Conditions selected for the SPME of DMA were as follows: sample volume of 25.0 mL, adsorption time of 15.0 min, and desorption time of 5.0 min. Under such conditions, the responses of the analyte were found to depend mainly on the reaction parameters. The elution conditions were adjusted to achieve a complete resolution between DMA–FMOC and unreacted FMOC (which was also significantly extracted onto the fibres).

The first parameter related with the derivatization of DMA that we studied was the concentration of FMOC. Fibres with the extracted DMA were immersed into a mixture of 0.5 mL of 0.05 M borate buffer (pH 10.0) and 1.0 mL of FMOC at a concentration ranging between 0.25 and 25.0 mM. The presence of the buffer is necessary for the amine to be in the

proper form (unprotonated) for reaction [12]. In this study, the concentration of DMA was 5 $\mu\text{g/mL}$ and the reaction time was 5 min. After then, the fibres were placed into the SPME–HPLC interface for desorption and chromatography of the derivative formed.

As observed in Fig. 2a, the peak areas obtained for DMA–FMOC increased by increasing the concentration of FMOC within the tested range, although little improvement was observed with the highest concentrations assayed. Moreover, a large excess of reagent resulted in overlapping between the peak of DMA–FMOC and the peak of unreacted FMOC. As a compromise, a concentration of FMOC 5.0 mM (giving a final concentration on the reaction mixture of 2.5 mM) was selected for further experiments.

The effect of time of reaction was investigated in the 2.0–10.0 min range. In this study the concentration of FMOC used to prepare the derivatization solution was 5.0 mM, and the other conditions were those indicated above. The optimum time of reaction was found to be 5.0 min (see Fig. 2b). Consequently, this was the time of reaction selected in further work.

The chromatograms obtained for a blank and for an standard solution of DMA under the selected conditions are depicted in Fig. 3. It can be observed that DMA–FMOC (retention time, $t_r = 9.9$ min) is well separated from unreacted FMOC ($t_r = 7.3$ min). Another peak related to the FMOC (most probably corresponding to a condensation product) was detected at 11.4 min.

The proposed conditions were also applied to analyze standard solutions of other short-chain aliphatic amines. The compounds tested were methylamine, ethylamine, PA, butylamine, pentylamine and diethylamine. Besides DMA, all the amines tested were significantly extracted onto the fibres and reacted FMOC. However, their respective FMOC derivatives could be resolved from DMA–FMOC, with the only exception of the derivative formed by PA, which also eluted at 9.9 min (see Fig. 4). Attempts were made to resolve the peaks originated by DMA and PA. Several mobile phase composi-

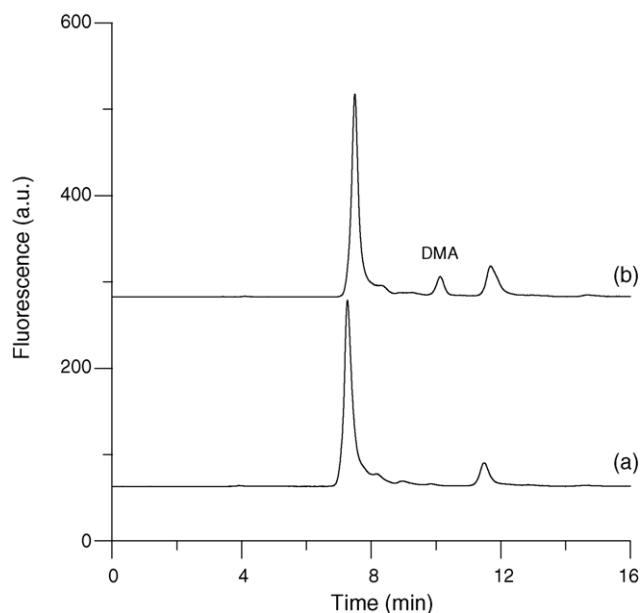


Fig. 3. Chromatograms obtained for (a) a blank (water) and (b) a standard solution of DMA (5 µg/mL) by the on-fibre derivatization method with FMOC. Peaks at 7.1 and 11.6 corresponded to unreacted FMOC and a condensation product, respectively. Final concentration of FMOC in the reaction mixture 3.3 mM; reaction time, 5 min. For other experimental details, see text.

tions and elution programs were tested, but in all conditions assayed the PA–FMOC eluted at almost identical times than DMA–FMOC.

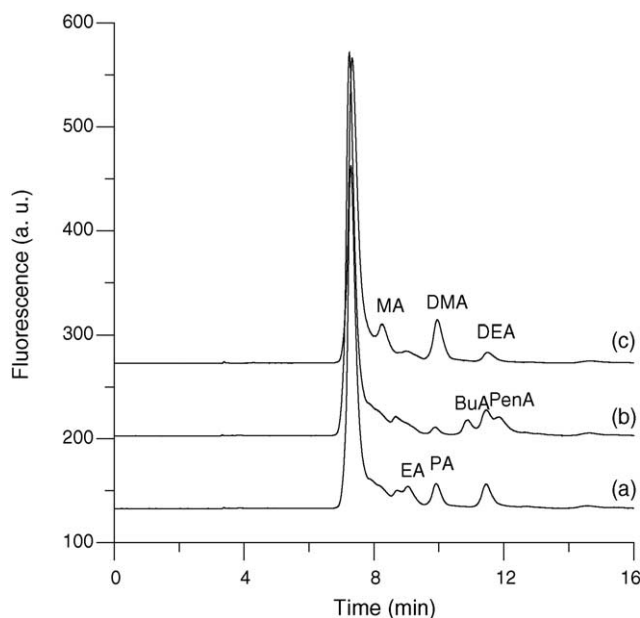


Fig. 4. Chromatograms obtained for standard solutions containing mixtures of the tested short-chain aliphatic amines: (a) ethylamine (EA) and PA; (b) *n*-butylamine (BuA) and *n*-pentylamine (PenA); (c) methylamine (MA), DMA and diethylamine (DEA). Concentration of each amine in the samples, 5.0 µg/mL. Final concentration of FMOC in the reaction mixture 3.3 mM; reaction time, 5 min. For other experimental details, see text.

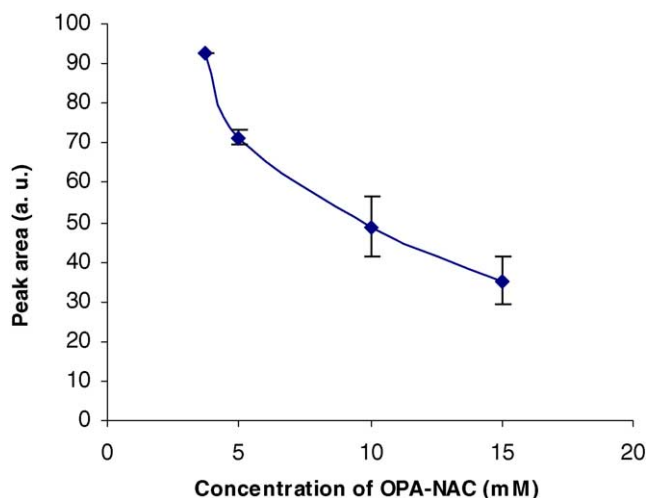


Fig. 5. Effect of the concentration of OPA–NAC on the responses obtained for PA. Concentration of PA, 5 µg/mL; time of reaction, 5 min. For other experimental details, see text.

3.2. On-fibre derivatization of PA with OPA–NAC

OPA is one of the reagent most widely used for labelling compounds containing primary amino groups. This is because in the presence of a thiol (such as NAC) OPA forms highly fluorescent isoindoles (see Fig. 1b). The utility of this reagent for the determination of primary aliphatic amines has been previously demonstrated [13]. The simultaneous use of OPA and FMOC for resolution of samples containing a large number of target compounds has been previously described [14,15]. In the present study we have evaluated the possibility of using OPA–NAC to transform possible PA into its corresponding isoindole derivative, thus preventing the formation of PA–FMOC during the derivatization of DMA.

PA was extracted from samples under conditions used for DMA and next, the fibres were immersed into a solution containing OPA–NAC. As in the derivatization with FMOC, a basic medium was also necessary. For this reason, the derivatization solution was a mixture of barate buffer of pH 10.0 and OPA–NAC. After a defined time of reaction, the fibres were removed from the derivatization solution of OPA–NAC, and next, immersed into the derivatization solution of FMOC. Conditions for derivatization with FMOC were those proposed for DMA.

In order to achieve maximum conversion of PA, different solutions of OPA–NAC at concentrations in the range 3.7–15.0 mM were assayed (resulting in final concentrations in the derivatization mixture of 3.33–13.5 mM). The concentration of PA in the samples was 5.0 µg/mL, and the reaction time was 5.0 min. The results obtained are depicted in Fig. 5. As expected, the peak corresponding to PA–FMOC in the resulting chromatogram decreased as the concentration of OPA–NAC increased. For a concentration of OPA–NAC of 15.0 mM, the peak of PA–FMOC was not detected. This is illustrated in Fig. 6, which compares the chromatograms

obtained for PA after derivatization with FMOC and after the optimized two-stages reaction procedure with OPA–NAC and FMOC. It is interesting to note that for the same concentration of OPA–NAC, the peak of PA–FMOC was detected when using times for reaction with FMOC longer than 5.0 min. This suggested that PA–FMOC is more stable than the compound formed with OPA–NAC.

The time of retention of PA–OPA–NAC, established by registering the chromatograms at the proper detection conditions ($\lambda_{\text{excitation}} = 330$ and $\lambda_{\text{emission}} = 440$ nm) was 4.1 min. This peak was not detected under the detection conditions used to monitorize FMOC derivatives ($\lambda_{\text{excitation}} = 264$ and $\lambda_{\text{emission}} = 313$ nm).

In Fig. 6 is also depicted the chromatogram obtained for DMA by the OPA–NAC/FMOC method. The mean ratio

$$\frac{\text{peak area of DMA by the OPA-NAC/FMOC method}}{\text{peak area of DMA by the FMOC method}}$$

was 0.950 ($n=5$, $5.0 \mu\text{g/mL}$ of DMA). This indicates that the amount of DMA in the fibres was not substantially altered by the derivatization with OPA–NAC, which can be explained by the high affinity of this amine for the CW-TR coating. Therefore, the inclusion of the derivatization step with OPA–NAC did not significantly affect the sensitivity obtained in the measurement of DMA–FMOC. This is an advantage of SPME mediated derivatizations over conventional solution derivatizations, which typically entail analyte dilution due to the addition of the reagents.

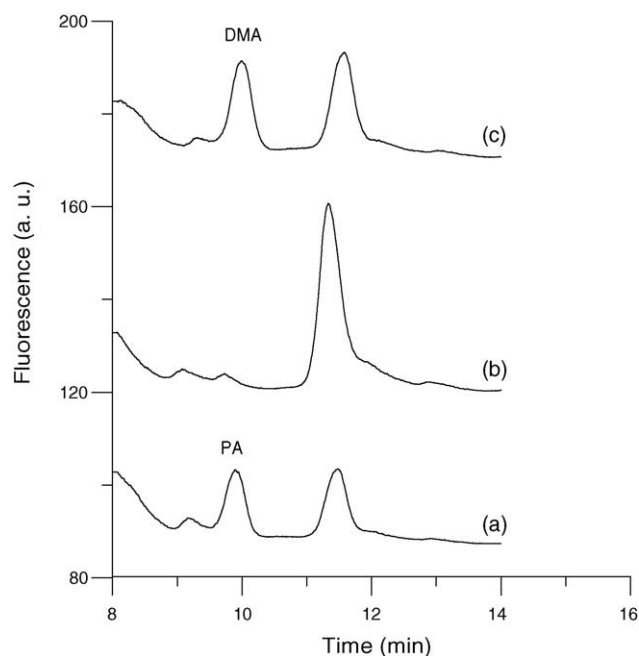


Fig. 6. Chromatograms obtained for PA ($5.0 \mu\text{g/mL}$) (a) by the FMOC method, and (b) by the OPA–NAC/FMOC; (c) chromatogram obtained for DMA ($5.0 \mu\text{g/mL}$) by the OPA–NAC/FMOC method. Reaction with OPA–NAC: final concentration of OPA–NAC, 2.5 mM ; time of reaction, 5 min . Reaction with FMOC: final concentration of FMOC 3.3 mM ; reaction time, 5 min . For other experimental details, see text.

Table 1

Accuracy for the determination of DMA by the optimized OPA–NAC/FMOC method ($n=3$)

Sample	Added concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Determined concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Relative error (%)
Standard	1	1.1 ± 0.3	+12
	5.0	5.0 ± 0.8	+0.4
	10	10.4 ± 1.3	+4
	$5.0 + 5 \mu\text{g/mL}$ of PA	4 ± 1	–20
	$5.0 + 10 \mu\text{g/mL}$ of PA	4.9 ± 0.5	–2
Tap water	1.0	0.9 ± 0.3	–6
	5.0	5.17 ± 1.18	+3
Irrigation water	1.0	1.0 ± 0.4	0
	5.0	5.1 ± 0.4	+3
River water	1.0	1.03 ± 0.4	+3
	5.0	4.3 ± 0.6	–15
Ground water	1.0	0.9 ± 0.2	–8
	5.0	4.9 ± 1.9	–3

3.3. Determination of DMA by the OPA–NAC/FMOC method

The reliability of the described method for the quantification of DMA in water was evaluated by processing standard samples containing the analyte in 1.0 – $10.0 \mu\text{g/mL}$ concentration range [16,17]. The linearity was tested by analysing samples at five different concentrations within the studied interval. The calibration equation obtained was $y = -(35 \pm 35) + (142 \pm 7)x$, with a mean correlation coefficient of $R = 0.990$ ($n = 10$). The method also provided suitable reproducibility, with intra-day and inter-day coefficients of variation, established for $5.0 \mu\text{g/mL}$ of DMA, of 7% ($n = 3$) and 16% ($n = 6$), respectively. The limit of quantification (LOQ) and the limit of detection (LOD) were 1.0 and $0.3 \mu\text{g/mL}$, respectively.

The accuracy was evaluated by processing standards solutions containing DMA at different concentrations within the tested concentration range. As observed in Table 1, suitable accuracy was observed, with a relative errors ranging from +12% (for a concentration equivalent to the LOQ) to +0.4%. In this table are also listed the concentrations of DMA calculated for standard samples containing mixtures of DMA and PA. The results obtained confirmed that the presence of PA did not affect the quantification of DMA. Therefore, the proposed method can be considered selective for DMA.

3.4. Application to real water samples

Different types of samples were analyzed in order to determine DMA: tap water, irrigation water, river water and ground water. Samples were fortified at different levels of concentration within the tested concentration range. The concentration of DMA was established from the calibration equation obtained from standards of DMA. The results of this study (see also Table 1) indicate that concentrations calculated with proposed procedure were close to the real ones.

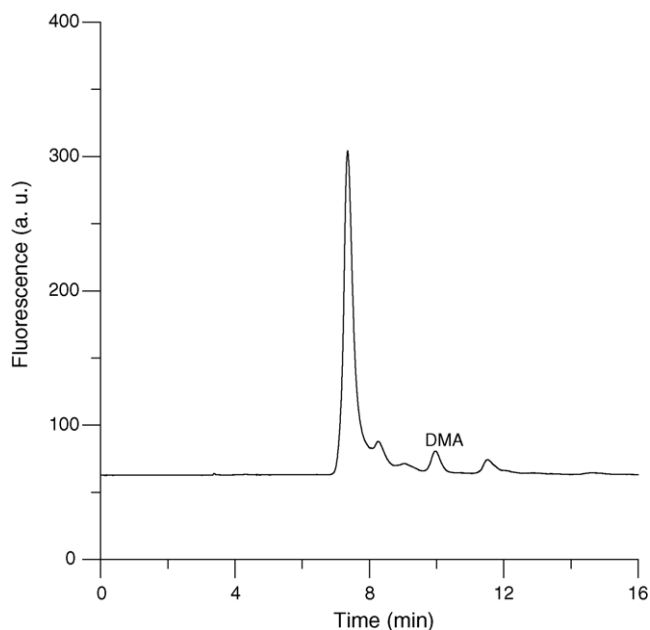


Fig. 7. Chromatogram obtained for a waste water sample by the optimized OPA–NAC/FMOC method.

Finally, the described method was applied to the analysis of waste water obtained from an industry dedicated to the production of fertilizers. As an illustrative example, in Fig. 7 is depicted the chromatogram obtained for one of the samples assayed. The concentration determined for DMA in such sample was 1.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4. Conclusions

The concept of SPME with on-fibre derivatization has been extended to derivatization procedures involving the sequential use of different reagents. In the present work, a two-stage derivatization method has been developed for DMA based on its derivatization with FMOC. The fibres with the extracted analyte were successively immersed into derivatization solutions of OPA–NAC and FMOC. During the first derivatization stage, possible primary aliphatic amines present in the samples were transformed into their OPA–NAC derivatives. Conditions were adjusted to transform quantitatively PA, which is a direct interferent in the determination of DMA with FMOC. In such a way, the

formation of PA–FMOC during the second stage is avoided, and thus the method can be considered selective for DMA.

Compared with conventional solution derivatization, the incorporation of the derivatization process into SPME fibres not only simplified the experimental effort, but also avoided analyte dilution caused by the addition of the reagents. This may be particularly important in derivatization procedures requiring two or more different reagents to achieve the desired selectivity.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project BQU2003-06138) for financial support received. C. Cháfer-Pericás expresses her gratitude to the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte of Spain for pre-doctoral grant.

References

- [1] M. Alpendurada, *J. Chromatogr. A* 889 (2000) 3.
- [2] L. Pan, J. Pawliszyn, *J. Anal. Chem.* 69 (1997) 196.
- [3] E.H.M. Koster, C.H.P. Bruins, G.J. De Jong, *The Analyst* 127 (2002) 598.
- [4] L.S. Cai, Y.Y. Zhao, S.L. Gong, L. Dong, C.Y. Wu, *Chromatographia* 58 (2003) 615.
- [5] S.W. Tsai, C.M. Chang, *J. Chromatogr. A* 1015 (2003) 143.
- [6] A. Namera, A. So, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 295.
- [7] R. Herráez-Hernández, C. Cháfer-Pericás, P. Campins-Falcó, *Anal. Chim. Acta* 513 (2004) 425.
- [8] C. Cháfer-Pericás, P. Campins-Falcó, R. Herráez-Hernández, *Anal. Biochem.* 333 (2004) 328.
- [9] M. Rodríguez López, M.J. González Alvarez, A.J. Miranda Ordieres, P. Tuñón Blanco, *J. Chromatogr. A* 721 (1996) 231.
- [10] T. Teerlink, M.W.T. Hennekes, C. Mulder, H.F.H. Brulez, *J. Chromatogr. B* 691 (1997) 269.
- [11] I. Poels, L.J. Nagels, *Anal. Chim. Acta* 440 (2001) 89.
- [12] P. Campins-Falcó, R. Herráez-Hernández, A. Sevillano-Cabeza, I. Trümpler, *Anal. Chim. Acta* 344 (1997) 125.
- [13] Y. Moliner-Martínez, P. Campins-Falcó, R. Herráez-Hernández, J. Verdú-Andrés, *Anal. Chim. Acta* 502 (2005) 235.
- [14] D. Heems, G. Luck, C. Fraudeau, E. Vérette, *J. Chromatogr. A* 798 (1998) 9.
- [15] P. Herbert, P. Barros, N. Ratola, A. Alves, *J. Food Sci.* 65 (2000) 1130.
- [16] J. Verdú-Andrés, P. Campins-Falcó, R. Herráez-Hernández, *Chromatographia* 55 (2002) 129.
- [17] Z.M. Siddiqi, D. Pathania, *Talanta* 60 (2003) 1197.

Liquid chromatographic determination of trimethylamine in water

Consuelo Cháfer-Pericás, Rosa Herráez-Hernández, Pilar Campíns-Falcó*

Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Dr. Moliner 50, 46100-Burjassot, Valencia, Spain

Received 24 April 2003; received in revised form 22 September 2003; accepted 3 October 2003

Abstract

A method for the selective determination of trimethylamine (TMA) in aqueous matrices by liquid chromatography is reported. The proposed procedure is based on the derivatization of the analyte with 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) in a precolumn (Hypersil C₁₈, 30 μm, 20 mm × 2.1 mm i.d.) connected on-line to the analytical column (LiChrosphere 100 RP₁₈, 5 μm, 125 mm × 4 mm i.d.). Gradient elution was performed with a mixture of acetonitrile–water–0.05 M borate buffer (pH 9.0). The method has been applied to the direct determination of TMA in water within the 0.25–10.0 μg/ml concentration interval, and can also be adapted to the determination of TMA over the range 0.05–1.0 μg/ml by incorporating a preconcentration stage with C₁₈ solid-phase extraction (SPE) cartridges. Good linearity, reproducibility and accuracy was achieved within the tested concentration intervals. The limits of detection at 262 nm were 50 and 5 ng/ml for the direct method and for the method involving preconcentration, respectively. The proposed conditions allowed the selective determination of TMA in the presence of other primary and secondary short-chain aliphatic amines. The utility of the described procedure has been tested by determining TMA in different water samples.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Water analysis; Trimethylamine

1. Introduction

The analysis of short-chain aliphatic amines in water samples is often problematic owing to their high polarity and water solubility, and also to the low concentrations present in real samples. Liquid chromatography (LC) is well suited for the analysis of these amines in aqueous matrices (water, biofluids). However, since short-chain aliphatic amines are rather insensitive towards common LC detectors, a chemical derivatization is generally required. Derivatization can also be used for more convenient sample preparation and chromatographic separation.

Several UV and fluorogenic reagents have been proposed for the derivatization of short-chain aliphatic amines before LC, including 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) [1,2], *o*-phthalaldehyde [3] or dansylchloride [3,4], and new reagents are constantly being developed [5–7]. However, those reagents are reactive only to primary and secondary amines. In contrast, only a few procedures have been developed for the derivatization of tertiary amino

groups, and they rarely include tertiary aliphatic amines. In this sense, the most popular approach is probably the tertiary amine-catalysed condensation of acetic anhydride with citric acid or with malonic acid [8,9]. However, this reaction is subjected to interference by water and thus, it can not be carried out in aqueous phases. Other proposals involve high temperatures and/or very long times of reaction [10]. Therefore, the development of methods for the derivatization of tertiary aliphatic amines for LC continues to be of great interest.

In a previous paper, we demonstrated that FMOC can be used to derivatize the tertiary amphetamine *N*-methylpseudoephedrine under mild conditions [11]. The same reagent has been successfully used for the determination of traces of primary and secondary short-chain aliphatic amines following their derivatization into solid supports [12]. The aim of the present study was to explore the utility of FMOC in the determination of tertiary short-chain aliphatic amines. Derivatizations have been carried out into a C₁₈-packed precolumn connected on-line to the analytical column. Trimethylamine (TMA) has been used as a model of compound, as its determination in aqueous matrices is of increasing interest. Recent methods for this compound are generally based on gas chromatography (GC) [13–17].

* Corresponding author. Tel.: +34-96-3543002; fax: +34-96-3544436.
E-mail address: pilar.campins@uv.es (P. Campíns-Falcó).

The limits of detection (LODs) reported in such methods are typically in the 4–50 ng/ml range. Assays based on potentiometry have also been reported [18,19] giving LODs in the 30–170 ng/ml interval. However, to our knowledge, no LC methods with precolumn derivatization have been reported.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

All the reagents were of analytical grade. Trimethylamine (TMA), methylamine, ethylamine, propylamine, *n*-butylamine, *n*-pentylamine, dimethylamine and diethylamine were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA), and 9-fluorenylmethyl chloroformate was purchased from Aldrich (Steinheim, Germany). Methanol and acetonitrile were of HPLC grade (Scharlau, Barcelona, Spain). Sodium hydroxide, 85%-phosphoric acid and boric acid were obtained from Panreac (Barcelona, Spain).

Stock standard solutions of TMA and the other aliphatic amines (1.0 g/l) were prepared in water. Working solutions of the analyte were prepared by dilution of the stock solutions with water, and then, the pH was adjusted to 10.0 by adding 0.5 M sodium hydroxide. Water was deionized and filtered through 0.45 μ m nylon membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain). All solutions were stored in the dark at 2 °C.

2.2. Apparatus and chromatographic conditions

The chromatographic system consisted of a quaternary pump (Hewlett-Packard 1050 Series, Palo Alto, CA, USA), a 100 μ l sample loop injector, and a UV detector (Hewlett-Packard 1046 Series). The detector was linked to a data system (Hewlett-Packard HPLC Chem Station) for data acquisition and storage. The signal was monitored at 262 nm.

A LiChrospher 100 RP₁₈, 5 μ m, 125 mm \times 4 mm i.d. (Merck, Darmstadt, Germany) column was the analytical column. The mobile-phase was a mixture of acetonitrile–water–0.05 M borate buffer (pH 9.0) in gradient elution. The mobile phase flow rate was 1.0 ml/min. The 0.05 M borate buffer was prepared by dissolving boric acid in water; then the pH was adjusted to the appropriate value by adding 0.5 M sodium hydroxide.

All solvents were filtered through 0.45 μ m nylon membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain) and degassed with helium before use.

2.3. Derivatization procedure

On-line solid support assisted derivatization was accomplished into a precolumn 20 mm \times 2.1 mm i.d., dry-packed with a Hypersil ODS-C₁₈, 30 μ m, station-

ary phase (Merck). The precolumn was connected to the analytical column by means of a high pressure six-port switching valve (Hewlett-Packard). Before each analysis the precolumn and the analytical column were equilibrated with a mobile-phase of acetonitrile–water. At the beginning of each assay the gradient elution program was started, and the switching valve was rotated. In such a way, the percentage of borate buffer in the precolumn was progressively increased, the eluent being sent to waste. At 2.5 min, 25 μ l of the samples were injected into the precolumn. After a delay time of 0.5 min, an aliquot of 50 μ l of 1 mM FMOC was injected. The trapped analyte and the reagent were left to react for 0.5 min. Finally, the switching valve was turned to the original position, so the TMA–FMOC derivative was transferred to the analytical column for chromatography. The FMOC solutions were prepared daily by dissolving the pure compound in acetonitrile.

Each sample was derivatized in triplicate and all assays were carried out at ambient temperature.

2.4. Preconcentration into C₁₈ SPE cartridges

For analyte enrichment, 1 ml Bond Elut C₁₈ cartridges containing 100 mg of packing (Varian, Harbor City, CA, USA) were used. The cartridges were conditioned with 1 ml of methanol followed by 1 ml of 0.05 M borate buffer of pH 9.0. Samples (5.0 ml) were drawn through the cartridges, and then the cartridges were washed with 1 ml of 0.05 M borate buffer and dried with air. Next, the retained TMA was desorbed from the cartridges with 0.5 ml of 0.1 M phosphoric acid. The extracts were basified by adding 100 μ l of 0.5 M sodium hydroxide. Finally, 25 μ l of the resulting mixture were injected into the chromatographic system for derivatization and chromatography.

Each sample was derivatized in triplicate and all assays were carried out at ambient temperature.

3. Results and discussion

3.1. Derivatization and elution conditions

According to previous works, an acetonitrile–water mixture was selected as the mobile-phase [12]. However, since derivatizations with FMOC require a basic medium the pH within the precolumn was increased by increasing the percentage of borate buffer (pH 9.0) in the mobile phase before sample injection. Different experiments were carried out under a variety of elution conditions in order to check whether TMA reacted with FMOC to produce an adequate signal for monitoring this compound. In this study, the concentration of FMOC was 25 mM, and the delay time between sample injection and injection of the reagent (t_1) was 0.5. The time between the injection of the FMOC and the transfer of the TMA derivative to the analytical column (time of reaction,

Table 1
Time schedule and conditions used in the determination of TMA

Cumulative time (min)	Valve position	Action	Elution conditions ^a	
–	1	Conditioning of the precolumn and analytical column	60:40 acetonitrile–water	
0	2	Start of the gradient elution	at 0 min	60:40 (v/v) acetonitrile–water
			at 1.5 min	60:40 (v/v) acetonitrile–0.05 M borate buffer (pH 9.0)
2.5	2	Sample injection (25 μ l)		
2.5–3.0	2	analyte purification		
3.0	2	Reagent injection (50 μ l, 1 mM)		
3–3.5	2	Reaction and elimination of unreacted FMOc	at 3.5 min	60:40 (v/v) acetonitrile–water
3.5	1	Transfer of the product of reaction		
3.5–15	1	Chromatography and detection	at 10 min	70:30 (v/v) acetonitrile–water
			at 15 min	100% acetonitrile
15	1	End		

^a mobile phase flow rate, 1.0 ml/min.

t_2) was also fixed at 0.5 min. The concentration of TMA in the samples was 10.0 μ g/ml.

In most of the tested conditions, it was observed that the reaction between TMA and FMOc resulted in an intense and well-defined chromatographic peak, whereas peaks corresponding to the excess of reagent and/or subproducts eluted at retention times lower than that of the TMA–FMOc derivative. Best resolution of the peak of interest in the minimum time of analysis was obtained under the elution conditions listed in Table 1.

The effect of other experimental variables on the derivatization yields of TMA was examined. The concentration of FMOc was evaluated in the 1–25 mM interval. Both t_1 and t_2 were 0.5 min. Although external standards of TMA–FMOc were not available (and therefore, the absolute analyte conversion yield could not be established), the responses obtained for the derivative of TMA were approximately constant within the tested concentration interval. This indicates that maximum TMA conversion was reached even with 1 mM FMOc. Moreover, best baseline was obtained with 1 mM FMOc, and therefore, this was the concentration used in further work. It should be noted that for this concentration of FMOc and for TMA 10 μ g/ml (the maximum concentration assayed in the present work), the reagent to analyte concentration ratio was about 6. Unlike solution derivatization, this may be enough in the solid support assisted derivatization approach to reach maximum analyte conversions [20]. Lower concentrations of reagent were not used in order to ensure an adequate FMOc-to-amine concentration ratio within the precolumn, particularly in samples with other amines potentially present.

The effect of the time of reaction was evaluated by changing t_2 . Times in the 0.5–1.5 min range were assayed. It was observed that the signal of the analyte remained constant or even decreased with increasing t_2 due to breakthrough. Consequently, a reaction time of 0.5 min was selected as the best option for derivatization of TMA.

3.2. Selectivity

In order to test the selectivity of the proposed method, different short-chain primary and secondary amines were assayed under the conditions listed in Table 1. The amines tested were methylamine, ethylamine, propylamine, *n*-butylamine, *n*-pentylamine, dimethylamine and diethylamine. Indeed, all these amines reacted with FMOc, but their derivatives showed retention times different to that of the TMA–FMOc. Nevertheless, in order to prevent an excessive consumption of FMOc in the presence of other potentially present amines, a purification step was incorporated in the analytical procedure. Purification was effected by flushing the precolumn with the mobile phase for a defined period of time (t_1) before injecting the FMOc reagent. Different values for t_1 within the 0.5–1.5 min interval were assayed.

All the amines tested were flushed from the precolumn already after 0.5 min, with the only exception of diethylamine. Increasing this time caused a loss of TMA. A flushing time of 0.5 min was therefore preferred.

On the basis of the above results, the conditions finally selected for the derivatization and chromatography of TMA are those listed in Table 1. Fig. 1 shows the chromatograms obtained for a blank (water) and a sample containing TMA under such conditions.

3.3. Analytical performance data

The reliability of the described method was evaluated by processing standard samples containing the analytes in 0.25–10.0 μ g/ml concentration range. The linearity was tested by analysing samples at four different concentrations within the studied interval. The proposed procedure provided adequate linearity ($y = (942 \pm 42)x + (642 \pm 234)$, $R^2 = 0.98$). The method also provided suitable reproducibility, with intra-day and inter-day coefficients of variation of 9% ($n = 3$) and 11% ($n = 6$), respectively (at a concentration of 5.0 μ g/ml).

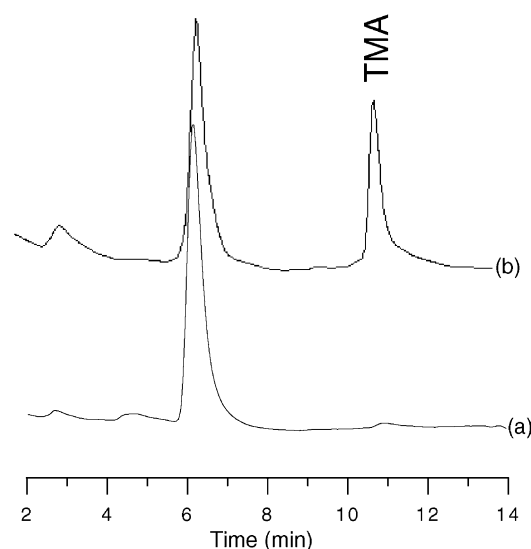


Fig. 1. Chromatograms obtained for (a) a blank (water) and for (b) a standard solution containing 2.5 µg/ml of TMA. For other experimental details, see text.

The limit of detection (LOD, established as the concentration required to generate a signal-to-noise ratio of 3), was estimated by analysing solutions of decreasing concentration of TMA. Before analysing each sample, water was processed. In such a way, it was confirmed that there were no contaminants and/or memory effects. The value obtained was 50 ng/ml.

In principle, the described conditions may be suitable for most applications concerning the determination of TMA in industrial and waste water, or in biological samples [6,19]. However, methods capable of determining concentrations of TMA below 1.0 µg/ml may be required, for example in the analysis of environmental water samples [16,17]. Although analyte enrichment is possible through the injection of large sample volumes into precolumns, such as that used in the

present study for derivatization, we obtained unsuccessful results for TMA. The reason is that, owing to the polarity of TMA and the small dimensions of the precolumn, losses of the analyte by breakthrough occurred even for sample volumes as low as 0.5 ml.

As an alternative, enrichment of the analyte was effected off-line on SPE cartridges according to the procedure previously described for primary and secondary amines [12]. The sample volume was 5.0 ml, and the concentration of TMA ranged from 0.05 to 1.0 µg/ml. The recovery of TMA obtained within the tested concentration interval was $(96 \pm 11)\%$ ($n = 12$), thus resulting in an enrichment factor of about 8. The linearity was suitable ($y = (8729 \pm 182)x + (776 \pm 291)$, $R^2 = 0.97$), and the intra-day and inter-day coefficients of variation were 11% ($n = 3$) and 13% ($n = 6$), respectively (for 0.05 µg/ml TMA). The LOD was 5 ng/ml. It is interesting to note that this value of about one order of magnitude higher than the LODs typically encountered for primary and secondary aliphatic amines [12]. This suggests that the reaction yield for this tertiary amine is significantly lower than the conversion yields obtained for primary and secondary aliphatic amines. Similar results were observed in the reaction between FMOC and primary, secondary and tertiary amphetamines [11].

The accuracy of the two proposed procedures was evaluated by processing standard solutions containing TMA at different concentrations within the tested concentration interval. As observed in Table 2, suitable accuracy was achieved, with relative errors ranging from +10% to -8%. In order to test possible interference by diethylamine (the only short-chain aliphatic amine that could be retained in the precolumn), samples containing 0.1 µg/ml of TMA and diethylamine were also assayed. The diethylamine to TMA concentration ratios in these samples were 1 and 50. Finally, a sample containing a mixture of several aliphatic amines besides TMA was processed. No significant interference was observed in any of the samples assayed (see Table 2).

Table 2
Accuracy for the determination of TMA ($n = 3$).

Sample	Added concentration (µg/ml)	Determined concentration (µg/ml)	Relative error (%)
Standard ^a	5.0	5.03	+0.6
Standard	0.1	0.11	+10
Standard	0.2	0.195	-3
Standard	0.5	0.46	-8
Standard	0.1 + 0.1 µg/ml of diethylamine	0.11	+10
Standard	0.1 + 5.0 µg/ml of diethylamine	0.11	+10
Standard	1.0 + methylamine + ethylamine + propylamine + butylamine + pentylamine + diethylamine + dimethylamine (1.0 µg/ml each)	0.84	-16
Tap water	0.1	0.11	+10
Tap water	0.5	0.52	+4
Sea water	0.5	0.55	+10
Ground water	0.5	0.45	-10
Waste water ^a	10.0	9.9	-1

^a Obtained by the direct method.

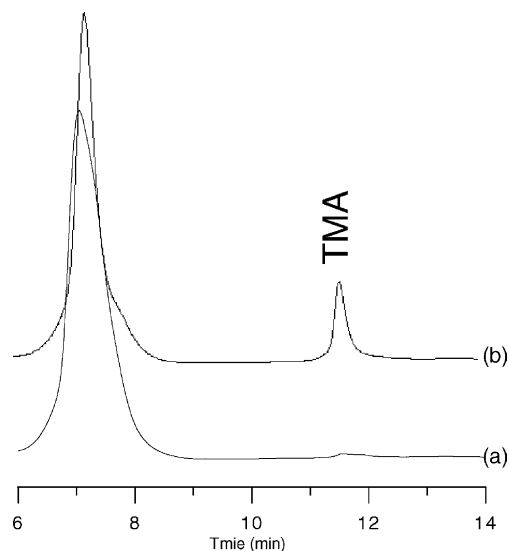


Fig. 2. Chromatograms obtained for (a) sea water, and for (b) sea water fortified with 1.0 $\mu\text{g/ml}$ of TMA, after SPE. For other experimental details, see text.

3.4. Application to real water samples

The reliability of the described method was tested by analysing tap water, ground water, sea water and waste water. Ground water, sea water and waste water were previously filtrated with 0.45 μm nylon membranes in order to remove any particulate matter. Waste water was analyzed by the direct method, whereas the other samples were then subjected previously to SPE. None of the samples analyzed contained TMA. As an illustrative example, in Fig. 2 are shown the chromatograms obtained for sea water and for sea water spiked with TMA.

Samples fortified with TMA were processed, and the concentration of TMA was established from the calibration curves obtained from the standard solutions. As observed in Table 2, the results obtained were comparable to those obtained for standard solutions. Therefore, the quantitative performance of the method can be considered suitable for these kind of samples.

4. Conclusions

The results of this study demonstrate the utility of FMOC for the sensitive analysis of TMA in water samples using the derivatization into C_{18} supports. Although FMOC has been proposed as a reagent for primary and secondary amines, the solid support assisted derivatization method permits the formation of TMA in very short times of reaction and under very mild conditions (pH 9.0 at ambient temperature).

The described method is very simple, as derivatizations are performed in an on-line mode, and allows the determination of TMA within the range 0.25–10.0 $\mu\text{g/ml}$ in about

15 min. If required, the method can be applied to the determination of TMA at lower concentrations (0.05–1.0 $\mu\text{g/ml}$) by preconcentrating the analyte into C_{18} SPE cartridges. The LODs are comparable to those reported by methods for TMA using GC. Additional advantages over previous methods involving derivatization are the fact that the reagent is commercially available, and that the reaction can be carried out into aqueous media. Moreover, the presence of other primary and/or secondary short-chain aliphatic amines did not interfere, with diethylamine as the only exception. Very large concentrations of this amine would interfere with the determination of TMA due to the consumption of FMOC.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Ministerio de Ciencia y Tecnología of Spain for financial support received for the realization of Project PPQ2000-1641. C. Cháfer expresses her gratitude to the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte of Spain for pre-doctoral grant.

References

- [1] M. Rodríguez López, M.J. González Alvarez, A.J. Miranda Ordieres, P. Tuñón Blanco, J. Chromatogr. A 721 (1996) 231.
- [2] J. Pietsch, S. Hampel, W. Schmidt, H.-J. Brauch, E. Worch, Fresenius J. Anal. Chem. 355 (1996) 164.
- [3] C. Mellbin, B.B.E. Smith, J. Chromatogr. 312 (1984) 203.
- [4] M.C. Gennaro, E. Mentasti, C. Sarzanini, V. Porta, Chromatographia 25 (1988) 117.
- [5] J. You, W. Lao, J. You, G. Wang, Analyst 124 (1999) 1755.
- [6] H. Wang, J. Li, X. Liu, H.-S. Zhang, Anal. Chim. Acta 423 (2000) 77.
- [7] X. Liu, H. Wang, S.-C. Liang, H.-S. Zhanga, Anal. Chim. Acta 441 (2001) 45.
- [8] M. Kudoh, I. Matoh, S. Fudano, J. Chromatogr. 161 (1983) 293.
- [9] P. López Mahía, J. Simal Gándara, P. Paseiro Losada, S. Paz Abuín, J. Simal Lozano, Fresenius J. Anal. Chem. 342 (1992) 581.
- [10] G. Gübitz, R. Wintersteiger, A. Hartinger, J. Chromatogr. 218 (1981) 51.
- [11] R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, Analyst 125 (2000) 1071.
- [12] J. Verdú-Andrés, P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández, Analyst 126 (2001) 1683.
- [13] G.A. Mills, V. Walker, H. Mughal, J. Chromatogr. B 723 (1999) 281.
- [14] T. Mushiroda, T. Yokoi, E. Takahara, O. Nagata, H. Kato, T. Kamataki, J. Chromatogr. B 734 (1999) 319.
- [15] C. Maris, A. Laplanche, J. Morvan, M. Bloquel, J. Chromatogr. A 846 (1999) 331.
- [16] C. Aguilar, H.-G. Janssen, C.A. Cramers, J. Chromatogr. 287 (2000) 207.
- [17] Y.-C. Chien, S.-N. Uang, C.-T. Kuo, T.-S. Shih, J.-F. Jen, Anal. Chim. Acta 419 (2000) 73.
- [18] I. Poels, L.J. Nagels, Anal. Chim. Acta 440 (2001) 89.
- [19] N. Adhoum, L. Monser, S. Sadok, A. El-Abed, G.M. Greenway, R.F. Uglow, Anal. Chim. Acta 478 (2003) 53.
- [20] P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández, A. Sevillano-Cabeza, I. Trümpler, Anal. Chim. Acta 344 (1997) 125.

Short communication

Selective determination of trimethylamine in air by liquid chromatography using solid phase extraction cartridges for sampling

Consuelo Cháfer-Pericás, Rosa Herráez-Hernández, Pilar Campíns-Falcó*

Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Dr. Moliner 50, 46100-Burjassot, Valencia, Spain

Received 13 February 2004; received in revised form 7 May 2004; accepted 13 May 2004

Abstract

The selective determination of trimethylamine (TMA) in air by liquid chromatography is reported. Sampling is effected by flushing air through C₁₈-packed solid-phase extraction (SPE) cartridges at a flow rate of 15 mL/min for 15 min. Next, TMA is desorbed from the cartridges and injected into the chromatographic system. The analyte is then selectively retained on a precolumn (20 mm × 2.1 mm i.d., packed with 30 μm, Hypersil C₁₈ phase), and derivatized on-line by injecting 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC). Finally, the TMA-FMOC derivative is transferred to the analytical column (125 mm × 4 mm i.d., LiChrospher 100 RP₁₈, 5 μm), and monitored at 262 nm. The method was applied to the measurement of TMA in air in the 0.25–2.5 μg interval (equivalent to concentrations of TMA of 1.1–11 mg/m³), providing good linearity, reproducibility and accuracy. The mean recovery of TMA was (96 ± 7%) (*n* = 12), and the limit of detection was 0.05 μg. The proposed procedure allows the selective determination of TMA in the presence of other primary and secondary short-chain aliphatic amines. © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Air analysis; Solid-phase extraction; Trimethylamine

1. Introduction

Trimethylamine (TMA) is a malodorous aliphatic amine frequently identified in the gaseous emissions of several industries and wastewater treatment plants. Health effects associated with the inhalation of TMA include irritation of the respiratory tract, eyes and skin. Consequently, the sensitive determination of TMA in atmospheric and human work environments is of great interest. As most short-chain aliphatic amines, TMA is currently determined by gas chromatography (GC) [1,2] or by liquid chromatography (LC) [3]. Prior preconcentration and/or chemical derivatization of the amines is generally involved to improve the specificity and sensitivity of the analysis.

Several alternatives have been proposed for collecting airborne aliphatic amines such as the employment of sorbents (silica gel, acidic coated XAD-7) [4,5] or impringer flasks

containing acidic solutions [6], but the general trend is to replace wet sampling methods by solvent-free extraction techniques. In this sense, one of the most promising approaches for sampling volatile compounds is solid phase microextraction (SPME). However, most SPME procedures described to date deal with the extraction of TMA from aqueous matrices [7]. Moreover, the formation of artefacts during the analysis of TMA in air by SPME-GC has been reported [8].

The employment of solid-phase extraction (SPE) cartridges may be a rapid and simple alternative for collecting volatile amines. This has been illustrated for a variety of primary short-chain aliphatic amines using C₁₈ cartridges and *o*-phthaldialdehyde-*N*-acetyl-L-cysteine (OPA-NAC) as derivatization reagent [9]. The proposed conditions could not be used to determine TMA because OPA-NAC only reacts with primary amines. This is a limitation of LC and GC procedures involving chemical derivatization, as a vast majority of the reagents available are reactive only to primary and secondary amine groups.

We have recently proposed a LC method for the analysis of TMA in water based on its derivatization with

* Corresponding author. Tel.: +34 96 3544436; fax: +34 96 3544436.
E-mail address: pilar.campins@uv.es (P. Campíns-Falcó).

9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) [10]. Although FMOC is typically used as a reagent for primary and secondary amines, the employment of a solid support to effect the derivatization made possible the transformation of TMA into its FMOC derivative with a conversion yield adequate for the quantification of this compound at low ppm levels. In such study, derivatization was effected on-line into a precolumn packed with a C₁₈-based stationary phase.

In the present study, we have developed a method for the determination of TMA in air using SPE cartridges for sampling and LC. In order to attain the required sensitivity, the analyte has been subjected to derivatization with FMOC according to the procedure described in [10].

2. Experimental

2.1. Apparatus

Air sampling was done with a portable Buck-Genie VSS-5 pump (A.P. Buck Inc., Orlando, FL, USA). For flow measurements a flow-meter Multicon KS, Dräger (Lübeck, Germany) was used.

The chromatographic system consisted of a quaternary pump (Hewlett-Packard 1050 Series, Palo Alto, CA, USA), a 100 μ L sample loop injector, and a UV detector (Hewlett-Packard 1046 Series). The detector was linked to a data system (Hewlett-Packard HPLC Chem Station) for data acquisition and storage. The detector operated at 262 nm.

