



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA (Q*) Facultat de Química

Departamento de Química Analítica

**Desarrollo de nuevas estrategias de microextracción.
Aplicación a la determinación de filtros UV en muestras
de agua de interés medioambiental**

Memoria presentada para la obtención
del título de Doctor por
Juan Luis Benedé Veiga
2016

Programa de Doctorado
“Técnicas Experimentales en Química”

Directores:

Alberto Chisvert Sanía
Amparo Salvador Carreño

D. Alberto Chisvert Sanía, Profesor Titular de Universidad, y Dña. Amparo Salvador Carreño, Catedrática de Universidad, ambos pertenecientes al Departamento de Química Analítica de la Universitat de València, en calidad de Directores de la Tesis Doctoral presentada por **Juan Luis Benedé Veiga**, con el título *“Desarrollo de nuevas estrategias de microextracción. Aplicación a la determinación de filtros UV en muestras de agua de interés medioambiental”*,

HACEN CONSTAR:

Que han dirigido y supervisado tanto los aspectos científicos como los aspectos formales de la realización de dicha Tesis Doctoral y de la elaboración de la memoria presentada y que, en su opinión, cumple los requisitos necesarios para que pueda procederse a su defensa.

Por ello **INFORMAN FAVORABLEMENTE** la solicitud de depósito de la Tesis Doctoral.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Valencia, a 21 de Marzo de 2016.

Prof. Dr. Alberto Chisvert

Prof. Dra. Amparo Salvador

Agradecimientos

Con las palabras de estas primeras páginas me gustaría agradecer a todas las personas que han contribuido, de una manera u otra, a llegar a este momento de poder escribir los agradecimientos de la Tesis.

En primer lugar, como no, a mis directores de Tesis, Alberto y Amparo, que me dieron la oportunidad de trabajar a su lado desde hace siete años, aportándome los conocimientos necesarios tanto a nivel científico como personal y que han permitido que llegue a completar esta etapa. Os considero unos referentes del buen trabajo y del buen hacer, siempre queriendo que esté perfecto. Esta Tesis también es vuestra. Gracias.

También agradecer al Prof. Dimos Giokas que, pese a estar en la distancia, siempre ha estado presente aportando su granito de arena en el desarrollo de los trabajos, y permitiéndome realizar una estancia de cuatro meses en su grupo de investigación en Ioannina. Ευχαριστώ πολύ.

A mis compañeros de laboratorio que he tenido durante este tiempo, por todo el trabajo que hemos realizado juntos y, sobre todo, por esos momentos distendidos de risas que ayudaban a acabar el día con una sonrisa. Mención especial merece Iсуha, que tras coincidir en el colegio, instituto y facultad (pese a no conocernos ni hablarnos), el destino quiso que acabáramos trabajando en el mismo grupo de investigación. Gracias a ello, puedo considerarte mi mejor amiga, con todos los momentos geniales que hemos vivido juntos tanto dentro como fuera del laboratorio. Y por todo el apoyo y asesoramiento, tan importante en muchísimas ocasiones, en los trabajos y en la realización de esta Tesis. Por algo eres P.E. Espero seguir contando contigo por mucho tiempo.

También agradecer a todos los compañeros del departamento que he tenido durante estos años, tan majos y simpáticos, que han hecho que los momentos de la comida fueran uno de los más divertidos del día (además de alguna que otra cena y viaje...).

Gracias a todas las amistades que he mantenido o comenzado en el transcurso de estos años que, aunque no nos veamos en el día a día, también me acuerdo de los momentos vividos y que han ayudado a “desconectar” cuando lo he necesitado.

A mi familia, y en especial a mi madre, por ayudar a ser quien soy, tanto en lo bueno como en lo malo.

Y, por supuesto, a Álex. Pese a ser la última persona que ha aparecido en mi vida de todas las que nombro aquí, te has convertido en el pilar más importante de todos. Tuve mucha suerte en encontrarte. Gracias por estar ahí a mi lado cada día y por tu paciencia.

Finalmente, gracias a la Generalitat Valenciana por la beca predoctoral concedida y la ayuda durante la estancia.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	5
ABSTRACT (resumen traducido al inglés)	9
SECCIÓN I. INTRODUCCIÓN	13
Capítulo 1. Técnicas de (micro)extracción	15
1.1. Técnicas de extracción.....	17
1.2. Técnicas de microextracción en fase sólida.....	18
1.3. Técnicas de microextracción en fase líquida	26
Capítulo 2. Filtros UV	37
2.1. Los filtros UV en la Unión Europea	39
2.2. Clasificación de los filtros UV	42
2.3. Métodos analíticos para la determinación de filtros UV	46
2.3.1. Productos cosméticos.....	46
2.3.2. Cuerpo humano	47
2.3.3. Medio ambiente: aguas y suelos de origen medioambiental..	48
2.4. Antecedentes sobre la determinación de filtros UV en aguas de origen medioambiental	49
2.4.1. Técnicas de analíticas	55
2.4.2. Técnicas de extracción.....	56
2.4.3. Muestras de agua analizadas	61
SECCIÓN II. RESUMEN DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES	63
Capítulo 3. Desarrollo de un método analítico para la determinación de filtros UV en las fracciones soluble y particulada de agua de mar mediante microextracción líquido-líquido dispersiva y cromatografía de gases- espectrometría de masas	65
Capítulo 4. Desarrollo de una nueva técnica de microextracción: microextracción sobre agregado formado in situ. Aplicación a la determinación de filtros UV en muestras de agua	89
Capítulo 5. Desarrollo de una nueva técnica de microextracción: microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora mediada	