The analytical column was a LiChrospher 100 RP₁₈, 5 μ m, 125 mm \times 4 mm i.d. column (Merck, Darmstadt, Germany). A precolumn 20 mm \times 2.1 mm i.d., dry packed with a Hypersil ODS-C₁₈, 30 μ m, stationary phase (Merck) was placed between the injector and the analytical column. The precolumn and the analytical column were connected by means of an automatic six-port switching valve (Helwett-Packard).

2.2. Reagents and solutions

All the reagents were of analytical grade. Methanol and acetonitrile were of HPLC grade (Scharlau, Barcelona, Spain). Trimethylamine, methylamine, ethylamine, propylamine, *n*-butylamine, *n*-pentylamine, dimethylamine and diethylamine were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA), and 9-fluorenylmethyl chloroformate was purchased from Aldrich (Steinheim, Germany). Sodium hydroxide, phosphoric acid and boric acid were obtained from Panreac (Barcelona, Spain).

Stock standard solutions of TMA and the other amines (1.0 g/L) were prepared in water. Working solutions of these compounds were prepared by dilution of the stock solutions with water. Water was deionized and filtered through 0.45 μ m nylon membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain). All solutions were stored in the dark at 2 °C.

2.3. Derivatization and chromatography

On-line solid support assisted derivatization was accomplished according to the procedure described in [10]. Briefly, the precolumn and the analytical column were connected and equilibrated with 60:40 acetonitrile–water (v/v) before each run. At the beginning of the assay the gradient elution program was started and the switching valve was rotated, so the eluent emerging from the precolumn was sent to waste. At 2.5 min 25 μ L of the sample were injected into the precolumn; the FMOC reagent (50 μ L) was injected at 3.0 min. The analyte and the reagent were left to react inside the column for 0.5 min. At min 3.5, the switching valve was rotated and the TMA-FMOC derivative was transferred to the analytical column for chromatography. Meanwhile, the eluent composition was changed to from 60:40 acetonitrile–water (v/v) at min zero to 60:40 acetonitrile-0.05 M borate buffer (pH 9.0) at 1.5 min, and then to 60:40 acetonitrile–water at 3.5 min. The acetonitrile content was then increased from 60 to 70% at min 10, and to 100 at 15 min. The mobile-phase flow rate was 1 mL/min.

The 0.05 M borate buffer was prepared by dissolving boric acid in water; then the pH was adjusted to the appropriate value by adding 0.5 M sodium hydroxide. All solvents were filtered through 0.45 μ m nylon membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain) and degassed with helium before use.

2.4. Air sampling for standards

For air sampling, 1 mL Bond Elut C₁₈ cartridges containing 100 mg of packing (Varian, Harbor City, CA, USA) were used. The cartridges were conditioned with 1 mL of methanol followed by 1 mL of 0.05M borate buffer of pH 9.0. Air was drawn through the cartridges for 15 min at a flow rate was 15 mL/min (unless otherwise stated). The flow rate was controlled with the flow-meter at the beginning and at the end of each assay. After sampling the retained TMA was desorbed from the cartridges with 0.5 mL of 0.1 M phosphoric acid. The pH of the extracts was made basic by adding 100 μ L of 0.5 M sodium hydroxide. Finally, 25 μ L of the resulting mixture were injected into the chromatographic system for derivatization and chromatography. Each sample was processed in triplicate, and all assays were carried out at ambient temperature.

2.5. Analysis of TMA in air

Air samples were prepared by contaminating the air inside a closed PVC chamber (29 cm \times 18 cm \times 15.5 cm) with TMA. For this purpose, an opened flask containing pure TMA was placed inside the chamber, and after a variable period of time sampling was carried out.

Each sample was processed in triplicate, and all assays were carried out at ambient temperature.

3. Results and discussion

3.1. Sampling procedure

In order to optimize the sampling conditions, 50 μL of 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TMA were placed in a plastic tube which acted as a volatilization chamber [9]. The outlet of the cartridges were connected to the air pump, whereas the inlet was connected the volatilization chamber. An aliquot of 50 μL of 0.5 M NaOH was added to the solution of TMA to volatilize the amine just before starting the sampling process. Several assays were carried out under different sampling times and flow-rates. Sampling efficiency was established by comparing peak areas obtained for the analyte with those obtained from the direct injection of a standard solution of TMA containing an equivalent amount of the analyte (2.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Best results were obtained at a sampling rate of 15 mL/min. At higher values poor reproducibility was observed because the pump did not deliver a constant flow rate, which can be explained by the variations in the porosity of the SPE cartridges between assays (data not shown). At a flow rate of 15 mL/min, the volatilization of the analyte was nearly complete in less than 15 min. The mean recovery of TMA was found to be $(95 \pm 6\%)$, $n = 3$. Consequently, sampling at 15 mL/min for 15 min (equivalent to a sample volume of 225 mL) were the conditions selected for further work.

As an illustrative example, in Fig. 1 are the chromatograms obtained for TMA in air and for a blank under the proposed conditions.

3.2. Analytical performance data

The reliability of the described method was evaluated by processing samples containing the analyte in the

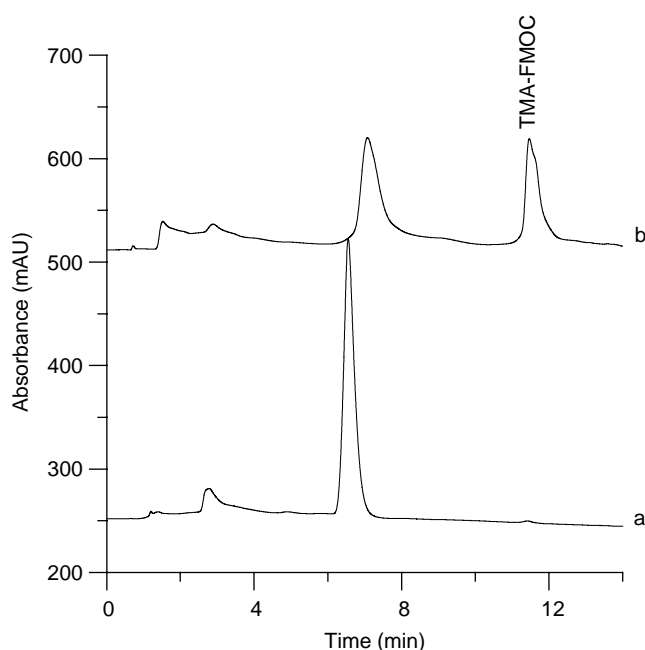


Fig. 1. (a) Chromatograms obtained for blank air, and (b) for air containing 11.1 mg/m^3 of TMA. For other details, see text. Peak at around 7.8 min (unreacted peak) decreases in samples containing TMA due to reagent consumption.

1.1–11 mg/m^3 concentration range (equivalent to amounts of TMA of 10.4–104 ng). For this purpose, aqueous standard solutions of TMA within the range 5.0–50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were placed in the volatilization chamber, and processed as described in the above section. The results of this study are summarised in Table 1.

As observed, good linearity was obtained over the studied range. The calibration equation was comparable to that obtained for aqueous standard solutions of TMA containing the same amounts of the analyte and injected directly into the chromatographic system, which was $y = (36900 \pm 1671)x + (642 \pm 235)$, ($r^2 = 0.98$, $n = 12$). The recovery of TMA in air samples, calculated from the ratio of the slopes of calibrations was 95%,

Table 1
Analytical performance data obtained in for TMA in air

Linearity ($y = ax + b$)	Recovery (%) ($n = 12$)	Reproducibility C.V. (%) ^a		LOD	Accuracy		
		Intra-day ($n = 3$)	Inter-day ($n = 6$)		Concentration added (mg/m^3)	Concentration determined (mg/m^3)	Er (%)
$a \pm S_a = 35131 \pm 2011$	(96 ± 7)	7	15	0.05 μg	5.56	5.33	-4
$b \pm S_b = 652 \pm 125$					11.1	11.2	+1
$r^2 = 0.990$					5.56 + a mixture of other aliphatic amines ^b (5.56 mg/m^3 each)	5.91	+6
					11.1 + a mixture of other aliphatic amines ^b (11.1 mg/m^3 each)	11.9	+9

^a Determined at 1.25 μg of TMA.

^b Methylamine, ethylamine, propylamine, butylamine, *n*-pentylamine, dimethylamine and diethylamine.

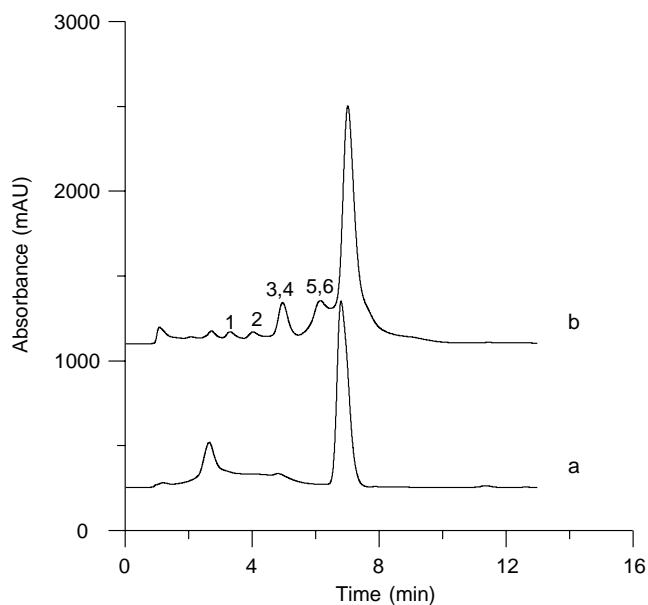


Fig. 2. (a) Chromatograms obtained for a mixture of (1) methylamine, (2) ethylamine, (3) propylamine, (4) dimethylamine, (5) butylamine, and (6) diethylamine under the proposed conditions, and (b) chromatogram obtained for the same mixture by injecting the FMOC 0.1 min after the injection of the sample. The concentration of each amine in the samples was 11.1 mg/m^3 . For other details, see text.

which is consistent with the value obtained in the above section.

The method provide suitable reproducibility, with intra-day and inter-day coefficients of variation of 9 and 15%, respectively (for an amount of TMA of $1.25 \mu\text{g}$). The limit of detection (established as the concentration required to generate a signal-to-noise ratio of 3) was $0.05 \mu\text{g}$ of TMA (equivalent to a concentration in air of 0.22 mg/m^3). This value is comparable to the limits of detection (LODs) reported by other methods proposed for the analysis of TMA in air [4,11]. However, the sample volume required in the present assay (and therefore, the sampling time) is significantly reduced.

The selectivity of the method was tested by analysing standard solutions containing mixtures of TMA and other short-chain aliphatic amines (methylamine, ethylamine, propylamine, *n*-butylamine, dimethylamine and diethylamine). None of the amines tested were detected in the chromatograms of the air samples (Fig. 2a), as they were excluded from the precolumn during the time elapsed between their injection and the injection of the reagent (0.5 min) [10]. When reducing this time interval, all amines were identified in the resulting chromatograms (Fig. 2b), which indicates that they were also retained in the SPE cartridges during sampling. However, their FMOC derivatives showed retention times lower than that of TMA-FMOC. Therefore, under the proposed conditions the assay can be considered selective for TMA. This was confirmed by determining the concentration of the TMA in samples containing mixtures of all amines tested (see Table 1).

3.3. Application

The procedure was applied to the analysis of air contaminated with TMA. The mean concentration of the analyte in this samples was established after different collecting times from the calibration curve obtained for TMA in air samples. The results obtained were ($0.568 \pm 0.008 \text{ mg/m}^3$), ($0.85 \pm 0.09 \text{ mg/m}^3$) and ($1.64 \pm 0.04 \text{ mg/m}^3$) for sampling times of 10 min, 20 min and 4 h (equilibrium), respectively ($n = 3$). Moreover, the amounts of TMA measured under equilibrium conditions on different days were rather similar, with a coefficient of variation of 9% ($n = 9$). This indicates that the proposed procedure offers suitable reproducibility.

4. Conclusions

Conventional C_{18} SPE cartridges can be used to sample TMA from air. The proposed approach avoids the use of solutions to retain the analyte and thus, is well suited for portable sampling devices. Compared with earlier described procedures, the time required for sampling is significantly reduced because the derivatization of TMA with FMOC increases the sensitivity. In fact, this is, to our knowledge, the first method proposed for the analysis of TMA in air based on its chemical derivatization. Most existing methods for the analysis of aliphatic amines in air can not be applied to TMA because they use reagents capable of reacting only with primary and secondary amines [5,12].

The sensitivity, accuracy and reproducibility achieved by the proposed method are adequate for monitoring occupational exposure of TMA [4]. Moreover, the presence of other primary and/or secondary short-chain aliphatic amines does not interfere, therefore, the method can be considered selective for TMA.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Ministerio de Ciencia y Tecnología of Spain for financial support received for the realization of Project PPQ2000-1641. C. Cháfer express her gratitude to the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte of Spain for pre-doctoral grant.

References

- [1] A.Q. Zhang, S.C. Mitchell, R. Ayesh, R.L. Smith, J. Chromatogr. 584 (1992) 141.
- [2] C. Maris, A. Laplanche, J. Morvan, M. Bloquel, J. Chromatogr. A 846 (1999) 331.
- [3] I. Poels, L. Nagels, J. Anal. Chim. Acta 440 (2001) 89.
- [4] OSHA, Method number PV 2060, Organic Service Branch I, Salt Lake City, UT, 1993.
- [5] N.A. Santagati, E. Bousquet, A. Spadaro, G. Ronsisvalle, J. Pharm. Biomed. Anal. 29 (2002) 1105.

- [6] L. Groenberg, P. Loevkvist, J.A. Joansson, *Chemosphere* 24 (1992) 1533.
- [7] G.A. Mills, V. Walker, H. Mughal, *J. Chromatogr. A* 723 (1999) 281.
- [8] F. Lestremau, V. Desauziers, J.L. Fanlo, *Analyst* 126 (2001) 1969.
- [9] Y. Moliner-Martínez, P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández, J. Verdú-Andrés, *Anal. Chim. Acta* 502 (2004) 235.
- [10] C. Cháfer-Pericás, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, *J. Chromatogr. A* 1023 (2004) 27.
- [11] Y.-C. Chien, S.-N. Uang, C.-T. Kuo, T.-S. Shih, J.-F. Jen, *Anal. Chim. Acta* 419 (2000) 73.
- [12] L. Pan, M. Chong, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 773 (1997) 249.

Comparative study of the determination of trimethylamine in water and air by combining liquid chromatography and solid-phase microextraction with on-fiber derivatization

C. Cháfer-Pericás, P. Campíns-Falcó*, R. Herráez-Hernández

Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

Received 31 May 2005; received in revised form 7 October 2005; accepted 4 November 2005

Available online 15 December 2005

Abstract

This work describes a new approach for the determination of trimethylamine (TMA) in water and air by liquid chromatography (LC). The assay is based on the employment of a solid-phase microextraction (SPME) fiber for sampling and for derivatization of the analyte with the fluorogenic reagent 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC). The fiber, with a Carbowax-templated resin –50 µm coating, was first immersed into a solution of the reagent. Once loaded with the reagent, the fiber was immersed into the water samples or exposed to the air samples in order to extract and to derivatize the analyte. Finally, the fiber was placed into a HPLC–SPME interface to desorb and transfer the TMA–FMOC derivative to the LC equipment. A comparative study of the analytical characteristics of the procedure in water and air samples was carried out. Under optimized conditions, the proposed approach permits the quantification of TMA in solution within the 1.0–10.0 µg/ml interval and in air within the 25–200 mg/m³ interval. The limits of detection were 0.25 µg/ml and 12 mg/m³ (25 °C, 1.013 × 10⁻⁵ Pa) in water and air, respectively. The utility of the proposed method for determining TMA in different kind of samples is discussed.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Solid-phase microextraction; Trimethylamine; Liquid chromatography; Water; Air

1. Introduction

Short-chain aliphatic amines can be found in many different matrices such as natural and waste waters, industrial raw materials, or gaseous emissions from waste incineration and sewage treatment plants. They are currently determined by gas chromatography (GC) [1,2] or by liquid chromatography (LC) [3,4]. However, the quantification of these amines, particularly at trace levels, is a complex task for a number of reasons. Firstly, their isolation and preconcentration are problematic because of their physicochemical characteristics, i.e. high polarity, water solubility, volatility and basic character. Moreover, this kind of amines often shows poor chromatographic properties [5]. Another difficulty encountered in LC assays is that these compounds are rather insensitive towards UV, fluorescence and electrochemical detectors.

To overcome such problems most LC assays incorporate a chemical derivatization before the chromatographic step [3,4]. Derivatization is usually carried out in the solution mode, that is, aqueous samples are directly mixed with a solution of the reagent to form derivatives more amenable for isolation and preconcentration, resolution and detection. The quantification of aliphatic amines in air typically entails the employment of solid sorbents, impinger flasks or bubbled through an acidic solution for sampling. After sampling, the analytes are dissolved in a medium adequate for derivatization with the selected reagent [6–8]. However, most of the reagents available for amines are not reactive towards tertiary amino groups and, therefore, tertiary short-chain aliphatic amines are not included in a vast majority of the reported assays [9–11]. This is the case of trimethylamine (TMA) in spite of the fact that there is an increasing demand of methods for monitoring this amine in the environmental and industrial hygiene fields.

In a previous study we demonstrated that 9-fluorenylmethylchloroformate (FMOC), a reagent widely used in LC for primary and secondary amines, also reacts in solution with ter-

* Corresponding author. Tel.: +34 96 3543002; fax: +34 94 3544436.
E-mail address: pilar.campins@uv.es (P. Campíns-Falcó).

tiary amines under mild conditions. This was illustrated first for the tertiary amphetamine *N*-methylephedrine [12]. However, the reaction yields were substantially lower than those observed for analogous primary and secondary ephedrine [13].

One of the approaches for increasing the analyte conversion yields and thus the sensitivity with respect to those obtained in solution derivatization is the so-called solid-support assisted derivatization technique [14]. This approach is based on retaining the analyte into a solid support, typically the packing of a solid-phase extraction (SPE) cartridge, which is then flushed with an aliquot of the derivatization reagent solution. After the reaction time the excess of reagent is eliminated by flushing the cartridge with the proper solvent and the derivative formed is desorbed and collected for subsequent analysis. Derivatization can be also performed into a precolumn connected on-line to the analytical column [15]. The later option has been used for the sensitive determination of TMA in water using FMOc as derivatization reagent [16]. This methodology was also adopted for the measurement of TMA in air using C₁₈-based SPE cartridges for sampling [17].

In the last years, SPME with polymeric coated fused-silica fibers has emerged as a valuable tool for sample preparation, as it integrates sampling, purification, preconcentration and sample introduction in a single process [18]. The solid-support assisted derivatization concept can be extended to the solid-phase microextraction (SPME) methodology. In fact, a chemical derivatization can be effected by treating the fiber with the proper reagent before or after the extraction of the analyte (on-fiber derivatization). In such a way, the entire analysis can be substantially simplified. According to the literature, FMOc is a reagent adequate for on-fiber derivatization of different amino compounds [19,20]. In the environmental field, the utility of this approach has been recently demonstrated in the LC analysis of methylamine [21] and dimethylamine [22] in water using Carbowax-templated resin coated fibers. In the present work, we have evaluated the possibility of simplifying the analysis of TMA by combining SPME and chemical derivatization with FMOc. The differences of the procedure for two matrices, water and air, are discussed. The advantages and disadvantages with respect to the solid-phase procedure previously proposed [16,17] have been outlined. The described conditions have been applied to measure TMA in air and water samples.

2. Experimental

2.1. Reagents

All the reagents were of analytical grade. Trimethylamine (TMA), methylamine, ethylamine, *n*-butylamine, *n*-pentylamine, propylamine, dimethylamine and diethylamine were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA), 9-fluorenylmethyl chloroformate and 3,5-dinitrobenzoyl chloride were purchased from Aldrich (Steinheim, Germany). Acetonitrile and methanol were of HPLC grade (Scharlau, Barcelona, Spain). Sodium hydroxide, 85% phosphoric acid and boric acid were obtained from Panreac (Barcelona, Spain).

Stock standard solutions of TMA and the other aliphatic amines (1.0 g/l, unless otherwise stated) were prepared in water. Working solutions of the analyte were prepared by dilution of the stock solutions with water. The pH of the samples was adjusted to 10.0 by adding 0.5 mol/l sodium hydroxide. Water was deionized and filtered through 0.45 μm nylon membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain). All solutions were stored in the dark at 2 °C.

2.2. Apparatus

The chromatographic system consisted of a quaternary pump (Hewlett-Packard 1050 Series, Palo Alto, CA, USA), a SPME–HPLC interface (Supelco, Bellefonte, PA, USA) and a fluorescence detector (Hewlett-Packard, 1050 Series). The excitation and emission wavelengths were 264 and 313 nm, respectively. A UV detector (Hewlett-Packard 1046 Series) was also employed. The signal was monitored at 262 nm. The detectors were coupled to a data system (Hewlett-Packard, HPLC Chem Station) for data acquisition and calculation. A SPME assembly with replaceable extraction fibers coated with Carbowax-templated resin (CW-TR, 50 μm, Supelco) was used for extraction and/or derivatization.

2.3. Chromatographic conditions

A LiChrospher 100 RP₁₈, 125 mm × 4 mm i.d. column (Merck, Darmstadt, Germany) was the analytical column. The mobile phase was a mixture of acetonitrile–water in gradient elution mode, and the flow rate was 1 ml/min. According to the results presented in [21] a precolumn and a high-pressure six-port valve (Hewlett-Packard) were inserted between the SPME–HPLC interface and the analytical column to effect peak compression. The precolumn (20 mm × 2.1 mm i.d.) was dry-packed with a Hypersil C₁₈, 30 μm, stationary phase. Initially, the precolumn and the analytical column were connected and equilibrated with water. During the desorption of the analytes in the SPME–HPLC interface filled with acetonitrile, the switching valve was rotated, so the eluent emerging from the precolumn (water) was sent to waste. The chromatographic run was started when the SPME–HPLC interface was activated to send the TMA–FMOc derivative to the precolumn. At 0.5 min the six-port valve was again rotated so precolumn and the analytical column were connected again. Meanwhile, the acetonitrile content in the mobile phase was linearly increased from 0 to 60% at 2.5 min; the mobile phase composition was kept constant until 3.5 min, and then the percentage of acetonitrile was increased to 70% at 10 min, and to 100% at 15 min (in such a way both the precolumn and the analytical column were cleaned at the end of each assay). All solvents were filtered through 0.45 μm nylon membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain) and degassed with the vacuum unit of the Hewlett-Packard pump before use.

2.4. SPME and derivatization procedures

2.4.1. Water standards

Unless otherwise stated, the fiber was plunged into a glass vial (2 ml) containing the derivatization solution for a defined

extraction time between 1 and 55 min. This solution consisted of 0.5 ml of 0.05 mol/l borate buffer with pH between 8.5 and 11.0 and 1.0 ml of the FMOc solution. The concentration of reagent was evaluated within the 1–25 mmol/l interval. The fiber was then removed from the vial and immersed into a glass vial containing the standard with concentration up to 10 µg/ml (25 ml). After a defined period of time, that was modified between 0.5 and 45 min, the fiber was removed from the sample vial and placed in the SPME–HPLC interface for desorption of the derivatized analyte and for chromatography. The TMA–FMOc derivative was desorbed under static mode: the fiber was soaked with 200 µl of acetonitrile for a defined desorption time that was assayed between 5 and 30 min, and then the valve of the SPME–HPLC interface was changed, so the TMA–FMOc derivative was sent to chromatographic system, and the chromatographic run was started. At the end of each run the fiber was cleaned by immersing it into a glass vial containing 10 ml of acetonitrile for 2.0 min, and then into a glass vial containing 10 ml of a solution 0.1 mol/l of phosphoric acid for other 2.0 min.

Conditions for the solution derivatization were selected according to previous works [13,15]: 0.25 ml of the samples were mixed with 0.25 ml of 0.05 mol/l borate buffer (pH 9.0), and then with 0.5 ml of 1 mmol/l FMOc inside a 2 ml glass vial; after 30 min, 100 µl of the resulting mixture were injected into the chromatographic system.

The borate buffer was prepared by dissolving the appropriate amount of boric acid in water. Then the pH was adjusted to the required value with 0.5 mol/l NaOH.

Each sample was derivatized in triplicate, and all assays were carried out at ambient temperature.

2.4.2. Air standards

Gaseous standards of TMA were generated into a 25 ml glass vial with a PVC cap having an orifice for the SPME holder. An aliquot of 50 µl of a standard solution of TMA was placed into the vial. In order to facilitate the volatilization of the analyte, 50 µl of 5 mol/l NaOH were also placed inside the vial, and the resulting mixture was stirred during the volatilization and SPME operations. The fiber, previously loaded with the reagent as described in the above section, was introduced in the vial, which was then sealed with teflon. After a defined period of time between 5 and 60 min, the fiber was removed from the vial and placed in the SPME–HPLC interface for desorption of the analytes and for chromatography. The fiber was cleaned and conditioned also as described in the previous section.

Each sample was derivatized in triplicate and all assays were carried out at ambient temperature.

2.5. Analysis of real samples

2.5.1. Water samples

The optimized conditions have been applied to the analysis of different water samples: tap water, ground water, river water and sea water. The samples were previously filtered through 0.45 µm nylon membranes (Teknokroma) in order to remove any particulate matter. The samples were spiked with TMA, and then pH was adjusted to 10.0. The final concentrations of TMA

Table 1

Optimized procedure for the SPME extraction/on-fiber derivatization of TMA with FMOc

Action	Conditions
Pretreatment of the fibers	Reagent solution: 10 ml of 25 mmol/l FMOc + 0.5 ml of 0.05 mol/l borate buffer of pH 9.0. Adsorption time: 5.0 min
Extraction/derivatization of TMA	Adsorption/reaction time: 30.0 min in water, 15.0 min in air
Desorption of TMA–FMOc	Desorption time: 5.0 min

in such samples ranged from 1 to 10 µg/ml. In river and ground water samples the increment of the pH lead to the precipitation of some matrix substances. Thus, these samples were filtered again after pH adjustment. Samples were processed by the optimized SPME/derivatization method (Table 1).

A 24 h washing fish water was also analyzed. Then, the sample was filtered through 0.45 µm nylon membranes (Teknokroma) and the pH was adjusted to 10.0.

2.5.2. Air samples

Air samples were prepared by contaminating the air inside a closed PVC chamber (29 cm × 18 cm × 15.5 cm) with TMA. For this purpose an opened flask containing pure TMA was placed inside three chambers. The first chamber was sampled immediately by introducing the SPME fiber (previously treated with FMOc; see Table 1) inside it for 15 min. The second and third chambers were sampled in the same form after 5 and 15 min starting from the introduction of the pure TMA flask. Other chambers were contaminated from flasks containing aqueous solutions of TMA (0.1, 5.0 and 10.0 g/l) and sampled after 5 min for 15 min by the treated SPME fiber.

Another sample was obtained by contaminating the air inside the chamber with a fish maintained inside for 4 h. Moreover, the air of a fish supermarket was sampled and the laboratory air was analyzed too. The on-line derivatization method [17] was applied to these three air samples in order to compare the results obtained by SPME. In this method, the sampling was dynamic using an air pump. By this method TMA was selectively determined.

Each sample was processed in triplicate, and all assays were carried out at ambient temperature.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of the SPME extraction/derivatization procedure in aqueous standards

Among the commercially available fiber coatings, CW-TR retained less unwanted products when using FMOc as derivatization reagent [21], and therefore, this was the fiber coating selected for the present study. SPME extraction of the reagent followed by the extraction/derivatization of the analyte was selected according to a previous study [22]. The results were compared with those obtained by derivatizing TMA in solution.

Initially, the effect of the concentration of reagent was evaluated. The adsorption time for the reagent was 5 min, whereas

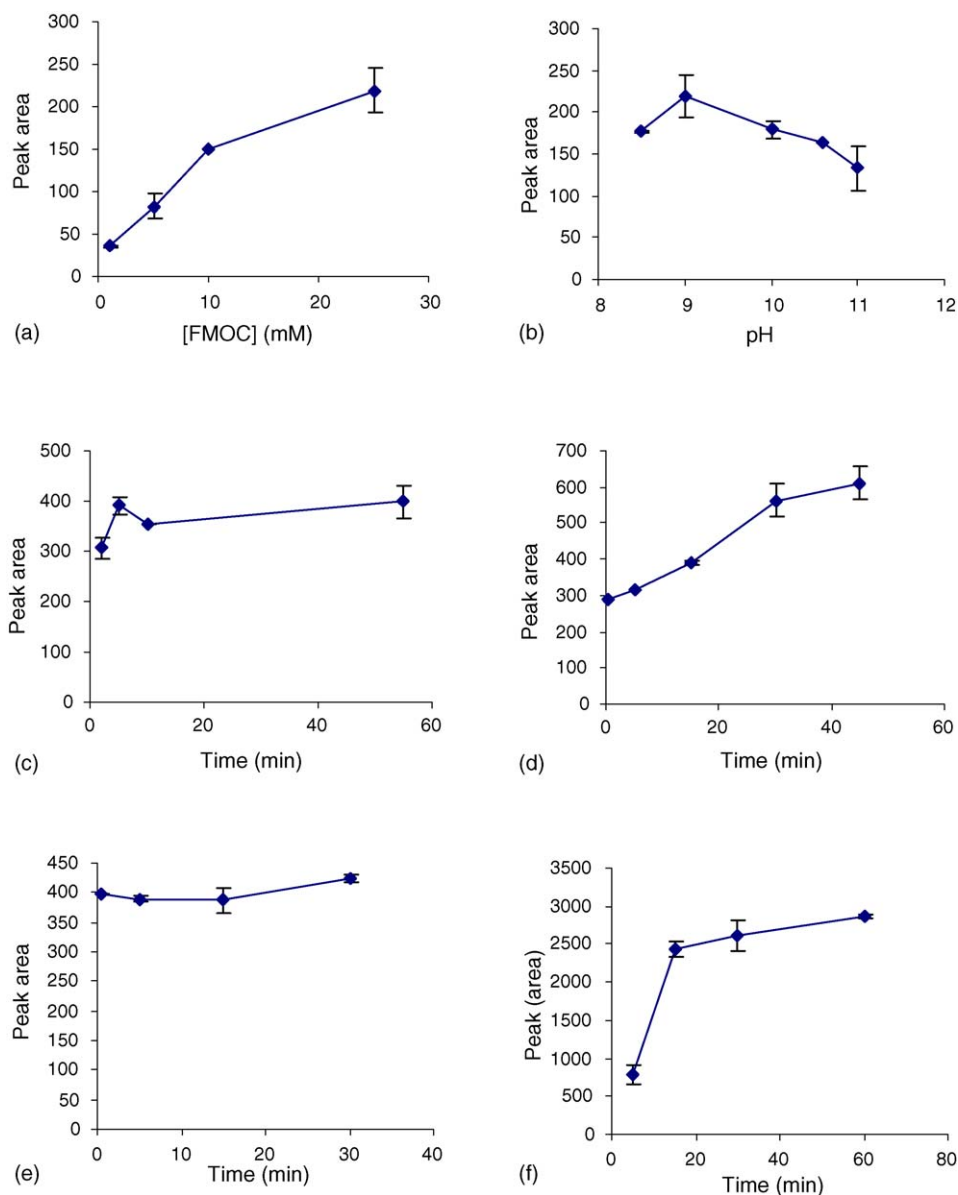


Fig. 1. Effect of experimental variables on TMA–FMOC responses (error bars signify ± 1 S.D. from the mean of $n=3$): (a) concentration of FMOC, (b) pH, (c) adsorption time for FMOC, (d) adsorption time for the TMA, (e) desorption time, and (f) volatilization time. For other experimental details, see text.

the time for extraction/reaction of the amine was 15 min. The pH of the derivatization solution was 9.0, and the desorption time for the TMA–FMOC derivative was 5 min. As observed in Fig. 1a, the response obtained for the TMA–FMOC derivative increased as the concentration of reagent was increased. However, concentrations higher than 25 mmol/l could not be used because the peak at 5.8 min, corresponding to the reagent, overlapped with the peak of the TMA–FMOC derivative. Therefore, a concentration of 25 mmol/l was selected for further work. The pH optimum was 9.0 (Fig. 1b).

Another parameter studied was the adsorption time for the reagent. This parameter was modified between 1 and 55 min (Fig. 1c) while keeping the other parameters constant, but no significant improvement was observed by using times longer than 5 min.

As regards the extraction time for the analyte, which can be also considered the reaction time, it was evaluated between 0.5 and 45 min using an adsorption time for the reagent of 5 min. The other conditions were kept constant. The results obtained (Fig. 1d) indicated that the maximum extraction/conversion yields were reached for times longer than 30.0 min. Finally, different desorption times in the 5–30 min were assayed but not significant improvement was found (Fig. 1e).

On the basis of the above results, the conditions selected for the determination of TMA were those summarized in Table 1. In Fig. 2 are depicted the chromatograms obtained for a blank (water) and for a standard solution of TMA processed under optimized conditions.

The SPME mediated derivatization lead responses for TMA–FMOC higher than those achieved by the solution deriva-

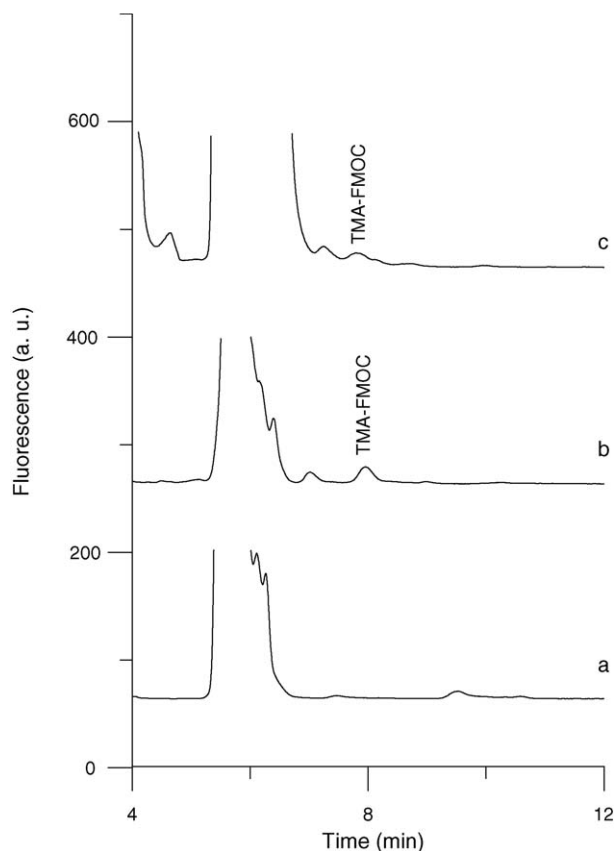


Fig. 2. Chromatograms obtained for: (a) blank (water) sample under optimized conditions, (b) chromatogram obtained for an standard solution of TMA (5 µg/ml) under optimized conditions, and (c) chromatogram obtained for TMA (7.5 µg/ml) by the solution derivatization method. For other experimental details see text.

tization approach (see Fig. 2). Moreover, more unwanted peaks (corresponding to condensation or degradation products of FMOC) were observed when using solution derivatization.

3.2. SPME extraction/derivatization procedure in gaseous standards

The SPME fiber was loaded with FMOC as described in Table 1 and exposed to the TMA vapours inside a vial for different times within the 5–60 min interval. Times longer than 15 min did not substantially improved the signal obtained for TMA–FMOC, as it can see in Fig. 1f. Consequently, the time

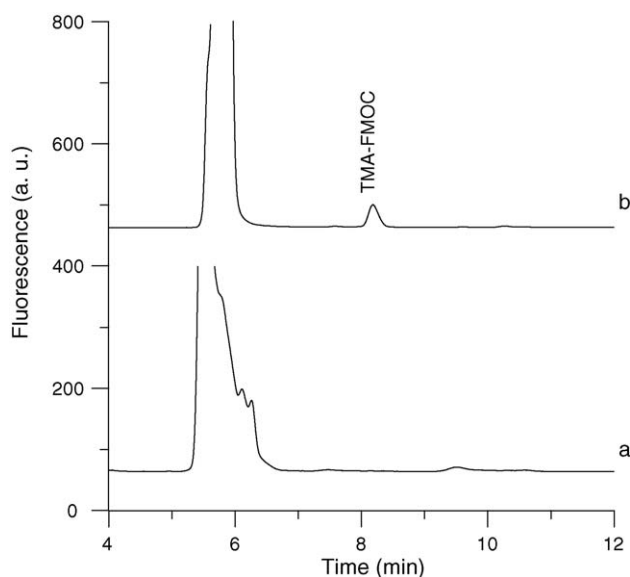


Fig. 3. Chromatograms obtained for: (a) blank air and (b) air containing 200 mg/m³ of TMA. For other experimental details, see text.

used for extraction/derivatization of the analyte in next experiments was 15.0 min because at this time the equilibrium was reached. After this time, the fiber was removed from the vial and inserted into the HPLC–SPME interface.

In Fig. 3 are shown the chromatograms obtained for blank air and for air containing TMA under the proposed conditions.

3.3. Analytical performance

3.3.1. Water samples

The results of Table 2 indicated that the method provided adequate linearity within the tested concentration interval. The intra-day and inter-day coefficients of variation were established at three concentration levels within the tested interval. The values obtained (see Table 2) were suitable. The limit of detection (LOD), established for a signal-to-noise ratio of 3, was 0.25 µg/ml. It is interesting to note that these values are of about five times greater than the values obtained by the solid-support assisted derivatization method using a precolumn [16]. This is due to the fact that, owing to the small dimensions of commercially available fibers, the amounts of TMA and FMOC that can be extracted to the fibers, and thus the amounts of TMA–FMOC

Table 2
Analytical data for the determination of TMA

Sample type	Interval	Linearity $y = a + bx$ ($n = 10$)	Precision			LOD
			Concentration/ amount	Intra-day R.S.D. (%) ($n = 3$)	Inter-day R.S.D. (%) ($n = 6$)	
Water	1.0–10.0 µg/ml	$a \pm s_a$: 37.3 ± 1.4 $b \pm s_b$: 47 ± 9 r^2 : 0.98	1.0 µg/ml	23	23	0.25 µg/ml
			5.0 µg/ml	16	12	
			10.0 µg/ml	7	16	
Air	25–200 mg/m ³ (25 °C, 1.013 × 10 ⁻⁵ Pa)	$a \pm s_a$: 98 ± 12 $b \pm s_b$: 1.672 ± 0.102 r^2 : 0.97	25 mg/m ³	10	9	12 mg/m ³
			100 mg/m ³	17	14	
			200 mg/m ³	16	14	

Table 3
Accuracy for the determination of TMA in different type of samples

Sample type	Added TMA	Determined TMA
Standard solution	5.0 µg/ml	6 ± 1 µg/ml
Standard solution containing a mixture of TMA and other aliphatic amines	1.0 µg/ml ^a , 5.0 µg/ml ^b	1.2 ± 0.4 µg/ml, 4 ± 1 µg/ml
Tap water	5.0 µg/ml	4.7 ± 0.9 µg/ml
Ground water	5.0 µg/ml	6 ± 1 µg/ml
River water	1.0 µg/ml	0.84 ± 0.15 µg/ml
Air	25 mg/m ³	32 ± 8 mg/m ³
	100 mg/m ³	90 ± 20 mg/m ³

^a A mixture containing 1.0 µg/ml in each amine of methylamine, ethylamine, *n*-butylamine, *n*-pentylamine and diethylamine. For other details see text.

^b A mixture containing 5.0 µg/ml in each amine of methylamine, ethylamine, *n*-butylamine, *n*-pentylamine and diethylamine. For other details see text.

that can be formed, are lower than those extracted/formed in a precolumn. Nevertheless, the sensitivity would be adequate for the determination of TMA in waste water [23]. The experimental effort by using the SPME procedure is reduced in relation to that necessary for the precolumn method. Also, it is remarkable that the SPME method is a non-destructive sampling procedure. The limit of quantification (LOQ), established for a signal-to-noise ratio of 10, was 1 µg/ml.

Since FMOc is also reactive towards primary and secondary short-chain aliphatic amines potentially present in the samples, the effect of these compounds was evaluated. The compounds assayed were methylamine, ethylamine, *n*-butylamine, *n*-pentylamine and diethylamine. Indeed, all the above amines were extracted and derivatized under the proposed conditions but their respective FMOc derivatives presented retention times different that that of TMA–FMOc. In order to test whether these amines would interfere with the determination of TMA due to the consumption of FMOc, different samples containing the analyte and a mixture of the other amines were assayed. The results obtained (Table 3) demonstrated that TMA was determined with suitable accuracy at the concentration levels assayed.

Dimethylamine (DMA) and propylamine (PA) are considered interferences because they elute at the same retention time as the TMA, also DMA forms the same derivative as the TMA [22]. So, different procedures were evaluated, in order to eliminate the DMA and PA present in samples. In instance, after loading the sample, the clean-up step was affected by solid-phase extraction passing through the C₁₈ cartridge different volumes of acetic acid 0.1 M and acetate buffer 0.1 M (pH 4). Different reagents for primary and secondary amines were evaluated, dinitrobenzoyl chloride (DNB) and dansylchloride, then the sample derivatized was flushed through the solid-phase cartridge, and the derivatives were eliminated with the minimum volume of acetonitrile. The best procedure to eliminate these interferences was to derivatize 5 ml of sample with DNB 40 mmol/l, then the derivatives were retained into a solid-phase extraction C₁₈ cartridge, after that they were eliminated by flushing 0.5 ml of acetonitrile. Having done that, the TMA was desorbed by flushing 5 ml of phosphoric acid 0.1 mol/l, then the extracts were basified. Finally, it was effected the SPME. The tolerance levels for DMA and PA were evaluated. They were 0.25 and 0.5 µg/ml, respectively. For these tolerance values of concentration no chromatographic peaks were obtained by processing the samples

by the clean-up procedure. The recovery obtained for TMA in presence of DMA and PA at tolerance levels was 100 ($s=5$, $n=4$). If real samples contain levels of DMA and PA higher than the tolerance ones, it was necessary to effect the derivatization in a precolumn connected on-line to the analytical column [16]. Because this procedure is selective to the TMA determination, and PA and DMA eluted at different retention times. By the SPME method it was determined the PA, DMA and TMA together.

The accuracy of the method was evaluated by analyzing standard solutions containing different concentrations of TMA within the tested concentration range. The results of this study are summarized in Table 3. As observed, the concentrations obtained were close to the real concentrations in all samples assayed.

Several samples were fortified with TMA and subjected to the proposed procedure. The fortified concentrations of TMA in these samples were calculated from the calibration equation obtained with standard solutions of TMA (Table 2). The values obtained in this study are listed in Table 3. Expanded uncertainties using a coverage factor of 2 are given in Table 3. The estimate is compliant with EURACHEM/CITACGuide [24] and is a full estimate based on in-house method validation. The overall run to run variation (precision) of the analytical procedure was the main contribution to the uncertainty. Comparable precision values were obtained by processing aqueous standards and samples. As for the standard samples, the proposed method provided values close to the fortified concentrations, except in sea water. In such sample, the responses obtained were significantly lower than those corresponding to standard samples. The peak areas observed in sea water were of about 38% of those observed for standard samples containing the same concentrations of amine. When processing an aqueous standard solution containing 5.0 µg/ml of TMA and 35 g/l of NaCl, the mean area obtained for TMA–FMOc was 41% ($s=3$, $n=3$) of those obtained for aqueous standard solution. Therefore, the employment or standards spiked with NaCl to construct the calibration curve would be required in the quantification of TMA in sea water.

3.3.2. Air samples

The results showed in Table 2 indicated that the method provided adequate linearity. The coefficients of variation were obtained at different concentration levels within the tested inter-

val. As we can see in Table 2, the precision can be considered suitable for this kind of analysis.

The air calibration equation $y = (98 \pm 12) + (67 \pm 4)x$ (μg), was compared to that obtained for aqueous standard solutions of TMA $y = (47 \pm 9) + (1.49 \pm 0.06)x$ (μg). From the ratio of the slopes of calibration equations expressing the concentration in absolute values (μg), we obtained that the signals corresponding to the air standards are of about 50 times greater than the signals obtained for aqueous standards. This fact can be due to greater facility of TMA molecules in gaseous phase to get to the porous fiber phase than the molecules in aqueous phase. Therefore, to quantify TMA in air samples cannot be used aqueous standards against to the dynamic sampling method proposed previously [17].

The long-time exposition level by the OSHA is 12 mg/m^3 [6] and the short-time exposition level (STEL) is 24 mg/m^3 . The LOD, established for a signal-to-noise ratio of 3, was 12 mg/m^3 and the LOQ, established for a signal-to-noise ratio of 10, was 20 mg/m^3 . Therefore, the method would be adequate for monitoring short-time exposure. It is interesting to note that the LOD is of about 55 times greater than the value obtained by the dynamic sampling method using a solid-phase extraction cartridge and derivatizing in a precolumn connected on-line to the analytical column [17]. This is due to the small dimensions of the fiber compared with the SPE cartridge dimensions and also by the passive sampling affected by the SPME procedure. However, as in the case of water analysis, the SPME-based method optimized the experimental effort. It is also remarkable that passive sampling methods do not require maintenance, while active sampling methods need to control and maintain a pump. The accuracy of the method was evaluated by generating air standards containing two different concentrations of TMA within the tested concentration range. As we can see in Table 3, the concentrations obtained were close to the real concentrations. Comparable precision values were obtained by processing aqueous or gaseous standards. The uncertainties were calculated as outlined above for water samples.

4. Application to real samples

The fish washing water sample was analyzed. The results indicated the absence of DMA and PA. The found TMA expressed as mean value \pm expanded uncertainty using a coverage factor of 2 was $2.48 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$. In the following found concentrations are done as indicated here. This result was compared with that obtained with the procedure based on on-line derivatization in a precolumn connected to the analytical column [16] that was $2.5 \pm 0.3 \mu\text{g/ml}$ of TMA. Both results are statistically similar.

Finally, the proposed procedure was applied to air samples contaminated with the analytes in order to evaluate STEL values (see Section 2). For this purpose, the air inside a close chamber was contaminated with pure TMA. The mean concentrations found were 170 ± 40 and $190 \pm 20 \text{ mg/m}^3$ after contaminating the chamber for 5 and 15.0 min, respectively. In another set of experiments different solutions of TMA were placed into the chamber for 5 min, and then sampling/derivatization was

affected. The amount of TMA found were 64 ± 13 , 104 ± 5 and $137 \pm 2 \text{ mg/m}^3$ when using solutions containing 0.1, 5.0 and 10.0 g/l of TMA, respectively.

Other air samples were laboratory air, fish supermarket air and the air of a chamber 4 h after placing a fish inside. They were sampled and analyzed by the two procedures (dynamic and static). The found concentrations were below the STEL legislated value.

5. Conclusions

The present paper describes the utility of SPME for the isolation and derivatization of TMA with FMOc prior to LC. Best results are obtained by loading the fibers with the reagent first and then, by extracting the analyte which is simultaneously derivatized on the fiber. It should be noted that the conventional (solution) derivatization method is not suitable because as the analyte is a tertiary amine low conversion yields are obtained under mild reaction conditions.

The proposed approach can be used to quantify TMA in waste water. The levels of tolerance for propylamine and dimethylamine in water samples were 0.5 and $0.25 \mu\text{g/ml}$. These interferences can be eliminated by means the solution derivatization with DNB and then with the clean-up step through SPE cartridge.

The method can be also used to quantify TMA in air. The sensitivity attainable is adequate for estimating short-term exposure limits in occupational atmospheres. This is particularly important in the analysis of TMA in air because SPME proposed procedure is a passive sampling method.

The advantages of using SPME technique in comparison with previous assays based on liquid–liquid or solid-phase extraction for both, water and air samples, are that the experimental effort and sample manipulation were reduced significantly. Also, it is remarkable that the proposed procedure is a non-destructive sampling method. Moreover, the selectivity was improved, because the most polar compounds of water were not extracted with the coated fiber.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project BQU2003-06138) for financial support received. C. Cháfer-Pericás expresses her gratitude to the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte of Spain for pre-doctoral grant.

References

- [1] J.B. Forehand, G.L. Dooly, S.C. Moldoveanu, J. Chromatogr. A 898 (2000) 111.
- [2] M. Kaykhaiia, S. Nazari, M. Chamsazb, Talanta 65 (2005) 223.
- [3] H. Moriwaki, H. Harino, H. Hashimoto, R. Arakawa, T. Ohe, T. Yoshikura, J. Chromatogr. A 995 (2003) 239.
- [4] Y. Moliner-Martinez, C. Molins-Legua, P. Campíns Falcó, Talanta 62 (2004) 373.
- [5] J. Krol, P.G. Alden, J. Morawski, J. Chromatogr. 626 (1992) 165.
- [6] OSHA, Method number PV 2060, Organic Service Branch I, Salt Lake City, UT, 1993.

- [7] N.A. Santagati, E. Bousquet, A. Spadaro, G. Ronsisvalle, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29 (2002) 1105.
- [8] L. Groenberg, P. Loevkvist, J.A. Joansson, *Chemosphere* 24 (1992) 1533.
- [9] H. Wang, J. Li, X. Liu, H.-S. Zhang, *Anal. Chim. Acta* 423 (2000) 77.
- [10] X. Liu, H. Wang, S.-C. Liang, H.-S. Zhang, *Anal. Chim. Acta* 441 (2001) 45.
- [11] Z.M. Siddiqi, D. Pathania, *Talanta* 60 (2003) 1197.
- [12] R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, *The Analyst* 125 (2000) 1071.
- [13] R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, A. Sevillano-Cabeza, *J. Chromatogr. B* 679 (1996) 69.
- [14] P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández, A. Sevillano-Cabeza, I. Trümpler, *Anal. Chim. Acta* 344 (1997) 125.
- [15] R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, A. Sevillano-Cabeza, *Anal. Chem.* 68 (1996) 734.
- [16] C. Cháfer-Pericás, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, *J. Chromatogr. A* 1023 (2004) 221.
- [17] C. Cháfer-Pericás, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, *J. Chromatogr. A* 1042 (2004) 219.
- [18] L. Pan, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 69 (1997) 196.
- [19] E.H.M. Koster, C.H.P. Bruins, G.J. de Jong, *The Analyst* 127 (2002) 598.
- [20] C. Cháfer-Pericás, P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández, *Anal. Biochem.* 333 (2004) 328.
- [21] R. Herráez-Hernández, C. Cháfer-Pericás, P. Campíns-Falcó, *Anal. Chim. Acta* 513 (2004) 425.
- [22] C. Cháfer-Pericás, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, *Talanta* 66 (2005) 1139.
- [23] B. Sahasrabudhey, A. Jain, K. Verma, *The Analyst* 124 (1999) 1017.
- [24] EURACHEM/CITAC (1995), *Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, 2nd ed., 2000.

An evaluation of solid phase microextraction for aliphatic amines using derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and liquid chromatography

R. Herráez-Hernández, C. Cháfer-Pericás, J. Verdú-Andrés, P. Campíns-Falcó*

Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Dr. Moliner 50, 46100-Burjassot, Valencia, Spain

Received 10 October 2005; received in revised form 25 November 2005; accepted 29 November 2005

Abstract

The reliability of SPME combined with a chemical reaction for the analysis of short-chain aliphatic amines by liquid chromatography has been investigated. Different options to couple SPME and derivatization have been tested and compared: (i) derivatization of the analytes in solution followed by the extraction of the derivatives, (ii) extraction of the analytes and subsequent derivatization by immersing the SPME fibre onto a solution of the reagent, and (iii) extraction/derivatization of the analytes using fibres previously coated with the reagent. Methylamine (MA), dimethylamine (DMA) and trimethylamine (TMA) have been selected as a model of primary, secondary and tertiary amines, respectively. The analytes have been derivatized with the fluorogenic reagent 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC), and the fibre coating was Carbowax-templated resin (CW-TR). The employment of fibres coated with FMOC to extract and derivatize the analytes was the best option, as compared with the other approaches tested the sensitivity was considerably improved. On the basis of these studies, a new procedure for the determination of MA, DMA and TMA in water is presented. To demonstrate the utility of the proposed conditions data on linearity, accuracy, repeatability and sensitivity are given. Results of the determination of the amines in tap, river and waste water are also presented.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: SPME; Derivatization; Amines; FMOC; Liquid chromatography

1. Introduction

Solid-phase microextraction (SPME) has emerged as an attractive alternative to conventional sample preparation procedures, and there is a growing interest in this technique from many fields (environmental, clinical, toxicological, forensic, food analysis, natural and industrial products). This is because SPME integrates sampling, analyte concentration and sample introduction in a single process. Moreover, it can be coupled to gas chromatography (GC) and to liquid chromatography (LC), as well as to other instruments. Additional advantages over conventional procedures such as liquid–liquid extraction (LLE) or solid-phase extraction (SPE) are the reduction on the consumption of organic solvents, the possibility of effecting on-site sampling, or the compatibility with portable equipments. Despite of

its numerous advantages, SPME also presents some drawbacks. It is generally recognised that the low sensitivity attainable is an important limitation compared with LLE or SPE based procedures. The reason is that owing to the small dimensions of the fibre coating the amount of analyte that can be extracted from the samples is low [1,2]. This is particularly important in the case of polar analytes due to their low affinities for common fibre coatings.

In order to enhance the sensitivity in SPME two main alternatives have been explored: the development of new fibre coatings, and the transformation of the analytes via a chemical reaction into compounds more amenable for their extraction. The utility of coupling derivatization to SPME has been extensively documented for a wide variety of matrices and analytes. However, a vast majority of the described applications deal with the derivatization of solutes prior to GC, as reflected in published reviews covering this topic [3,4]. In contrast, the combination of SPME and a chemical reaction for LC has received much limited attention, in spite of the fact that many LC determi-

* Corresponding author. Tel.: +34 96 3543002; fax: +34 96 3544436.
E-mail address: pilar.campins@uv.es (P. Campíns-Falcó).

nations require prior derivatization of the analytes. A typical example is the determination of short-chain aliphatic amines in water. The analysis of these compounds generally entails pre-concentration followed by a chromatographic separation. This is a difficult task because short-chain aliphatic amines present high polarity, water solubility and volatility. Moreover, they are rather insensitive towards common LC detectors. For those reasons, a vast majority of the LC assays proposed for aliphatic amines incorporate a chemical derivatization to transform the analytes into derivatives that can be more easily isolated, resolved and detected [5–9].

The combination of SPME and chemical derivatization for aliphatic amines was firstly reported by Pawliszyn et al. [10]. The authors demonstrated that the transformation of the analytes into less polar derivatives reduced considerably the limits of detection (LOD) over direct SPME. Derivatization has been also used to increase the extraction efficiency with fibre coatings specially synthesised for short-chain aliphatic amines [11]. In both studies GC was used to separate and quantify the derivatized amines. We have recently demonstrated the utility of combining SPME with a chemical derivatization for the determination of methylamine (MA) in water prior to LC [12]. For this purpose, CW-TR coated SPME fibres were successively immersed into the samples and into a solution of the reagent, 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC). The same extraction/derivatization scheme was adapted to reactions involving the sequential use of two derivatization agents [13]. However, other possibilities available for combining SPME and derivatization remain unexplored.

In the present work, we evaluated and compared different options to couple derivatization and SPME for short-chain aliphatic amines using LC: (i) solution derivatization followed by extraction of the derivatives, (ii) extraction of the analyte and subsequent derivatization by immersing the fibre onto a solution of the reagent, and (iii) extraction of the analytes using fibres previously coated with the reagent. FMOC was selected as derivatizing agent because, unlike most of the reagents available for compounds containing amino groups, it is also capable of reacting with tertiary amines [14]. MA, dimethylamine (DMA) and trimethylamine (TMA) were selected as a model of primary, secondary and tertiary amines, respectively. In order to achieve a better understanding of the processes involved, the results were compared with those obtained by processing directly samples subjected to a conventional solution derivatization.

2. Experimental

2.1. Apparatus and chromatographic conditions

The chromatographic system consisted of a quaternary pump (Hewlett-Packard 1050 Series, Palo Alto, CA, USA), a SPME–HPLC interface (Supelco, Bellefonte, PA, USA) and a fluorescence detector (Hewlett-Packard, 1050 Series). The detector was coupled to a data system (Hewlett-Packard, HPLC Chem Station) for data acquisition and calculation. The excitation and emission wavelengths were 264

and 313 nm, respectively. A SPME assembly with replaceable extraction fibres coated with Carbowax-templated resin, (CW-TR, 50 μm , Supelco) was used for extraction and/or derivatization.

A Clifton water bath equipped with a thermostat (Nickel Electro LTD, Avon, England) was used to perform derivatization at temperatures other than ambient temperature.

2.2. Reagents and solutions

All the reagents were of analytical grade. Methylamine, dimethylamine, and trimethylamine were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA), and 9-fluorenylmethyl chloroformate was purchased from Aldrich (Steinheim, Germany). Acetonitrile was of HPLC grade (Scharlau, Barcelona, Spain). Sodium hydroxide and boric acid were obtained from Panreac (Barcelona, Spain).

Stock standard solutions of the amines (1.0 g/L) were prepared in water. Working solutions of the analytes were prepared by dilution of the stock solutions with water. The pH of the samples was adjusted to 10.0 by adding 0.5 M sodium hydroxide. Water was deionized and filtered through 0.45 μm nylon membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain). All solutions were stored in the dark at 2 $^{\circ}\text{C}$.

The FMOC solutions were prepared daily by dissolving the pure compound in acetonitrile. The 0.05 M borate buffer used in derivatizations was prepared by dissolving the appropriate amount of boric acid in water. Then the pH was adjusted to 9.0 with 0.5 M NaOH.

2.3. Chromatographic conditions

A LiChrospher 100 RP₁₈, 125 mm \times 4 mm i.d. column (Merck, Darmstadt, Germany) was the analytical column. The mobile-phase was a mixture of acetonitrile–water in gradient elution mode. The mobile-phase flow rate was 1 mL/min. In SPME assays a precolumn and a high-pressure six-port valve (Hewlett-Packard) were inserted between the SPME–HPLC interface and the analytical column to effect peak compression [12]. The precolumn (20 mm \times 2.1 mm i.d.) was dry-packed with a Hypersil C₁₈, 30 μm , stationary phase. Initially, the precolumn and the analytical column were connected and equilibrated with water. During the desorption of the analytes in the SPME–HPLC interface the switching valve was rotated, so the eluent emerging from the precolumn (water) was sent to waste. The chromatographic run was started when the SPME–HPLC interface was activated to send the FMOC derivatives from the interface to the precolumn. At 0.5 min, the six-port valve was again rotated so precolumn and the analytical column were connected. Meanwhile, the acetonitrile content in the mobile phase was linearly increased from 0 to 60% (v/v) at 2.5 min, and then to 70% (v/v) at 9 min, and to 100% at 17 min (in such a way, both the precolumn and the analytical column were cleaned at the end of each assay).

All solvents were filtered through 0.45 μm nylon membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain) and degassed with helium before use.

2.4. SPME and derivatization procedures

2.4.1. Solution derivatization

Conditions used to derivatize in solution the amines tested were selected according to previous works [15,16]: standard solutions of the analytes (0.25 mL) were placed in 2-mL glass vials and mixed with 0.25 mL of the borate buffer; then, 0.5 mL of 1 mM FMOC were added to the vials, and the resulting mixtures were left to react for a defined period of time. Finally, 100 μ L of the mixture were injected into the analytical column, and processed using the same elution conditions of the above section. Each sample was derivatized in triplicate and all assays were carried out at ambient temperature.

2.4.2. SPME of the amine followed by on-fibre derivatization

The fibre was immersed into a glass vial containing 25 mL of a standard solution of the samples for 30 min. Then, the fibre was removed and immersed into a 2-mL glass vial containing the derivatization solution (1 mL of 25 mM FMOC and 0.5 mL of borate buffer). After an adsorption/reaction time of 30 min, the fibre was removed from the reaction vial and placed into the SPME–HPLC interface. The derivatives were desorbed under static mode: the fibre was soaked with 200 μ L of acetonitrile for 5 min (desorption time), and then the valve of the SPME–HPLC interface was changed, so the FMOC derivatives were sent to chromatographic system and the chromatographic run was started. At the end of each run the fibre was cleaned by immersing it into a glass vial containing 10 mL of acetonitrile for 2 min, and then into a glass vial containing 10 mL of water for other 2 min. Each sample was derivatized in triplicate and all assays were carried out at ambient temperature.

2.4.3. Solution derivatization followed by SPME

Standard solutions of the analytes (0.25 mL) were placed in 2 mL glass vials and mixed with 0.25 mL of the borate buffer. Then, 0.5 mL of 1 mM FMOC were added to the vials, and then the fibre was immersed into the reaction mixture. Unless otherwise stated, the time used for reaction/adsorption was 30 min. After then, the fibre was removed from the vial and placed into the SPME–HPLC interface. Conditions for desorption of the derivatives formed and for fibre regeneration were those indicated above. Each sample was derivatized in triplicate and all assays were carried out at ambient temperature.

2.4.4. SPME of the reagent followed by sampling/derivatization of the amine

In studies aimed at comparing the different extraction/derivatization strategies, working conditions were as follows: the fibre was immersed for 5 min into a 2-mL glass vial containing 1 mL of 25 mM FMOC. Next, the fibre was removed from the reagent solution and immersed into the samples (25 mL). After adsorption/reaction time of 30 min, the fibre was removed from the sample vial and placed into the SPME–HPLC interface. In studies aimed at optimizing the experimental conditions, different parameters were tested: concentration of FMOC, time for adsorption of the reagent, time and

temperature for adsorption/derivatization of the amines, sample volume and sample pH. The pH of the samples was adjusted to the required value by adding 0.5 M NaOH. Conditions for desorption of the derivatives formed and for fibre regeneration were those indicated above. Each sample was derivatized in triplicate, and unless otherwise stated, all assays were carried out at ambient temperature.

2.5. Analysis of real water samples

Samples of water collected from the Serpis river and from an industry dedicated to the production of fertilisers were filtered through 0.45 μ m nylon membranes (Teknokroma) in order to remove any particulate matter. Tap water samples were processed directly. River water and tap water samples were spiked with standard solutions of the analytes to give final concentrations within the tested concentration intervals. Aliquots of these samples were subjected to the optimized SPME/derivatization method. Each sample was derivatized in triplicate.

3. Results and discussion

3.1. Comparison of the different extraction/derivatization approaches tested

According with the reaction scheme proposed in [14] the product of the reaction between TMA and FMOC is most probably DMA–FMOC. This was confirmed in the present study by the fact that the peaks originated by DMA and TMA eluted at the same retention times under a wide variety of elution conditions. Consequently, the mobile phase composition was selected to achieve a complete resolution between MA–FMOC and DMA–FMOC in the minimum time of analysis.

3.1.1. Solution derivatization and direct LC

The main parameters affecting the conversion yields in the reaction between amines and FMOC in solution are the concentration of reagent and the time of reaction [15,16]. Maximum conversion yields were reached for MA and DMA using a concentration of reagent of 1 mM and a time of reaction of 10 min. However, for TMA and for the same concentration of reagent (1 mM) reaction times of 30–45 min were necessary to achieve maximum conversions (data not shown). Consequently, the reaction time used for TMA was 30 min. Standard solutions containing different concentrations of each amine were derivatized under their respective optimum conditions and injected directly into the LC equipment. The concentrations assayed and the calibration parameters obtained for the three amines tested under the selected conditions are listed in Table 1.

As observed in Table 1, the slopes of the calibration lines obtained for MA and DMA (expressed as L/mol) were statistically equivalent revealing that under the experimental conditions used the conversion yields obtained for both amines were comparable (absolute conversion yields were not established because external standards of the analyte–FMOC derivatives were not available). In contrast, the slope of the calibration curve of TMA was about 80 times lower than those of MA and DMA. This

Table 1
Comparison of the calibration equations obtained for MA, DMA and TMA by the different procedures tested

Method	MA		DMA		TMA	
	Calibration equation ^a	Concentration interval (µg/mL)	Calibration equation ^a	Concentration interval (µg/mL)	Calibration equation ^a	Concentration interval (µg/mL)
Solution derivatization	$Y = 5.868 \times 10^7 x - 21.46$, $R^2 = 0.997$ ($n = 8$)	0.5–10.0	$Y = 5.789 \times 10^7 x - 12.39$, $R^2 = 0.9993$ ($n = 8$)	0.5–10.0	$Y = 6.771 \times 10^5 x + 71.67$, $R^2 = 0.97$ ($n = 7$)	5.0–25.0
SPME of the amine/on-fibre derivatization	$Y = 1.593 \times 10^5 x + 9.44$, $R^2 = 0.98$ ($n = 7$)	1.0–15.0	$Y = 4.275 \times 10^5 x + 8.86$, $R^2 = 0.98$ ($n = 7$)	1.0–15.0	$Y = 1.334 \times 10^5 x + 22$, $R^2 = 0.98$ ($n = 7$)	5.0–25.0
Solution derivatization/SPME	$Y = 2.830 \times 10^5 x + 11$, $R^2 = 0.98$ ($n = 8$)	1.0–15.0	$Y = 2.848 \times 10^5 x + 37$, $R^2 = 0.97$ ($n = 7$)	1.0–15.0	$Y = 1.30 \times 10^5 x + 9$, $R^2 = 0.99$ ($n = 7$)	5.0–25.0
Coating of the SPME fibres/sampling	$Y = 3.56 \times 10^7 x + 475$, $R^2 = 0.98$ ($n = 7$)	0.1–1.0	$Y = 7.369 \times 10^7 x + 156$, $R^2 = 0.98$ ($n = 7$)	0.1–1.0	$Y = 2.169 \times 10^6 x + 49.17$, $R^2 = 0.98$ ($n = 7$)	1.0–10.0

^a Slopes expressed as L/mol.

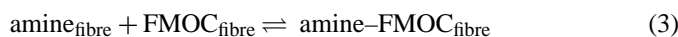
indicates that, as expected, the conversion yield for this tertiary amine was much lower than those obtained for the primary and secondary amines.

3.1.2. SPME of the amine and subsequent derivatization (Method 1)

In this approach, the extraction and derivatization of the amines can be summarised by two steps. First, the amines were extracted from the sample:



Next, the fibre was removed from the sample and immersed into a vial containing the reagent. The reagent was then extracted, and the reaction with the analytes took place in the fibre simultaneously or somewhat later:



In our study, the SPME parameters for extracting the amines were a sample volume of 25 mL and an adsorption time of 30 min. After sampling, the fibre was introduced into a vial containing the derivatizing solution (1 mL of 25 mM FMOC and 0.5 mL of borate buffer). Maximum analyte responses were obtained for the three analytes when using a time interval for extraction of the reagent and on-fibre reaction of 30 min. For longer times the peak areas of the derivatives formed remained constant within experimental variations. Therefore, an adsorption/reaction time of 30 min was selected for further work.

Under the above conditions the main factors that determine the amount of amine-FMOC formed in the fibre can be expected to be the amount of amine extracted in (1), which indeed was determined by the concentration of amine in the sample, and the efficiency of the reaction between the amine and FMOC in the fibre (equilibrium (3)). If we assume that reactions in the fibre and in solutions have similar tendencies, the differences in the responses observed between the amines (at equivalent concentrations) have to be explained on the basis of their respective affinities for the fibre coating, that is, by equilibrium (1). In other words, differences in the responses observed for the amines were determined by their respective polarities.

This is consistent with the results presented in Table 1. The slope of the calibration curve obtained for MA was lower than that of DMA (the octanol/water partition coefficients, expressed as $\log P_{\text{ow}}$, are -0.71 and -0.38 for MA and DMA, respectively). Although TMA is the less polar of the tested amines ($\log P_{\text{ow}} = 0.27$), the slope of the calibration line obtained for this compound was slightly lower than those obtained for MA and DMA. This confirmed that, as in solution, TMA reacted in the fibre less efficiently than MA and DMA.

It should be noted that the absolute values of the calibration parameters obtained under the present approach (or other SPME procedures) can not be compared with those obtained by the direct injection of the derivatives formed in solution, as the absolute amounts of analyte-FMOC injected into the chromatographic system were not comparable.

3.1.3. Solution derivatization followed by SPME of the derivative (Method 2)

In the present method the amount of FMOC-analyte in the fibre was determined by the maximum concentration of derivative that could be formed in solution:



Firstly, the derivatives were formed in solution under conditions optimized previously. After the time of reaction (10 min for MA and DMA, and 30 min for TMA) the fibre was immersed into the reacting solution for other 30 min in order to extract the compounds of interest. Finally, the fibre was removed from the reaction vial and placed into the HPLC-SPME interface for subsequent analysis. The results were compared with those obtained by placing the SPME fibre in the reacting solution just after the addition of the reagent; after 30 min the fibre was removed from this solution and placed into the HPLC-SPME interface. Since the peak areas obtained for all the analytes by the two procedures were statistically equivalent (for a confidence level of 99%), the later method was adopted in order to simplify the analytical procedure. The calibration equations obtained for the tested amines under the selected conditions are also listed in Table 1.

The slopes of the calibration equations obtained for MA and DMA derivatives under the present derivatization/SPME approach were comparable. Since the reaction yields in solution

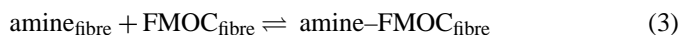
for both amines were similar (see Table 1), these results indicated that both FMOc–amine derivatives exhibit similar water/fibre partition coefficients. As stated below, the main parameter affecting the extraction efficiency into the SPME fibres used in the present study is the polarity of the compounds to be extracted. Indeed, MA is more polar than DMA. However, derivatization of these amines with a high-molecular weight reagent such as FMOc makes the relative differences between the derivatives (i.e. between their polarities) significantly smaller than for the amines themselves. For this reason the extraction efficiencies observed for MA–FMOc and DMA–FMOc were rather similar. The slope obtained for TMA was significantly lower because, as stated below, the concentration of derivative that could be formed in solution was also lower.

3.1.4. Derivatization with reagent coated fibres (Method 3)

Firstly, the fibre was coated with the reagent:



And then, the fibre was immersed into the samples to extract and derivatize the amine:



According to this and for a given concentration of amine in the sample, the amount of amine–FMOc derivative that can be formed in the fibre could be increased by increasing the concentration of FMOc in the fibre through equilibrium (2). It should be noted that the reaction scheme between the analytes and FMOc in the fibre was identical in Methods 1 and 3. However, the maximum amount of amine–FMOc that could be formed in Method 1 was determined by the concentration of the amine in the sample, whereas in Method 3 the maximum amount of derivative was determined by the amount of FMOc in the reagent vial. In other words, the amount of amine–FMOc that could be formed in the fibre in Method 1 was limited by the concentration of amine in the sample, whereas the amount of amine–FMOc formed in Method 3 could be increased by increasing the concentrations of FMOc in the reagent mixture or by extending the adsorption time for equilibrium (2). Indeed, the situation more favourable would correspond to the employment of fibres saturated with the reagent.

In the present study, the fibre was coated by immersing it into the reagent solution for 5 min. Next, the fibre was removed from the vial and immersed into 25 mL of the samples for other 30 min. As depicted in Fig. 1, the analytical signals observed by the present approach were much higher than those obtained by the other SPME/derivatization methods. In fact, the plots *peak areas* versus *concentration of amine* obtained for MA and DMA revealed that the fibre was saturated with their respective FMOc derivatives for concentrations of amine in the samples higher than 5 mg/L (see Fig. 2). The responses for these amines were linear only in the 0.1–1.0 mg/L interval (Table 1). Although not tested, the linear interval could be most probably extended by reducing the time for extraction/reaction of the amine.

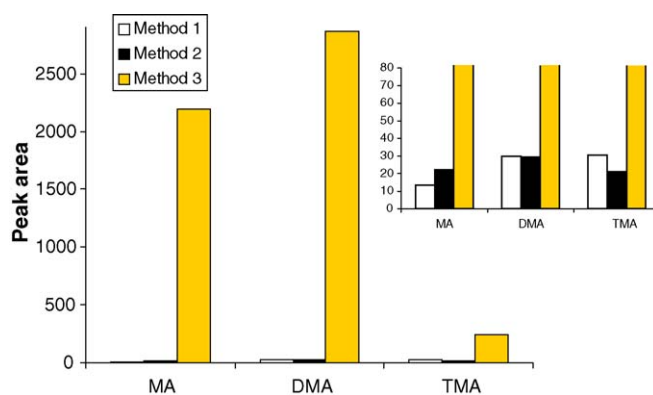


Fig. 1. Mean peak areas obtained for the amines under the three SPME/derivatization methods tested. Method 1: extraction of the amine followed by on-fibre derivatization; Method 2: solution derivatization followed by the extraction of the derivative; Method 3: extraction/on-fibre derivatization with reagent coated fibres. Concentration of MA and DMA, 1 mg/L; concentration of TMA, 5 mg/L. For other details, see text.

The responses in Method 3 were also determined into some extent by the affinities of the analytes for the fibre coating through equilibrium (1). This is consistent with the fact that the slope of calibration obtained for DMA was higher than that of MA (see Table 1). Finally, the slope of the calibration line obtained for TMA confirmed that the reaction rate for this amine in the fibre (equilibrium (3)) was lower than those of MA and DMA. The linearity for TMA was adequate up to a concentration of 10.0 mg/L (Table 1).

The high amount of unreacted reagent on the fibres did not interfere with the measurement of the analytical signals obtained for the analytes. This is illustrated in Fig. 3, which shows the chromatograms obtained with Method 3 for the three amines assayed. On the other hand, no significant peak corresponding to unreacted FMOc was detected when samples previously subjected to extraction/derivatization were directly injected in the

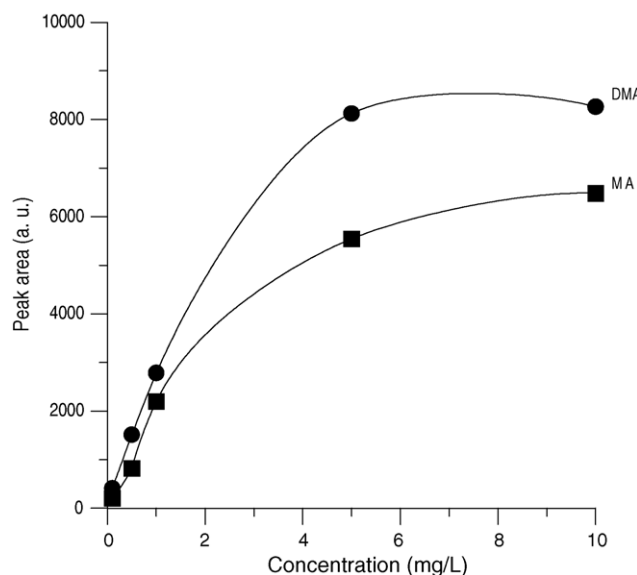


Fig. 2. Peak area vs. concentration of amine profiles for MA and DMA obtained by the extraction/on-fibre derivatization with reagent coated fibres method. For other details, see text.

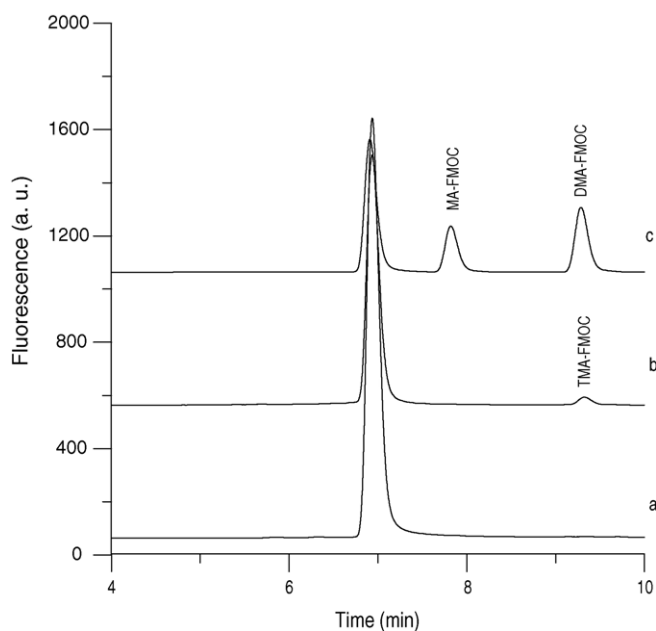


Fig. 3. Chromatograms obtained for: (a) a blank (water), (b) a solution containing 10 mg/L of TMA, and (c) a solution containing a mixture of MA and DMA (1 mg/L each). Peak at 6.9 min corresponds to unreacted FMOC. For other experimental details, see text.

chromatographic column. This means that the constant for equilibrium (2) was very high, and therefore, the present approach can be considered non-destructive sample treatment.

3.2. Optimization of the extraction/derivatization procedure with FMOC coated fibres

The proposed extraction/derivatization approach (Method 3) was optimised using experimental designs. Firstly, the bulk effect of the experimental parameters on peak areas was evaluated by means of a Plackett-Burman design [17]. Six factors at two levels each were analysed with eight experiments. The experimental variables and values assayed were selected according to the observations of the above sections (see Table 2). The statistical analysis of the results obtained showed similar tendencies for the three amines assayed. In all instances, a positive

Table 2
Optimization of the selected SPME/derivatization method

Experimental design	Variables studied	Tested values
Packett-Burman	Adsorption time for FMOC (min)	<u>3</u> and 7
	Adsorption time for the analytes (min)	10 and 20
	Concentration of FMOC (mM)	20 and <u>30</u>
	Sample volume (mL)	1 and 3
	Sample pH	9.0 and <u>11.0</u>
	Temperature for the SPME/derivatization (°C)	<u>20</u> and 25
	Complete 2 ²	Adsorption time for the analytes (min)
Sample volume (mL)		3 and <u>5</u>

The underlined values correspond to the values selected in the final procedure.

effect on the analyte responses was found with increasing the adsorption time for the analytes, the FMOC concentration, the sample volume and pH. The time for coating the fibre and the temperature of reaction did not significantly affect analyte conversions at the assayed levels. Consequently, an adsorption time for FMOC of 3 min and a temperature of 20 °C were taken as optimum values.

It can be expected that increasing the values of the other four variables would result in an increment on peak areas. However, in a previous set of experiments it was observed that concentrations of FMOC higher than 30 mM resulted in poor chromatographic profiles because the large peak corresponding to unreacted FMOC disturbed with the measurement of the peak of MA-FMOC. Similarly, increasing the sample pH resulted in worse chromatographic profiles due to the presence of several unwanted peaks most probably corresponding to FMOC degradation products. Consequently, a concentration of FMOC of 30 mM and a sample pH of 11 were the highest values assayed. These values were selected as the optimum values.

For the other two factors, a complete 2² experimental design was performed using the experimental values listed in Table 2. Some signal improvement was observed for the higher values assayed. Therefore, an adsorption time for the analytes of 30 min and a sample volume of 5 mL were taken as the best option for determining MA, DMA and TMA.

3.3. Analytical performance of the proposed procedure

The optimized conditions were applied to standard solutions of the analytes in order to test the quantitative performance of the method. The concentrations assayed as well as the results obtained are listed in Table 3. The results on this table indicate that the proposed conditions provided satisfactory linearity within the tested concentration ranges. The repeatability can be also considered suitable at these concentration levels. As regards the sensitivity, the LODs and LOQs obtained for MA and DMA were comparable to those reported by assays involving analyte enrichment by LLE or SPE [5,8]. The LOD obtained for TMA was higher than that reported in [18]. However, in such method a previous preconcentration of TMA into C₁₈ SPE cartridges was necessary. Therefore, the proposed SPME extraction/derivatization approach can be considered an alternative when simplicity rather than sensitivity is needed.

3.4. Application to real water samples

The utility of the proposed method was tested by analysing tap, river and waste waters. None of the amines assayed were detected in the tap and river water samples assayed. These samples were spiked with known concentrations of the analytes and subjected to the SPME/derivatization proposed procedure. The results of this study can be seen in Table 4. It can be derived that the accuracy for this kind of samples was suitable.

Finally, the proposed method was applied to the analysis of an industrial waste water assayed. Two peaks corresponding to MA-FMOC and DMA-FMOC were observed in the chromatograms obtained for this sample. In order to check whether

Table 3
Analytical data for the determination of MA, DMA and TMA by the proposed SPME on-fibre derivatization method

Compound	Concentration interval ($\mu\text{g/mL}$)	Linearity ^a $y = ax + b$ ($n = 8$)	Repeatability ^b		LOQ (ng/mL)	LOD (ng/mL)
			Intraday precision (%) ($n = 3$)	Interday precision (%) ($n = 6$)		
MA	0.1–1.0	$y = 6.80 \times 10^7 x - 110$, $R^2 = 0.98$	2	14	20	5
DMA	0.1–1.0	$y = 7.20 \times 10^7 x - 217$, $R^2 = 0.98$	12	24	20	5
TMA	1.0–10.0	$Y = 2.2 \times 10^6 x - 56$, $R^2 = 0.98$	16	12	1000	250

^a Slopes expressed as L/mol.

^b Determined at half of the highest concentration in the tested range.

Table 4
Results obtained from the analysis of tap water and river water spiked with MA, DMA and TMA ($n = 3$)

Analyte	Added concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Found concentration ($\mu\text{g/mL}$)	
		Tap water	River water
MA	0.5	0.49 ± 0.04	0.51 ± 0.04
DMA	0.5	0.55 ± 0.12	0.49 ± 0.04
TMA	5.0	4.8 ± 0.8	4.1 ± 0.5

the peak of DMA–FMOC was due to the presence of DMA or TMA (or both), the sample was also processed by a method selective for TMA [18]. Since no TMA was detected by such method it was concluded that the sample contained MA and DMA. The concentrations of MA and DMA measured after sample dilution were (0.149 ± 0.007) and (0.122 ± 0.008) $\mu\text{g/mL}$, respectively, equivalent to concentrations in the sample of (7.4 ± 0.4) and (6.1 ± 0.4) $\mu\text{g/mL}$, respectively.

4. Conclusions

The usefulness of derivatizing the analytes before SPME to increase the sensitivity has been extensively documented for many types of compounds, including some short-chain aliphatic amines. However, it has been demonstrated that when using FMOC as the reagent on-fibre derivatization is generally a better option, specially when using fibres coated with the reagent for extracting/derivatizing the analytes. This is because the fibres can be coated with a large amount of reagent resulting in an exhaustive extraction of the analytes in the sampling step, and therefore, in the formation of larger amounts of amine–FMOC derivative in the fibre. As a result, the sensitivity is considerably improved with respect the other methods tested. For example, the slope of calibration obtained for MA by the recommended approach was ca. 126 and 223 times higher than the values obtained by the solution derivatization/SPME and SPME of the amine/on-fibre derivatization methods, respectively.

As in methods involving solution derivatization, the sensitivity attainable by the recommended on-fibre derivatization approach depends on the structure of the amine to be derivatized. The sensitivity attainable for the tertiary amine TMA is much lower than those of analogous primary and secondary amines. Nevertheless, the proposed method can be considered of interest taking into account the lack of LC methods applicable to TMA [5–8,18].

The proposed SPME/on-fibre derivatization method can be considered a simple alternative to those procedures which use LLE or SPE, often combined with chemical derivatization, to reach the required sensitivity. It can be also an alternative to SPME based methods using fibre coatings specially designed for short-chain aliphatic amines. Unlike those methods, the proposed approach does not require the synthesis of new coatings but only the saturation with the reagent of commercially available fibres, which is very simple and rapid.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project BQU2003-06138) for financial support received. C. Cháfer-Pericás expresses her gratitude to the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte of Spain for pre-doctoral grant.

References

- [1] M.de F. Alpendurada, J. Chromatogr. A 889 (2000) 3.
- [2] G. Theodoridis, E.H.M. Koster, de. Koster, G.J. Jong, J. Chromatogr. B 745 (2000) 49.
- [3] J.M. Rosenfeld, J. Chromatogr. A 843 (1999) 19.
- [4] E.E. Stashenko, J.R. Martínez, Trends Anal. Chem. 23 (2004) 553.
- [5] B. Sahasrabudhhey, A. Jain, K. Verma, Analyst 124 (1999) 1017.
- [6] H. Wang, J. Li, X. Liu, H-S. Zhang, Anal. Chim. Acta 423 (2000) 77.
- [7] X. Liu, H. Wang, S-C. Liang, H-S. Zhang, Anal. Chim. Acta 441 (2001) 45.
- [8] J. Verdú-Andrés, P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández, Analyst 126 (2001) 1683.
- [9] Z.M. Siddiqi, D. Pathania, Talanta 60 (2003) 1197.
- [10] L. Pan, J.M. Chong, J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A 773 (1997) 249.
- [11] L. Cai, Y. Zhao, S. Gong, L. Dong, C. Wu, Chromatographia 58 (2003) 615.
- [12] R. Herráez-Hernández, C. Cháfer-Pericás, P. Campíns-Falcó, Anal. Chim. Acta 513 (2004) 425.
- [13] C. Cháfer-Pericás, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, Talanta 66 (2005) 1139.
- [14] R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, Analyst 125 (2000) 1071.
- [15] P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández, A. Sevilano-Cabeza, I. Trümpler, Anal. Chim. Acta 344 (1997) 125.
- [16] J. Verdú-Andrés, P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández, Chromatographia 55 (2002) 129.
- [17] D.L. Massart, BGM Vandeginste, LMC Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part A, Elsevier Science, Amsterdam, 1997.
- [18] C. Cháfer-Pericás, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, J. Chromatogr. A 1023 (2004) 27.

Application of solid-phase microextraction combined with derivatization to the determination of amphetamines by liquid chromatography

C. Cháfer-Pericás, P. Campíns-Falcó, and R. Herráez-Hernández*

Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

Received 28 April 2004

Available online 6 July 2004

Abstract

This work evaluates the utility of solid-phase microextraction (SPME) in the analysis of amphetamines by liquid chromatography (LC) after chemical derivatization of the analytes. Two approaches have been tested and compared, SPME followed by on-fiber derivatization of the extracted amphetamines, and solution derivatization followed by SPME of the derivatives formed. Both methods have been applied to measure amphetamine (AP), methamphetamine (MA), and 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), using the fluorogenic reagent 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) and carbowax-templated resin (CW-TR)-coated fibers. Data on the application of the proposed methods for the analysis of different kind of samples are presented. When analyzing aqueous solutions of the analytes, both approaches gave similar analytical performance, but the sensitivity attainable with the solution derivatization/SPME method was better. The efficiencies observed when processing spiked urine samples by the SPME/on-fiber derivatization approach were very low. This was because the extraction of matrix components into the fiber coating prevented the extraction of the reagent. In contrast, the efficiencies obtained for spiked urine samples by the solution derivatization/SPME approach were similar to those obtained for aqueous samples. Therefore, the later method would be the method of choice for the quantification of amphetamines in urine.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Solid-phase microextraction; Derivatization; Amphetamines; Liquid chromatography

The identification and quantification of amphetamines have been described using a variety of techniques such as immunoassay [1], liquid chromatography (LC) [2–4], gas chromatography (GC) [1,5–7], and capillary electrophoresis [8,9]. In LC methods a chemical derivatization is generally used to make the analytes more amenable for chromatography and/or to enhance the sensitivity. Moreover, if the analytes are going to be determined in complex matrices (i.e., plasma or urine) sample preparation also entails analyte preconcentration and purification.

During the past few years, solid-phase microextraction (SPME) has emerged a valuable alternative for

sample preparation in the analysis of a wide variety of compounds [10]. SPME typically uses a polymeric-coated fused-silica fiber to extract the analytes from the samples. The extracted compounds are then desorbed and transferred to an analytical instrument for separation and detection. Desorption is normally attained by placing the fiber into the hot injector of a gas chromatograph or into the interface of a liquid chromatograph. In such a way, sampling, purification, concentration, and sample introduction are integrated in a single process.

As regards the analysis of amphetamines, SPME has been extensively used in combination with GC. Samples are alkalized and heated in order to volatilize the amphetamines, which are then extracted from the headspace of the sample vial, and subsequently injected into the gas chromatograph. Successful results have been

* Corresponding author.

E-mail address: rosa.herraez@uv.es (R. Herráez-Hernández).

reported in the direct analysis of a variety of amphetamines [11–15]. In some GC methods, a chemical reaction has been utilized to enhance analyte detectability and/or to increase its affinity for the fiber coating. Derivatization is typically accomplished by adding the reagent to the samples before the SPME step [16–19]. Alternatively, the amphetamines can be first extracted and then derivatized by immersing the fiber into a solution containing the reagent [20] or by exposing the fiber to the headspace of a vial containing the reagent [20–22] (on-fiber derivatization).

The analysis of some amphetamines using LC in combination with SPME has also been reported [23]. In such study, the underivatized amphetamines were monitored by mass spectrometry (MS). However, to our knowledge, no LC methods have been reported for amphetamines combining SPME and derivatization with classical UV or fluorogenic reagents.

We have recently demonstrated the possibility of determining methylamine in water using SPME fibers for extraction and subsequent derivatization of the analyte [24]. The experimental effort involved was significantly reduced in relation to previously reported assays based on liquid-liquid or solid-phase extraction of methylamine and/or its Fmoc (9-fluorenylmethyl chloroformate) derivative.

In the present work, we have evaluated the possibility of using a chemical derivatization in combination with SPME for the analysis of amphetamines by LC. For derivatization the fluorogenic reagent 9-fluorenylmethyl chloroformate was selected, as excellent results have been reported for amphetamines using either solution derivatization [3] and solid-phase derivatization [25]. Two alternatives have been examined and compared, SPME followed by on-fiber derivatization, and solution derivatization followed by SPME of the amphetamine–Fmoc derivatives. Amphetamine (AP), methamphetamine (MA), and 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) have been selected as model compounds. The analytical performance and possible applications of both approaches are discussed.

Experimental

Apparatus and chromatographic conditions

The chromatographic system consisted of a quaternary pump (Hewlett–Packard 1050 Series, Palo Alto, CA), a SPME–HPLC interface (Supelco, Bellefonte, PA), and a fluorescence detector (Hewlett–Packard, 1050 Series). The detector was coupled to a data system (Hewlett–Packard, HPLC Chem Station) for data acquisition and calculation. The excitation and emission wavelengths were 264 and 313 nm, respectively.

A LiChrospher 100 RP₁₈, 125 × 4 mm i.d. column (Merck, Darmstadt, Germany) was the analytical column. The mobile phase was a mixture of acetonitrile–water in gradient elution mode, and the flow rate was 1 mL/min. According to the results presented in [24] a precolumn and a high-pressure six-port valve (Hewlett–Packard) were inserted between the SPME–HPLC interface and the analytical column to effect peak compression. The precolumn (20 × 2.1 mm i.d.) was dry-packed with a Hypersil C₁₈, 30 μm, stationary phase. Initially, the precolumn and the analytical column were equilibrated with water. During the desorption of the analytes in the SPME–HPLC interface the eluent emerging from the precolumn (water) was sent to waste. The chromatographic run was started when the SPME–HPLC interface was activated to send the analytes to the chromatographic system. At 0.5 min the six-port valve was rotated so precolumn and the analytical column were connected, and therefore, the eluent emerging from the precolumn was sent to the analytical column. Meanwhile, the acetonitrile content in the mobile phase was linearly increased from 0 to 40% at 2.5 min, to 50% at 5 min, and then to 70% at 7.5 min; from 7.5 to 12.5 min the mobile phase composition was kept constant. At 12.5 min the acetonitrile content was again increased to reach a value of 100% at 16.5 min to clean both the precolumn and the analytical column. All solvents were filtered through 0.45-μm nylon membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain) and degassed with helium before use.

A Clifton water bath equipped with a thermostat (Nickel Electro, Avon, England) was used to perform derivatization at temperatures other than ambient temperature.

Reagents and solutions

All the reagents were of analytical grade. AP sulfate, MA hydrochloride, and MDMA hydrochloride were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA), and Fmoc was purchased from Aldrich (Stenheim, Germany). Acetonitrile and hexane were of HPLC grade (Scharlau, Barcelona, Spain). Boric acid and sodium hydroxide were obtained from Panreac (Barcelona, Spain).