por nanopartículas magnéticas. Aplicación a la determinación de filtros UV en muestras de agua	113
Capítulo 6. Desarrollo de un método analítico para la determinación de filtros UV mediante microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora acoplada a desorción térmica – cromatografía de gases – espectrometría de masas	135
Capítulo 7. Desarrollo de un método analítico para la determinación de filtros UV hidrofílicos mediante microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora mediada por composites magnéticos	151
CONCLUSIONES GENERALES	175
FINAL CONCLUSIONS (conclusiones traducidas al inglés)	181
BIBLIOGRAFÍA	187
LISTA DE ACRÓNIMOS	211
ANEXO	
ARTÍCULOS PUBLICADOS	217
Determination of UV filters in both soluble and particulate fractions of seawaters by dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry	
In-situ suspended aggregate microextraction: A sample preparation approach for the enrichment of organic compounds in aqueous solutions	
Development of stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles and its analytical application to the determination of hydrophobic organic compounds in aqueous media	
Determination of ultraviolet filters in bathing waters by stir bar sorptive-dispersive microextraction coupled to thermal desorption – gas chromatography – mass spectrometry	
Stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles-nylon 6 composite for the extraction of hydrophilic organic compounds in aqueous media	

RESUMEN

RESUMEN

Las técnicas de microextracción aportan numerosas ventajas a la etapa de preparación de la muestra. Algunas de estas técnicas están actualmente bien establecidas y se han implementado en numerosos laboratorios analíticos, aunque también se han descrito algunas limitaciones.

En la presente Tesis Doctoral se ha contribuido al desarrollo y validación de nuevas estrategias analíticas basadas en técnicas de microextracción, y se han aportado algunas mejoras a las ya existentes, obteniéndose buenas características como rapidez, bajo coste, simplicidad y respeto hacia el medio ambiente y el operador (“*Química Verde*”). Para evaluar la aplicabilidad de estas nuevas estrategias, se han aplicado a la determinación de “Filtros UV” en muestras de agua. Debe señalarse que los filtros UV son un grupo de ingredientes cosméticos ampliamente utilizados en productos para la protección solar, además de en otros productos cosméticos de uso cotidiano. Estos ingredientes cosméticos se han catalogado como contaminantes emergentes, ya que pueden provocar efectos adversos en el medio ambiente acuático, al que llegan con relativa facilidad. Es por ello que resulta interesante su determinación.

Esta Tesis Doctoral se ha estructurado en siete capítulos.

La Sección I, constituida por los Capítulos 1 y 2, corresponde a la **Introducción**, en la que se describen algunos conceptos fundamentales, los antecedentes del tema y las metodologías analíticas seguidas en la presente Tesis Doctoral. En este sentido:

- En el **Capítulo 1** se resume la evolución que han sufrido las técnicas de microextracción, mencionando las ventajas e inconvenientes de cada una de ellas, y presentando las aportaciones realizadas en esta Tesis Doctoral sobre el desarrollo de nuevas técnicas de microextracción
- En el **Capítulo 2** se incluye información general sobre los filtros UV, incluyendo su clasificación y su empleo en los productos cosméticos. También se discute su presencia en el cuerpo humano y, especialmente, en el medioambiente, y se realiza una revisión exhaustiva de los métodos analíticos empleados para la

determinación de filtros UV en muestras de agua de origen medioambiental, dado que es el tema de la presente Tesis Doctoral

En los cinco capítulos incluidos en la Sección II se recoge el **trabajo experimental**, así como los **resultados** obtenidos a lo largo de esta Tesis Doctoral. Al final de cada capítulo se exponen las conclusiones más relevantes obtenidas en cada uno de los estudios realizados.