Stock standard solutions of AP, MA, and MDMA (200.0 μg/mL) were prepared in water. Working solutions of these compounds were prepared by dilution of the stock solutions with water. Water was deionized and filtered through 0.45-μm nylon membranes (Teknokroma). All solutions were stored in the dark at 2 °C.

The Fmoc solutions, at concentrations ranging from 0.5 to 25 mM, were prepared daily by dissolving the pure compound in acetonitrile. The 0.05 M borate buffer used in derivatizations was prepared by dissolving the appropriate amount of boric acid in water, and then by

adjusting the pH to the proper value with 0.5 M sodium hydroxide.

SPME and derivatization procedures

A SPME assembly with replaceable extraction fibers coated with Carbowax-templated resin, (CW-TR, 50 μm , Supelco) was used for extraction and/or derivatization.

SPME followed by on-fiber derivatization

The fiber was plunged into a glass vial containing the samples (25 mL) for 15.0 min. After extraction, the fiber was removed from the sample vial and immersed into a 2 mL glass vial containing the derivatization solution. This solution consisted of 0.5 mL of the borate buffer and 1.0 mL of the FMOC solution (0.5–25.0 mM). After a defined reaction time the fiber was removed from the vial and placed in the SPME–HPLC interface for desorption of the analytes and for chromatography. The amphetamine–FMOC derivatives were desorbed under static mode: the fiber was soaked with 200 μL of acetonitrile for 5.0 min, and then the valve of the SPME–HPLC interface was changed, so the compounds of interest were sent to the chromatographic system, and the chromatographic run was started. At the end of each run the fiber was cleaned by immersing it into a glass vial containing 2.0 mL of hexane for 2.0 min; finally, the fiber was reconditioned by placing it for 2.0 min into a glass vial containing 2.0 mL of water.

Each sample was derivatized in triplicate, and (unless otherwise stated) all assays were carried out at ambient temperature.

Solution derivatization followed by SPME of the derivatives formed

Samples (0.5 mL) were placed into 2-mL glass vials and mixed with 0.4 mL of borate buffer and with 0.1 mL of 10 mM FMOC [22]. After a reaction time of 2.0 min, the fiber was immersed into the reaction vial for extraction of the amphetamine–FMOC derivatives. The adsorption time was 15.0 min. Finally, the SPME fibers were placed into the SPME–HPLC interface, and the compounds of interest were desorbed and transferred to the chromatographic system according with the procedure described above. The fibers were cleaned and conditioned also as described in the previous section.

Each sample was derivatized in triplicate and all assays were carried out at ambient temperature.

Analysis of real samples

The optimized conditions have been applied to the analysis of illicit tablets and urine spiked with the tested amphetamines. Illicit tablets were powdered and homogenized, and the required amount was dissolved in 25 mL

of 40/60 v/v acetonitrile/water. The resulting solution was further diluted to 250 mL with water. Untreated urine samples were spiked with the analytes producing concentrations from 1.0 to 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for AP and MA, and from 2.5 to 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for MDMA. Samples were processed by the two optimized extraction/derivatization methods. Each sample was assayed in triplicate.

Results and discussion

Although most of the assays reported for amphetamines use polydimethylsiloxane (PDMS) fibers [16–20], in the present study only fibers coated with CW-TR were used. This is because, as demonstrated in a previous paper [24], the affinity of FMOC and by-products for the CW-TR coating is significantly lower than that observed for the PDMS coating. As a result, the chromatograms obtained with the CW-TR fibers showed less unwanted peaks.

SPME followed by on-fiber derivatization

The SPME parameters were selected as follows: adsorption time of 15.0 min, desorption time of 5.0 min, and sample volume of 25.0 mL. Under such conditions the analyte responses were found to depend mainly on the reaction parameters [24]. Consequently, the experimental parameters affecting the reaction on the fiber between the analytes and FMOC were investigated, using aqueous standard solutions of each amphetamine (at a concentration of 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The variables investigated were concentration of reagent, pH of the reaction, reaction time, and temperature.

First, the effect of the concentration of FMOC was tested in the range 0.5–25 mM using a reaction time of 5.0 min and a borate buffer of pH 10.0; the assays were carried out at ambient temperature. Peak areas considerably increased when increasing the concentration of reagent up to a concentration of 10 mM. A further increment of the concentration of FMOC resulted in a modest increment on analyte peak areas. In order to reduce the intensity of the peaks corresponding to unreacted FMOC in the final chromatograms, a concentration of 10 mM was selected. The effect of the pH was evaluated between 9.0 and 11.5. In this study 10 mM FMOC was used, the reaction time was 5.0 min, and the reactions were carried out at ambient temperature. For all the buffers assayed it was verified that the pH of the resulting derivatization solution was adequate for the reaction (≥ 9.0). However, the highest peak areas were obtained at pH 11.0 (data not shown), and therefore, this was the pH selected for further work.

Different reaction times between 2.0 and 15.0 min were assayed using the optimized concentration of FMOC and pH, and ambient temperature. We observed

that the signal increased up to 5.0 min, and then remained constant or slightly decreased, specially for the FMOc-MDMA derivative. Consequently, a reaction time of 5.0 min was selected as the best option. Finally, the effect of the reaction temperature was studied by immersing in a water bath the vial containing the reaction mixture and the fiber. Different temperatures in the range 40–70 °C were assayed (the other conditions were those optimized previously), but no significant improvement was observed compared with the signals obtained at ambient temperature. On the basis of the above results, the reaction conditions finally selected for the SPME/on-fiber derivatization method were as follows: 10 mM FMOc in borate buffer of pH 11.0, and reaction for 5 min at ambient temperature. Typical chromatograms obtained under the optimized conditions for a blank (water) and for a standard solution of the analytes are depicted in Fig. 1. It should be noted that the large

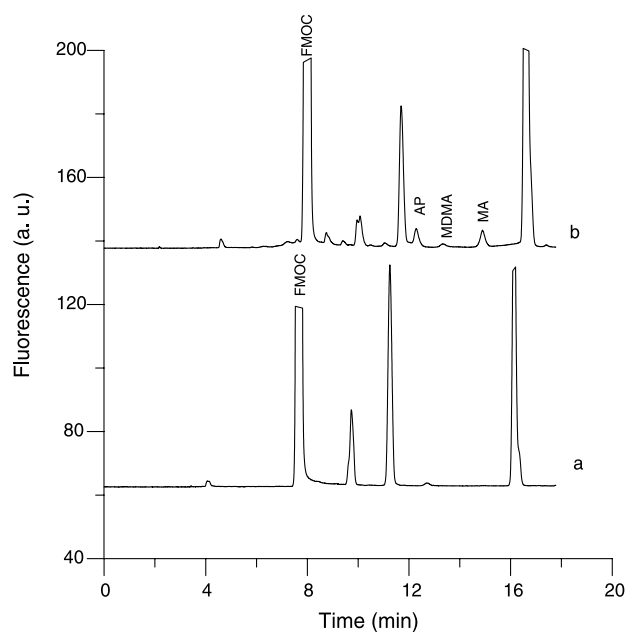


Fig. 1. Chromatograms obtained for (a) a blank (water), and (b) a standard solution containing AP, MA, and MDMA (5.0 µg/mL each) by the SPME/on-fiber derivatization method. For other experimental details, see text.

peak at 7.6 min corresponded to unreacted FMOc, which indicated that the reagent was significantly extracted into the fiber. The chromatograms also showed other minor peaks corresponding to the reagent and/or its degradation or hydrolyzation products. None of these peaks interfered with the peaks of the analytes.

The absolute analyte extraction/conversion yields were not established because external standards of the amphetamine–FMOc derivatives were not available. Instead, the efficiency of the tested approach was estimated by comparing the peak areas obtained for the analytes with those achieved through the direct injection of standard samples subjected to solution derivatization. The experimental conditions used for the derivatization of the amphetamines in solution form were selected according to the results of previous works [22,25]. The amounts of the FMOc-analyte derivatives appearing in the resulting chromatograms are listed in Table 1. This table also shows the percentages of amphetamines in the final chromatograms. These values were calculated by comparing the areas obtained for the analytes with those obtained after the direct injection of standards derivatized in the solution mode. It should be noted that those percentages correspond to the fraction of each drug that was first extracted and then derivatized. As observed in this table, the amounts of MDMA extracted plus derivatized were significantly lower than the amounts of the other amphetamines.

The reliability of the described procedure was tested by analyzing aqueous solutions containing AP and MA in the 1.0–10.0 µg/mL concentration interval, and in the 2.5–25.0 µg/mL interval for MDMA. The results are summarized in Table 2. This table shows that the proposed method provided adequate linearity, reproducibility, and accuracy within the tested concentration intervals. The limits of detection (LODs) and quantification (LOQs) obtained for MDMA were higher than the values obtained for AP and MA, which is consistent with the results of Table 1. The LODs are about one order of magnitude higher than those reported previously by using C₁₈-based solid-phase extraction (SPE) cartridges for effecting the derivatization [26]. In such

Table 1
Efficiencies of the SPME/on-fiber derivatization and solution derivatization/SPME methods ($n = 3$)

Method	Sample type	Concentration (µg/mL)	AP		MA		MDMA	
			Amount injected (µg)	Mean percentage ^a (%)	Amount injected (µg)	Mean percentage ^a (%)	Amount injected (µg)	Mean percentage ^a (%)
SPME/on-fiber derivatization	Aqueous solution	5.0	0.0033 ± 0.0013	0.0026	0.0096 ± 0.0015	0.0047	0.006 ± 0.001	0.0010
		10.0	0.006 ± 0.002		0.0211 ± 0.0012		0.012 ± 0.003	
Solution derivatization / SPME	Aqueous solution	5.0	0.014 ± 0.003	0.59	0.0140 ± 0.0019	0.57	0.00472 ± 0.00017	0.19
		10.0	0.032 ± 0.007		0.0293 ± 0.0019		0.0090 ± 0.0018	
	Spiked Urine	5.0	0.015 ± 0.003	0.63	0.011 ± 0.003	0.47	0.0035 ± 0.0018	0.17
		10.0	0.034 ± 0.003		0.026 ± 0.003		0.010 ± 0.004	

^a Percentage of drug extracted plus derivatized.

Table 2

Analytical data for the determination of AP, MA and MDMA in water by the SPME/on-fiber derivatization method

Compound	Linearity ^a $y = a + bx$ ($n = 12$)	Reproducibility			Accuracy ($n = 3$)			LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
		Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Intraday precision, RSD (%) ($n = 3$)	Interday precision, RSD (%) ($n = 6$)	Added concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Calculated concentration ($\mu\text{g/mL}$)	E_r (%)		
AP	$a \pm s_a: -2 \pm 13$	1	12	18	1	1.0 ± 0.3	3	0.1	1
	$b \pm s_b: 41 \pm 2$	5	11	15	5	5.0 ± 0.9	-0.16		
	$r = 0.990$	10	6	11					
MA	$a \pm s_a: 0 \pm 14$	1	4	21	1	0.84 ± 0.01	-16	0.1	1
	$b \pm s_b: 51 \pm 2$	5	7	14	5	4.2 ± 0.3	-16		
	$r = 0.991$	10	1	4					
MDMA	$a \pm s_a: 11 \pm 5$	2.5	4	18	2.5	2.7 ± 0.9	10	1	2.5
	$b \pm s_b: 8.8 \pm 0.4$	10	4	10	10	7.7 ± 0.8	-23		
	$r = 0.990$	25	5	6					

^a Concentration interval: AP and MA, 1.0–10.0 $\mu\text{g/mL}$; MDMA, 2.5–25.0 $\mu\text{g/mL}$.

method, the analytes were retained into the SPE packing, and then derivatized by flushing through the cartridges an aliquot of the FMOC solution (solid-support-assisted derivatization method). After a given reaction time, the derivatized analytes were desorbed from the cartridges and chromatographed. Owing to the small dimensions of commercially available fibers, the amounts of amphetamines and FMOC that can be extracted on the fibers (and thus, the amounts of analyte-FMOC derivatives that can be formed) are lower than those that can be retained/formed in the SPE cartridges. However, the present procedure is more simple as sample manipulation is significantly reduced. In addition, the SPME/on-fiber derivatization is a nondestructive technique.

Solution derivatization followed by SPME

After solution derivatization under optimized conditions, the FMOC derivatives were subjected to SPME, using an adsorption time of 15.0 min and a desorption time of 5.0 min. Therefore, the SPME parameters were the same of the SPME/on-fiber derivatization method with the only exception of the sample volume, which in the present method was 0.5 mL. As an illustrative example, in Fig. 2 are shown the chromatograms obtained with the proposed conditions. Such chromatograms were similar to those obtained by the SPME/on-fiber derivatization method (see Fig. 1). However, the peak areas of the FMOC–amphetamine derivatives were higher with the solution derivatization/SPME approach. This indicates that the FMOC–amphetamine derivatives present higher affinity for the CW-TR coating than the underivatized amphetamines. The same conclusions can be derived from the results of Table 1. As in the SPME/on-fiber derivatization method, the lower efficiency was obtained for MDMA.

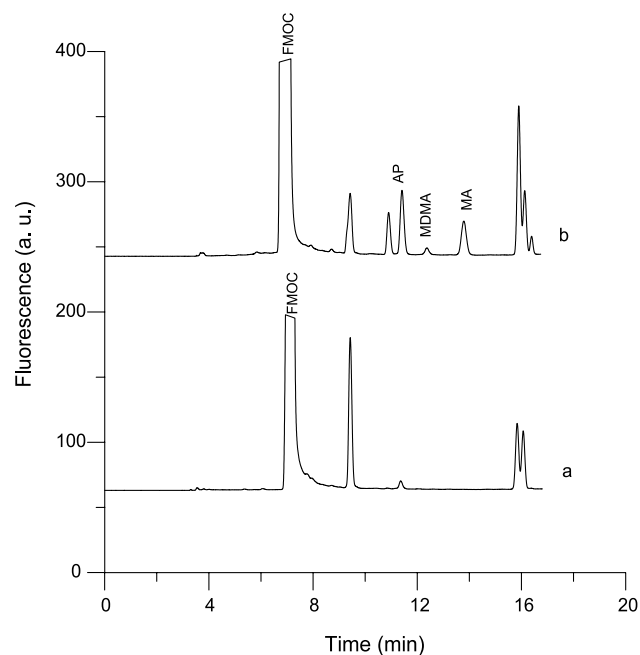


Fig. 2. Chromatograms obtained for (a) a blank (water), and (b) a standard sample containing AP, MA, and MDMA (5.0 $\mu\text{g/mL}$, each) by the solution derivatization/SPME method. For other experimental details, see text.

The described method was applied to the quantification of the three amphetamines tested in the 1.0–10.0 $\mu\text{g/mL}$ interval. The analytical performance data are listed in Table 3. As observed, this approach provided linearity, reproducibility, and accuracy comparable to those of the SPME followed by on-fiber derivatization method, but the sensitivity was better, which is agreement with the values of Table 1.

The proposed SPME-method is less sensitive than methods based on the employment of SPE cartridges to

Table 3
Analytical data for the determination of AP, MA and MDMA in water and in urine by the solution derivatization/SPME method

Sample type	Compound	Linearity ^a $y = a + bx$ ($n = 10$)	Reproducibility			Accuracy ($n = 3$)			LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
			Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Intraday precision, RSD (%) ($n = 3$)	Interday precision, RSD (%) ($n = 6$)	Added concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Calculated concentration ($\mu\text{g/mL}$)	E_r (%)		
Aqueous standards	AP	$a \pm s_a$: 69 ± 8	1	13	22	2.5	2.73 ± 0.06	9	0.05	0.25
		$b \pm s_b$: 74 ± 2	5	8	14	7.5	7.1 ± 1.9	-5		
		$r = 0.998$	10	12	10					
	MA	$a \pm s_a$: 35 ± 9	1	13	13	2.5	2.93 ± 1.04	17	0.1	0.25
		$b \pm s_b$: 47 ± 2	5	5	5	7.5	8 ± 3	8		
		$r = 0.994$	10	14	11					
MDMA	$a \pm s_a$: 15 ± 1	1	14	18	2.5	1.96 ± 1.13	-22	0.5	1	
	$b \pm s_b$: 7.3 ± 0.2	5	18	23	7.5	7 ± 3	-4			
	$r = 0.996$	10	19	18						
Urine	AP	$a \pm s_a$: 65 ± 11	1	21	21	2.5	2.3 ± 0.4	-8	0.1	0.5
		$b \pm s_b$: 85 ± 2	5	16	15	7.5	8 ± 1	2		
		$r = 0.998$	10	8	9					
	MA	$a \pm s_a$: 1 ± 17	1	21	27	2.5	2.42 ± 0.11	-3	0.25	0.5
		$b \pm s_b$: 61 ± 3	5	22	15	7.5	8.23 ± 1.09	10		
		$r = 0.991$	10	9	20					
MDMA	$a \pm s_a$: 7 ± 3	5	22	20	2.5	3.0 ± 0.5	19	1	2.5	
	$b \pm s_b$: 6.2 ± 0.6	10	28	26	7.5	8 ± 3	7			
	$r = 0.996$									

^a Concentration interval: AP and MA, 1.0–10.0 $\mu\text{g/mL}$; MDMA, 1.0–10.0 $\mu\text{g/mL}$ in water and 2.5–10.0 $\mu\text{g/mL}$ in urine.

isolate and concentrate the FMOC–amphetamine derivatives [3]. Again, this can be explained by the relative small amounts of amphetamines and FMOC that can be extracted into the fiber.

Application to real samples

In order to test their reliability, the two optimized methods were applied to analyze illicit tablets and urine spiked with the analytes.

The chromatograms obtained for illicit tablets revealed that MDMA was the only compound present. The concentration of this drug was calculated from the calibration curves obtained with aqueous standard solutions (Tables 2 and 3). The values found were 10.0 ± 0.4 and $10 \pm 1 \mu\text{g/mL}$ by the SPME/on-fiber derivatization and by the solution derivatization/SPME methods, respectively. Therefore, it can be concluded that the two approaches provided comparable results.

The application of the SPME/on-fiber derivatization method to urine samples spiked with the analytes lead to unsuccessful results. The signals of the three amphetamines were < 5% of those of observed for the aqueous standard samples. Attempts were made to increase the percentage of the extraction/reaction by adding NaOH or NaCl to the samples [17], but the recoveries were not significantly increased. These results suggest that matrix components were significantly extracted into the fiber,

thus limiting the amount of the amphetamines and/or the amount of FMOC that could be extracted.

In contrast, the responses achieved by the solution derivatization/SPME method for urine were comparable to those obtained for aqueous solutions (see also Table 1). It can be, therefore, concluded that the affinity of the FMOC derivatives for the fiber coating was higher than the affinity of most matrix components.

The mean recoveries of the analytes in the urine samples were calculated by comparing the peak areas in the samples with the peak areas of aqueous standard solutions containing an equivalent amount of drug. The values obtained were 106% for AP, 93% for MDMA, and 84% for MA ($n = 6$). The linearity and accuracy in urine were also comparable to those achieved for aqueous standards, although the LODs and LOQs were 2–2.5 times higher. Nevertheless, the sensitivity achieved is adequate for the quantification of the amphetamines in real samples, that is, in samples collected after the ingestion of street tablets [27]. It should be noted that the reproducibility observed for the spiked urine samples was worse than that of the aqueous samples, which was most probably due to the reutilization of the fibers. In the present study the fibers were cleaned after every assay by immersing them into 2.0 mL of hexane for 2.0 min. If required, the reproducibility could be improved by using higher volumes of the solvents and/or longer washing times to achieve more effective

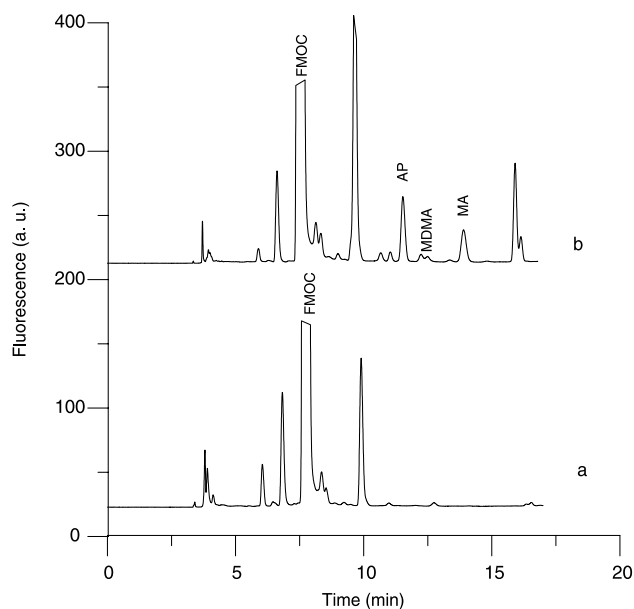


Fig. 3. Chromatograms obtained for (a) blank urine, and (b) urine spiked with AP, MA, and MDMA (10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, each) by the solution derivatization/SPME method. For other experimental details, see text.

cleaning [25]. The selectivity was satisfactory, as observed in Fig. 3.

Conclusions

Two methods have been described for the quantification of amphetamines by LC using SPME and derivatization with FMOOC. Derivatization of the analytes in the solution form followed by the SPME of the derivatives formed is a good option for the analysis of AP, MA, and MDMA either in aqueous samples and in urine. This approach combines the simplicity of SPME for sampling and analyte isolation, and the advantages of chemical derivatization. This approach can be considered a simple and rapid alternative for the determination of amphetamines at low ppm levels, which are the concentrations typically found in real samples, for example, in urine of drug abusers.

The SPME of the amphetamines followed by their on-fiber derivatization is also a suitable methodology for the determination of these compounds in aqueous samples. However, this alternative cannot be applied to quantify amphetamines in urine. The reason is that the extraction of matrix components to the fiber coating prevents the extraction of the reagent during the derivatization step. As a result, the total amount of the analytes derivatized in the fiber is unacceptably low. The main advantage of this procedure compared with the solution derivatization/SPME method is that samples are not altered by the derivatization step. This would be the method of choice for the analysis of illicit formulations containing amphetamines.

Compared to previously described methods involving liquid-liquid extraction (LLE) or SPE to isolate derivatives formed, the present procedures provide worse sensitivity, but sample treatment is considerably simplified. The proposed methods are also less time and resource consuming than most existing methods, particularly those involving LLE. Therefore, they can be considered a valuable alternative when simplicity or rapidity instead of sensitivity is required.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Ministerio del Interior of Spain-Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas for financial support received. C. Cháfer expresses her gratitude to the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte of Spain for a predoctoral grant.

References

- [1] Z. Huang, S. Zhang, Confirmation of amphetamine, methamphetamine, MDA and MDMA in urine samples using disk solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry after immunoassay screening, *J. Chromatogr. B* 792 (2003) 241–247.
- [2] D. Talwar, I.D. Watson, M.J. Stewart, Routine analysis of amphetamine class drugs as their naphthaquinone derivatives in human urine by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B* 735 (1999) 229–241.
- [3] R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, J. Verdú-Andrés, Sensitive determination of methylenedioxyated amphetamines by liquid chromatography, *Analyst* 126 (2001) 581–586.
- [4] N.A. Santagati, G. Ferrara, A. Marrazzo, G. Ronsisvalle, Simultaneous determination of amphetamine and one of its metabolites by HPLC with electrochemical detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 247–255.
- [5] M. Pellegrini, F. Rosati, R. Pacifici, P. Zuccaro, F.S. Romolo, A. Lopez, Rapid screening method for determination of Ecstasy and amphetamines in urine samples using gas chromatography-chemical ionisation mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 769 (2002) 243–251.
- [6] M. Nishida, A. Namera, M. Yashiki, T. Kojima, Routine analysis of amphetamine and methamphetamine in biological materials by gas chromatography-mass spectrometry and on-column derivatization, *J. Chromatogr. B* 789 (2003) 65–71.
- [7] M. Pujadas, S. Pichini, S. Poudevida, E. Menoyo, P. Zuccaro, M. Farré, R. de la Torre, Development and validation of a gas chromatography-mass spectrometry assay for hair analysis of amphetamine, methamphetamine and methylenedioxy derivatives, *J. Chromatogr. B* 798 (2003) 249–255.
- [8] G. Boatto, M.V. Faedda, A. Pau, B. Asproni, S. Menconi, R. Cerri, Determination of amphetamines in human whole blood by capillary electrophoresis with photodiode array detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29 (2002) 1073–1080.
- [9] V. Piette, F. Parmentier, Analysis of illicit amphetamine seizures by capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 979 (2002) 345–352.
- [10] S. Ulrich, Solid-phase microextraction in biomedical analysis, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 167–194.
- [11] I. Koide, O. Noguchi, K. Okada, A. Yokoyama, H. Oda, S. Yamamoto, H. Kataoka, Determination of amphetamine and methamphetamine in human hair by headspace solid-phase

- microextraction and gas chromatography with nitrogen–phosphorus detection, *J. Chromatogr. B* 707 (1998) 99–104.
- [12] N. Raikos, K. Christopoulou, G. Theodoridis, H. Tsoukali, D. Psaroulis, Determination of amphetamines in human urine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography, *J. Chromatogr. B* 789 (2003) 59–63.
- [13] S.-W. Myung, H.-K. Min, S. Kim, M. Kim, J.-B. Cho, T.-J. Kim, Determination of amphetamine, methamphetamine and dimethylamphetamine in human urine by solid-phase microextraction (SPME)-gas chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 716 (1998) 359–365.
- [14] J. Liu, K. Hara, S. Kashimura, M. Kashiwagi, M. Kageura, New method of derivatization and headspace solid-phase microextraction for gas chromatographic–mass spectrometric analysis of amphetamines in hair, *J. Chromatogr. B* 758 (2001) 95–101.
- [15] S. Gentili, A. Torresi, R. Marsili, M. Chiarotti, T. Macchia, Simultaneous detection of amphetamine-like drugs with headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 780 (2002) 183–192.
- [16] H. Grefslie Uglund, M. Krogh, K. Rasmussen, Aqueous alkylchloroformate derivatization and solid-phase microextraction: determination of amphetamines in urine by capillary gas chromatography, *J. Chromatogr. B* 701 (1997) 29–38.
- [17] K. Okajima, A. Namera, M. Yashiki, I. Tsukue, T. Kojima, Highly sensitive analysis of methamphetamine and amphetamine in human whole blood using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry, *Forensic Sci. Int.* 116 (2001) 15–22.
- [18] M.-K. Huang, C. Liu, S.-D. Huang, One step and highly sensitive headspace solid-phase microextraction sample preparation approach for the analysis of methamphetamine and amphetamine in human urine, *Analyst* 127 (2002) 1203–1206.
- [19] M. Yonamine, N. Tawil, R. Lucia de Moraes Moreau, O. Silva, Solid-phase micro-extraction–gas chromatography–mass spectrometry and headspace-gas chromatography of tetrahydrocannabinol, amphetamine, methamphetamine, cocaine and ethanol in saliva samples, *J. Chromatogr. B* 789 (2003) 73–78.
- [20] E. Koster, C. Bruins, G. de Jong, On-fibre derivatization for direct immersion solid-phase microextraction, *Analyst* 127 (2002) 598–602.
- [21] F. Musshoff, D. Lachenmeier, L. Kroener, B. Madea, Automated headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of amphetamines and synthetic designer drugs in hair samples, *J. Chromatogr. A* 958 (2002) 231–238.
- [22] M.-R. Lee, Y.-S. Song, B.-H. Hwang, C.-C. Chou, Determination of amphetamine and methamphetamine in serum via headspace derivatization solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 896 (2000) 265–273.
- [23] J. Wu, H. Lord, J. Pawliszyn, Determination of stimulants in human urine and hair samples by polypyrrole coated capillary in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography–electrospray mass spectrometry, *Talanta* 54 (2001) 655–672.
- [24] C. Cháfer-Pericás, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, Analysis of methylamine by solid-phase microextraction and HPLC after on-fibre derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate, *Anal. Chim. Acta* 513 (2004) 425–433.
- [25] R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, A. Sevillano-Cabeza, On-line derivatization into precolumns for the determination of drugs by liquid chromatography and column switching: determination of amphetamines in urine, *Anal. Chem.* 68 (1996) 734–739.
- [26] P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández, A. Sevillano-Cabeza, I. Trümpfer, Derivatization of amines in solid-phase extraction supports with 9-fluorenylmethyl chloroformate for liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta* 344 (1997) 125–136.
- [27] N. Samyn, G. De Boeck, M. Wood, C. Lamers, D. De Waard, K. Brookhuis, A. Verstraete, W. Riedel, Plasma, oral fluid and sweat wipe ecstasy concentrations in controlled and real life conditions, *Forensic Sci. Int.* 128 (2002) 90–97.

Application of solid-phase microextraction combined with derivatization to the enantiomeric determination of amphetamines

C. Cháfer-Pericás, P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández*

Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

Received 26 July 2005; received in revised form 13 September 2005; accepted 30 September 2005

Available online 14 November 2005

Abstract

The utility of combining chiral derivatization and solid-phase microextraction (SPME) for the enantiomeric analysis of primary amphetamines by liquid chromatography has been investigated. Different derivatization/extraction strategies have been evaluated and compared using the chiral reagent *o*-phthaldialdehyde (OPA)–*N*-acetyl-L-cysteine (NAC) and fibres with a Carbowax-templated resin coating. Amphetamine, norephedrine and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) were used as model compounds. On the basis of the results obtained, a new method is presented based on the derivatization of the analytes in solution followed by SPME of the OPA–NAC derivatives formed. The proposed conditions have been applied to determine the compounds of interest at low ppm levels ($\leq 10 \mu\text{g/ml}$) in aqueous and urine samples. Data on the linearity, reproducibility, sensitivity and selectivity are given. The utility of the described procedure for the quantification of amphetamine, norephedrine and MDA enantiomers in different kind of samples is also discussed.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Solid-phase microextraction; Derivatization; Amphetamines; Liquid chromatography

1. Introduction

The enantioselective analysis of amphetamine and related substances is receiving increasing attention for a number of reasons. These compounds exist as pairs of enantiomers, which may differ in their action with biological specimens. Moreover, unlike clandestine preparations some pharmaceutical preparations contain only one of the enantiomers. Therefore, enantiomeric composition determinations may be useful in differentiating therapeutic from illicit intake of amphetamines. Enantiomeric characterisation and determination can also help to identify the synthetic pathways of clandestine amphetamine preparations.

Among the different methods available for the enantiomeric analysis of amphetamines derivatization with a chiral reagent followed by the separation of the diastereomers formed by liquid chromatography (LC) is the most widely adopted strategy [1,2]. The reason is that derivatization is a common and often obligatory step in most methods (enantioselective or not) owing to the low UV absorbances of amphetamines and also to their

very low natural fluorescence. Therefore, derivatization is also aimed at enhancing the sensitivity, which is particularly important in the analysis of biological samples. In this sense, several reagents and derivatization strategies have been described [3–7].

The main disadvantage of indirect LC methods over methods based on the employment of chiral selectors is that they typically involve an extensive sample manipulation. This is because, since chiral determinations could increase the number of peaks to be resolved, intensive matrix elimination is necessary. Moreover, the derivatization process often involves additional steps aimed at eliminating the excess of reagent or side-products. For such purposes liquid–liquid extraction (LLE) or solid-phase extraction (SPE) are the techniques typically used [7]. In some of the reported assays the reaction conditions required to obtain satisfactory conversion yields (i.e. reaction times of several hours) result in procedures unsuitable for routine analysis [8]. Therefore, the development of rapid and simple methods for the enantioselective analysis of amphetamines continues to be an area of major interest.

The employment of a solid-support to perform analyte purification and derivatization (*solid-support assisted derivatization methodology*) appears as a useful alternative to simplify procedures that involve the chemical transformation of the analytes

* Corresponding author.

E-mail address: rosa.herraez@uv.es (R. Herráez-Hernández).

[9,10]. In the context of enantiomeric analysis the utility of this approach has been illustrated for the analysis of amphetamine enantiomers using small precolumns packed with a C₁₈ phase and the reagent *o*-phthaldialdehyde (OPA)–*N*-acetyl-L-cysteine (NAC) [11]. More recently, the solid-support assisted derivatization approach has been applied to the resolution of some amphetamine-derived designer drugs using C₁₈-packed SPE cartridges and the reagent (–)-1-(9-fluorenyl)ethyl chloroformate (FLEC) [12]. Alternatively, the analytes can be isolated and purified in C₁₈ based SPE cartridges, desorbed with the proper solvent, and then derivatized with FLEC in solution [13]. The later option, however, is significantly less sensitive than the solid-support assisted derivatization based method.

The solid-support assisted derivatization concept can be extended to solid-phase microextraction (SPME) with on-fibre derivatization [14]. Besides the inherent advantages of SPME, the combination of SPME and a chemical reaction offers some advantages over conventional derivatization procedures such simplicity or minor solvent consumption [15,16]. As regards amphetamines, SPME with a chemical derivatization has been extensively used in the achiral analysis of some amphetamines by gas chromatography (GC) [17–20]. Derivatization is typically aimed at transforming the analytes into compounds more amenable for GC or at increasing their affinity for the fibre coating. Recently, we have proposed a method for the (achiral) analysis of some amphetamines by LC, which combines SPME and derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) [21]. To our knowledge, no attempts have been made to combine SPME with chiral reagents for the enantiomeric analysis of amphetamines.

As an attempt to simplify the enantioselective analysis of amphetamines, in the present work we have evaluated for the first time the possibility of coupling SPME and derivatization with a chiral reagent. OPA–NAC has been selected for derivatization because according to previous studies with aliphatic amines this reagent shows excellent compatibility with typical fibre coatings [22]. Moreover, the enantioresolution attainable with OPA–NAC for primary amphetamines is adequate for most purposes [23]. Amphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) and norephedrine have been selected as model compounds, and the fibre coating was Carbowax-templated resin [14]. On the basis of these studies a new method for the enantioselective analysis of the amphetamines is proposed. The analytical performance and possible applications of the proposed conditions are discussed.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

All reagents were of analytical grade. Racemic amphetamine sulphate, 3,4-methylenedioxyamphetamine hydrochloride and norephedrine were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). *o*-Phthaldialdehyde and *N*-acetyl-L-cysteine were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Acetonitrile and methanol were of HPLC grade (Scharlau, Barcelona, Spain). Sodium hydroxide, sodium acetate, boric acid and acetic acid were obtained from Panreac (Barcelona, Spain).

Stock standard solutions of amphetamine, MDA and norephedrine (50 µg/ml, each enantiomer) were prepared in water. Working solutions of these compounds were prepared by dilution of the stock solutions with water. Water was deionized and filtered through 0.45 µm nylon membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain). All solutions were stored in the dark at 2 °C.

The derivatization reagent was a mixture of OPA and NAC at a concentration of 100 mM in each compound. It was prepared by dissolving the pure compounds in methanol–water (15:85, v/v). Since derivatizations with OPA–NAC require a basic pH, a 0.05 M borate buffer of pH 10.0 was also added to the reaction medium.

2.2. Apparatus and chromatographic conditions

The chromatographic system consisted of a quaternary pump (Hewlett-Packard 1050 Series, Palo Alto, CA, USA), a SPME–HPLC interface (Supelco, Bellefonte, PA, USA), and a fluorescence detector (Hewlett-Packard, 1050 Series). The detector was coupled to a data system (Hewlett-Packard, HPLC ChemStation) for data acquisition and calculation. The excitation and emission wavelengths were 231 and 425 nm, respectively. The SPME fibres, coated with Carbowax-templated resin (CW-TPR, 50 µm) were also obtained from Supelco.

A LiChrospher 100 RP₁₈, 125 mm × 4 mm i.d. column (Merck, Darmstadt, Germany) was the analytical column. A precolumn and a high-pressure six-port valve (Hewlett-Packard) were inserted between the SPME–HPLC interface and the analytical column to effect peak compression [14]. The precolumn (20 mm × 2.1 mm i.d.) was dry-packed with a Hypersil C₁₈, 30 µm, stationary phase. Before each assay the precolumn and the analytical column were flushed with water at a flow rate of 1.0 ml/min. At the beginning of the run the SPME–HPLC interface was activated and the switching valve was rotated. In such a way, the mobile phase emerging from the interface (water) was sent to the precolumn and then to waste. At 0.5 min the six-port valve was again rotated so the precolumn and the analytical column were connected, and the mobile phase composition was changed to acetate buffer–methanol–acetonitrile (46:48:6, v/v). The mobile phase flow rate was kept at 1 ml/min. The acetate buffer (0.05 M, pH 7.5) was prepared by dissolving sodium acetate in water; then the pH was adjusted to the required value by adding 0.5 M sodium hydroxide.

All solvents were filtered through 0.45 µm nylon membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain) and degassed with helium before use.

3. SPME and derivatization procedures

3.1. SPME of the analytes followed by on-fibre derivatization

The fibres were first immersed into the samples (25 ml) for 30 min, and then into the derivatization solution for other 5 min. The derivatization solution consisted of 1.0 ml of OPA–NAC and 0.5 ml borate buffer. The samples and the derivatization solution were stirred during extraction. Finally, the fibres were removed

from the vials and placed into the SPME–HPLC interface. The derivatives formed were desorbed from the fibres under static mode: fibres were soaked with 200 μ l of methanol for 10 min. Next, the valve of the SPME–HPLC interface was rotated, so the analytes were sent to the precolumn and to the analytical column. At the end of each run the fibres were cleaned by immersing them into a vial containing 15 ml of water for 2 min.

3.2. On-fibre derivatization with coated fibres

Fibres were first immersed into the reaction solution (1.0 ml of OPA–NAC plus 0.5 ml of borate buffer) for 5 min, and then into the samples (25 ml) for other 30 min. The extraction processes were effected under magnetic stirring. Finally, the fibres were removed from the samples and placed into the SPME interface for desorption and for chromatography. Conditions used to transfer the derivatives formed as well as to re-equilibrate the fibres were those of the above section.

3.3. Solution derivatization followed by SPME

The experimental conditions used to effect solution derivatization were selected according to previous studies [23]: 1.25 ml of the samples were placed in 2 ml glass vials and mixed with 0.50 ml of borate buffer and with 0.25 ml of the OPA–NAC solution. After a reaction time of 3 min, the fibres were immersed in the resulting mixture for 5–45 min while being stirred. Finally, the fibres were removed from the samples and placed into the SPME interface for desorption and for chromatography. The other conditions were those indicated above.

Each sample was derivatized in triplicate, and all assays were carried out at ambient temperature.

3.4. Analysis of real samples

The proposed conditions were applied to urine samples. Samples were prepared by spiking untreated urine with standard solu-

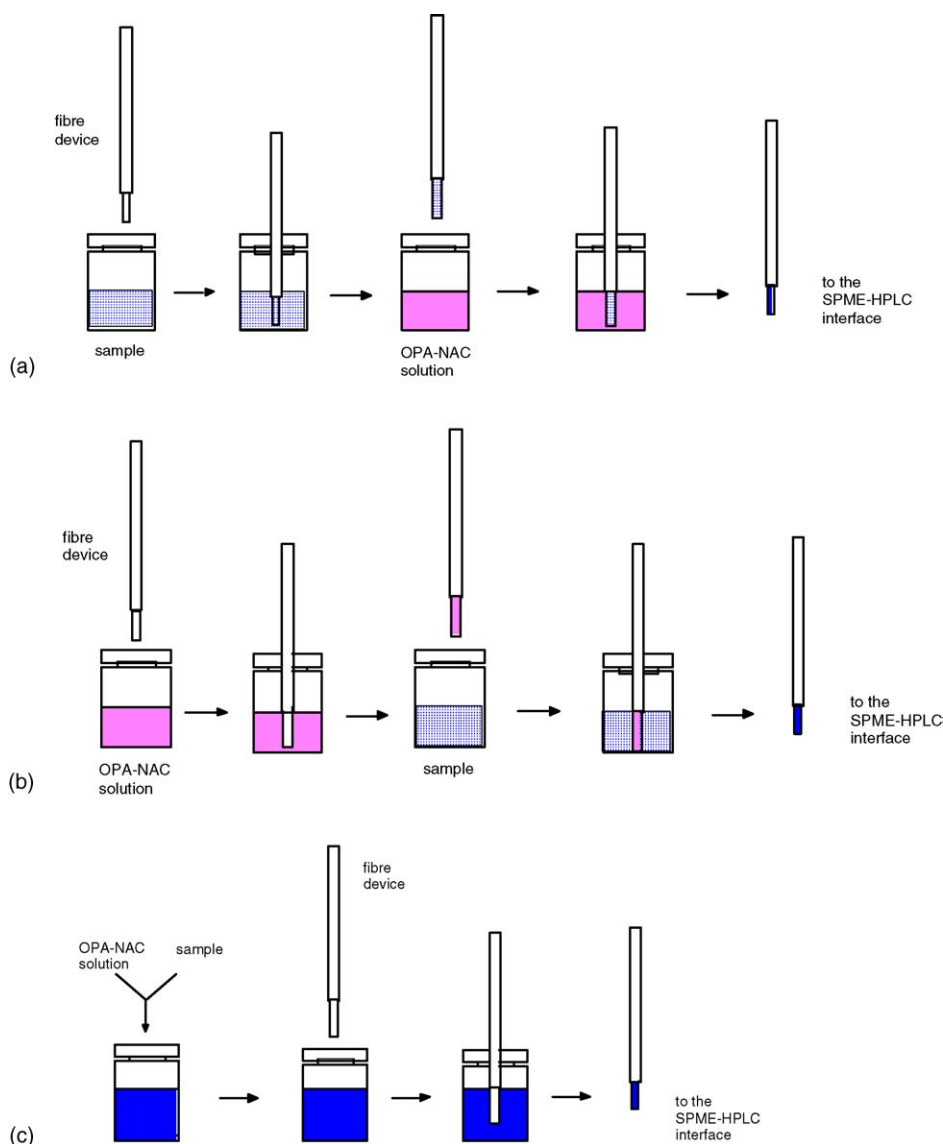


Fig. 1. Schemes of the extraction/derivatization procedures tested: (a) SPME of the analyte followed by on-fibre derivatization, (b) extraction/derivatization of the amphetamine with fibres coated with OPA–NAC and (c) solution derivatization followed by SPME of the derivatives formed. For other details see text.

tions of the analytes producing different concentrations within the tested interval. The proposed method was also applied to the analysis of *Senioral* tablets (Laboratories Belmac, Zaragoza, Spain) labelled to contain 30 mg of norephedrine hydrochloride. Three tablets were weighed, powdered and homogenized, and the required amount was suspended in 250 ml of water. This suspension was filtered and the filtrate was further diluted with distilled water. The resulting solution was processed by the derivatization/SPME proposed method. Urine samples obtained after the administration of one of those tablets were also analyzed.

Each sample was analyzed in triplicate and all assays were carried out at ambient temperature.

4. Results and discussion

4.1. Optimization of the derivatization/SPME procedure

Derivatization can be effected before, during or after SPME of the target compounds. In the first option the derivatives are formed in solution and then extracted by immersing the fibres in the reaction medium. In the second approach the fibres, previously coated with the reagent, are immersed into the samples (or exposed to the headspace of a vial containing the sample), so the analytes are extracted and derivatized simultaneously. In the last option the fibres are successively immersed into the samples and into the reagent solution. Only the last two approaches can be considered *on-fibre* derivatization procedures.

In the present study, the three possibilities have been tested and compared using standard solutions of each amphetamine (see Fig. 1). Equivalent SPME conditions were used for the *on-fibre* derivatization methods: adsorption times for the analytes and the reagent of 30 and 5 min, respectively, and a desorption time for the OPA–NAC derivatives of 10 min. Conditions for the solution derivatization were selected according to the results presented in [23]; then, the derivatives formed were subjected to SPME using adsorption and desorption conditions equivalent of those of the *on-fibre* derivatization procedures.

Under the three approaches tested equivalent peak areas (within experimental fluctuations) were observed for the two diastereomers obtained from the racemic solutions of each amphetamine. This indicates that as in solution, and provided that SPME was effected under non-equilibrium conditions, the reaction yields obtained for each pair of enantiomers were identical. In other words, unlike other reactions taking place on polymer resins [24], no racemization occurred in *on-fibre* mediated derivatizations with CW-TR fibres and OPA–NAC. Best efficiencies were observed when the derivatization was carried out in solution and then the derivatives were subjected to SPME. This is illustrated for amphetamine in Fig. 2. The peak areas obtained for the three amphetamines tested by the solution derivatization/SPME approach were of about 6–15 times greater than those obtained with the other methods. These results indicate that the affinity of the OPA–NAC derivatives for the fibre coating is significantly greater than those of the underivatized amphetamines and/or OPA–NAC, which can be explained by the relatively high polarities of amphetamines and OPA–NAC compared with the polarity of their respective isoindole derivatives.

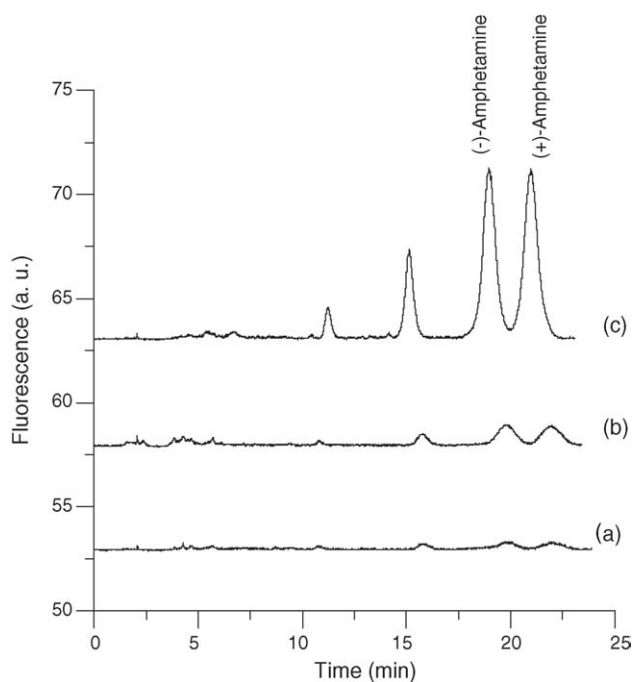


Fig. 2. Chromatograms obtained for racemic amphetamine (7.5 µg/ml, each isomer) by the different extraction/derivatization approaches tested: (a) SPME of the analyte followed by on-fibre derivatization, (b) extraction/derivatization of the amphetamine with fibres coated with OPA–NAC and (c) solution derivatization followed by SPME of the derivatives formed. Elution order for norephedrine and amphetamine enantiomers taken from Ref [23]. For other details see text.

In accordance with the above results, solution derivatization followed by SPME of the derivatives formed was the strategy adopted for the enantiomeric analysis of amphetamines. The main parameters affecting the SPME process were optimized. Different adsorption times in the 5–45 min interval were applied for standard solutions of the amphetamines. The desorption time was 5 min. Maximum analytes responses were observed for adsorption times in the 30–45 min interval. Next, different desorption times were assayed in the 2–15 min interval (for an adsorption time of 30 min). Maximum peak areas were reached when using a desorption time of 10 min. Different sample volumes in the 0.25–1.25 ml interval were also assayed. Increasing the sample volume had a positive effect on analyte responses within the tested interval. However, higher sample volumes were not tested as they are rarely used in the analysis of biological samples. On the basis of the above results the conditions selected for the enantiomeric analysis of amphetamines were as follows: solution derivatization (1.25 ml of samples + 0.25 ml of OPA–NAC + 0.50 ml of borate and a reaction time of 3 min) followed by adsorption of the derivatives for 30 min, and a desorption time of 10 min.

Typical chromatograms obtained under the optimized conditions for a blank (water) and for standard solutions of the analytes are depicted in Fig. 3. Unlike previously reported assays for amphetamines using the conventional solution derivatization approach no peaks due to the excess OPA–NAC products were observed in the chromatogram obtained for a blank [23]. This is consistent with the low affinity of OPA–NAC for the fibre coating previously observed. No other peaks corresponding to

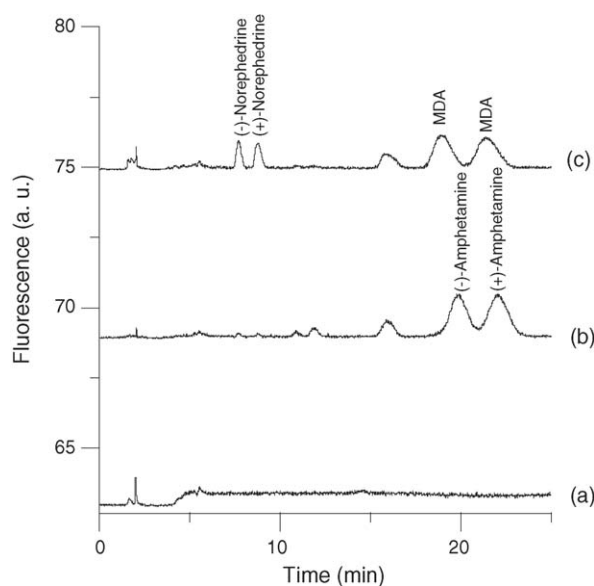


Fig. 3. Chromatograms obtained under the proposed solution derivatization/SPME procedure for: (a) a blank (water), (b) amphetamine in water and (c) a mixture of norephedrine and MDA in water. Concentration of each enantiomer, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. For other details see text.

side-products were observed. The presence of unwanted peaks in the chromatograms obtained by the solid-support assisted derivatization methodology is also general due not only to the reagent but also to the impurities of the solid-support [9–11]. Therefore, compared with other derivatization/extraction procedures, the present method provides improved chromatograms. This is particularly important in the context of chiral analysis because, as stated below, chiral separations may increase drastically the number of peaks in the final chromatograms.

4.2. Analytical performance

The utility of the optimized derivatization/SPME method for the quantification of amphetamine, MDA and norephedrine in water and spiked urine samples was evaluated. The calibration equations obtained for the analytes are presented in Table 1. The results of this table indicate that the proposed method provided adequate linearity within the tested concentration intervals. In all instances the slopes of the calibration graphs obtained for each pair of enantiomers were statistically equivalent (at a confidence level of 95%). The slopes obtained for norephedrine enantiomers were much lower than those of the other amphetamine derivatives. The higher polarity of norephedrine, and thus of norephedrine–OPA–NAC, compared to those of amphetamine and MDA derivatives may be the explanation. This is in agreement with the much lower retention times observed for norephedrine–OPA–NAC isomers under reversed phase conditions (see Fig. 3).

The mean recovery percentages in urine calculated from the slopes of calibration equations are also listed in Table 1. The efficiency of the derivatization/SPME process obtained for urine samples was significantly lower than that of aqueous samples,

Table 1
Analytical data for the determination of amphetamine, MDA and norephedrine in water and urine by the solution derivatization/SPME method

Sample type	Compound	LOD ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Concentration interval ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Linearity, $y = a + bx$ ($n = 8$)		R^2	Mean recovery in urine (%) ($n = 16$)	Reproducibility			
					$a \pm s_a$	$b \pm s_b$			Intra-day precision CV (%) ($n = 3$)	Inter-day precision CV (%) ($n = 3$)	2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Aqueous standards	(-)-Amphetamine	0.1	0.4	0.375–10	16 ± 3	24.4 ± 0.7	0.99	–	2	13	9	20
	(+)-Amphetamine	0.1	0.4	0.375–10	13 ± 4	25.8 ± 0.9	0.99	–	6	18	11	20
	(-)-Norephedrine	0.1	0.4	1–10	2 ± 2	6 ± 0.3	0.98	–	17	10	16	7
	(+)-Norephedrine	0.1	0.4	1–10	3 ± 2	6 ± 0.3	0.98	–	17	9	17	6
	MDA first eluting isomer	0.1	0.4	1–10	8 ± 6	26 ± 1	0.98	–	4	11	19	15
	MDA last eluting isomer	0.1	0.4	1–10	7 ± 6	26 ± 1	0.98	–	17	11	20	16
Urine	(-)-Amphetamine	0.25	0.75	1–10	16 ± 4	12.2 ± 0.8	0.97	50	11	0.5	9	20
	(+)-Amphetamine	0.25	0.75	1–10	14 ± 5	13.6 ± 0.7	0.98	53	20	5	20	18
	(-)-Norephedrine	0.25	1	1–10	5.4 ± 1.2	3.4 ± 0.2	0.98	57	2	5	10	7
	(+)-Norephedrine	0.25	1	1–10	6.5 ± 1.2	3.9 ± 0.2	0.98	65	3	8	10	11
	MDA first eluting isomer	0.25	1	1–10	-18 ± 6	26 ± 1	0.98	100	16	5	15	8
	MDA last eluting isomer	0.25	1	1–10	-7 ± 8	25 ± 1	0.97	104	7	14	9	14

especially for norephedrine and amphetamine enantiomers. This suggests that some urinary compounds were also extracted to the fibres thus limiting the amount of OPA–NAC derivatives that could be extracted.

The intra- and inter-day coefficients of variation were calculated at two concentration levels of each amphetamine. As shown in Table 1, the obtained values were $\leq 20\%$, and no significant differences were found between aqueous and urine samples. The LODs and LOQs found in aqueous standards and in urine samples are also listed in Table 1.

The selectivity was evaluated by processing other amphetamines (racemates) as well as different compounds commonly found with amphetamine and MDA in clandestine preparations. The compounds evaluated were: 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA, Ecstasy), methamphetamine, ephedrine, pseudoephedrine, *p*-methoxyamphetamine, paracetamol, caffeine, acetylsalicylic acid, saccharine, sodium chloride and lactose. None of these compounds modified the derivatization/extraction of the analytes. Only *p*-methoxyamphetamine was observed in the resulting chromatograms, as it was the only amphetamine with a derivatizable primary amino group. However, the derivatives formed eluted at 22.5 and 26.1 min, respectively, and thus they did not interfere with the analytes. Of particular interest is the absence of reaction for methamphetamine and MDMA, as these compounds are mainly metabolised to amphetamine and MDA, respectively. The selectivity observed for urine samples was also adequate. As an illustrative example, the chromatograms obtained for blank urine and for urine spiked with norephedrine and MDA enantiomers are shown in Fig. 4.

The same conclusion can be derived from Fig. 5, which shows the chromatograms obtained from two subjects at different times after the administration of norephedrine. It should be noted that

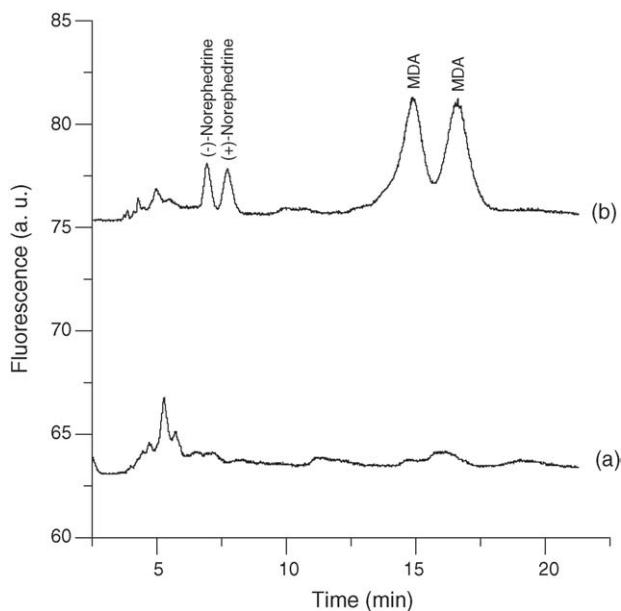


Fig. 4. Chromatograms obtained under the proposed solution derivatization/SPME procedure for: (a) blank urine and (b) urine spiked with norephedrine and MDA (7.5 $\mu\text{g/ml}$, each isomer). For other details see text.

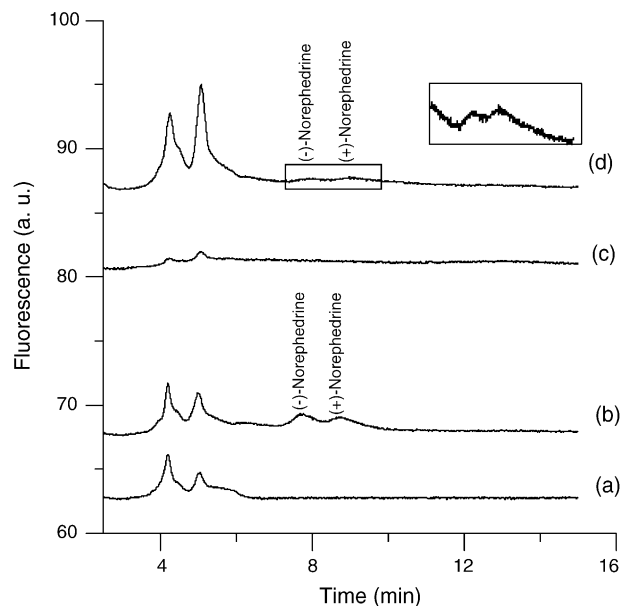


Fig. 5. Chromatograms obtained after a single dose administration of 30 mg of norephedrine hydrochloride: subject 1 (a) immediately and (b) 4.5 h after drug administration; subject 2 (c) immediately and (d) 11 h after drug administration. For other details see text.

in all urine samples assayed endogenous compounds eluted at retention times of 4–6 min.

Finally, the accuracy was investigated by determining amphetamines in spiked urine. Samples were spiked with the analytes at two concentration levels within the tested concentration interval, and processed under the proposed conditions. The concentrations of the analytes in these samples were established from the calibration equations of Table 1. In Table 2 are listed the results obtained. In all cases, the concentrations calculated were close to the concentrations present. The proposed conditions were also applied to the quantification of norephedrine in a pharmaceutical preparation. The only peaks detected in the resulting chromatograms were those corresponding to norephedrine enantiomers. The concentrations of these

Table 2
Accuracy for the determination of amphetamines in spiked urine

Analyte	Added concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Determined concentration ($\mu\text{g/ml}$) ($n=3$)	Relative error (%)
(-)-Amphetamine	2.5	2.6 ± 0.2	+5
	7.5	9 ± 2	+20
(+) -Amphetamine	2.5	2.4 ± 0.6	-3
	7.5	8 ± 2	+7
(-)-Norephedrine	2.5	2.3 ± 0.3	-8
	7.5	8.0 ± 0.5	+7
(+) -Norephedrine	2.5	2.22 ± 0.12	-11
	7.5	8.7 ± 0.8	+16
MDA first eluting isomer	2.5	2.5 ± 0.3	0
	7.5	7.3 ± 0.6	+3
MDA last eluting isomer	2.5	2.48 ± 0.04	-0.6
	7.5	7.7 ± 0.6	+3

compounds were calculated from the calibration graphs corresponding to aqueous standard solutions in Table 1. The amounts of (–) and (+)-norephedrine found in the samples (expressed as hydrochlorides) were (13 ± 2) and (15 ± 3) mg, respectively ($n = 3$). Therefore, the tablets contained a racemic mixture of norephedrine (at a confidence level of 95%). These values were consistent with the total amount of norephedrine hydrochloride declared by the manufacturer (30 mg per tablet). Urine samples collected from two subjects after a single dose administration of one of those tablets were also processed (Fig. 5). The concentrations of (–)- and (+)-norephedrine were calculated from the calibration graphs corresponding to spiked urine in Table 1. The values obtained in sample corresponding to Fig. 5b were (5.5 ± 0.6) and (4.9 ± 0.3) $\mu\text{g/ml}$ for the (–)- and (+)-enantiomers, respectively ($n = 3$). It can be deduced that urine also contained equal proportion of the two enantiomers (at a confidence level of 95%). The chromatogram of Fig. 5d, which was obtained from urine collected 11 h after the administration of the tablet, showed analytical signals for norephedrine enantiomers close to the LODs.

4.3. Comparison with other derivatization and sample treatment approaches

The features of the present method have been compared with those of other approaches proposed for the chiral analysis of amphetamines through the formation of their respective OPA–NAC derivatives: the conventional solution derivatization method [23], and the solid-support assisted derivatization method using a precolumn connected on-line to the analytical column [11]. In the former method, the analysis of urine samples entailed analyte purification with C_{18} based SPE cartridges before derivatization. In Table 3 are compared relevant analytical data of these methods. This table also shows data obtained by a method previously reported for the achiral determination of some amphetamines following a solution derivatization/SPME scheme with the fluorogenic reagent FMOC [21].

The three derivatization methods using OPA–NAC in Table 3 are suitable to quantify amphetamine enantiomers at low ppm levels either in water and in urine. However, the solution derivatization and the solid-support assisted derivatization methods provided better reproducibility than the proposed solution derivatization/SPME procedure. Nevertheless, the precision of the proposed method can be considered adequate for the analysis of amphetamines in biosamples [7].

The LODs and LOQs achieved by the proposed solution derivatization/SPME were about were 5–50 times greater than those achieved by other procedures. Therefore, the proposed procedure seem to be less sensitive. Nevertheless, the sensitivity attained by present method is suitable for the enantiomeric analysis of amphetamines in real samples (e.g. in urine of drug abusers) [25].

The application of the solution derivatization method to urine required the purification of the analytes. In the procedure in Table 3 samples were loaded in the previously conditioned SPE cartridges, which were then flushed with water to eliminate matrix compounds. Next, the cartridges were dried with air, and

Table 3
Analytical data of different approaches for determining amphetamines in water and urine

Methodology	Reagent	Compounds tested	Values for the first eluting and last eluting isomer, respectively			LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	Sample manipulation degree ^b	Selectivity ^c	Reference
			Reproducibility ^a							
			Intra-day precision CV (%)	Inter-day precision CV (%)						
1. Solution derivatization ^c	OPA–NAC	Amphetamine	1, 1 ^d	9, 7 ^d	50 ^{d,e}	250 ^{d,e}	*	*	[23]	
		Norephedrine	1, 2 ^d	9, 6 ^d	25 ^{d,e}	100 ^{d,e}				
		MDA	2, 4 ^d	4, 7 ^d	50 ^{d,e}	250 ^{d,e}				
2. Solid-support assisted derivatization into a precolumn connected to the analytical column ^c	OPA–NAC	Amphetamine	5, 4 ^e	5, 7 ^e	50, 50 ^e	–	***	**	[11]	
		Amphetamine	13, 18 ^d ; 0.5, 5 ^e	20, 20 ^d ; 20, 18 ^e	100, 100 ^d ; 250, 250 ^e	400, 400 ^d ; 750, 750 ^e	**	***	This work	
3. Solution derivatization followed by SPME	OPA–NAC	Norephedrine	10, 9 ^d ; 5, 8 ^e	7, 6 ^d ; 7, 11 ^e	100, 100 ^d ; 250, 250 ^e	400, 400 ^d ; 1000, 1000 ^e				
		MDA	11, 11 ^d ; 5, 14 ^e	15, 16 ^d ; 8, 14 ^e	100, 100 ^d ; 250, 250 ^e	400, 400 ^d ; 1000, 1000 ^e				
		Amphetamine	8 ^d ; 16 ^e	14 ^d ; 15 ^e	50 ^d ; 100 ^e	250 ^d ; 500 ^e	**	***	[21]	
4. Solution derivatization followed by SPME	FMOC	Amphetamine								

^a Determined at 5.0 $\mu\text{g/ml}$ in methods 2 and 4, and at 7.5 $\mu\text{g/ml}$ in methods 1 and 3.

^b The more asterisks, the better procedure.

^c SPE into C_{18} packed cartridges was used in the analysis of urine samples.

^d Water.

^e Urine.

the analytes were desorbed with a methanol/phosphate buffer mixture. Finally, the collected extract was derivatized in solution and chromatographed. With the proposed derivatization/SPME method the treatment of the samples is drastically simplified: addition of the reagents to the samples followed by the immersion of the fibres into the resulting solution. The solid-support assisted derivatization based method in Table 3 is an on-line procedure developed for the analysis of amphetamine enantiomers. Analyte purification and derivatization were effected into the precolumn through the successive injection of the samples and the reagent, and therefore, minimum sample manipulation was involved.

As regards the selectivity, the proposed solution derivatization/SPME method is superior to the other methods. This is illustrated in Fig. 6, which shows the chromatograms obtained for urine under the different derivatization/extraction approaches. The number and intensity of the peaks in the final chromatograms is lower when applying the solution derivatization/SPME approach. Therefore, the latter approach is clearly superior for chiral analysis.

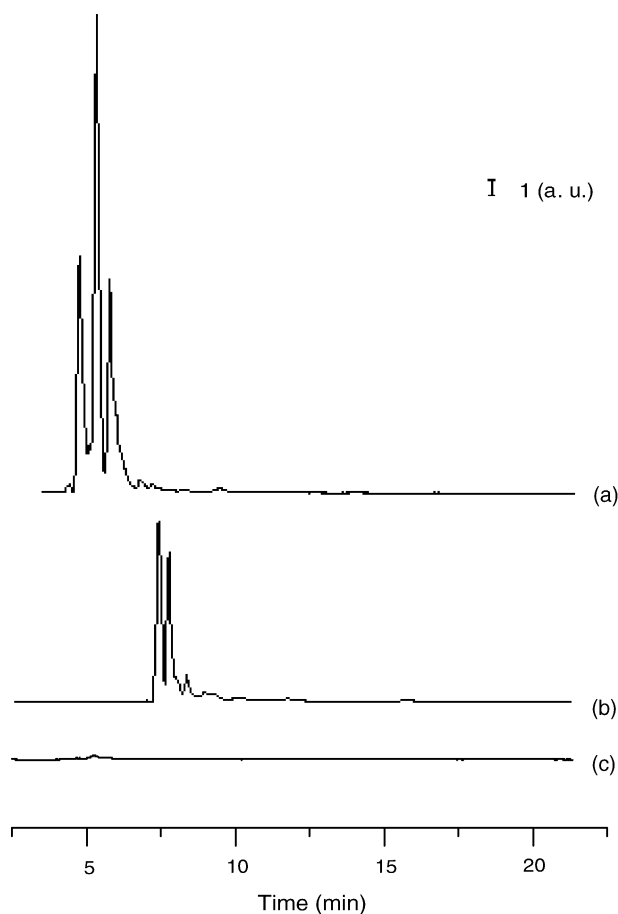


Fig. 6. Chromatograms obtained for urine under different extraction/derivatization approaches: (a) SPE with a C_{18} packing followed by solution derivatization, (b) solid-support assisted derivatization into a precolumn containing a C_{18} packing and (c) the proposed solution derivatization SPME method. The time shift in figure (b) is due to the purification and derivatization stages, which are effected in the same chromatographic system before transferring the derivatives to the analytical column. For other experimental details see text.

On the other hand, the solution derivatization/SPME approaches either with chiral and achiral reagents have shown the same tendency in terms of reproducibility, sensitivity and selectivity.

5. Conclusions

This study shows for the first time the possibility of combining derivatizations with a chiral reagent, such as OPA–NAC and SPME with CW-TPR fibres for the enantiomeric analysis of amphetamines by LC. On-fibre mediated derivatizations do not modify the reaction rates between enantiomers, which is highly desirable if the method has to be used for quantitative purposes. However, solution derivatization followed by SPME is the best option as it provides better reaction/extraction efficiencies.

The proposed methodology permits the enantiomeric analysis of primary amphetamines at low ppm levels in aqueous and urine samples with adequate linearity, reproducibility and accuracy. The proposed derivatization/SPME strategy seems to be less sensitive and reproducible than other indirect methods using OPA–NAC, such as those using solution derivatization or solid-support assisted derivatization. However, the proposed method is clearly superior in terms of selectivity, which is particularly important in chiral analysis when processing biological samples. In addition, compared with conventional chiral methods for amphetamines the proposed procedure is very simple and rapid, as in most of such procedures intensive sample treatments by LLE or SPE are necessary to achieve the required selectivity. Therefore, the proposed method can be considered a simple and rapid alternative to conventional methods for the enantiomeric analysis of primary amphetamines in different kind of samples. If high precision and/or sensitivity are required, other sample treatments must be considered.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Ministerio de Educación, Ciencia y Deporte (Project CTQ2004-03088/BQU) for financial support received. C. Cháfer-Pericás expresses her gratitude to the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte of Spain for pre-doctoral grant.

References

- [1] J.T. Liu, R.H. Liu, *J. Biochem. Biophys. Methods* 54 (2002) 115–146.
- [2] R. Herráez, P. Campíns, J. Verdú, *J. Biochem. Biophys. Methods* 54 (2002) 147–167.
- [3] K.S. Boos, B. Wilmers, R. Sauerbrey, E. Schlimme, *Chromatographia* 25 (1988) 199–204.
- [4] I.S. Krull, Z. Deyl, H. Lingeman, *J. Chromatogr. B* 659 (1994) 1–17.
- [5] J.C.M. Waterval, H. Lingeman, A. Bult, W.J.M. Underberg, *Electrophoresis* 21 (2000) 4029–4045.
- [6] S. Görög, M. Gazdag, *J. Chromatogr. B* 659 (1994) 51–84.
- [7] T. Kraemer, H.H. Maurer, *J. Chromatogr. B* 713 (1998) 163–187.
- [8] C. Gunaratna, P.T. Kissinger, *J. Chromatogr. A* 828 (1998) 95–103.
- [9] R. Herráez, P. Campíns, A. Sevillano, *Anal. Chem.* 68 (1996) 734–739.
- [10] R. Herráez, P. Campíns, A. Sevillano, *J. Chromatogr. Sci.* 35 (1997) 169–175.

- [11] M.D. Pastor, R. Porras, R. Herráez, P. Campíns, *Analyst* 123 (1998) 319–324.
- [12] J. Verdú, P. Campíns, R. Herráez, *Chromatographia* 60 (2004) 537–544.
- [13] P. Campíns, J. Verdú, R. Herráez, *Chromatographia* 57 (2003) 309–316.
- [14] R. Herráez, C. Chafer, P. Campíns, *Anal. Chim. Acta* 513 (2004) 425–433.
- [15] L. Pan, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 69 (1997) 196–205.
- [16] E.E. Stashenko, J.R. Martinez, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 533–561.
- [17] E.H.M. Koster, C.H.P. Bruins, G.J. de Jong, *Analyst* 127 (2002) 598–602.
- [18] M.-K. Huang, C. Liu, S.-D. Huang, *Analyst* 127 (2002) 1203–1206.
- [19] M. Yonamine, N. Tawil, R.L. de Moraes Moreau, O.A. Silva, *J. Chromatogr. B* 789 (2003) 73–78.
- [20] M. Pujadas, S. Pichini, S. Poudevida, E. Menoyo, P. Zuccaro, M. Frré, R. de laTorre, *J Chromatogr. B* 798 (2003) 249–255.
- [21] C. Chafer, R. Herráez, P. Campíns, *Anal. Biochem.* 333 (2004) 328–335.
- [22] C. Chafer, R. Herráez, P. Campíns, *Talanta* 66 (2005) 1139–1145.
- [23] R. Herráez, P. Campíns, J. Verdu, *Chromatographia* 56 (2002) 559–566.
- [24] M. Pumera, M. Flegel, L. Lepsa, I. Jelinek, *Electrophoresis* 23 (2002) 2449–2456.
- [25] N. Samyn, G. De Boeck, M. Wood, C. Lamers, *Forensic Sci. Int.* 128 (2002) 90–97.

UNPUBLISHED PAPER

An optimized headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-flame ionization detection procedure for the estimation of the main legislated volatile organic compounds in water samples

C. Cháfer-Pericás, P. Campíns-Falcó*, R. Herráez-Hernández
Department of Analytical Chemistry, University of Valencia,
Dr. Moliner 50, 46100-Burjassot, Valencia, Spain

Abstract

An optimized procedure for the determination of the concentration of legislated volatile organic compounds (VOCs) in real samples by means headspace (HS)-solid-phase microextraction (SPME) coupled to gas chromatography (GC) with flame ionization detection (FID) has been proposed. The compounds tested were: pentachlorobenzene, 1,2-dichloroethane, trichloromethane, benzene, tetrachloromethane, trichloroethene, toluene, tetrachloroethene, chlorobenzene, ethylbenzene, *m,p*-xylene, *o*-xylene, 1,3-dichlorobenzene, 1,4-dichlorobenzene and 1,2-dichlorobenzene. Two capillary columns with different internal diameter and coating thickness were compared (30 m x 0.32 mm I.D. x 0.5 μ m particle size and 30 m x 0.25 mm I.D. x 0.25 μ m particle size) and experimental parameters related with HS sampling were optimised in order to achieve the best resolution and sensitivity for VOCs screening analysis. Both columns achieved satisfactory selectivity, but the 0.25 mm i. d column provided shorter times and was selected to carry out the analysis of the real waste water samples.

Under the optima conditions the detection limits established were between 0.001-1 μ g/L. These values were adequate for the analysis of these compounds in water samples according to the legislation. The effect of the sample filtration was also studied sistematically. The results obtained from filtered samples were not statistical similar to those obtained from non-filtered samples. Erratic results with high variation coefficient (> 60%) were also obtained for some filtered samples obtained from two fractions collected sequentially.

* Corresponding author - telephone: 34-96-3543002; fax: 34-96-3544436
E-mail address: pilar.campins@uv.es (P. Campíns-Falcó).

Introduction

The most important sources of volatile organic compounds (VOCs) to the atmosphere are natural emissions of vegetation and anthropogenic emissions coming from the extensive use of fuels. These factors make VOCs ubiquitous environmental contaminants [1]. The presence of these compounds in water samples is probably due to fuel spills, leaking underground tanks and the direct release of unburned fuel. Reducing their expansion is an important affair due to their high toxicity. According to the European legislation [2], the compounds selected can be classified in List I (tetrachloromethane, trichloromethane, 1,2-dichloroethane, trichloroethene), List II (benzene, chlorobenzene, ethylbenzene, toluene, xylene) as pollutant substances that were fixed as quality objectives, and Priority List (benzene, 1,2-dichloroethane, pentachlorobenzene, trichloromethane). The maximum levels of VOCs fixed by European legislation in drinking water are 1 µg/L for benzene, 150 µg/L for trihalomethanes, 10 µg/L for trichloroethene + tetrachloroethene, and 3 µg/L for 1,2-dichloroethane [3]. According to the environmental quality legislation, the maximum concentration of VOCs in continental surface water are those summarized in Table 1 [4].

Nowadays, gas chromatography (GC) plays an important role in the identification and quantification of ubiquitous pollutants in the environment [5]. The determination of VOCs in water samples is usually carried out by GC with flame ionisation detection (GC-FID) [6] or by mass spectrometry (MS) [7]. Some analytical methods are based on direct aqueous injection [8], while others require an extraction step of VOCs from water samples. Liquid-liquid extraction has several disadvantages, such as large time and volumes of organic solvents consuming. Other extraction techniques for volatile compounds are static headspace (HS) coupled to solid-phase microextraction (SPME) [9], dynamic-headspace that can be coupled to liquid-phase microextraction [10], spray and trap chromatographic systems [11] and direct SPME [12, 13]. The HS-SPME sampling is more suitable when matrix could affect the determination of analytes [14, 15]. Furthermore, in static HS the equilibrium is reached and the total content of VOCs is not removed from the sample. There are several experimental variables affecting HS-SPME procedures such as type of fiber, stirring rate, temperature, extraction time, and addition of salt [16].

In the present work two different capillary columns were evaluated, and the HS-SPME procedure was optimized in order to achieve the best analytical characteristics for the screening of the main legislated VOCs in water samples. In the present paper, it was also studied systematically the influence of the filtration step in the determination of VOCs in water samples by means HS-SPME and GC. An study in this sense in the literature was not found.

Experimental

Apparatus and chromatographic conditions

The chromatographic system consisted of a gas chromatograph (Focus GC, Thermo Finnigan Focus, Waltham, MA, USA) equipped with a flame ionization detector (FID). The GC separation columns were a 30m × 0.32 mm i.d. × 0.5 μm, TRB-5 column (C1) (equivalent to a 5% diphenyl, 95% dimethylpolysiloxane) (Teknokroma, Barcelona, Spain), and a 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm, TRB-5 column (C2) (Teknokroma, Barcelona, Spain). The carrier gas was nitrogen. Injector and detection port temperatures were, 250 and 320°C, respectively, with split less mode. For the first column assayed, the flow was fixed at 2.2 mL/min; oven temperature 40°C (hold 4.5 min), rate 30°C/min to 80°C (hold 7.5 min), rate 30°C/min to 150°C (hold 7 min). For the second column, the gas flow was 2 mL/min, oven temperature 35°C (hold 4 min), rate 30°C/min to 80°C (hold 7.5 min), rate 30°C/min to 150°C (hold 7 min). The second ramp was used to clean the column.

Reagents and solutions

All the chemicals were of analytical grade. Two standard solutions were required to quantify the analytes selected. MIX 1 contained benzene, toluene, chlorobenzene, ethylbenzene, *m,p*-xylene, *o*-xylene, 1,3-dichlorobenzene, 1,4-dichlorobenzene and 1,2-dichlorobenzene at 2.0 g/L of each analyte, in methanol. MIX 2 contained 1,2-dichloroethane, trichloromethane, benzene, tetrachloromethane, trichloroethene, toluene, tetrachloroethene, chlorobenzene, ethylbenzene, 1,3-dichlorobenzene, 1,4-dichlorobenzene and 1,2-dichlorobenzene at 0.1 g/L of each analyte, in methanol. Other stock standard solutions used to identify some of the analytes in the mixtures were: tetrachloroethene in methanol (100 μg/mL), trichloroethene in methanol (100 μg/mL), 1,2-dichloroethane in methanol (1000 μg/mL) and pentachlorobenzene in acetonitrile (10 μg/mL). All these solutions were obtained from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany).

Stock standard solutions of toluene, benzene and tetrachloromethane were obtained from Probus (Barcelona, Spain) and trichloromethane was obtained from Scharlau (Barcelona, Spain).

Working solutions of the analytes were prepared by dilution of the stock solutions with water just before the analysis. Water was deionized and filtered through 0.45 μm nylon membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain). All solutions were stored in the dark at 20°C.

Headspace-SPME sampling procedure

A 22-mL glass vial with a septum in the cap (Supelco, Bellefonte, PA, USA), which can be perforated by the SPME device was used to carry out the HS sampling. A SPME assembly with replaceable extraction fibres coated with polydimethylsiloxane/divinylbenzene, (PDMS-DVB, StableFlex 65 μm, Supelco) was

used for extraction. Before using a new fibre, it was conditioned for 1 hour in the GC injector port at 250°C, then it could be used for further work.

Some parameters that can influence the HS-SPME sampling were studied with C1 column using MIX 2 at a concentration of 1 µg/mL of each analyte. A volume of a standard solution of VOCs between 10 and 20 mL was placed into the vial. The sample was stirred during analyte volatilization and SPME operations to increase the release of the analytes from the water matrix to the HS. Volatilization and sampling steps were assayed at different temperatures between 20 and 100 °C. A magnetic stirrer hot plate was used (Raypa, Barcelona, Spain). After a defined period of sampling time between 5 and 60 min, the fibre was removed from the vial and placed in the injection port of the GC for analyte desorption. Desorption temperature was tested between 150 and 250 °C, and desorption time was evaluated between 1 and 3 min.

Analysis of real waters

Residual water samples were collected from 22 different points of the Comunidad Valenciana. The samples were kept in 1L bottles that were completely filled to avoid VOCs migration from the aqueous solution to the headspace. Two 10-mL fractions of each non filtered sample were placed in 22 mL glass vials immediately after arriving at the laboratory. HS sampling was carried out in these vials in duplicate. The rest of the sample was filtered through 0.45 µm nylon membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain) collecting sequentially two fractions of 100 mL and 10-mL of each one were placed in 22 mL glass vials to carry out the same analysis in duplicate. All these experiments were affected at ambient temperature. These analysis were carried out with the 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm column.

Results and discussion

Optimization of the SPME-GC procedure

The analytes selected in this study are those presented in Table 1. The HS-SPME was assayed as an alternative to the direct injection in the GC system. Several advantages were achieved, such as, better selectivity and sensitivity, as depicted Figure 1. In the direct injection method, the most volatile analytes overlapped with the solvent peak; moreover, the resolution for the most retained analytes was poor.

In the optimization of HS sampling, the adsorption time was the first parameter studied. Stirring was maintained constant. It was not observed any significant influence of the adsorption time on the intensity of the peaks (Figure 2a). Therefore, 5 min was the time selected to volatilize the analytes at ambient temperature, and the sampling time was 10 min. The volatilization was not improved by increasing the temperature (Figure 2b). Consequently, ambient temperature was selected for further work. The effect of sample volume was studied between 10 and 20 mL, and no significant differences in the signals were observed (Figure 2c). Therefore, 10 mL was selected as the sample volume for further work.

As regards the desorption, two parameters were studied, the desorption time and the port temperature. The optima values were 1 min and 250 °C, respectively (data not shown).

Under the working conditions used in this study the limits of detection (LODs), established as the concentration of analyte necessary to produce a signal-to-noise ratio of 3, obtained with C2 and C1 were similar. With the 0.25 µm coating thickness column (C2), the limits of detection were 1 µg/L for trichloromethane and 1,2-dichloroethane; 0.1 µg/L for chlorobenzene and tetrachloroethene, and the rest of analytes had LOD lower than 0.025 µg/mL (Table 2). These values are lower than those reported by previous assays involving HS-SPME-GC [7]. The sensitivity was adequate to the analysis of drinking water according to the European legislation.

The working ranges and the calibration curves are also presented in Table 2. As observed the linearity was satisfactory. The reproducibility was evaluated for a mixture of 10 µg/L of each VOC under the optimum conditions. The intra-day coefficients of variation were between 1 and 18 % (Table 2). Both columns provided similar reproducibilities.

The accuracy of the method was evaluated by analysing tap water spiked with 10 µg/L of each VOC under the optimum conditions. The concentrations were calculated from the calibration equations obtained with standard solutions of VOCs. The results obtained are listed in Table 3, as observed the recoveries were close to 100 %. Thus, the method provided values close to the real concentrations with both columns.

Figures 3 and 4 show the chromatograms obtained for standard samples under the optimum conditions with both columns tested, respectively.

On the other hand, the C2 column was selected to analyse the real water samples because the time required for chromatography was shorter. Figure 5 shows the retention times obtained for the analytes and their respective octanol-water partition coefficients. The linear relationship obtained was described by the equation: $\log(\text{retention time, min}) = 0.6512(\log K_{ow}) - 1.2256$, $R^2 = 0.90$.

Influence of the filtration of the sample

Two fractions of approximately 100 mL of each sample were filtered sequentially and conserved separately, and 10 mL from each fraction were used to carry out the analysis in duplicate. The most important variable of the filtration procedure was the filtration time which depended on the characteristics of each particular sample; the volume of fraction collected varied from one sample to other. Samples 1-14 required between 2 and 4 hours to collect the two filtrated fractions. However, for samples 15-22 times between 5 and 30 min were necessary. Figure 6 presents the different filtration times required for collecting both fractions of each sample considering $t=0$ when the filtration was initialised.

The results obtained in the analysis of the 22 waste water samples filtered by the described procedure were compared with those obtained from non-filtered fractions. The concentrations found are summarized in Table 4. As observed in some samples similar concentrations were found in the filtered and non-filtered fractions. However, in most of them the concentrations found in filtered fractions were erratic, with variation coefficients (VC) > 60%, probably due to the long filtration time needed. In few filtered samples the concentrations found were quite similar (samples 2,13,18), and in most of them lower (samples 4,6,9,10,12,14,16,17,19,22) than the concentrations found in the non-filtered fractions. This can be due by the fact that the VOCs are highly volatile compounds, and they tend to escape to the atmosphere during filtration. As an example in Figure 7 are shown the different chromatograms obtained for a real water sample (sample 16) for most analytes. The non-filtered fractions showed more concentrations than the filtered fractions, and for tetrachloroethene the results obtained for the filtered fractions were erratic.

The VOCs concentration values obtained from the screening analysis of the real 22 non-filtered samples are summarized in Table 4 with expanded uncertainties using a coverage factor of 2. As can be seen suitable results were obtained for all samples. According to the environmental quality legislation, sample 10 had a high concentration of tetrachloromethane, and sample 21 presented a slightly high concentration of trichloroethene. 1,2-Dichloroethane only was found in sample 3, tetrachloromethane was found in nine samples, trichloroethene in five samples, tetrachloroethene in ten samples, benzene in eighteen samples, pentachlorobenzene in six samples, chlorobenzene in three samples, ethylbenzene in five samples, 1,3-dichlorobenzene in twelve samples, 1,4-dichlorobenzene in nine samples, 1,2-dichlorobenzene in eight samples, m,p-xylene in twenty-one samples, toluene and o-xylene were found in all the samples analyzed.

Conclusions

The advantage of HS-SPME coupled to GC in the determination of VOCs in water samples respect to the direct injection are improved the sensitivity and selectivity. Sample filtration has an important influence on the results obtained for VOCs estimation, giving erratic results in most of the cases. In some samples the analytes were lost during the filtration step, and in a few cases a contamination effect was observed.

This methodology is adequate for the routine analysis of water samples. The main advantage of this procedure is the short time of analysis; under the proposed conditions four samples per hour could be analyzed. The sensitivity achieved was also satisfactory for the analysis of drinking water. The limits of detection achieved were lower than those presented in the literature [16].

In this work are studied all the main VOCs that are legislated in drinking water however, in previous works this research was limited to benzene, toluene, ethylbenzene and xylene (BTEX) [9].


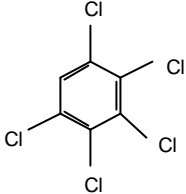
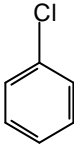
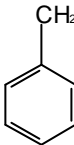
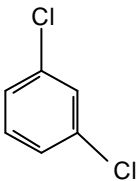
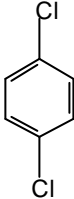
Acknowledgment

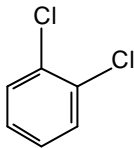
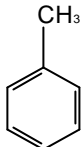
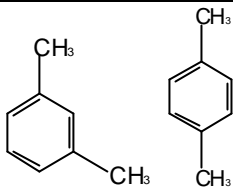
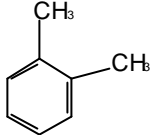
The authors are grateful to the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project BQU2003-06138) for financial support received. C. Cháfer-Pericás expresses her gratitude to the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte of Spain for pre-doctoral grant.

References

- [1] McCulloh, A., *Chemosphere*, 50 (2003) 1291.
- [2] R.D. 2000/60/CE modified by the Decision 2455/2001/CE of the European Parliament and the Council of 20 November 2001, DOCE nº L 331 (2001).
- [3] Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption, Official Journal L 330 (1998) 0032.
- [4] Directive 76/464/CE of the European Parliament and the Council of 18 May 1976, DO nº L 129 (1976). R.D. 995/2000.
- [5] Santos, F. J.; Galceran, M. T., *Trends Anal. Chem.*, 21 (2002) 672.
- [6] Xiong, G.; Koziel, J. A.; Pawliszyn, J., *J. Chromatogr. A*, 1025 (2004) 57.
- [7] Borden, R. C.; Black, D. C.; McBlief, K. V., *Environmental Pollution*, 118 (2002) 141.
- [8] Kubinec, R.; Adamuscin, J.; Jurdáková, H.; Foltin, M.; Ostrovský, I.; Kraus, A.; Soják, L., *J. Chromatogr. A*, 1084 (2005) 90.
- [9] Flórez Menéndez, J. C.; Fernández Sánchez, M. L.; Sánchez Uría, J. E.; Fernández Martínez, E.; Sanz-Medel, A., *Anal. Chim. Acta*, 415 (2000) 9.
- [10] Jiang, X.; Basheer, C.; Zhang, J.; Lee, H., *J. Chromatogr. A*, 1087 (2005) 289.
- [11] Yang, K-L.; Lai, C-H.; Wang, J-L., *J. Chromatogr. A*, 1027 (2004) 41.
- [12] Khaled, A.; Pawliszyn, J., *J. Chromatogr. A*, 892 (2000) 455.
- [13] Wu, J.; Pawliszyn, J., *J. Chromatogr. A*, 909 (2001) 37.
- [14] Ezquerro, O.; Ortiz, G.; Pons, B.; Tena, M. T., *J. Chromatogr. A*, 1035 (2004) 17.
- [15] Ezquerro, O.; Pons, B.; Tena, M.T., *J. Chromatogr. A*, 1020 (2003) 189.
- [16] Arambari, I.; Lasa, M.; García, R.; Millán, E., *J. Chromatogr. A*, 1033 (2004) 193. .

Table 1. Volatile organic compounds investigated

Volatile organic compounds			
Compound (*)	Log K _{ow}	Environmental Quality Norm (**)	Structure
Trichloromethane ¹	1.97	12 µg/L	CHCl ₃
1,2-Dichloroethane ¹	1.48	10 µg/L	ClCH ₂ CH ₂ Cl
Tetrachloromethane ¹	2.64	12 µg/L	CCl ₄
Trichloroethene ¹	2.42	10 µg/L	Cl ₂ C=CHCl
Tetrachloroethene	2.6		Cl ₂ C=CCl ₂
Benzene ²	2.13	30 µg/L	
Pentachlorobenzene	1.49		
Chlorobenzene ²	2.18-2.84	20 µg/L	
Ethylbenzene ²	3.2	30 µg/L	
1,3-Dichlorobenzene ²	3.53	20 µg/L (sum of isomers)	
1,4-Dichlorobenzene ²	3.37		

1,2 Dichlorobenzene ²	3.38		
Toluene ²	2.69	50 µg/L	
<i>m, p</i> -Xylene ²	3.20-3.15	30 µg/L (sum of isomers)	
<i>o</i> -Xylene ²	3.12		

(*) Directive 2000/60/CE of European Parliament and Council of 23 October 2000

¹ Substances in List I

² Priority substances

(**) Directive 86/280/CEE. R.D. 995/2000 (Spain)

Table 2. Analytical data obtained for VOCs with the two columns tested.

Analyte	C 1 Concentration interval (µg/L) 1-1000			C 2 Concentration interval (µg/L) 0.01-10		
	Calibration equation*	Intra-day reproducibility (10 µg/L) (n=3) C. V (%)	LOD (µg/L)	Calibration equation*	Intra-day reproducibility (10 µg/L) (n=3) C. V (%)	LOD (µg/L)
Benzene	$Y = 2290.3 x + 4,5 \cdot 10^3$ $R^2 = 0.97$ (n=8)	16.09	0.025	$Y = 149230 x + 35499$ $R^2 = 0.96$ (n=4)	12.3	0.01
Toluene	$Y = 5708.9 x + 9,1 \cdot 10^3$ $R^2 = 0.97$ (n=8)	7.89	0.01	$Y = 38111 x + 6113$ $R^2 = 0.998$ (n=8)	12.6	0.01
Chlorobenzene	$Y = 9834 x + 10^6$ $R^2 = 0.99$ (n=8)	11.98	0.025	$Y = 52559 x - 9507$ $R^2 = 0.998$ (n=4)	11.5	0.1
Ethylbenzene	$Y = 10030 x + 5 \cdot 10^6$ $R^2 = 0.999$ (n=6)	18 (n= 2)	0.025	$Y = 65586 x - 14554$ $R^2 = 0.99$ (n=7)	13.6	0.01
m,p-Xylene	$Y = 12005 x + 10^7$ $R^2 = 0.99$ (n=6)	7.29	0.025	$Y = 131839 x + 224873$ $R^2 = 0.93$ (n=7)	14.5	0.01
o-Xylene	$Y = 7951 x + 5 \cdot 10^6$ $R^2 = 0.99$ (n=4)	3.56	0.025	$Y = 86851 x + 888$ $R^2 = 0.997$ (n=7)	9.8	0.01
1,3-Dichlorobenzene	$Y = 16265 x + 12 \cdot 10^3$ $R^2 = 0.98$ (n=8)	15.5	0.025	$Y = 22281 x + 3820$ $R^2 = 0.99$ (n=7)	2.08 (n= 2)	0.01

1,4-Dichlorobenzene	$Y = 16213.6 x + 10^6$ $R^2 = 0.97$ (n=9)	13.07	0.025	$Y = 43260 x + 3305$ $R^2 = 0.99$ (n=7)	14.9	0.01
1,2-Dichlorobenzene	$Y = 21219 x + 10^6$ $R^2 = 0.98$ (n=10)	6.42	0.025	$Y = 43802 x + 21602$ $R^2 = 0.997$ (n=7)	7.2	0.01
Pentachlorobenzene	$Y = 241219 x + 2.10^7$ $R^2 = 0.999$ (n=5)	7.13	0.001	$Y = 324687 x + 4.10^6$ $R^2 = 0.997$ (n=7)	1.31	0.001
1,2-Dichloroethane	$Y = 10976 x - 232789$ $R^2 = 0.99$ (n=4)		1	$Y = 658.88 x - 157538$ $R^2 = 0.998$ (n=4)	6.42	1
Trichloromethane	$Y = 2618.5 x + 28973$ $R^2 = 1$ (n=3)		0.05	$Y = 11644 x + 5628$ $R^2 = 0.9999$ (n=3)	3.93	1
Tetrachloromethane	$Y = 4028.8 x + 24688$ $R^2 = 1$ (n=3)		0.025	$Y = 4128 x + 65875$ $R^2 = 0.997$ (n=5)	18	0.025
Trichloroethene	$Y = 747.47 x + 39441$ $R^2 = 0.99$ (n=3)		1	$Y = 4831.8 x + 15047$ $R^2 = 0.9998$ (n=4)	15.2 (n= 2)	0.05
Tetrachloroethene	$Y = 843.05 x + 9871.9$ $R^2 = 1$ (n=3)		1	$Y = 7444.6 x + 52149$ $R^2 = 0.99$ (n=3)	12.12	0.1

(*) – Slopes expressed as L/ μ g.

Table 3. Accuracy for the determination of VOCs in tap water with two columns tested.

Analyte	C 1 (10 µg/L of each VOC)				C 2 (10 µg/L of each VOC)			
	Reproducibility (n= 3) C. V. (%)	Recovery (%)	Determined concentration (µg/L) (n= 3)	Er (%)	Reproducibility (n= 3) C. V. (%)	Recovery (%)	Determined concentration (µg/L) (n= 3)	Er (%)
Benzene	13	79	7.9 ± 0.4 (n= 2)	-21	12	99	9.88 ± 1.16	-1
Toluene	10	80	8.0 ± 0.3 (n= 2)	-19	7	103	10.3 ± 0.7	+3
Chlorobenzene	12	84	8 ± 1	-16	3	103	10.3 ± 0.3	+3
Ethylbenzene	25	89	9 ± 2	-11	15	103	10.3 ± 1.6	+3
<i>m,p</i> -Xylene	18	97	10 ± 2	-3	14	105	10.5 ± 1.5	+5
<i>o</i> -Xylene	14	96	9.6 ± 1.4	-4	11	110	11.0 ± 1.2	+10
1,3- Dichlorobenzene	8	84	8.4 ± 0.7	-16	9	117	11.7 ± 0.5 (n= 2)	+17
1,4- Dichlorobenzene	7	107	11 ± 2	+7	9	109	10.95 ± 1.02	+9
1,2- Dichlorobenzene	17	114	10.7 ± 0.8	+14	22	120	12 ± 3 (n= 2)	+18

Table 4- Summary of the concentrations of VOCs found in the analysis either non-filtered and filtered real water samples (n= 2). The concentrations are expressed in µg/L.

ANALYTES		SAMPLES							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Pentachlorobenzene	Non filtered		0.034 ± 0.015		0.121 ± 0.006			0.5 ± 0.1	0.52 ± 0.06
	Filtered		Erratic result		0.08 ± 0.03			0.60 ± 0.05	0.57 ± 0.01
1,2-Dichloroethane	Non filtered			~1 (LOD)					
	Filtered			N.D.					
Trichloromethane	Non filtered								
	Filtered								
Benzene	Non filtered	0.4 ± 0.2			0.29 ± 0.16	0.70 ± 0.15	1.4 ± 0.1	0.20 ± 0.06	0.29 ± 0.08
	Filtered	Erratic result			Erratic result	Erratic result	Erratic result	Erratic result	Erratic result
Tetrachloromethane	Non filtered		1.2 ± 0.6				0.97 ± 1.13	~ 0.025 (LOD)	N.D.
	Filtered		N.D.				0.6 ± 0.3	Erratic result	Erratic result
Trichloroethene	Non filtered	10 ± 3							
	Filtered	N.D.							
Toluene	Non filtered	1.5 ± 0.3	1.143 ± 0.102	~ 0.01 (LOD)	7.7 ± 0.7	0.06 ± 0.02	~ 0.01 (LOD)	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1
	Filtered	N.D.	0.8 ± 0.2	Erratic result	Erratic result	Erratic result	Erratic result	0.63 ± 0.04	Erratic result
Tetrachloroethene	Non filtered		2.7 ± 0.6	~ 0.1 (LOD)		~ 0.1 (LOD)	0.4 ± 0.1		
	Filtered		0.14 ± 0.13	Erratic result		0.9 ± 0.1	N.D.		
Chlorobenzene	Non filtered	~ 0.1 (LOD)			~ 0.1 (LOD)				
	Filtered	N.D.			N.D.				
Ethylbenzene	Non filtered	0.03 ± 0.02		~ 0.01 (LOD)	0.12 ± 0.02				
	Filtered	N.D.		Erratic result	N.D.				
<i>m,p</i> -Xylene	Non filtered	0.20 ± 0.03	0.17 ± 0.06	~ 0.01 (LOD)	0.34 ± 0.09		~ 0.01 (LOD)	0.12 ± 0.06	0.06 ± 0.02
	Filtered	N.D.	Erratic result	Erratic result	Erratic result		Erratic result	Erratic result	Erratic result
<i>o</i> -Xylene	Non filtered	0.34 ± 0.07	0.20 ± 0.04	~ 0.01 (LOD)	0.70 ± 0.05	~ 0.01 (LOD)	0.11 ± 0.12	0.30 ± 0.05	0.06 ± 0.02
	Filtered	Erratic result	Erratic result	Erratic result	0.230 ± 0.102	Erratic result	0.065 ± 0.012	0.29 ± 0.04	Erratic result
1,3-Dichlorobenzene	Non filtered		0.29 ± 0.07	~ 0.01 (LOD)	1.89 ± 0.11	0.35 ± 0.08	0.34 ± 0.12	0.52 ± 0.19	0.63 ± 0.08
	Filtered		0.24 ± 0.03	N.D.	0.034 ± 0.005	0.45 ± 0.01	0.25 ± 0.03	Erratic result	0.54 ± 0.04
1,4-Dichlorobenzene	Non filtered		0.3 ± 0.1		2.02 ± 0.16		0.20 ± 0.08		
	Filtered		0.15 ± 0.02		N.D.		N.D.		
1,2-Dichlorobenzene	Non filtered		0.09 ± 0.03				0.11 ± 0.03		
	Filtered		Erratic result				N.D.		

ANALYTES	SAMPLES								
		9	10	11	12	13	14	15	16
Pentachlorobenzene	Non filtered				~ 0.001 (LOD)				
	Filtered				Erratic result				
1,2-Dichloroethane	Non filtered								
	Filtered								
Trichloromethane	Non filtered								
	Filtered								
Benzene	Non filtered	~ 0.01 (LOD)		0.4 ± 0.1		1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.2	0.307 ± 0.107	0.60 ± 0.15
	Filtered	N.D.		Erratic result		Erratic result	Erratic result	Erratic result	0.33 ± 0.04
Tetrachloromethane	Non filtered	~ 0.025 (LOD)	17 ± 1		3 ± 1				
	Filtered	N.D.	Erratic result		1.9 ± 0.6				
Trichloroethene	Non filtered		7 ± 1	0.5 ± 0.1					0.315 ± 0.106
	Filtered		N.D.	N.D.					0.20 ± 0.05
Toluene	Non filtered	1.9 ± 0.4	2.9 ± 0.1	0.7 ± 0.2	2.1 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.14 ± 0.05	0.07 ± 0.03	0.17 ± 0.04
	Filtered	Erratic result	1.36 ± 1.05	Erratic result	Erratic result	Erratic result	0.06 ± 0.05	Erratic result	0.08 ± 0.05
Tetrachloroethene	Non filtered	1.26 ± 0.06	8 ± 1	6 ± 1	1.9 ± 0.6				0.19 ± 0.04
	Filtered	N.D.	0.081 ± 0.004	5.2 ± 0.4	1.2 ± 0.2				Erratic result
Chlorobenzene	Non filtered						~ 0.1 (LOD)		
	Filtered						N.D.		
Ethylbenzene	Non filtered		0.17 ± 0.01				~ 0.01 (LOD)		
	Filtered		N.D.				Erratic result		
<i>m,p</i> -Xylene	Non filtered	0.16 ± 0.06	0.20 ± 0.03	0.14 ± 0.03	0.045 ± 0.018	0.04 ± 0.02	~ 0.01 (LOD)	~ 0.01 (LOD)	~ 0.01 (LOD)
	Filtered	0.04 ± 0.02	0.023 ± 0.007	0.131 ± 0.003	Erratic result	0.042 ± 0.019	Erratic result	Erratic result	N.D.
<i>o</i> -Xylene	Non filtered	0.20 ± 0.04	0.26 ± 0.03	0.05 ± 0.01	0.13 ± 0.03	~ 0.01 (LOD)	~ 0.01 (LOD)	~ 0.01 (LOD)	~ 0.01 (LOD)
	Filtered	0.251 ± 0.108	Erratic result	0.09 ± 0.02	0.22 ± 0.08	Erratic result	Erratic result	Erratic result	N.D.
1,3-Dichlorobenzene	Non filtered	0.29 ± 0.06	0.10 ± 0.03	0.040 ± 0.013	0.6 ± 0.1				
	Filtered	0.10 ± 0.02	0.09 ± 0.06	0.11 ± 0.03	Erratic result				
1,4-Dichlorobenzene	Non filtered	0.26 ± 0.04	~ 0.01 (LOD)	~ 0.01 (LOD)	0.5 ± 0.1				
	Filtered	N.D.	N.D.	Erratic result	0.43 ± 0.14				
1,2-Dichlorobenzene	Non filtered		~ 0.01 (LOD)	~ 0.01 (LOD)	0.23 ± 0.05	0.2 ± 0.1			0.09 ± 0.02
	Filtered		N.D.	Erratic result	Erratic result	Erratic result			0.035 ± 0.007

ANALYTES		17	18	19	20	21	22
Pentachlorobenzene	Non filtered					~ 0.001 (LOD)	
	Filtered					Erratic result	
1,2-Dichloroethane	Non filtered						
	Filtered						
Trichloromethane	Non filtered						
	Filtered						
Benzene	Non filtered	0.8 ± 0.2	1.5 ± 0.3	2.0 ± 0.4	1.6 ± 0.4	2.0 ± 0.5	2.01 ± 0.04
	Filtered	Erratic result	Erratic result	0.8 ± 0.2	Erratic result	0.93 ± 0.04	Erratic result
Tetrachloromethane	Non filtered	~ 0.025 (LOD)	0.07 ± 0.01			0.75 ± 0.05	
	Filtered	Erratic result	N.D.			Erratic result	
Trichloroethene	Non filtered					10.6 ± 0.6	
	Filtered					Erratic result	
Toluene	Non filtered	0.15 ± 0.05	0.15 ± 0.03	0.29 ± 0.17	0.20 ± 0.06	10 ± 1	0.42 ± 0.16
	Filtered	0.10 ± 0.05	Erratic result	0.26 ± 0.06	0.4 ± 0.2	4.1 ± 0.8	Erratic result
Tetrachloroethene	Non filtered					2.1 ± 0.2	
	Filtered					0.8 ± 0.1	
Chlorobenzene	Non filtered						
	Filtered						
Ethylbenzene	Non filtered						
	Filtered						
<i>m,p</i> -Xylene	Non filtered	~ 0.01 (LOD)	~ 0.01 (LOD)	~ 0.01 (LOD)	~ 0.01 (LOD)	0.26 ± 0.07	0.05 ± 0.01
	Filtered	Erratic result	Erratic result	Erratic result	Erratic result	0.12 ± 0.04	Erratic result
<i>o</i> -Xylene	Non filtered	~ 0.01 (LOD)	~ 0.01 (LOD)	~ 0.01 (LOD)	~ 0.01 (LOD)	2.6 ± 0.5	0.10 ± 0.03
	Filtered	Erratic result	Erratic result	Erratic result	Erratic result	2.53 ± 1.24	Erratic result
1,3-Dichlorobenzene	Non filtered					0.22 ± 0.07	
	Filtered					N.D.	
1,4-Dichlorobenzene	Non filtered			1.9 ± 0.7		1.6 ± 0.3	
	Filtered			1.3 ± 0.3		Erratic result	
1,2-Dichlorobenzene	Non filtered						0.06 ± 0.02
	Filtered						N.D.

(*)Erratic result: corresponding to C.V. > 60%

± Expanded uncertainty (K= 2) estimated with EURACHEM/CITAC Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, second edition QUAM: 2000. P1.

N.D. Non detected results.

Figure captions

- Figure 1** Chromatograms obtained in C1 for MIX 2: (a) direct injection (2 μL) and (b) HS-SPME (10 min adsorption time; 2 min desorption time). Concentration of each VOC, 1 $\mu\text{g/mL}$. For other details, see text.
- Figure 2** Optimization of the HS parameters: (a) time of adsorption, (b) temperature of extraction, and (c) sample volume.
- Figure 3** Chromatograms obtained for the different VOCs in C1: (a) MIX 1 at 1 $\mu\text{g/mL}$ of each compound, (b) 0.01 $\mu\text{g/mL}$ of pentachlorobenzene and (c) MIX 2 at 0.5 $\mu\text{g/mL}$ of each compound. For other details, see text.
- Figure 4** Chromatograms obtained for the different VOCs in C2 (a) MIX 2 at 1 $\mu\text{g/mL}$ of each compound, (b) 0.001 $\mu\text{g/mL}$ of pentachlorobenzene and (c) MIX 1 at 1 $\mu\text{g/mL}$ of each compound. For other experimental details, see text.
- Figure 5** Representation of $\log K_{ow}$ vs \log retention time (min) obtained with C2 for each analyte: (1) 1,2-dichloroethane, (2) pentachlorobenzene, (3) trichloromethane, (4) benzene, (5) tetrachloromethane, (6) trichloroethene, (7) toluene, (8) tetrachloroethene, (9) chlorobenzene, (10) ethylbenzene, (11) *m,p*-xylene, (12) *o*-xylene, (13) 1,3-dichlorobenzene, (14) 1,4-dichlorobenzene and (15) 1,2-dichlorobenzene. For other experimental details, see text.
- Figure 6** Filtration time required for obtaining the two collecting 100 mL-fractions of each water sample. For other experimental details, see text.
- Figure 7** Chromatograms obtained in C2 for a real water sample : (a) non-filtered, and (b) filtered fractions. For other experimental details, see text.

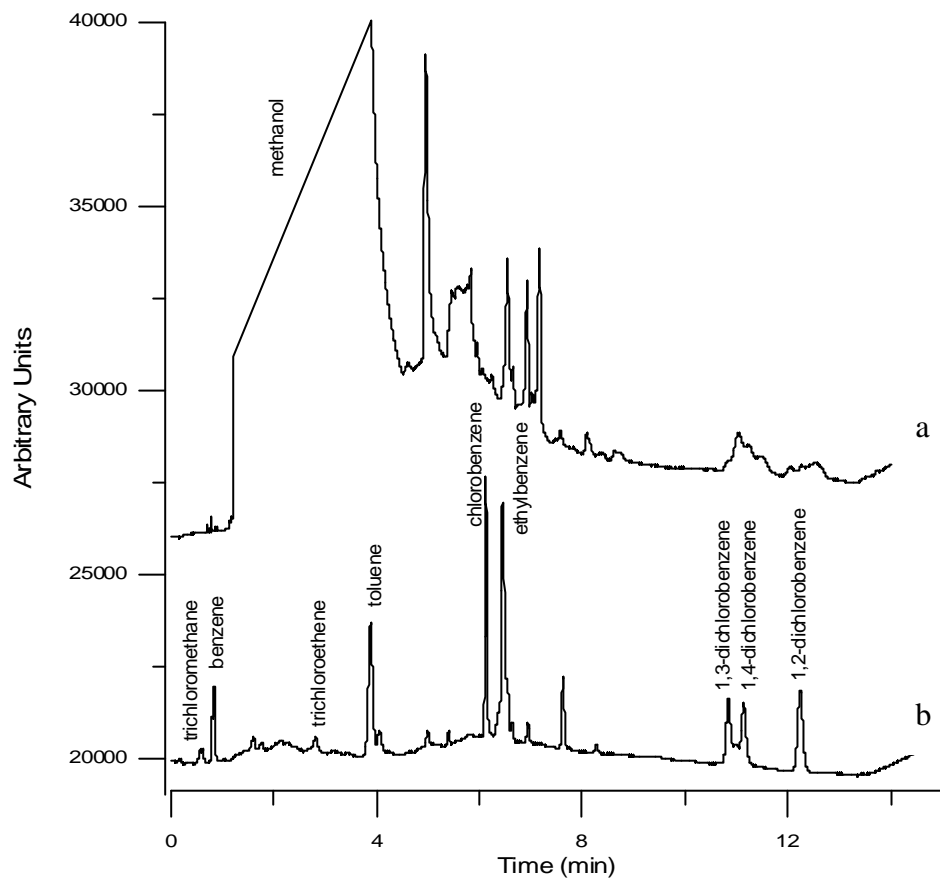


Figure 1

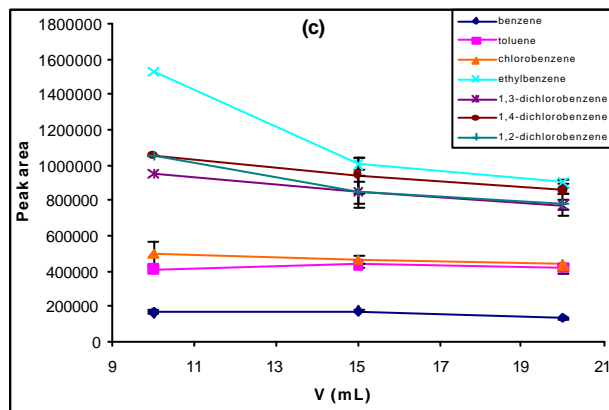
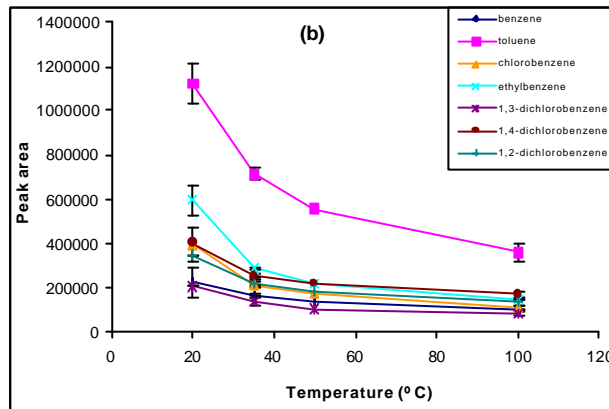
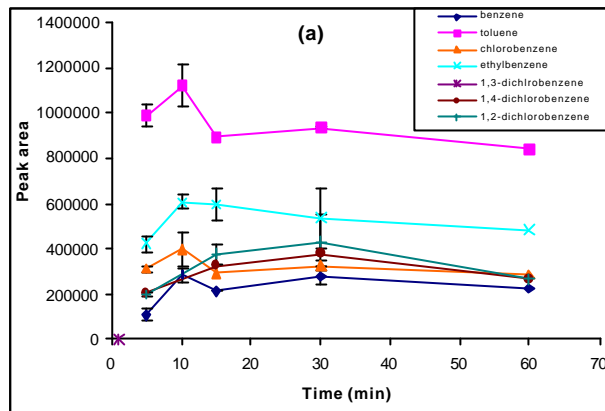


Figure 2

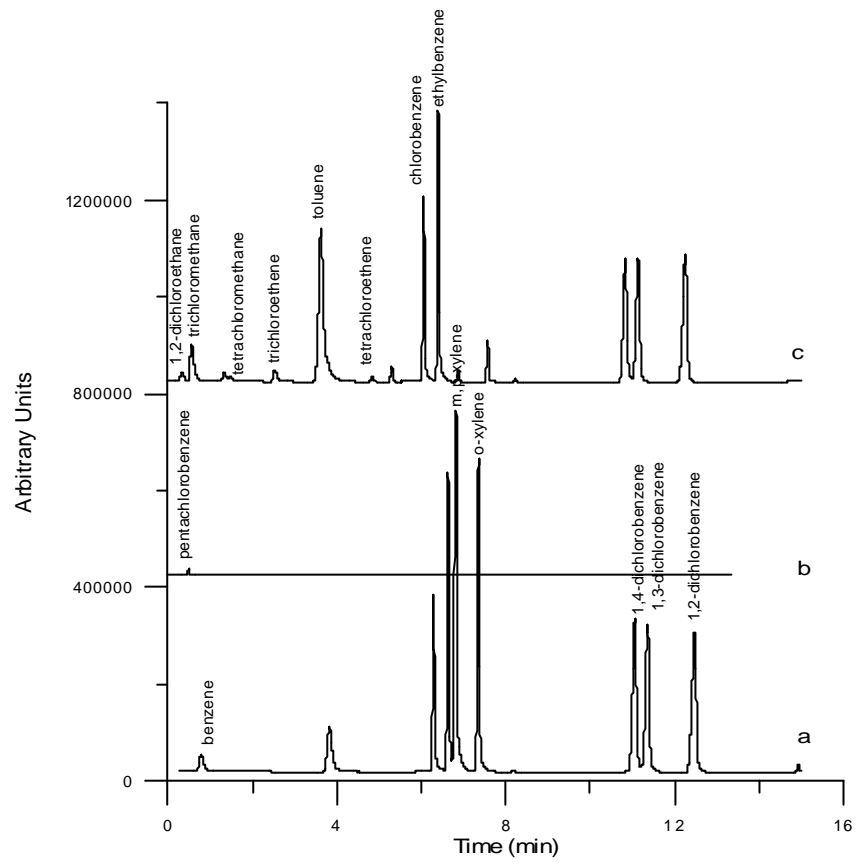


Figure 3

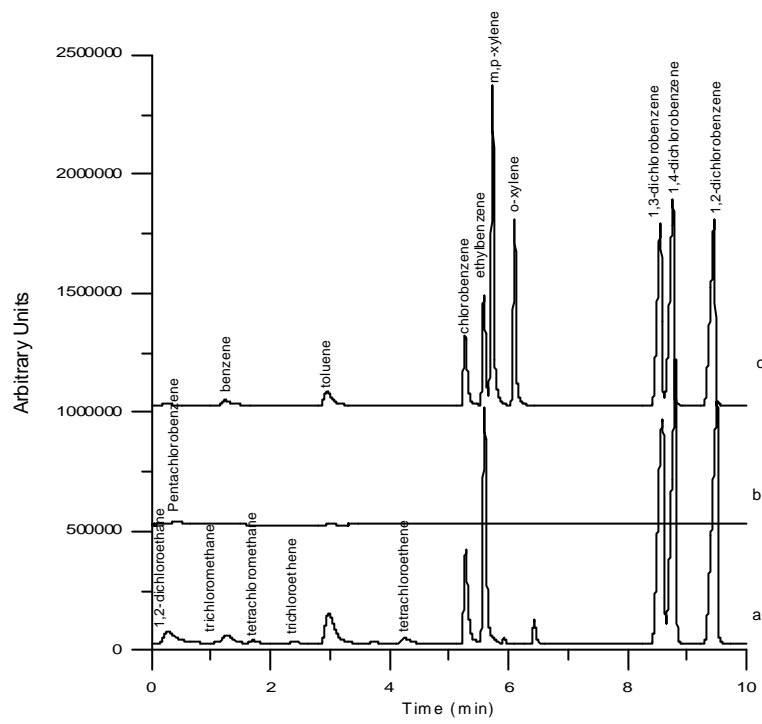


Figure 4

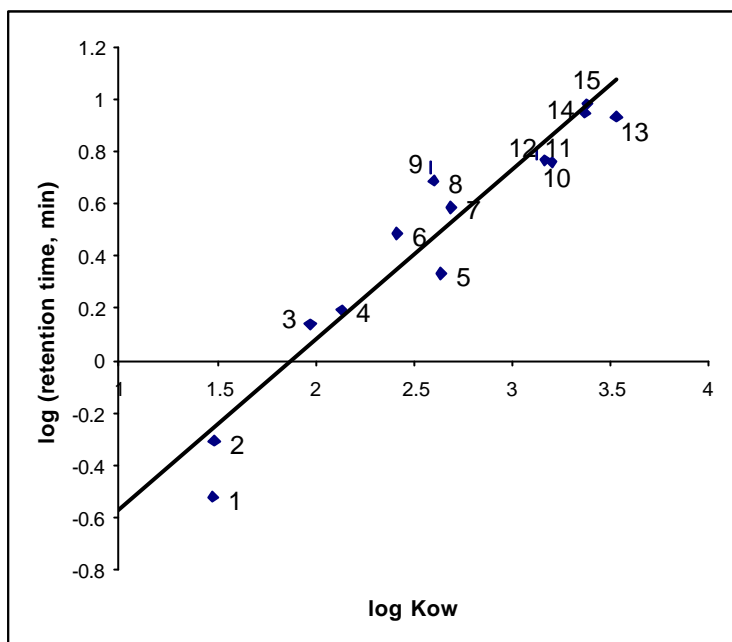


Figure 5

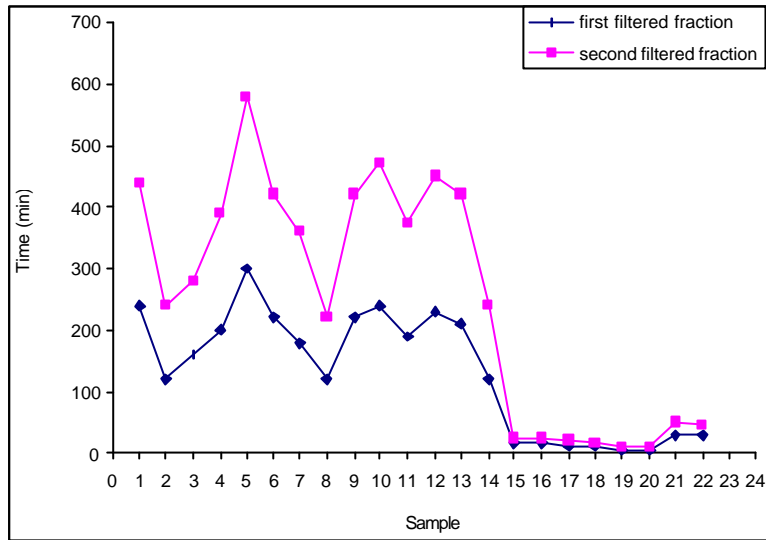


Figure 6

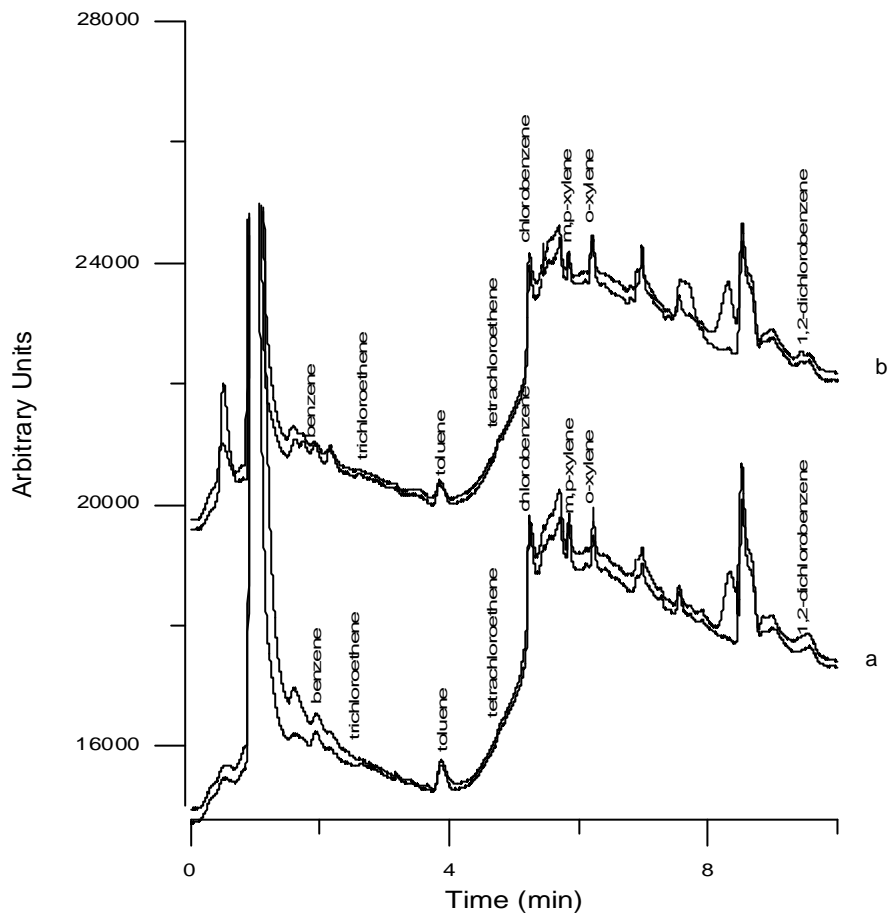


Figure 7



On-fibre solid-phase microextraction coupled to conventional liquid chromatography versus in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography for the screening analysis of triazines in water samples

C. Cháfer-Pericás, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó*

Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

Received 23 March 2006; received in revised form 17 May 2006; accepted 19 May 2006

Abstract

This paper compares the advantages and disadvantages of two different configurations for the extraction of triazines from water samples: (1) on-fibre solid-phase microextraction (SPME) coupled to conventional liquid chromatography (LC); and (2) in-tube SPME coupled to capillary LC. In-tube SPME has been effected either with a packed column or with an open capillary column. A critical evaluation of the main parameters affecting the performance of each method has been carried out in order to select the most suitable approach according to the requirements of the analysis. In the on-fibre SPME configuration the fibre coating was polydimethylsiloxane (PDMS)–divinylbenzene (DVB). The limits of detection (LODs) obtained with this approach under the optimized extraction and desorption conditions were between 25 and 125 $\mu\text{g/L}$. The in-tube SPME approach with a C_{18} packed column (35 mm \times 0.5 mm I.D., 5 μm particle size) connected to a switching micro-valve provided the best sensitivity; under such configuration the LODs were between 0.025 and 0.5 $\mu\text{g/L}$. The in-tube SPME approach with an open capillary column coated with PDMS (30 cm \times 0.25 mm I.D., 0.25 μm of thickness coating) connected to the injection valve provided LODs between 0.1 and 0.5 $\mu\text{g/L}$. In all configurations UV detection at 230 nm was used. Atrazine, simazine, propazine, ametryn, prometryn and terbutryn were selected as model compounds.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Triazines; On-fibre; In-tube; SPME; Conventional HPLC; Capillary HPLC

1. Introduction

Triazine herbicides and some of their transformation products are considered one of the most important classes of chemical pollutants owing to their widespread use and toxicity. These compounds are applied in agriculture as selective pre and post-emergence weed control for corn, wheat, barley, sorghum and sugar cane, but they are also widely employed for non-agricultural uses (railways and roadside verges). Consequently, these compounds are intensively monitored by water authorities (see Table 1).

Triazine herbicides are relatively soluble and stable in water. Atrazine is a very popular herbicide, and in the last two decades

it has become the most frequently detected pesticide in surface and groundwater [1].

The determination of triazines in water samples has been described using a variety of techniques to preconcentrate and purify the analytes such as liquid–liquid extraction (LLE), solid-phase extraction (SPE) [2], on-line SPE [3] and solid-phase microextraction (SPME) [4,5]. LC [6,7] and gas chromatography (GC) [8,9] have been typically employed to separate them. In Table 2 are summarized the procedures for extraction of triazines from water samples that can be found in the bibliography, as well as some of their analytical characteristics (LODs, sample volume). As observed, the sample volume markedly depends on the method used for extraction, with off-line SPE being the approach that requires the largest sample volumes. SPME-based procedures usually require volumes 100 times lower than those involved in SPE-based methods in order to achieve adequate LODs. Other extraction procedures are immunoextraction [10]

* Corresponding author. Tel.: +34 96 3543002; fax: +34 96 3544436.
E-mail address: pilar.campins@uv.es (P. Campíns-Falcó).

Table 1
Maximum concentrations allowed for triazines as function of the type of water given by European and American legislations

Type of sample	European Legislation Directive 2000/60	US Environmental Protection Agency (EPA) Legislation
Drinking water	98/83/EEC Individual triazine (0.1 µg/L) Total triazines (0.5 µg/L)	1985/EPA Atrazine (3 µg/L)
Surface water and groundwater (Environmental Quality Norm)	86/280/EEC Simazine (1 µg/L) ^a Atrazine (1 µg/L) ^a	
Waste water	91/271/EEC 98/15/EEC No specified value	1994/419/EPA No specified value

^a R.D. 995/2000 (Spain).

and superheated water extraction (SWE) [11], which also provide satisfactory LODs for the analysis of waste water samples.

SPME has been extensively used for the determination of triazines in combination with GC. Successful results have been reported for the analysis of a variety of compounds such as atrazine, simazine, propazine, terbuthylazine, simetryn, desethylatrazine, prometon, trietazine, terbuthylazine, prometryn, terbuthryn and ametryn, using electron-capture detection [12], thermionic specific detection [12] and mass-spectrometry (MS) [13,14]. A few methods have been reported for triazines using SPME and LC. In such works, a range of pesticides in environmental water was analysed with conventional LC and UV detection [15], or with capillary LC coupled to MS [16]. To our knowledge, no methods have been reported for the analysis of triazines in water using capillary LC and UV detection.

In the present work we have evaluated two approaches for the determination of the triazines, which are summarized in Table 3: on-fibre SPME coupled to conventional LC, and in-tube SPME coupled to capillary LC. The last approach permits the automation of the SPME procedure. Advantages and disadvantages of the two alternatives for the analysis of triazines in water are outlined. Besides classical analytical properties, cost and number of samples per hour has also been established.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

All the reagents were of analytical grade. Simazine, atrazine, propazine, ametryn, prometryn and terbuthryn were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Acetonitrile and methanol were of HPLC grade (Scharlau, Barcelona, Spain). Acetic acid was obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Sodium hydrogenphosphate was obtained from Probus (Barcelona, Spain). Humic acid sodium salt was obtained from Aldrich (Steinheim, Germany).

Stock standard solutions of the triazines (10 µg/mL) were prepared in water. Working solutions of these compounds were prepared by dilution of the stock solutions with water. Water was deionized and filtered through 0.45 µm nylon membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain). All solutions were stored in the dark at 2 °C.

2.2. Apparatus and chromatographic conditions

2.2.1. On-fibre SPME/conventional LC

The chromatographic system consisted of a quaternary pump (Hewlett-Packard 1050 Series, Palo Alto, CA, USA), equipped with a high-pressure six port valve (Rheodyne model 7725, Rohnert Park, CA, USA) with a 100 µL loop, a Hypersil ODS, 250 mm × 4 mm I.D., 5 µm, analytical column (Merck, Darmstadt, Germany), and a UV detector (Hewlett-Packard, 1100 Series) equipped with a 14 µL flow cell (10 mm pathlength). The detector was linked to a data system (Hewlett-Packard, HPLC ChemStation) for data acquisition and calculation. The signal was monitored at 230 nm.

The 100 µL loop was used in assays involving the direct injection of the samples. In the on-fibre SPME configuration the loop was replaced by a SPME–HPLC interface (Supelco, Bellefonte, PA, USA). In order to effect peak compression [17] a precolumn and a high-pressure six-port valve (Hewlett-Packard) were inserted between the SPME–HPLC interface and the analytical column, as depicted in Fig. 1a. The precolumn (20 mm × 2.1 mm I.D.) was dry-packed with a Hypersil C₁₈, 30 µm, stationary phase (Merck).

The mobile-phase was a mixture of acetonitrile–water in gradient elution mode at a flow rate of 1 mL/min. Initially the eluent was 100% water. Next, the acetonitrile content was linearly increased from 0% at 0.5 min to 45% at 1 min; such composition was kept constant until 10 min. Then, the percentage of acetonitrile was increased up to 60% at 15 min, and this content was maintained constant until the end of the program (24 min). All solvents were filtered through 0.45 µm nylon membranes (Teknokroma) and degassed with helium before use.

2.2.2. In-tube SPME/capillary LC

The capillary chromatographic system used consisted of a capillary pump (Agilent 1100 Series, Waldbronn, Germany) equipped with a high-pressure six port valve (Rheodyne model 7725) with a 2 µL internal loop (unless otherwise stated), a Zorbax SB C₁₈ (150 mm × 0.5 mm I.D., 5 µm particle diameter) analytical column (Agilent), and a UV detector (Hewlett-Packard, 1100 Series). The detector was equipped with a 1 µL micro-flow cell (5 mm pathlength). All the components of the system were linked with fused silica tubing (550 mm length × 50 µm I.D. supplied by Agilent). The detector was

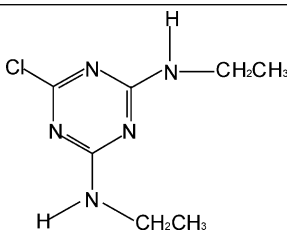
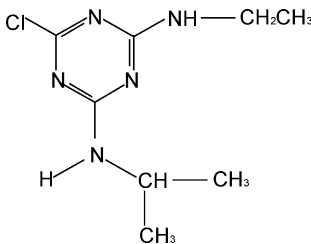
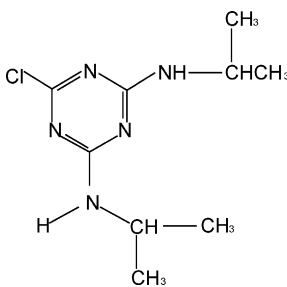
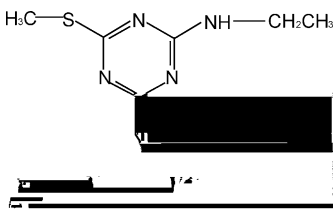
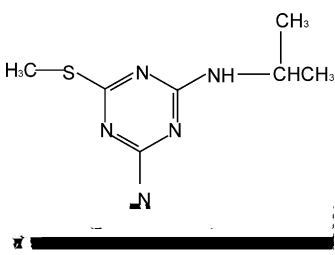
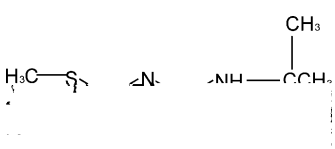
Table 2
Characteristics of the extraction procedures tested for triazines

Analyte	Procedure		Measurement of the analytical signal	LOD ($\mu\text{g/L}$)	Reference
	Extraction	Volume of sample (mL)			
Simazine	Off-line SPE/HPLC ^a	250	UV detection	0.012	[2]
	On-line SPE/HPLC ^a	10	MS	0.0016	[3]
	Off-line SPE/HPLC ^a	2	UV detection	0.003	[6]
	Off-line SPE/GC ^a	1000	Ion trap MS	0.012	[8]
	SPME/GC ^a	3	ECD or TSD	0.05	[9]
	Immunoextraction/RPLC ^a	0.05	UV–vis detector	0.25	[10]
	On-line SWE/SWC ^a	1000	UV detection	1.4 $\mu\text{g/g}$	[11]
	SPME/GC ^a	2	MS	0.013	[13]
	SPME/HPLC ^a	3	UV detection	1.5	[15]
	Off-line SPE/HPLC ^a	50	MS (ESI)	0.1	[20]
	Fibre protected LPME/GC ^a	3	MS	0.063	[21]
	SPME/GC ^a	3	MS	0.06	[23]
	Off-line SPE/RPLC-TOTAD-GC ^a	1000	UV detection	0.00033	[24]
	SPE-micro LLME/RPLC ^a	Solid	DAD	0.1	[25]
	Off-line SPE (nanotubes)/HPLC	500	DAD	0.009	[26]
	Off-line SPE (propazine-MIP)/HPLC ^a	100	DAD	0.1	[27]
Atrazine	Off-line SPE/HPLC ^a	250	UV detection	0.018	[2]
	On-line SPE/HPLC ^a	10	MS	0.001	[3]
	Off-line SPE/HPLC ^a	2	UV detection	0.002	[6]
	Off-line SPE/GC ^a	1000	Ion trap MS	0.00075	[8]
	SPME/GC ^a	3	ECD or TSD	0.03	[9]
	Immunoextraction/RPLC ^a	0.05	UV–vis detector	0.25	[10]
	On-line SWE/SWC ^a	Solid	UV detection	1.4 $\mu\text{g/g}$	[11]
	SPME/GC ^a	2	MS	0.006	[13]
	Off-line SPE/GC	500	MS	0.0017	[14]
	SPME/HPLC ^a	3	UV detection	1.65	[15]
	Off-line SPE/HPLC ^a	500	DAD	0.004	[19]
	Off-line SPE/HPLC ^a	50	MS (ESI)	0.1	[20]
	Fibre protected LPME/GC ^a	3	MS	0.014	[21]
	SPME/GC ^a	11	NPD	0.03	[22]
	SPME/GC	3	MS	0.04	[23]
	Off-line SPE/RPLC-TOTAD-GC ^a	1000	UV detection	0.00017	[24]
SPE-micro LLME/RPLC ^a	1000	DAD	0.1	[25]	
Off-line SPE (nanotubes)/HPLC	500	DAD	0.033	[26]	
Off-line SPE (propazine-MIP)/HPLC ^a	100	DAD	0.1	[27]	
Propazine	Off-line SPE/HPLC ^a	2	UV detection	0.0033	[6]
	SPME/GC ^a	3	ECD or TSD	0.025	[9]
	On-line SWE/SWC ^a	Solid	UV detection	1.4 $\mu\text{g/g}$	[11]
	SPME/GC ^a	2	MS	0.007	[13]
	Off-line SPE/HPLC ^a	50	MS (ESI)	0.1	[20]
	Fibre protected LPME/GC ^a	3	MS	0.01	[21]
	Off-line SPE (propazine-MIP)/HPLC ^a	100	DAD	0.1	[27]
Ametryn	Off-line SPE/HPLC ^a	250	UV detection	0.034	[2]
	Off-line SPE/HPLC ^a	2	UV detection	0.033	[6]
	On-line SWE/SWC ^a	Solid	UV detection	1.4 $\mu\text{g/g}$	[11]
	SPME/GC ^a	2	MS	0.01	[13]
	SPME/HPLC ^a	3	UV detection	2.64	[15]
Prometryn	On-line SPE/HPLC ^a	10	MS	0.0005	[3]
	Off-line SPE/HPLC ^a	2	UV detection	0.0025	[6]
	SPME/GC ^a	2	MS	0.01	[13]
	Fibre protected LPME/GC ^a	3	MS	0.007	[21]
	SPE-micro LLME/RPLC ^a	1000	DAD	0.1	[25]
Terbutryn	Off-line SPE/HPLC ^a	2	UV detection	0.0019	[6]
	SPME/GC ^a	2	MS	0.014	[13]
	Off-line SPE/HPLC ^a	500	DAD	0.006	[19]
	SPME/GC ^a	11	NPD	0.03	[22]
	SPME/GC ^a	3	MS	0.02	[23]
	Off-line SPE/RPLC-TOTAD-GC ^a	1000	UV detection	0.00012	[24]
Sum of all triazines	Evaluation of a field-test kit	0.1	UV detection	0.5	[18]

SWE: superheated water extraction; SWC: superheated water chromatography; ECD: electron-capture detector; TSD: thermoionic specific detector; DAD: diode array detector; ESI: electrospray ionisation; NPD: nitrogen-phosphorus detector; TOTAD: through-oven-transfer adsorption/desorption; LPME: liquid-phase microextraction; LLME: liquid–liquid microextraction; MIP: molecular imprinted polymer.

^a Triazines screening.

Table 3
Triazines selected as analytes

Compound	log K_{ow}	Chemical structure
Simazine ^a	4.7	
Atrazine ^a	2.34	
Propazine	2.55	
Ametryn	2.81	
Prometryn	3.52	
Terbutryn	3.70	

umn by means an automatic switching micro-valve (Agilent 1100 Series), as observed in Fig. 1b. A Zorbax SB C₁₈, 35 mm × 0.5 mm I.D., 5 μm, precolumn (Agilent) was used for SPME. The mobile-phase was a mixture of acetonitrile–water (45:55, v/v) in isocratic elution mode at a flow rate of 20 μL/min.

2.2.2.2. In-tube SPME with an open column. The in-tube SPME with an open capillary column device consisted of a high-pressure six port valve (Rheodyne model 7725) directly connected to the analytical column, and an open tubular capillary column TRB-5 coated with 5% diphenyl–95% dimethylpolysiloxane (Teknokroma) which was used as an injection loop (see Fig. 1c). Two different GC capillary columns were tested, a 30 cm × 0.1 mm I.D., 0.1 μm film thickness column, and a 30 cm × 0.25 mm I.D., 0.25 μm film thickness column.

The mobile-phase was a mixture of acetonitrile–water in gradient elution mode at a flow rate of 10 μL/min. The eluent was 100% water for the 0–0.5 min time interval, and then, the content of acetonitrile was increased up to 50% at min 2.0. This composition was maintained constant until 14 min. Next, the percentage of acetonitrile was increased to 70% at 22 min. Finally, it was maintained for other 15 min. All solvents were filtered through 0.45 μm nylon membranes (Teknokroma) and degassed with helium before use.

2.3. Extraction procedures

2.3.1. On-fibre SPME procedure

A SPME assembly with replaceable extraction fibres was used for extraction of triazines from water samples. Fibres with three different coatings were tested: polydimethylsiloxane (PDMS, 100 μm, 1 cm), polydimethylsiloxane–divinylbenzene (PDMS–DVB, 60 μm, 1 cm) and Carbowax-templated resin (CW-TPR, 50 μm, 1 cm). The SPME assembly and the fibres were obtained from Supelco.

The fibre was immersed into a glass vial containing the standard samples of the triazines at concentrations of 0.05–2.5 μg/mL (each compound) for an adsorption time ranging from 5 to 65 min. Unless otherwise stated, samples were stirred during the extraction process. Then, the SPME device was placed into the SPME–HPLC interface, and the triazines were desorbed from the fibre under static mode: the fibre was soaked with 200 μL of acetonitrile for a defined desorption time between 5 and 25 min, and then the valve of the SPME–HPLC interface was rotated, so the analytes were sent to the precolumn to effect peak compression, and then to the analytical column (see Fig. 1a). At the end of each run the fibres were cleaned by immersing them in a 15 mL of methanol for 2 min.

In studies aimed at evaluating the influence of sample pH on analyte recoveries, an appropriate volume of 0.5 M NaOH or 0.1 M acetic acid was added to the samples in order to produce pHs between 4 and 10. For evaluating the effect of the temperature during extraction the vials containing the samples and the fibres were immersed into a water bath equipped with a thermostat (Clifton, Avon, UK); no agitation of the samples was done in such studies.

All the experiments were performed in duplicate at ambient temperature.

2.3.2. In-tube SPME procedure

In assays using in-tube SPME with a packed column, variable volumes of the samples (standard solutions of triazines containing 1 μg/mL of each compound) ranging from 2 to 100 μL were tested. In such studies loops of 2, 10, 20 and 100 μL were used. Different modalities for performing on-line SPME were tested and compared: single injection in the 2-μL loop, several consecutive injections of 2 μL using the 2 μL-loop, or the injection of an increasing sample volume in different loops (10, 20 and 100 μL). Immediately after filling the injection loop the elution program was started and the switching micro-valve was rotated. In such a way, the analytical column was disconnected and SPME of the analytes was carried out in the C₁₈ packed column (see Fig. 1b). After the time necessary to empty the loop (0.5–5 min) the switching micro-valve was rotated again, so the analytes were transferred to the analytical column.

In assays using in-tube SPME with the open capillary columns, different sample volumes between 0.25 and 1 mL were processed in order to study the maximum preconcentration factor. The injection velocity was fixed at 0.250 mL/min. After sample loading, a volume of nanopure water was flushed into the capillary column in order to flush out the unextracted analytes; the volume of water used was 15 or 8 μL when using the 0.25 and 0.1 mm I.D. capillary columns, respectively. Finally, the analytes were desorbed by injecting 10 or 5 μL of methanol for the 0.25 mm or for the 0.1 mm I.D. capillary column, respectively. Immediately after the injection of methanol the valve was rotated, so the analytes were transferred to the analytical column (see Fig. 1c). In such a way, the volumes injected into the analytical column were those corresponding to the internal volume of the GC capillaries: 2.35 and 14.7 μL for 0.1 and 0.25 mm I.D. columns, respectively.

All the samples injected into the capillary chromatographic system were filtered through 0.45 μm filters (Teknokroma). All the experiments were performed in duplicate at ambient temperature.

2.4. Analysis of real water samples

2.4.1. On-fibre SPME/conventional LC

Field water (S1), river water (S2), irrigation water (S3a), ground water (S4) and waste water from an industry aimed at the production of fertilizers (S5) were filtered through 0.45 μm nylon membranes (Teknokroma) in order to remove any particulate matter and was directly processed. Each sample was analysed in triplicate, and all assays were carried out at ambient temperature.

2.4.2. In-tube SPME/capillary LC

The in-tube SPME with a packed column procedure was applied to field water (S1), river water (S2), irrigation water (S3a), ground water (S4), industrial waste water (S5), drinking water (S6), water-treatment plant water (S7), pond water (S8) and natural water (S9).

The in-tube SPME with an open column procedure was applied to field water (S1), river water (S2), irrigation water (S3b), water from a dam (S8) and 22 waste water samples (S10–S31) flowing to the sea, and collected at different points along the coast of the Comunidad Valenciana (Spain).

All samples were filtered through 0.45 μm nylon membranes (Teknokroma) after their arrival to the laboratory in order to remove any particulate matter. They were filtered again just before their injection in the capillary chromatographic system using 0.45 μm nylon membranes (Teknokroma). Each sample was analysed in triplicate and all assays were carried out at ambient temperature.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of the extraction process

3.1.1. On-fibre SPME procedure

Fibres with three different coatings were tested, but no significant differences of amounts extracted were observed among them (data not shown). Thus, according to previously reported works on the analysis of triazines in water samples [12], a PDMS–DVB fibre coating was used in further experiments.

In a previous paper we studied how to reduce peak broadening caused by the transfer of the analytes from the SPME–LC interface to the analytical column in large volumes of organic solvents [17]; such large volumes are necessary to desorb the analytes from the fibre inside the desorption chamber of the interface. In such paper it was demonstrated that peak broadening can be minimized by effecting peak compression into a precolumn placed between the SPME–LC interface and the analytical column, and consequently, this was the configuration used in the present work (see Fig. 1a).

Different adsorption times in the 5–65 min interval were tested for standard solutions containing a mixture of the triazines evaluated (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each compound). The desorption time was 5 min. It was observed that the peak areas obtained for simazine and propazine hardly increased by increasing the adsorption time from 5 to 65 min. However, the responses of atrazine, ametryn, prometryne and terbutryne increased significantly by extending the adsorption time up to 45 min. Little improvement was observed for longer adsorption times. Consequently, an adsorption time of 45 min was selected for further work.

The effect of the sample pH in the range 4–10 was evaluated for standard solutions containing a mixture of the triazines (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ each). The adsorption and desorption times were 45 and 10 min, respectively. No significant differences were observed within the tested pH interval. Consequently, the sample pH was not modified, that is, adjusted before the analysis.

The influence of the temperature in the extraction process was studied in the 20–70 $^{\circ}\text{C}$ range using standard solutions containing 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each triazine. The adsorption and desorption times were 15 and 5 min, respectively. Since significant differences on analytes responses were not observed, further experiments were carried out at ambient temperature.

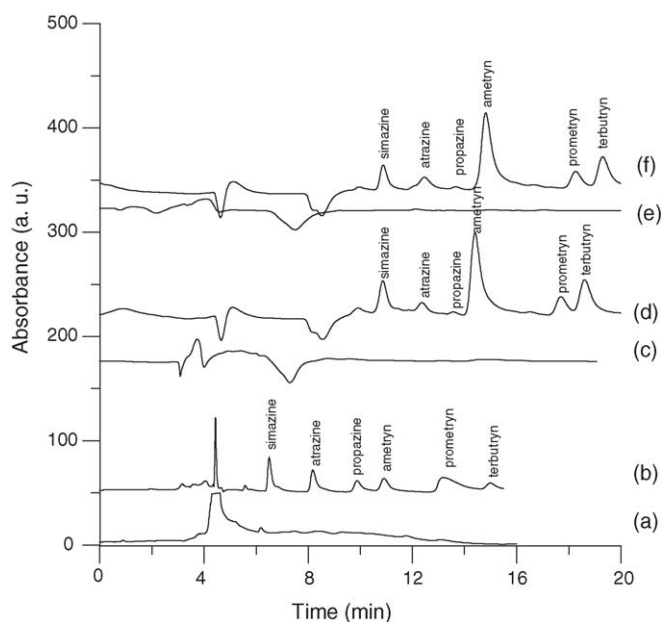


Fig. 2. Chromatograms obtained with the on-fibre SPME/conventional LC procedure for: (a) blank (water) and (b) a standard solution containing 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each triazine. Chromatograms obtained by the in-tube SPME with a packed column/capillary LC procedure for: (c) a blank (water) and (d) a standard solution containing 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each triazine. Chromatograms obtained by the in-tube SPME with the 30 cm \times 0.25 mm I.D., 0.25 μm of film thickness open column/capillary LC procedure for: (e) a blank (water) and (f) a standard solution containing 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each triazine. For other experimental details, see text.

The desorption time was evaluated between 5 and 25 min using standard solutions containing 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each triazine. The adsorption time was 15 min. Maximum analyte responses were reached for most triazines using desorption times of 10 min. Only for atrazine the analytical signal increased by extending the desorption time up to 25 min. A desorption time of 10 min was finally selected.

The effect of sample volume was investigated in the 10–50 mL range. The adsorption and the desorption time were 15 and 10 min, respectively. No significant differences were obtained for different sample volumes. We selected 25 mL as a sample volume for further work.

Fig. 2a and b shows the chromatograms obtained under the selected on-fibre SPME conditions for a blank (water) and for a standard solution containing 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each triazine, respectively.

In order to investigate whether the presence of humic acids in sample could affect the recoveries of the analytes, standard samples containing 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each triazine and variable concentrations of humic acid were also assayed. The concentrations of humic acid in the samples were varied from 5 to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the SPME conditions were those previously optimized. However, since in the presence of humic acid the fibre coating became very dark after the adsorption stage, an additional step was found to be necessary to clean-up the fibre coating. For this purpose, the fibre was immersed into 10 mL of water for 3 min under stirring. As observed in Fig. 3, no matrix effect was found. Therefore, the proposed on-fibre SPME method is useful

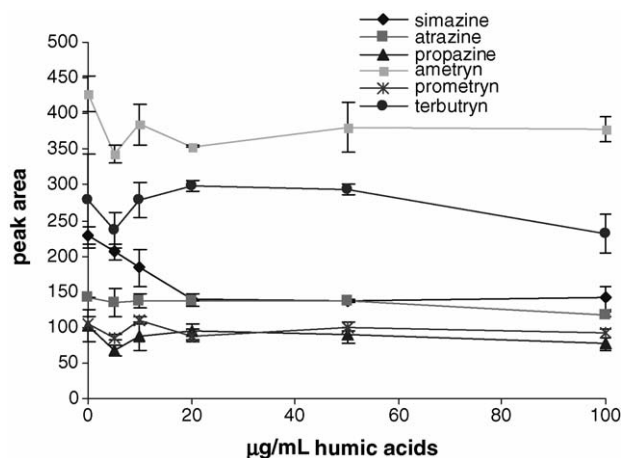


Fig. 3. Effect of humic acid in the adsorption of the tested triazines on the SPME fibre. Concentration of each triazine, 1 µg/mL. Adsorption time, 45 min; desorption time, 10 min. For other experimental details, see text.

for the analysis of triazines in natural waters with high content of dissolved organic matter.

The absolute amounts of the analytes extracted by the on-fibre SPME procedure were estimated from the peak areas in the resulting chromatograms and the calibration equations constructed through the direct injection of 100 µL of standard solutions of the analytes in the 0.1–2 µg/mL interval (each triazine). The recoveries were then established by comparing the extracted amounts and the amount of the analytes in the samples (25 mL). The results are shown in Table 4. As observed in this table the recoveries varied from 0.27 to 2.9%. These low recoveries can be explained by the small dimensions of the fibre coating in comparison with the sample volume. The fused silica core diameter measured 110 µm, and thus the volume of the SPME phase was 0.510 µL. Therefore, the proposed procedure can be considered a non-disruptive sampling method.

3.1.2. In-tube SPME procedure

Fig. 2c and d shows the chromatograms obtained when using the C₁₈ packed column to carry out the in-tube SPME. The

effect of the sample volume was studied between 2 and 100 µL (see Section 2). A single injection of 100 µL of the sample was selected as the best option; SPME in the packed column was carried out during 5 min at a flow rate of 20 µL/min using isocratic elution (see Fig. 1b). The recoveries obtained for a standard solution containing 10 µg/L of each triazine were estimated from the peak areas in the resulting chromatograms and the calibration equations obtained through the direct injection of 2 µL of standard samples at concentrations of 0.01–1 µg/mL for each triazine. The absolute percentages of extraction ranged from 41 to 131% (see Table 4). Differences in the recoveries obtained for the compounds tested are most probably due to the differences in their affinities for the fibre coating. In this in-tube option, the SPME-phase volume was 6.87 µL.

The internal volumes of the two GC columns tested as open columns for in-tube SPME were 2.35 and 14.7 µL, respectively. These columns were also used as injection loops for the sample (see Fig. 1c). Fig. 4 shows the influence of the sample volume passed through those columns on analyte responses. According to such results, 1 mL was selected as the optimum sample volume. The recoveries obtained with the above columns for a standard solution containing 0.1 µg/mL of each triazine were estimated from the peak areas obtained for each compound and the calibration equations constructed by the direct injection of 2 µL of standard samples at concentrations of 0.01–1 µg/mL for each triazine. The recoveries were in the 0.74–9.1% range. The percentages of analyte extracted with the GC column of 0.25 µm of film thickness (C1) were slightly higher than those obtained with the 0.1 µm of thickness GC column (C2). This fact can be explained by the volume of the SPME phases, which were 0.0589 and 0.0236 µL for C1 and C2, respectively. Accordingly, the 0.25 µm thickness coating column was used in further work. A linear relationship exists between the recoveries obtained for the two GC columns ($R_{C1} = 1.5576 \times R_{C2} - 0.8186$, $R^2 = 0.9915$).

3.2. Analytical performance

The LODs (established for a signal-to-noise ratio of 3) achieved by the tested methods are shown in Table 5. As

Table 4
Recoveries of the on-fibre SPME and in-tube SPME procedures

Analyte	On-fibre SPME/conventional LC ^a : recovery (%) ± s	In-tube SPME with a packed column/capillary LC ^b : recovery (%) ± s (n=6)	In-tube SPME with an open column/capillary LC ^c : recovery (%) ± s (n=3)	
			30 cm × 0.1 mm I.D., 0.1 µm film thickness column	30 cm × 0.25 mm I.D., 0.25 µm film thickness column
Simazine	0.27 ± 0.02 (n=7)	59 ± 8	1.6 ± 0.2	1.8 ± 0.3
Atrazine	2.9 ± 0.1 (n=5)	79 ± 4	6.2 ± 0.7	9.1 ± 1.9
Propazine	1.96 ± 0.14 (n=9)	131 ± 3	0.84 ± 0.09	0.74 ± 0.06
Ametryn	0.27 ± 0.02 (n=5)	114 ± 5	4.7 ± 0.7	6.6 ± 0.5
Prometryn	1.23 ± 0.09 (n=10)	49 ± 2	4.5 ± 0.3	5.9 ± 0.6
Terbutryn	1.87 ± 0.17 (n=7)	41 ± 1	2.66 ± 0.04	2.88 ± 0.07

^a Calculated as the ratio of the slopes of the calibration equations by the on-fibre SPME and direct injection methods.

^b Calculated from a solution containing 0.01 µg/mL of each triazine.

^c Calculated from a solution containing 0.1 µg/mL of each triazine.

Table 5
Analytical characteristics of the procedures studied

Method	Analyte	LOD ($\mu\text{g/L}$)	Linearity					Precision (RSD%) ^a		Cost per sample	Rapidity (s)	Automation degree
			Linear interval (mg/L)	<i>N</i>	<i>a</i> ± <i>s_a</i>	<i>b</i> ± <i>s_b</i>	<i>R</i> ²	Intra-day (<i>n</i> = 3)	Inter-day (<i>n</i> = 6)			
On-fibre SPME/conventional LC (sample volume, 25 mL)	Simazine	50	0.1–1	12	5 ± 4	346 ± 6	0.997	6	4	3	1 sample/h	2
	Atrazine	50	0.1–1	9	92 ± 50	1680 ± 90	0.98	4	7			
	Propazine	125	0.25–2.5	12	6 ± 18	343 ± 11	0.99	8	7			
	Ametryn	25	0.05–1	9	65 ± 30	1265 ± 40	0.99	10	22			
	Prometryn	25	0.05–0.5	11	–26 ± 20	1820 ± 70	0.99	21	19			
	Terbutryn	35	0.05–0.5	7	80 ± 70	4100 ± 200	0.98	5	14			
Direct injection (100 μL)/conventional LC	Simazine	100	0.25–4	4	27 ± 8	135 ± 4	0.99			2	4 sample/h	5
	Atrazine	250	0.25–4	4	20 ± 20	33 ± 10	0.91					
	Propazine	250	0.25–4	4	15 ± 2	3.4 ± 0.9	0.94					
	Ametryn	25	0.25–4	4	100 ± 50	470 ± 20	0.99					
	Prometryn	150	0.25–4	4	0 ± 17	167 ± 8	0.99					
	Terbutryn	150	0.25–4	4	13 ± 20	185 ± 10	0.99					
Direct injection (2 μL)/capillary LC	Simazine	2.5	0.1–1	4	52 ± 6	171 ± 15	0.99			3	4 sample/h	5
	Atrazine	5	0.01–1	4	17 ± 5	211 ± 6	0.99					
	Propazine	25	0.25–2.5	4	4 ± 14	85 ± 17	0.96					
	Ametryn	6.25	0.01–1	4	0 ± 80	220 ± 50	0.96					
	Prometryn	50	0.05–1	4	9 ± 1	135 ± 5	0.99					
	Terbutryn	20	0.05–1	4	–1.5 ± 0.7	279 ± 2	0.99					
In-tube SPME with a packed column/capillary LC (sample volume, 100 μL)	Simazine	0.025	0.0001–0.1	14	22 ± 6	12540 ± 180	0.997	1.6	10	5	3 sample/h	5
	Atrazine	0.05	0.0001–0.1	14	5 ± 8	16900 ± 190	0.998	3	2			
	Propazine	0.1	0.001–0.1	10	–19 ± 4	14600 ± 103	0.999	5	12			
	Ametryn	0.0625	0.0001–0.1	16	–54 ± 20	33000 ± 500	0.996	4	4			
	Prometryn	0.5	0.001–0.1	13	25 ± 3	4330 ± 70	0.996	3	6			
	Terbutryn	0.2	0.001–0.1	13	–5 ± 11	9400 ± 200	0.992	7	6			
In-tube SPME with an open column (30 cm × 0.1 mm I.D., 0.1 μm film thickness)/capillary LC (sample volume, 1 mL)	Simazine	0.1	0.01–0.5	5	60 ± 30	2620 ± 120	0.99	12	13	3	2 sample/h	5
	Atrazine	0.1	0.01–0.5	5	156 ± 5	550 ± 20	0.99	0.9	10			
	Propazine	1	0.01–0.5	5	33 ± 3	317 ± 13	0.99	8	23			
	Ametryn	0.1	0.01–0.5	5	270 ± 90	7500 ± 400	0.99	8	17			
	Prometryn	0.1	0.01–0.5	5	90 ± 16	1230 ± 70	0.99	4	9			
	Terbutryn	0.1	0.01–0.5	5	140 ± 50	3500 ± 200	0.99	4	6			
In-tube SPME with an open column (30 cm × 0.25 mm I.D., 0.25 μm film thickness)/capillary LC (sample volume, 1 mL)	Simazine	0.1	0.01–0.5	5	–6 ± 10	3450 ± 40	0.99	17	16	3	2 sample/h	5
	Atrazine	0.1	0.01–0.5	5	107 ± 16	1500 ± 70	0.99	16	19			
	Propazine	0.5	0.01–0.5	5	18 ± 4	257 ± 15	0.99	20	21			
	Ametryn	0.1	0.01–0.5	5	540 ± 140	11200 ± 600	0.99	10	8			
	Prometryn	0.1	0.01–0.5	5	109 ± 30	1600 ± 130	0.98	6	13			
	Terbutryn	0.1	0.01–0.5	5	290 ± 70	3000 ± 300	0.98	4	8			

5, the most expensive and the most suitable for automation procedure; *n*, number of standards used; *a*, ordinate of the calibration graph; *b*, slope of the calibration graph.

^a Tested at half concentration range.

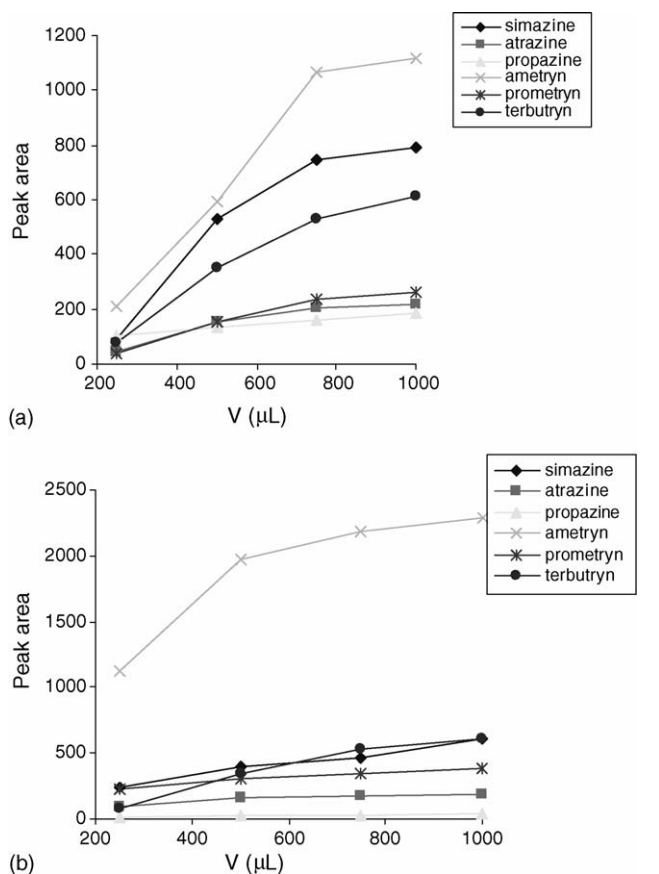


Fig. 4. Optimization of the sample volume for a standard solution containing 100 µg/L of each triazine in the in-tube SPME with an open column method for: (a) the 30 cm × 0.1 mm I.D., 0.1 µm film thickness column and (b) the 30 cm × 0.25 mm I.D., 0.25 µm film thickness column. For other experimental details, see text.

observed, the in-tube SPME with a packed column/capillary LC method provided the lowest LODs (0.025–0.5 µg/L), which can be explained by the largest SPME-phase volume. LODs in the 0.1–1 µg/mL range were reached by in-tube SPME with an open column coupled to capillary chromatography. For the two GC columns tested the SPME-phase volume was smaller than that of the in-tube method with a packed column. However, higher sample volume was processed under the in-tube SPME with open capillary column approach. The on-fibre SPME/conventional LC method, the direct injection/capillary LC, and the direct injection/conventional LC methods provided higher LODs (5–250 µg/L). The preconcentration of the sample with the SPME phase is less efficient although an intermediate sample volume is used (0.510 µL).

As different phases were used in the different SPME options, the interactions established with the analytes were also different, and therefore, no good correlations were obtained between them. It should be also remarked that, as capillary LC provides better sensitivity than conventional LC (see Table 5), the differences in the sensitivities by the tested SPME/chromatographic options are only partly due to the performance of the extraction processes. The LOD is the most important factor to select an appropriate method for each type of water sample for screening triazines, as observed in Fig. 5 and in Table 1. The on-fibre

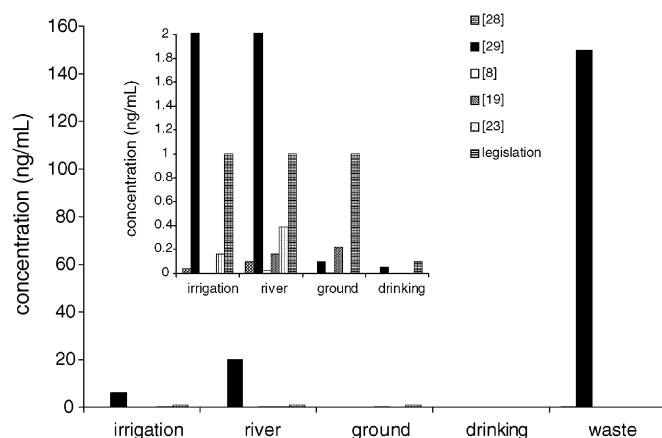


Fig. 5. Concentrations of triazines found in different kinds of water samples reported in [8,19,23,28,29], and European legislated concentration value.

SPME/conventional LC and the direct injection/capillary LC methods can be applied to the analysis of waste water samples. The in-tube SPME/capillary LC methods can be applied also to drinking water (see Table 1).

The working ranges and calibration curves obtained by the different approaches tested as well as through the direct injection of standards are also showed in Table 5. The repeatability and reproducibility were evaluated by calculating the intra-day and inter-day coefficients of variation, respectively. As observed in Table 5, the best precision was obtained by the in-tube SPME with a packed column coupled to capillary LC method. However, the on-fibre SPME and the in-tube SPME with an open column methods have satisfactory variation coefficients.

The in-tube SPME with a packed column/LC capillary method was a quite fast and automated procedure, but it was more time-consuming than the methods based on direct injection. Both approaches had the same high degree of automation. The on-fibre SPME method was the most time-consuming method and offered the lowest degree of automation (Table 5). The retention times were quite similar for the two studied in-tube SPME methods.

Cost of the analysis was also evaluated. The in-tube SPME with a packed column method incorporates a precolumn and a switching valve, which put up the price of the equipment. However, in the in-tube SPME with an open column procedure only a capillary GC column connected to the injection valve is needed. In the on-fibre SPME procedure coupled to conventional LC a SPME–HPLC interface is required, although a capillary LC system is more expensive than a conventional LC system (Table 5).

The accuracy of the methods was evaluated by analysing standard solutions containing the triazines at different concentrations within the tested concentration ranges. The results obtained are listed in Table 6. Moreover, four different spiked samples (S1, S2, S3, S4) were analysed in order to evaluate possible systematic errors. No matrix effect was found in such samples. The concentrations of triazines in the spiked samples were then calculated from the calibration equations obtained with standard solutions of triazines. In all instances the proposed methods provided values close to the real concentrations.

Table 6
Accuracy and concentrations of triazines found in the different types of water analysed by the studied procedures ($n = 3$)

	On-fibre SPME/conventional LC			In-tube SPME with a packed column/capillary LC			In-tube SPME with an open column/capillary (added concentration 0.1 ($\mu\text{g/mL}$) of each triazine)			
	Added concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Determined concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Relative error (%)	Added concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Determined concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Relative error (%)	30 cm \times 0.1 mm I.D., 0.1 μm film thickness column		30 cm \times 0.25 mm I.D., 0.25 μm film thickness column	
							Determined concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Relative error (%)	Determined concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Relative error (%)
S1										
Simazine	0.1	0.098 \pm 0.007	-1	0.01	0.010 \pm 0.001	0	0.093 \pm 0.017	-7	0.091 \pm 0.008	-9
	0.5	0.48 \pm 0.08	-4	0.05	0.0430 \pm 0.0012	-14				
Atrazine	0.1	0.1067 \pm 0.0005	+7	0.01	0.0087 \pm 0.0004	-13	0.10 \pm 0.02	0	0.093 \pm 0.012	-7
	0.5	0.49 \pm 0.08	-1	0.05	0.0464 \pm 0.0013	-7				
Propazine	0.25	0.23 \pm 0.08	-6	0.01	0.0106 \pm 0.0006	+6	0.08 \pm 0.03	-20	0.08 \pm 0.03	-20
	1.25	1.51 \pm 0.12	21	0.05	0.0542 \pm 0.0013	+8				
Ametryn	0.05	0.048 \pm 0.008	-5	0.01	0.0115 \pm 0.0006	+15	0.115 \pm 0.007	+15	0.093 \pm 0.017	-7
	0.25	0.24 \pm 0.02	-3	0.05	0.0472 \pm 0.0006	-6				
Prometryn	0.05	0.048 \pm 0.009	-3	0.01	0.008 \pm 0.002	-20	0.116 \pm 0.007	+14	0.11 \pm 0.02	+10
	0.25	0.27 \pm 0.04	+7	0.05	0.0456 \pm 0.0015	-9				
Terbutryn	0.05	0.042 \pm 0.007	-17	0.01	0.0119 \pm 0.0002	+19	0.118 \pm 0.009	+18	0.117 \pm 0.019	+17
	0.25	0.23 \pm 0.11	-9	0.05	0.0500 \pm 0.0005	+0				
S2										
Simazine	0.1	0.09 \pm 0.04	-11	0.01	0.0090 \pm 0.0006	-10	-	-	0.083 \pm 0.005	-17
	0.5	0.45 \pm 0.06	-9	0.05	0.040 \pm 0.003	-20				
Atrazine	0.1	0.09 \pm 0.03	-15	0.01	0.0100 \pm 0.0001	0	0.12 \pm 0.06	+20	0.08 \pm 0.02	-20
	0.5	0.58 \pm 0.02	+17	0.05	0.0485 \pm 0.0013	-3				
Propazine	0.25	0.211 \pm 0.106	-15	0.01	0.0011 \pm 0.0004	+10	0.119 \pm 0.012	+19	0.08 \pm 0.01	-20
	1.25	1.45 \pm 0.20	+16	0.05	0.058 \pm 0.003	+16				
Ametryn	0.05	0.05 \pm 0.03	+9	0.01	0.0122 \pm 0.0004	+22	0.083 \pm 0.004	-17	0.080 \pm 0.017	-20
	0.25	0.26 \pm 0.05	+5	0.05	0.0478 \pm 0.0016	-4				
Prometryn	0.05	0.053 \pm 0.005	+6	0.01	0.0081 \pm 0.0003	-19	0.089 \pm 0.009	-11	0.112 \pm 0.003	+12
	0.25	0.21 \pm 0.03	-16	0.05	0.046 \pm 0.002	-8				
Terbutryn	0.25	0.25 \pm 0.04	+2	0.01	0.0118 \pm 0.0002	+18	0.090 \pm 0.003	-10	0.12 \pm 0.01	+20
				0.05	0.0506 \pm 0.0011	+1.2				
S3										
Simazine	0.1	0.118 \pm 0.016	+18	0.05	0.0526 \pm 0.0012	+5	0.08 \pm 0.01	-20	0.085 \pm 0.003	-15
	0.5	0.48 \pm 0.04	-5	0.091	0.0971 \pm 0.0018	+7				
Atrazine	-	-	-	0	0.0020 \pm 0.0002	-	0.083 \pm 0.003	-17	0.09 \pm 0.02	-10
	0.1	0.114 \pm 0.012	+14	0.05	0.0514 \pm 0.0011	+3				
	0.5	0.49 \pm 0.07	-1	0.091	0.0929 \pm 0.0015	+2				
Propazine	0.25	0.23 \pm 0.03	-7	0.05	0.062 \pm 0.003	+24	0.085 \pm 0.006	-15	0.082 \pm 0.018	-18
	1.25	1.27 \pm 0.03	+2	0.091	0.098 \pm 0.005	+8				
Ametryn	0.05	0.06 \pm 0.02	+17	0.01	0.0117 \pm 0.0001	+17	0.110 \pm 0.016	+10	0.078 \pm 0.006	-22
	0.25	0.314 \pm 0.010	+25	0.05	0.0465 \pm 0.0007	-7				

Table 6 (Continued)

Prometryn	0.05	0.066 ± 0.001	+30	0.01	0.0074 ± 0.0002	-25	0.096 ± 0.017	-4	0.083 ± 0.008	-17
	0.25	0.234 ± 0.014	-6	0.05	0.0465 ± 0.0011	-7				
Terbutryn	-	-	-	0	0.008 ± 0.002	-	0.11 ± 0.02	+10	0.115 ± 0.002	+15
	0.05	0.04 ± 0.01	-12	0.01	0.0148 ± 0.0006	-19				
	0.25	0.25 ± 0.05	+2	0.05	0.0578 ± 0.0016	+4				
S4										
Simazine	0.1	0.088 ± 0.018	-12	0.01	0.0088 ± 0.0002	-12	0.09 ± 0.01	-10	0.093 ± 0.008	-7
	0.5	0.52 ± 0.04	+5	0.05	0.0417 ± 0.0011	-20				
Atrazine	0.1	0.12 ± 0.02	+18	0.01	0.0098 ± 0.0005	-2	0.12 ± 0.03	+20	0.08 ± 0.02	-20
	0.5	0.51 ± 0.03	+1.5	0.05	0.048 ± 0.002	-3				
Propazine	0.25	0.19 ± 0.03	-23	0.01	0.0093 ± 0.0002	-7	0.11 ± 0.06	+10	0.08 ± 0.01	-20
	1.25	1.21 ± 0.03	-3	0.05	0.054 ± 0.003	+8				
Ametryn	0.05	0.054 ± 0.017	+8	0.01	0.0117 ± 0.0001	+17	0.093 ± 0.015	-7	-	-
	0.25	0.29 ± 0.07	+17	0.05	0.0477 ± 0.0006	-5				
Prometryn	0.05	0.058 ± 0.015	+16	0.01	0.0084 ± 0.0009	-16	0.086 ± 0.008	-14	0.085 ± 0.008	-15
	0.25	0.27 ± 0.02	+9	0.05	0.0464 ± 0.0008	-7				
Terbutryn	-	-	-	0.01	0.0114 ± 0.0004	+14	0.087 ± 0.002	-13	0.08 ± 0.03	-16
				0.05	0.049 ± 0.003	-2				
S5 20 times diluted	0	0.27 ± 0.09	-21	0	0.25 ± 0.02					
Atrazine	0.45	0.55 ± 0.04								

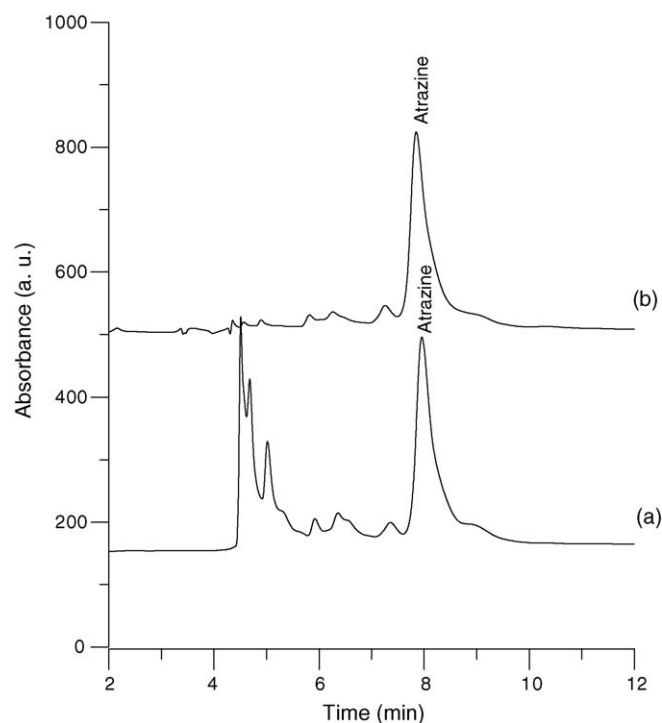


Fig. 6. Chromatograms obtained by the on-fibre SPME/conventional LC procedure for (a) waste water (S5) five times diluted and directly injected and (b) waste water (S5) no diluted. For other experimental details, see text.

3.3. Application to real samples

Finally, the reliability of the described methods was tested by analysing field water (S1), river water (S2), irrigation water (S3a, S3b), ground water (S4), waste water from an industry (S5), drinking water (S6), water-treatment plant water (S7), pond water (S8), natural water (S9) and several sewage samples flowing to the sea (S10–S31). The found concentration is always characterized by the expanded uncertainty ($K = 2$) estimated with EURACHEM/CITAC Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement [30]

3.3.1. On-fibre SPME/conventional LC

Triazines were not found in field water (S1), river water (S2), irrigation water (S3a, S3b) and ground water (S4) when using the on-fibre SPME method. The main advantage of this procedure is that peaks corresponding to some matrix components are minimised, as observed in Fig. 6. The chromatogram obtained for S5 revealed that this sample contained atrazine. To quantify its concentration, it was necessary to dilute the sample 20 times. The concentration of the analyte (calculated from the calibration graph obtained from standard samples) was $5.3 \pm 1.8 \mu\text{g/mL}$.

3.3.2. In-tube SPME/capillary LC

Water samples analysed by in-tube SPME with a packed column procedure coupled to capillary LC were S1–S9. These water samples were obtained from an area with great agricultural activity, the main crops being citrus. Triazines were not found in S1, S2, S4, S6, S7 and S9. The analysis of S3a revealed the presence of atrazine and terbutryne at concentrations of 2.0 ± 0.2 and

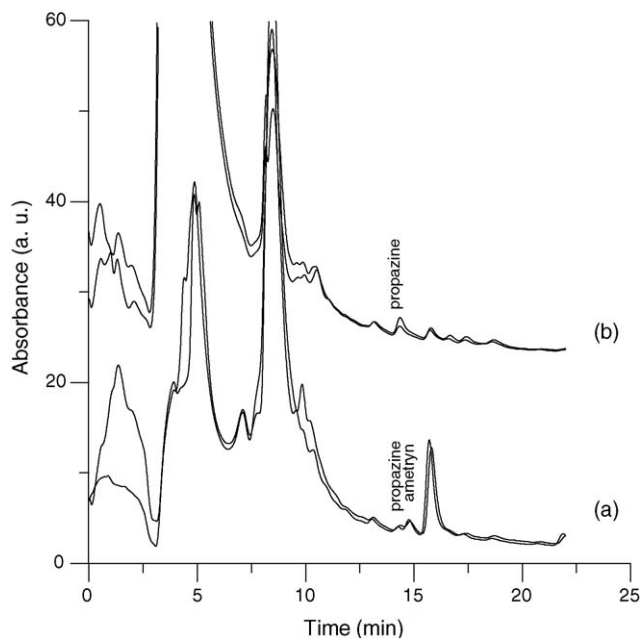


Fig. 7. Chromatograms obtained by the in-tube SPME/capillary LC procedure with an open column of 0.25 μm coating thickness for samples (a) S15 and (b) S17.

$8 \pm 2 \mu\text{g/L}$, respectively. In S5, previously diluted 340 times, a concentration of $5.0 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$ of atrazine was found; this value was statistically comparable with that obtained by means on-fibre SPME procedure. The analysis of sample S8 showed the presence of atrazine at a concentration of $0.46 \pm 0.08 \mu\text{g/L}$.

Samples S1, S2 and S4 were also analysed by the in-tube SPME with an open column procedure and triazines were not detected. The analysis of sample S3b using the 0.25 mm I.D. column revealed the presence of atrazine at a concentration level close to its LOD. The high degree of automation and satisfactory selectivity and sensitivity obtained, make this procedure (using the 0.25 μm thickness column) adequate for the analysis of S10–S31 samples, that were collected from different points of the coast of the Comunidad Valenciana. The analysis was carried out in duplicate ($n=2$) and the concentrations found were: $29 \pm 6 \mu\text{g/L}$ of atrazine in sample S10; samples S12, S15 and S30 presented ametryn at concentrations 0.7 ± 0.1 , 5.5 ± 0.6 and $4 \pm 1 \mu\text{g/L}$, respectively; samples S13–S15 and S17 presented propazine at concentrations 33 ± 8 , 16 ± 5 , 3 ± 1 and $28 \pm 8 \mu\text{g/L}$, respectively. The standard relative deviation oscillated between 11 and 33%. In samples S11, S16, S18–S28, S30 and S31 any triazine was found. As an illustrative example in Fig. 7 are shown chromatograms obtained for real water samples (samples S15 and S17) containing some triazines.

4. Conclusions

On-fibre SPME, in-tube SPME with a packed column and in-tube SPME with an open column procedures have been successfully applied to the determination of most used triazines in water samples using PDMS–DVB fibres, C_{18} phase and PDMS

GC columns, respectively. The three analytical procedures tested provided suitable accuracy and precision.

The main advantage of on-fibre SPME method in the determination of triazines is the good selectivity, as several products from waste water samples are not extracted into the fibre coating. This method is adequate to estimate triazines content in waste water samples bearing in mind the concentrations expected (this work and Fig. 5).

The in-tube SPME with a packed column procedure was also useful to determinate triazines in drinking water. The in-tube SPME with an open column-capillary chromatography procedure provided good LODs and permitted to analyse the majority of environmental water samples (see Fig. 5 and Table 1).

Considering the cost per sample, the in-tube SPME with packed column method is the most expensive method, but under such approach 3 samples per hour can be processed. Instead, 2 and 1 sample/hour can be processed with the in-tube with an open column method and with the on-fibre SPME method, respectively. The latter SPME approach generates more wastes than the in-tube SPME-based procedures.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project BQU2003-06138) for financial support received. C.C.-P. expresses her gratitude to the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte of Spain for pre-doctoral grant.

References

- [1] C. Crescenzi, in: R.A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Wiley, West Sussex, 2000, p. 6582.
- [2] G.M. Pinto, I.C. Jardim, *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 463.
- [3] A. Asperger, J. Efer, T. Koal, W. Engewald, *J. Chromatogr. A* 960 (2000) 109.
- [4] T. Kumazawa, O. Suzuki, *J. Chromatogr. B* 747 (2000) 241.
- [5] J. Beltran, F.J. López, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 389.
- [6] M.S. Dopico, M.V. González, J.M. Castro, E. González, J. Pérez, M. Rodríguez, A. Calleja, J.M.L. Vilariño, *Talanta* 59 (2003) 561.
- [7] Y. Gou, R. Eisert, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 873 (2000) 137.
- [8] Z. Cai, D. Wang, W.T. Ma, *Anal. Chim. Acta* 503 (2004) 263.
- [9] C. Gonçalves, M.F. Alpendurada, *J. Chromatogr. A* 963 (2000) 19.
- [10] M.A. Nelson, A. Gates, M. Dodlinger, D. Hage, *Anal. Chem.* 76 (2004) 805.
- [11] R. Tajuddin, R.M. Smith, *J. Chromatogr. A* 1084 (2005) 194.
- [12] C. Gonçalves, M.F. Alpendurada, *J. Chromatogr. A* 968 (2002) 177.
- [13] S. Frías, M.A. Rodríguez, J.E. Conde, J.P. Pérez-Trujillo, *J. Chromatogr. A* 1007 (2003) 127.
- [14] W.T. Ma, K.K. Fu, Z. Cai, G.B. Jiang, *Chemosphere* 52 (2003) 1627.
- [15] S.-D. Huang, H.-I. Huang, Y.-H. Sung, *Talanta* 64 (2004) 887.
- [16] J.-Y. Hu, T. Aizawa, M. Asami, Y. Magara, *Water Sci. Tech.* 38 (1998) 169.
- [17] R. Herráez-Hernández, C. Cháfer-Pericás, P. Campíns-Falcó, *Anal. Chim. Acta* 513 (2004) 425.
- [18] B. Ballesteros, D. Barceló, A. Dankwardt, P. Schneider, M.P. Marco, *Anal. Chim. Acta* 475 (2003) 105.
- [19] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, E. Fernández-Laespada, F.J. Sánchez-San Román, *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 471.
- [20] J.M. Nogueira, T. Sandra, P. Sandra, *Anal. Chim. Acta* 505 (2004) 209.
- [21] G. Shen, H.-K. Lee, *Anal. Chem.* 74 (2002) 648.
- [22] J. Dugay, C. Miège, M.-C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 795 (1998) 27.

- [23] F. Hernández, J. Beltran, F.J. López, J.V. Gaspar, *Anal. Chem.* 72 (2000) 2313.
- [24] M. Pérez, J. Alario, A. Vázquez, J. Villén, *Anal. Chem.* 72 (2000) 846.
- [25] K. Vandecasteele, I. Gaus, W. Debreuck, K. Walraevens, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3093.
- [26] Q. Zhou, J. Xiao, W. Wang, G. Liu, Q. Shi, J. Wang, *Talanta* 68 (2006) 1309.
- [27] R. Carabias, E. Rodríguez, E. Herrero, *J. Chromatogr. A* 1085 (2005) 199.
- [28] S. Óllers, H.P. Singer, P. Fässler, S.R. Müller, *J. Chromatogr. A* 911 (2001) 225.
- [29] B. Bjarnason, L. Chimuka, P. Önnarfjord, S. Eremin, J.-A. Jönsson, G. Johansson, J. Emnéus, *Anal. Chim. Acta* 426 (2001) 197.
- [30] S.L.R. Ellison, M. Rösslein, A. Williams, *Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, Second ed., EURACHEM/CITAC, Berlin, 2000.

UNPUBLISHED PAPER

In tube –SPME-capillary chromatography as a solution to the screening analysis of organophosphorous pesticides in untreated environmental water samples

Consuelo Cháfer-Pericás, Rosa Herráez-Hernández and Pilar Campíns-Falcó*
Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Dr. Moliner 50, 46100
Burjassot, Valencia, Spain

Abstract

This paper describes a method for the screening of organophosphorous pesticides in water in presence of other pollutants potentially present. In-tube solid-phase microextraction (SPME) in an open GC capillary column coupled to capillary liquid chromatography (LC) with UV detection has been used to effect preconcentration, separation and detection of the analytes in the same assembly. The capillary coating was 95 % polydimethylsiloxane (PDMS)-5 % polydiphenylsiloxane. For in-tube SPME two capillaries of the same length (30 cm) and different internal diameters and coating thicknesses have been tested and compared, a 0.25 mm i.d.-0.25 μm coating thickness capillary, and a 0.1 mm of i.d.-0.1 μm of coating thickness, respectively. The proposed methodology provides limits of detection (LODs) for organophosphorous pesticides in the range 0.1-10 $\mu\text{g/L}$ which is adequate to monitorize the analyte levels in drinking water according to the European legislation. However, the direct injection method in capillary LC provides LODs in the range 50-1000 $\mu\text{g/L}$. Another method based on the on line preconcentration assisted by a solid support provides LODs in the range 0.25-50 $\mu\text{g/L}$. Triazines, polyaromatic hydrocarbons (PAHs), nonylphenol, organochloride pesticides or polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) have been evaluated as possible interferents. The reliability of the described methods is demonstrated by analysing several real water samples.

(*) Corresponding author
e-mail address: pilar.campins@uv.es

Introduction

Over the past decades the analysis of compounds used in agriculture to increase crop production, such as organophosphorous pesticides has become an important topic because, owing to their persistence and water solubility, they constitute an important source of environmental contamination [1]. There is a real need for developing analytical methods to detect these pollutants at low concentration levels, according to the limits set by the European list of priority pollutants.

Most analytical methods for pesticide analysis are based on gas chromatography (GC) [2] and liquid chromatography (LC) [3]. In the former case, detection typically entails nitrogen-phosphorous [4], electron capture [5], mass spectrometer (MS) [6] and flame photometric [7] detectors. In LC based methods detection is usually accomplished by UV [8], UV-diode-array [9], electrochemical [10] and fluorescence [11] detectors. Regardless of the separation and detection methods, analyte preconcentration and cleanup using some kind of extraction is necessary to achieve adequate sensitivity and selectivity. The type of extraction depends on the complexity of the matrix and on the characteristics of the target compounds. Off-line procedures, such as liquid-liquid extraction (LLE) [12], solid-phase extraction (SPE) [13] or ion-exchange [14] are time consuming, labour-intensive and require large volumes of sample and organic solvents. Nowadays, the general tendency is to simplify the sample preparation. SPME is very attractive because it is a solvent-free technique in which extraction and preconcentration can be carried out simultaneously, and directly from aqueous samples [15] or from the headspace above them [16]. Other recent efforts have been focused on the miniaturisation of LLE, or on the development of the single-drop microextraction (SDME) [17]. Micro solid-liquid extraction with focused ultrasound (μ SLEFU) has also been used to determine PAHs in solid matrices [18].

On-line extraction techniques with sorbents are very useful because the whole extracted analytes can be transferred to the analytical column [19]. Moreover, the sample size as well as the consumption of solvents can be substantially reduced. In this sense, in-tube SPME appears as one of the most useful approaches for on-line sample preparation. In tube-SPME is a mode of SPME which uses GC capillary columns with a proper coating on the internal surface to extract the analytes [20-22]. There are two fundamental approaches to perform in-tube SPME, active or dynamic, when the analytes are passed through the tube [23], and passive or static, when the analytes are transferred into the coating using diffusion [24]. The dynamic method can be carried out by programming an autosampler to pass the sample in and out of the extraction capillary until the equilibrium or a suitable extraction level is reached [25, 26]. Alternatively, samples can be manually injected using the extraction capillary as an injection loop [27].

In this study, an automated in-tube SPME method coupled to a capillary chromatographic LC system has been developed for the determination of organophosphorous pesticides. The reliability of the method is demonstrated through the analysis of several real water samples. These water samples were obtained from an area

with great agricultural activity, the main crops being citrus, and thus organophosphorous compounds are commonly used herbicides.

Experimental

Apparatus and chromatographic conditions

The capillary chromatographic system used consisted of a capillary pump (Agilent 1100 Series, Waldbronn, Germany) equipped with a high-pressure six port valve (Rheodyne model 7725) and with a GC capillary column as an injection loop. All the components of the system were linked with fused silica tubing (550 mm length and 50 μm i. d.). A UV detector (Hewlett-Packard, 1046 Series) and a fluorescence detector (Agilent, 1100 Series) were connected in series. The UV detector operated at 230 nm, whereas the fluorescence detector was programmed to collect the signal at variable excitation and emission wavelengths (Table 1). The detectors were coupled to a data system (Agilent, HPLC ChemStation) for data acquisition and calculation.

Reagents and Solutions

All the reagents were of analytical grade. Simazine, atrazine, propazine, ametryn, prometryn, terbutryn, parathion, fenitrothion, dlorfenvinphos, fenthion, chlorpyrifos and trifluraline were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Fensulfothion, fenamiphos, fonofos, malathion, nonylphenol, naphthalene, anthracene, fluoranthrene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, indene(1,2,3-cd)pyrene and benzo(g,h,i)perylene, endosulfan, dieldrin, DDD, alachlor, hexachlorobenzene, DDT, isodrin, DDE, lindane, aldrin, BDE-47, BDE-100 and BDE-99 were obtained from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Acetonitrile and methanol were of HPLC grade (Scharlau, Barcelona, Spain).

Stock standard solutions of the triazines (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ each), organophosphorous pesticides (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ each), PAHs (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ each), organochloride pesticides (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ each), polybrominated diphenyl ethers (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ each) and nonilphenol (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were prepared in water. Working solutions of these compounds were prepared by dilution of the stock solutions with water. Water was deionized and filtered through 0.45 μm nylon membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain). All solutions were stored in the dark at 2°C.

Columns and mobile phases

A Zorbax SB C₁₈, 150 x 0.5 mm i.d., 5 μm particle diameter column (Agilent) used for the separations of the analytes. In-tube solid-phase microextraction was carried out using two different GC capillary columns (30 cm length both) coated with 95% of PDMS and 5% of polydiphenylsiloxano (Teknokroma, Barcelona, Spain), one of 0.25 mm i.d. and 0.25 μm coating thickness, and the other with a 0.1 mm i.d. and 0.1 μm coating thickness.; the internal volumes of these capillaries were 14.7 and 2.35 μL , respectively.

These capillaries were connected to the injection valve and acted as the injection loop (Figure 1).

The mobile-phase was a mixture of acetonitrile-water in gradient elution mode at a flow rate of 10 μ L/min. The eluent was 100 % water during the 0-0.5 min time interval. Then, the acetonitrile content was increased up to 50 % at min 2. This percentage was kept constant in the 2-14 min interval. Next, the content of acetonitrile was increased to reach a percentage of 70 % at 22 min. This composition was kept constant until the end of the chromatographic run.

All solvents were filtered through 0.45 μ m nylon membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain) and degassed with helium before use.

Extraction procedure

Different sample volumes between 0.25 and 1 mL were processed in order to study the maximum preconcentration factor. Injections were manually effected at a flow rate of 0.250 mL/min. After sample injection water was passes through the GC capillary column to clean it. The cleaning step was required to eliminate the unextracted analytes. Then, desorption of the analytes was effected by injecting 10 or 2 μ L of methanol (depending on the open capillary column used). Immediately after the injection of the solvent the valve was rotated, so the analytes were transferred to the analytical column. All these experiments were done in duplicate.

Analysis of real water samples

Field water (S1), river water (S2), ground water (S3), irrigation water (S4) and 22 real waste water (S5-S26) samples were filtered through 0.45 μ m nylon membranes (Teknokroma) in order to remove any particulate matter. Samples were filtered again through nylon 0.45- μ m nylon filters (Supelco, Bellefonte, USA) immediately before their injection into the capillary chromatographic system. Each sample was analyzed in duplicate and all assays were carried out at ambient temperature.

Results and Discussion

Extraction efficiency

Two capillary GC columns with different internal diameters and coating thickness were tested for in-tube extraction of organophosphorous pesticides. For this purpose, standard solutions containing a mixture of nine organophosphorous pesticides (at a concentration of 0.1 µg/mL each compound) were processed. In preliminary tests different sample volumes in the 0.25 and 1.0 mL range were assayed. Since maximum analyte responses were obtained for most analytes when using 1.0 mL, this was the sample volume selected for further work.

The efficiencies of the in-tube SPME were calculated by comparing the amount of analyte extracted that is the amount of the analyte transferred to the analytical column, with the total amount of analyte injected in the GC extraction capillary. The amount of analyte extracted was established from the peak areas in the resulting chromatograms and the calibration equations constructed through the direct injection of 2 µL of standard solutions of the analytes in the 1-100 µg/mL concentration range. The recoveries obtained are listed in Table 2. As observed in this table, better efficiencies were generally obtained with the 0.25 mm id-0.25 µm coating thickness capillary. The same conclusion can be derived from Figure 2, which shows the chromatograms obtained for the standard solutions of organophosphorous pesticides (2a and 2b) with the two in-tube SPME devices tested. As observed in this figure, the times of retention of the tested compounds were independent on the GC capillary used.

Analytical performance

The linearity was established for organophosphorous compounds (50-500 µg/L). The calibration equations obtained for the two GC capillaries tested for in-tube SPME are presented in Table 3. The values on this table indicate that the method provided adequate linearity within the tested concentration intervals.

The repeatability and reproducibility were evaluated by calculating the intra-day and inter-day coefficients of variation, respectively. These coefficients were established by processing standard solutions of the organophosphorous pesticides containing 100 µg/L of each analyte. In all instances the values obtained were ≤ 20% (see also Table 3), and thus, they can be considered acceptable.

The LODs were determined experimentally by processing standard solutions of decreasing concentrations of the analytes. Between two consecutive injections of the analytes a blank was also processed in order to check for possible carryover or other contaminant effects. The LODs were established as concentration that produced a peak with a signal-to-noise ratio of 3. The values obtained are also listed in Table 3. As observed in this table the LODs obtained with both capillaries were comparable, although the 0.25 mm i.d.-0.25 µm film thickness capillary provided lower values especially for the organophosphorous compounds.

In Table 3 are also listed the LODs established through the direct injection of 2 μL of the standard solutions into the LC column. It can be derived that for a majority of the analytes the LODs were markedly reduced by the in-tube-SPME approaches with respect to direct injection method. The improvement is particularly important for compounds showing high LODs by the direct injection based method (e.g. fenamiphos, parathion, fenthion).

The accuracy of the described in-tube SPME procedures was studied by processing standard solutions of the analytes (100 $\mu\text{g/L}$ each). The concentrations of the analytes in these solutions were established from the calibration equations listed in Table 3. The results obtained are summarized in Table 4. As observed, the methods provided suitable accuracy, with relative errors $\leq 20\%$.

The selectivity was tested by processing standard solutions of other pollutants potentially present in water such as triazines, PAHs, nonylphenol, organochloride pesticides and PBDEs. The compounds assayed are listed in Table 5. All the compounds tested were detected in the chromatograms, which means that they were also extracted in the in-tube SPME device. However, most of them were eluted at retention times quite different of those of the analytes (see Table 5), and thus they did not interfere with the triazines and organophosphorous pesticides. As an example, the chromatogram obtained for a mixture of PAHs and nonylphenol is shown in Figure 2e. Since PAHs and nonylphenol are naturally fluorescent, the selective identification of the analytes was possible by coupling in series a fluorescence detector to the UV detector.

Application to real samples

The proposed procedures were applied to the analysis of different real water samples, field water (S1), river water (S2), ground water (S3) and irrigation water (S4). None of these samples contained the organophosphorous compounds assayed, whereas some triazines were found only in S4. The compounds found in S4 were prometryn, terbutryn and atrazine although their concentrations were close to their respective LODs (0.1 $\mu\text{g/L}$). These samples (S1-S4) were then spiked with the triazines and organophosphorous pesticides at a concentration of 100 $\mu\text{g/L}$ (each compound), and processed by the described procedures. The concentrations of the analytes found in these samples were close to the real concentrations (see Table 4) which confirmed that the proposed methods provided suitable accuracy. Moreover, no matrix effect was found for the different types of water assayed.

Finally, different real waste water samples (S5-S26) collected from different points along the coast of the Comunidad Valenciana area (Spain) were assayed, using the 0.25 mm i.d.-0.25 μm film thickness capillary for in-tube SPME. The concentrations of the analytes in these samples were characterized by the expanded uncertainty ($K=2$) estimated with the EURACHEM/CITAC Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, second edition QUAM. P1 [28]. The results obtained are summarized in Table 5. As observed in this table, fenamiphos and parathion were found in sample S12, fenitrothion was found in sample S10, and fenthion was found in samples S5-S7 and S10.

Fonofos was the compound most commonly found as it was detected in six of the samples assayed (S6, S8, S9, S10, S14, S15, S16, S18, S19, S22, S24 and S26). As an illustrative example, in Figure 3 are depicted the chromatograms obtained for sample S10, which contained some of organophosphorous compounds included in this study. Moreover, in Figure 4 are presented the chromatograms obtained from different waste water samples that contained some analytes.

Conclusions

This work describes an on-line method for the screening of triazines and organophosphorous pesticides in water using in-tube SPME and capillary LC. The in-tube SPME assembly used permits the on-line enrichment of the analytes with the advantages of minimum sample manipulation, low cost, high speed and sensitivity (the LODs are considerably reduced with respect to the direct injection of the analytes). Moreover, under the proposed conditions no matrix effects or interferences due to other pollutants potentially present in water such as triazines, PAHs, nonylphenol, organochloride pesticides or PBDEs were observed.

The proposed procedure is very simple and allows the identification and quantification of the target compounds in the range of low parts-per-billion. Therefore, it is suitable to control the water quality for organophosphorous pesticides according to the maximum concentration levels established in the EU regulations.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Ministerio de Educación y Ciencia (Projects BQU2003-06138 and CTQ2004-03088) for financial support received. C. Cháfer-Pericás expresses her gratitude to the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte of Spain for pre-doctoral grant.

References

- [1] Battershill, J. M.; Edwards, P. M.; Johnson, M. K., *Food and Chemical Toxicology*, 42 (2004) 1279.
- [2] Solé, M.; Porte, C.; Barcelo, D.; Albaiges, J., *Marine Pollution Bulletin*, 40 (2000) 746.
- [3] Gou, Y.; Eisert, R.; Pawliszyn, J., *J. Chromatogr. A*, 873 (2000) 137.
- [8] Beltran, J.; López, F. J.; Hernández, F., *J. Chromatogr. A*, 885 (2000) 389.
- [9] Lekkas, T.; Kolokythas, G.; Nikolau, A.; Kostopoulou, M., *Environment International*, 30 (2004) 995.
- [4] Berrada, H.; Font, G.; Moltó, J. C., *J. Chromatogr. A*, 890 (2000) 303.
- [5] Li, H-P.; Li, G-C.; Jen, J-F, *J. Chromatogr. A*, 1012 (2003) 129.
- [10] Sánchez, A.; Sampedro, M. C.; Unceta, N.; Goicolea, M. A.; Barrio, R. J., *J. Chromatogr. A*, 1094 (2005) 70.
- [11] Muñoz de la Peña, A.; Mahedero, M. C.; Bautista, A., *J. Chromatogr. A*, 950 (2002) 287.
- [6] Lacorte, S.; Guiffard, I.; Fraisse, D.; Barceló, D., *Anal. Chem.*, 72 (2000) 1430.
- [7] Su, P-G.; Huang, S-D., *Talanta*, 49 (1999) 393.
- [12] Jiménez, J. J.; Bernal, J. L.; del Nozal, M. J.; Alonso, C., *J. Chromatogr. A*, 1048 (2004) 89.
- [13] Mezcuca, M.; Agüera, A.; Llibeira, J. L.; Cortés, M. A.; Bagó, B.; Fernández-Alba, A., *J. Chromatogr. A* 1109 (2006) 222.
- [14] Legrouri, A.; Lakraimi, M.; Barroug, A.; De Roy, A.; Besse, J. P., *Water Research*, 39 (2005) 3441.
- [15] Yao, Z.; Jiang, G.; Liu, J.; Cheng, W., *Talanta* 55 (2001) 807.
- [16] Ai, J., *Anal. Chem.*, 69 (1997) 1230.
- [17] Lambropoulou, D.; Psillakis, E.; Albanis, T.; Kalogerakis, N., *Anal. Chim. Acta*, 516 (2004) 205.
- [18] Capelo, J. L.; Galesio, M. M.; Felisberto, G. M.; Vaz, C.; Costa, J., *Talanta*, 66 (2005) 1272.
- [19] Asperger, A.; Efer, J.; Koal, T.; Engewald, W., *J. Chromatogr. A*, 960 (2000) 109.
- [20] Eisert, R.; Pawliszyn, J., *Anal. Chem.*, 69 (1997) 3140.
- [21] Fan, Y.; Feng, Y-Q.; Shi, Z-G.; Wang, J-B., *Anal. Chim. Acta*, 543 (2005) 1.
- [22] Nardi, L., *J. Chromatogr. A* 985 (2003) 39.
- [23] Saito, Y.; Jinno, K., *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 53.
- [24] Lord, H.; Pawliszyn, J., *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 153.
- [25] Wu, J.; Pawliszyn, J., *Anal. Chem.* 73 (2001) 55.
- [26] Wu, J.; Tragas, C.; Lord, H.; Pawliszyn, J., 976 (2002) 357.
- [27] Fan, Y.; Feng, Y-Q.; Da, S-L.; Wang, Z-H., *Talanta*, 65 (2005) 111.
- [28] EURACHEM/CITAC (1995, *Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, 2nd. ed., 2000.

Table 1. Programme of excitation and emission wavelengths for the fluorescence detector.

Time (min)	Excitation wavelength (nm)	Emission wavelength (nm)
0	275	300
15	280	330
25	250	375
29	280	420
35	290	430
42	300	500
47	290	410

Table 2. Efficiencies obtained with the two GC capillary columns tested for in-tube SPME (n=6), the triazine data were obtained from a previous work.

Compound	Recovery* (%)	
	0.1 mm id-0.1 μ m coating thickness capillary	0.25 mm id-0.25 μ m coating thickness capillary
Fensulfothion	1.96 \pm 0.04	1.72 \pm 0.05
Fenamiphos	2.29 \pm 0.08	2.61 \pm 0.08
Parathion	0.50 \pm 0.03	0.136 \pm 0.016
Fenitrothion	9.5 \pm 1.4	13 \pm 2
Clorfenvinphos	2.9 \pm 0.7	2.5 \pm 0.5
Fenthion	12 \pm 2	26 \pm 2
Fonophos	12.4 \pm 1.5	43 \pm 7
Clorpiriphos	2.6 \pm 0.3	4 \pm 0.5
Trifluraline	9.6 \pm 1.3	28 \pm 4

(*) – Values established from standard solutions containing 0.1 μ g/mL of each analyte; volume of sample, 1 mL.

Table 3. Analytical data obtained for the analytes with both GC columns tested.

Compound	LOD ^a with direct injection ng/mL	0.1 mm id - 0.1 μm coating thickness capillary				0.25 mm id - 0.25 μm coating thickness capillary			
		Linearity (n= 5) y= a + bx	Reproducibility ^b C.V.(%)		LOD ng/mL	Linearity (n= 5) y= a + bx	Reproducibility ^b C.V.(%)		LOD ng/mL
			Intra- day (n= 3)	Inter- day (n= 6)			Intra- day (n= 3)	Inter- day (n= 6)	
Fensulfothion	50	a ± s _a : 40 ± 6 b ± s _b : 780 ± 30 R ² = 0.99	7	10	1	a ± s _a : 2 ± 20 b ± s _b : 880 ± 90 R ² =0.97	29	28	1
Fenamiphos	100	a ± s _a : 52 ± 5 b ± s _b : 970 ± 20 R ² = 0.99	4	12	1	a ± s _a : 74 ± 17 b ± s _b : 900 ± 70 R ² = 0.98	4	9	1
Parathion	100	a ± s _a : 680 ± 30 b ± s _b : 30 ± 10 R ² = 0.99	11	15	1	a ± s _a : 10 ± 14 b ± s _b : 900 ± 60 R ² = 0.99	18	13	1
Malathion	1000	a ± s _a : 91 ± 5 b ± s _b : 3.6 ± 1.1 R ² = 0.99	8	18	10	a ± s _a : 7.3 ± 0.5 b ± s _b : 45.2 ± 1.7 R ² = 0.99	12	25	10
Fenitrothion	100	a ± s _a : 1075 ± 115 b ± s _b : 70 ± 30 R ² = 0.97	4	19	5	a ± s _a : 30 ± 40 b ± s _b : 1800 ± 160 R ² = 0.97	9	16	0.1
Clorfenvinphos	100	a ± s _a : 731 ± 61 b ± s _b : 100.5 ± 14.5 R ² = 0.98	3	14	5	a ± s _a : 104 ± 17 b ± s _b : 1120 ± 70 R ² = 0.99	3	11	1
Fenthion	100	a ± s _a : 2100 ± 200 b ± s _b : 150 ± 50 R ² = 0.97	4	17	1	a ± s _a : 270 ± 50 b ± s _b : 5100 ± 200 R ² = 0.97	9	8	0.1
Fonofos	50	a ± s _a : 3070 ± 119 b ± s _b : 140 ± 30 R ² = 0.99	4	10	0.1	a ± s _a : 350 ± 40 b ± s _b : 8900 ± 200 R ² = 0.99	7	16	0.1
Clorpiriphos	50	a ± s _a : 5158.5 ± 100.9 b ± s _b : -40 ± 20 R ² = 0.99	11	25	1	a ± s _a : 60 ± 30 b ± s _b : 15000 ± 120 R ² = 0.99	4	16	0.1
Trifluraline	50	a ± s _a : 6700 ± 200 b ± s _b : -90 ± 50 R ² = 0.99	19	14	1	a ± s _a : -200 ± 100 b ± s _b : 20800 ± 400 R ² = 0.99	8	15	0.1

(a) - obtained from the direct of 2 μL of the standards into the capillary LC column

(b) – established at a concentration of 0.1 μg/mL

Table 4. Accuracy obtained for triazines (data extracted form a previous work) and organophosphorous compounds in different water samples by the in-tube SPME-capillary LC methods (n=3).

Compound	Determined concentration* ($\mu\text{g/mL}$)/ E_r (%)				
	0.1 mm id - 0.1 μm coating thickness capillary				
	S1	S2	S3	S4	Standard
Fensulfothion	0.10 \pm 0.01 / 0	0.101 \pm 0.011 / 1	0.113 \pm 0.012 / 13	0.086 \pm 0.007 / -14	0.12 \pm 0.01 / 20
Fenamiphos	0.102 \pm 0.006 / 2	0.091 \pm 0.012 / -9	0.09 \pm 0.011 / -10	0.097 \pm 0.008 / -3	0.11 \pm 0.02 / 10
Parathion	0.106 \pm 0.006 / 6	0.08 \pm 0.02 / -20	0.12 \pm 0.04 / 20	0.102 \pm 0.003 / 2	0.12 \pm 0.02 / 20
Malathion	0.08 \pm 0.02 / -20	0.066 \pm 0.012 / -34	0.14 \pm 0.04 / 40	0.11 \pm 0.03 / 10	0.09 \pm 0.03 / -10
Fenitrothion	0.088 \pm 0.009 / -12	0.084 \pm 0.005 / -16	0.11 \pm 0.02 / 10	0.09 \pm 0.02 / -10	0.12 \pm 0.04 / 20
Clorfenvinphos	0.11 \pm 0.02 / 10	0.107 \pm 0.007 / 7	0.119 \pm 0.012 / 19	0.096 \pm 0.017 / -4	0.11 \pm 0.04 / 10
Fenthion	0.10 \pm 0.01 / 0	0.091 \pm 0.003 / -9	0.099 \pm 0.019 / -1	0.098 \pm 0.014 / -2	0.12 \pm 0.04 / 20
Fonofos	0.100 \pm 0.007 / 0	0.101 \pm 0.005 / 1	0.115 \pm 0.017 / 15	0.102 \pm 0.014 / 2	0.12 \pm 0.02 / 20
Clorpiriphos	0.093 \pm 0.015 / -7	0.093 \pm 0.016 / -7	0.101 \pm 0.013 / 1	0.11 \pm 0.04 / 10	0.091 \pm 0.008 / -9
Trifluraline	0.090 \pm 0.013 / -10	0.097 \pm 0.007 / -3	0.09 \pm 0.01 / -10	0.11 \pm 0.03 / 10	0.095 \pm 0.015 / -5

(*)- Added concentration, 0.1 $\mu\text{g/mL}$.

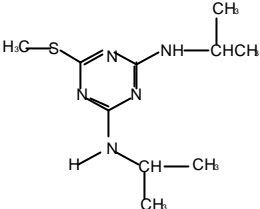
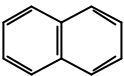
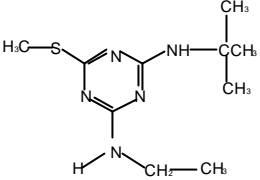
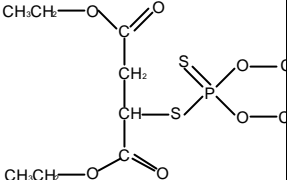
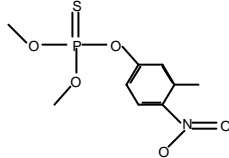
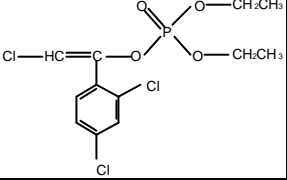
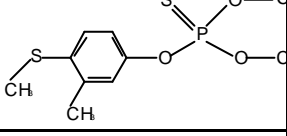
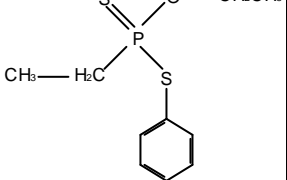
Table 4. Accuracy obtained for triazines (data obtained from a previous work) and organophosphorous compounds in different water samples by the in-tube SPME-capillary LC methods (n=3).

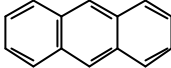
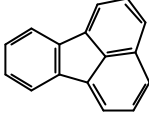
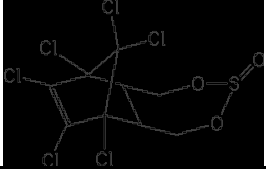
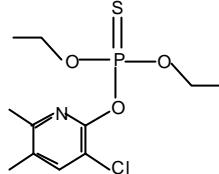
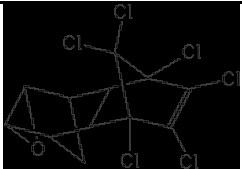
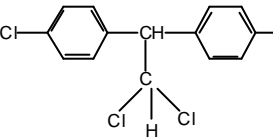
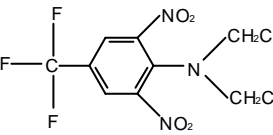
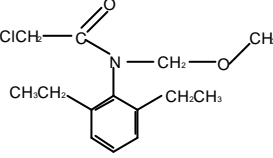
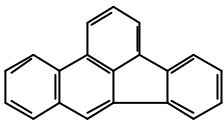
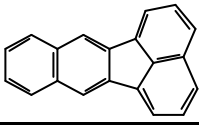
Compound	Determined concentration* ($\mu\text{g/mL}$) / E_r (%)				
	0.25 mm id - 0.25 μm coating thickness capillary				
	SI	SI	SI	SI	SI
Fensulfothion	0.092 \pm 0.018 / -8	0.092 \pm 0.018 / -8	0.092 \pm 0.018 / -8	0.092 \pm 0.018 / -8	0.092 \pm 0.018 / -8
Fenamiphos	0.104 \pm 0.006 / 4	0.104 \pm 0.006 / 4	0.104 \pm 0.006 / 4	0.104 \pm 0.006 / 4	0.104 \pm 0.006 / 4
Parathion	0.102 \pm 0.003 / 2	0.102 \pm 0.003 / 2	0.102 \pm 0.003 / 2	0.102 \pm 0.003 / 2	0.102 \pm 0.003 / 2
Fenitrothion	0.1145 \pm 0.0014 / 14.5	0.1145 \pm 0.0014 / 14.5	0.1145 \pm 0.0014 / 14.5	0.1145 \pm 0.0014 / 14.5	0.1145 \pm 0.0014 / 14.5
Clorfenvinphos	0.102 \pm 0.002 / 2	0.102 \pm 0.002 / 2	0.102 \pm 0.002 / 2	0.102 \pm 0.002 / 2	0.102 \pm 0.002 / 2
Fenthion	0.1086 \pm 0.0010 / 8.6	0.1086 \pm 0.0010 / 8.6	0.1086 \pm 0.0010 / 8.6	0.1086 \pm 0.0010 / 8.6	0.1086 \pm 0.0010 / 8.6
Fonofos	0.095 \pm 0.006 / -5	0.095 \pm 0.006 / -5	0.095 \pm 0.006 / -5	0.095 \pm 0.006 / -5	0.095 \pm 0.006 / -5
Clorpiriphos	0.0953 \pm 0.0019 / -5	0.0953 \pm 0.0019 / -5	0.0953 \pm 0.0019 / -5	0.0953 \pm 0.0019 / -5	0.0953 \pm 0.0019 / -5
Trifluraline	0.089 \pm 0.006 / -11	0.089 \pm 0.006 / -11	0.089 \pm 0.006 / -11	0.089 \pm 0.006 / -11	0.089 \pm 0.006 / -11

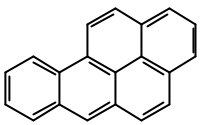
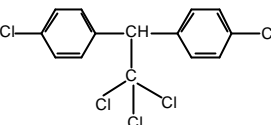
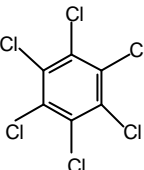
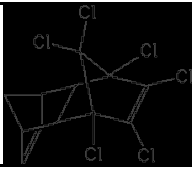
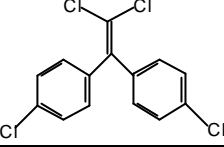
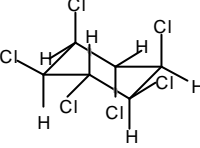
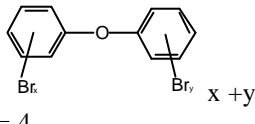
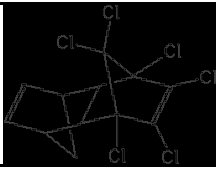
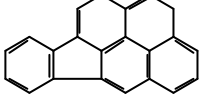
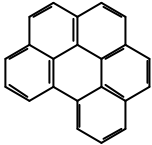
(*)- Added concentration, 0.1 $\mu\text{g/mL}$.

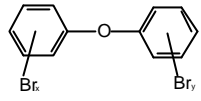
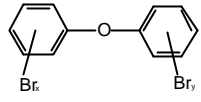
Table 5. Summary of the retention times and found concentrations of the analytes and other potential contaminants in water samples analysed by means the in-tube SPME with 0.25 mm id - 0.25 μm coating thickness capillary.

Compound	t_R (min)	Sample: concentration found ($\mu\text{g/L}$)	Structure
Simazine ^{2,3,*}	10,9	-	
Fensulfothion	11,86	-	
Atrazine ^{2,3,*}	12,39	-	
Nonylphenol ³	12,87	-	
Propazine	13,54	-	
Ametryn [*] (fluorescent)	14,57	-	
Fenamiphos [^]	14,97	S12: 4 \pm 1	
Parathion [*]	17,60	S12: 28 \pm 8	

Prometryn	17,84	-	
Naphthalene ^{2,3} (fluorescent)	18,59	-	
Terbutryn [*]	18,83	-	
Malathion [^]	19,80	-	
Fenitrothion [^]	20,58	S10: 23 ± 8	
Clorfenvinphos ^{3,*}	21,74	-	
Fenthion [*]	24,25	S5: 16 ± 2 S6: 136 ± 15 S7: 2.9 ± 0.3 S10: 34 ± 4	
Fonofos [*]	25,59	S6: 33 ± 7 S8: 8 ± 3 S9: 6 ± 2 S10: 1.0 ± 0.4 S14: 0.8 ± 0.3 S15: 16 ± 5 S16: 15 ± 5 S18: 22 ± 6 S19: 18 ± 6 S22: 2.3 ± 0.7	

		S24: 4 ± 1 S26: 5 ± 1	
Anthracene ³ (fluorescent)	26,6	-	
Fluoranthene ³ (fluorescent)	28,33	-	
Endosulfan ^{3,*}	29,48	-	
Clorpyrifos ^{1,3,*}	31,24	-	
Dieldrin	31,50	-	
DDD	31,87	-	
Trifluraline ³	31,93	-	
Alachlor ³	32,82	-	
Benzo(b)fluoranthene ³ (fluorescent)	36,20	-	
Benzo(k)fluoranthene ³ (fluorescent)	37,15	-	

Benzo(a)pyrene (fluorescent)	37,74	-	
DDT	38,06	-	
Hexachlorobencene ³	39,44	-	
Isodrin	40,16	-	
DDE	40,51	-	
Lindane [*]	40,56	-	
BDE-47	41,36	-	 Br, Br, x + y = 4
Aldrin	43,86	-	
Indene(1,2,3-cd)pyrene ³ (fluorescent)	44,22	-	
Benzo(g,h,i)perylene ³ (fluorescent)	46,50	-	

BDE-100	48,54	-	 $= 5$
BDE-99	50,91	-	 $= 5$

¹ Active substance includes in Annex 1 of Directive 91/414/CEE, modified by Directive 2005/53/CE

* Active substance excludes from Annex 1 of Directive 91/414/CEE, modified by Directive 2005/53/CE

^ Active substance pending from community revision of Directive 91/414/CEE, modified by Directive 2005/53/CE.

² II List: Directive 2000/60/CE of European Parliament and Decision 2455/2001/CE

³ Priority List: Directive 2000/60/CE of European Parliament and Decision 2455/2001/CE

Figure captions

- Figure 1** Schematic diagram for the on-line in-tube SPME coupled to capillary LC.
- Figure 2** Chromatograms obtained under the optimum conditions for organophosphorous compounds with (a) the 0.1 mm i.d.-0.1 μm film thickness capillary, and (b) the 0.25 mm i.d.-0.25 μm film thickness capillary. Concentration of organophosphorous pesticides, 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (each compound). For other experimental details, see text.
- Figure 3** Chromatograms obtained under the optimum conditions with the 0.25 mm i.d.-0.25 μm film thickness capillary for: (a) two replicates of sample S10, (b) sample S10 spiked with the organophosphorous pesticides (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ each). For other experimental details, see text.
- Figure 4** Chromatograms obtained under the optimum conditions for different waste water samples containing some analytes: (a) S14, (b) S16, (c) S18, (d) S12, (e) S24 and (f) S6.

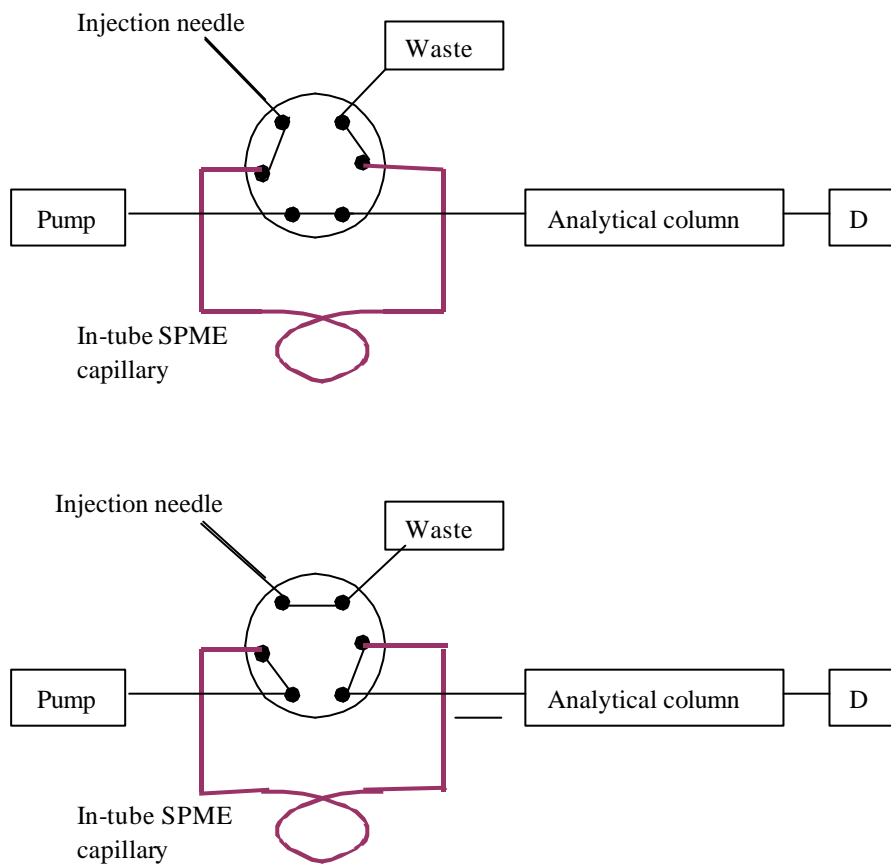


Figure 1

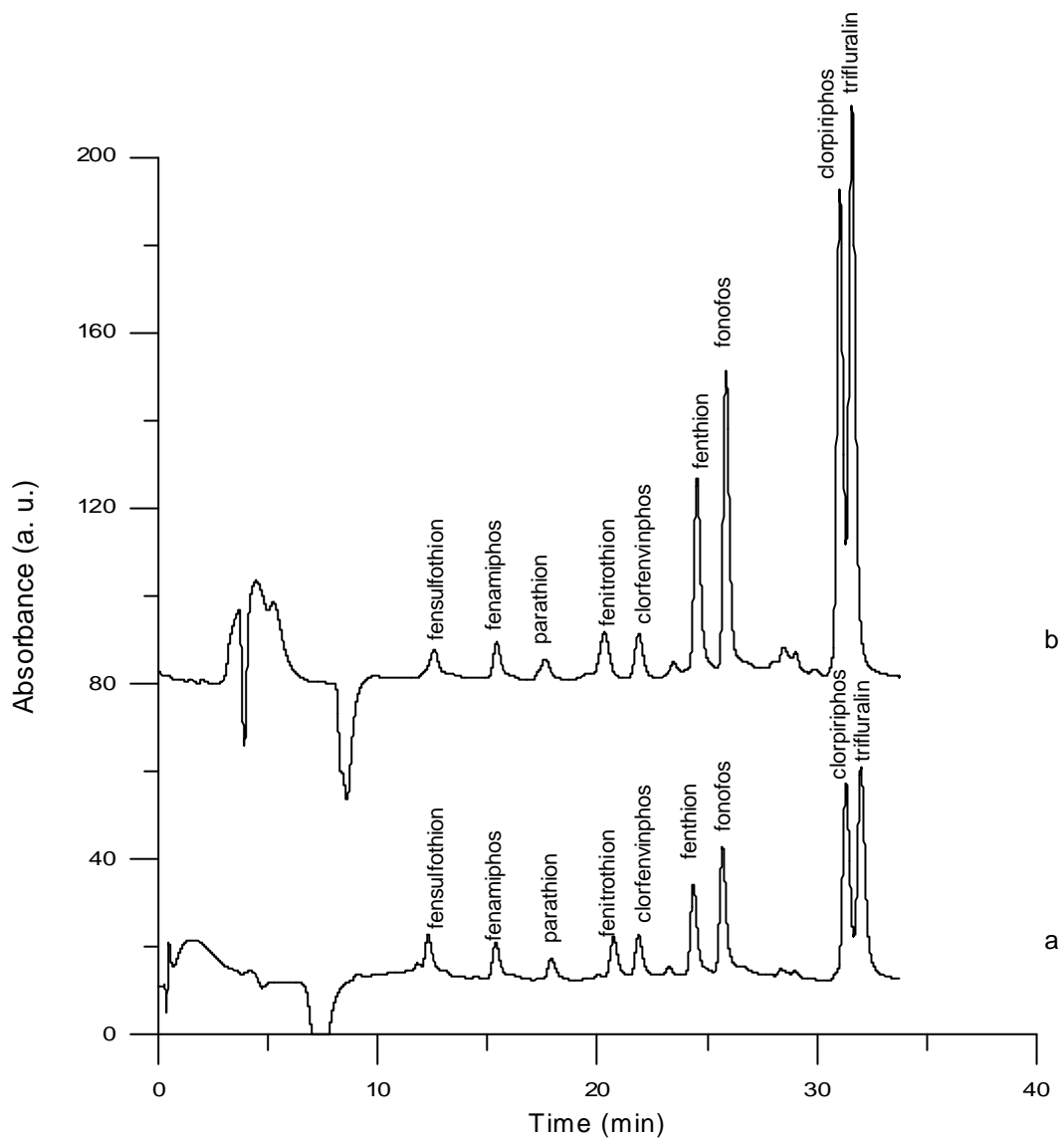


Figure 2

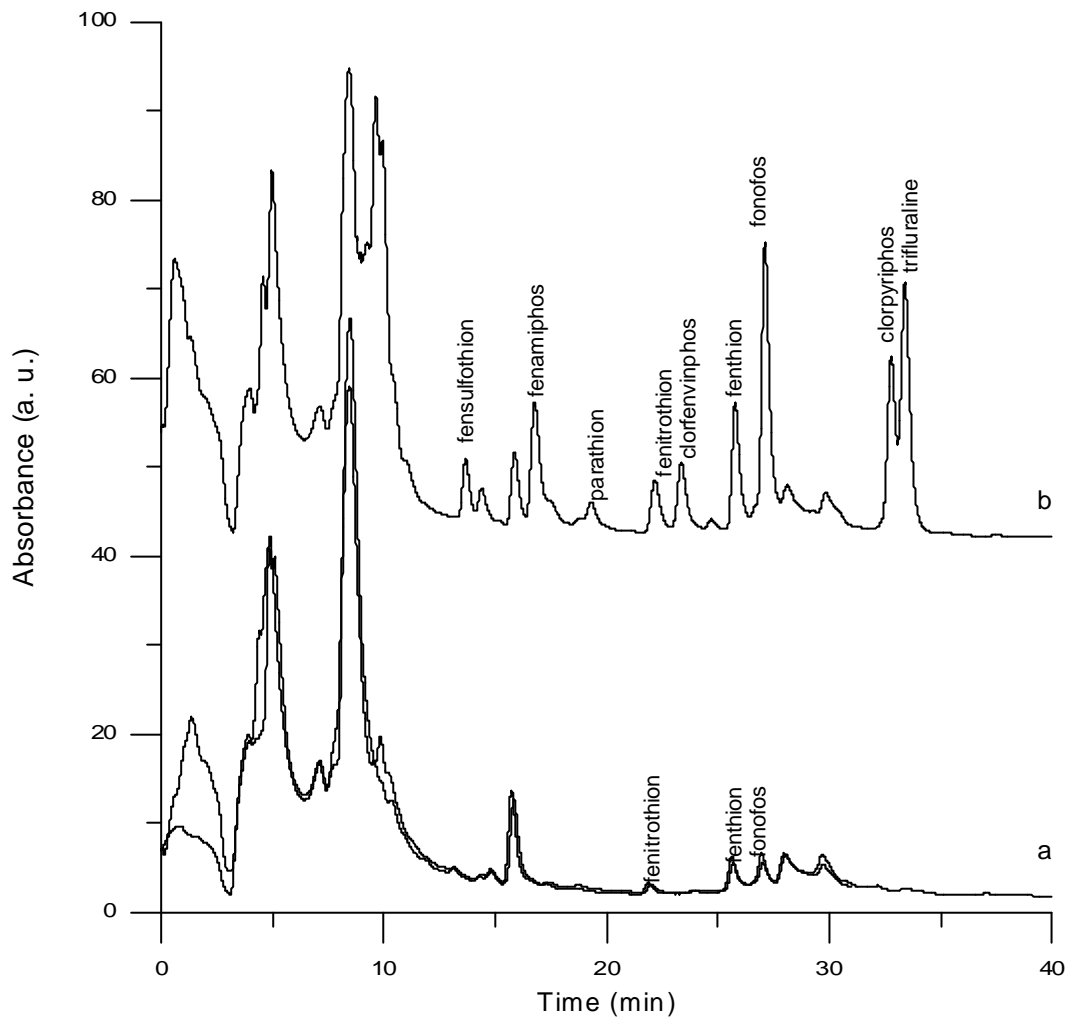


Figure 3

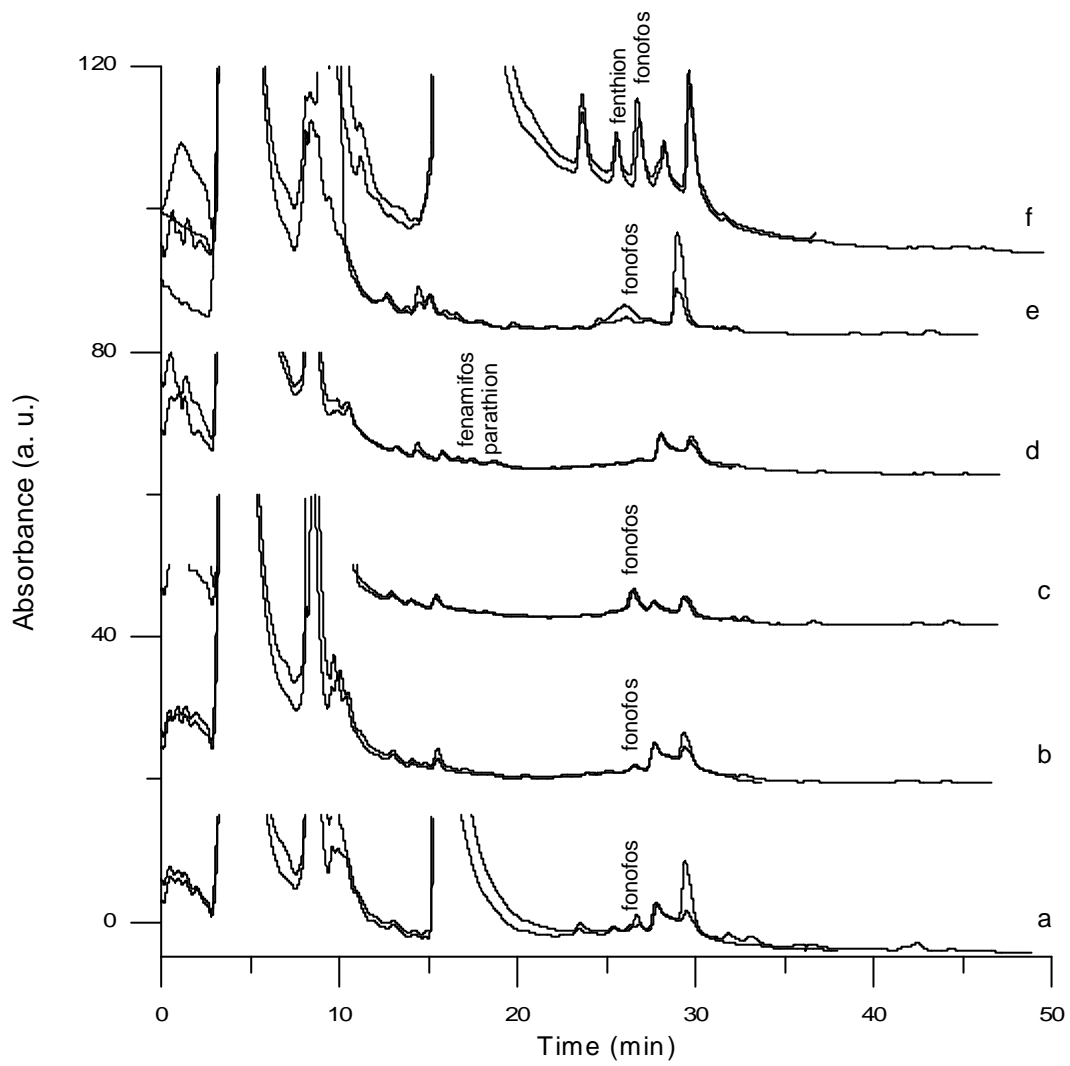


Figure 4