- En el **Capítulo 3** se describe un método analítico, basado en la microextracción líquido-líquido dispersiva, que permite la determinación del contenido total de filtros UV en muestras de agua de mar, determinándolos tanto en la fracción soluble como en la materia particulada
- En el **Capítulo 4** se presenta una nueva técnica de microextracción basada en la formación *in situ* de un agregado supramolecular como fase de extracción
- En los **Capítulos 5 a 7** se desarrolla una nueva técnica de microextracción mediada por materiales magnéticos como fase de extracción, siendo validada mediante la determinación de filtros UV lipofílicos e hidrofílicos en muestras de agua de origen medioambiental de diferente naturaleza

Cabe mencionar que el trabajo incluido en el **Capítulo 4** fue realizado en una estancia predoctoral de cuatro meses en el Departamento de Química de la Universidad de Ioannina (Grecia) bajo la supervisión del Prof. Dimosthenis L. Giokas.

Para finalizar, se presentan las **Conclusiones generales** de esta Tesis Doctoral y, como Anexo, se incluyen las publicaciones científicas a las que ha dado lugar.

ABSTRACT

ABSTRACT

Microextraction techniques provide numerous advantages to sample preparation step. Some of these techniques can nowadays be considered well established and have been implemented in many analytical laboratories, although some limitations have been also described.

In this PhD thesis, new analytical strategies based on microextraction techniques have been developed and evaluated based on their analytical characteristics. These methods offers many advantages to sample preparation including simplicity, rapid analysis time, cost-effectiveness and being both user and environmentally friendly according to the so-called “Green Chemistry”. These novel approaches have been applied to the determination of “UV filters” in water samples. It should be said that UV filters are a group of cosmetic ingredients nowadays used in many cosmetic products, in addition to those exclusively designed for sun protection (i.e. sunscreens). These cosmetic ingredients have been catalogued as emergent contaminants since they could cause harmful effects on the aquatic environment. In these sense, their determination is of high interest.

This PhD thesis is divided into seven chapters.

Some fundamental concepts, the background of the topic and the methodologies used in this PhD thesis are described in Section I, **Introduction**. In this sense:

- The evolution of the microextraction techniques, their advantages and limitations and the contributions of this PhD thesis to the development of new microextraction techniques are summarized in **Chapter 1**
- General information about UV filters, their classification and their use in cosmetic products are included in **Chapter 2**. Moreover, their presence in the human body as well as in the environment, and an exhaustive compilation of analytical methods employed to the determination of UV filters in environmental water samples are also included in this chapter

The **experimental work** and the **results** obtained along this PhD thesis are presented in Section II. The most relevant conclusions of each study are presented at the end of each chapter.

- A method to determine UV filters not only in the soluble fraction but also in the particulate fraction (i.e. that adhered to suspended particles) of seawater samples, based on dispersive liquid-liquid microextraction, is described in **Chapter 3**
- A new microextraction technique based on the *in situ* formation of a supramolecular aggregate as extractant phase is presented in **Chapter 4**
- A novel microextraction technique mediated by magnetic materials as extractant phase is developed in **Chapters 5 to 7**

It should be point out that the work included in **Chapter 4** was carried out in a pre-doctoral stay for four months in the Department of Chemistry of the University of Ioannina (Greece) under the supervision of Prof. Dismothenis L. Giokas.

Finally, the **General conclusions** of this doctoral thesis are shown and the published articles obtained from the work performed in this PhD thesis are included as Annex.

SECCIÓN I
INTRODUCCIÓN

Capítulo 1

Técnicas de (micro)extracción

1.1. Técnicas de extracción

La preparación de la muestra es una de las etapas más cruciales para alcanzar el éxito de cualquier método analítico. Esta etapa del método analítico tiene tres objetivos principales: 1) separación de los analitos de posibles sustancias interferentes, 2) preconcentración de los analitos, para mejorar los límites de detección y cuantificación y/o 3) acondicionamiento de la muestra a los requerimientos del instrumento de medida [1]. En este sentido, las técnicas de extracción juegan un papel muy importante, especialmente en el análisis de compuestos a nivel de trazas, ya que permiten la separación y preconcentración en una sola etapa. Cabe señalar que las técnicas de extracción están en continuo desarrollo con la finalidad de mejorar su rapidez y versatilidad, así como reducir algunos de los problemas asociados al elevado consumo de tiempo, muestra y disolventes.

La técnica de extracción tradicional más empleada ha sido la **extracción líquido-líquido** (LLE, del inglés *liquid-liquid extraction*) [2], en la que los analitos se transfieren desde un disolvente a otro inmisible por el que tienen una mayor afinidad. Sin embargo, la aparente sencillez de LLE presenta numerosos inconvenientes ya que se trata de una técnica lenta que requiere volúmenes grandes tanto de muestra como de disolventes orgánicos, que en general son tóxicos para el usuario y el medio ambiente, y de coste elevado. Además, a menudo se precisa realizar un gran número de repeticiones sucesivas para conseguir buenos rendimientos, lo que puede ocasionar resultados inexactos debido a pérdidas de analito.

Por otra parte, la **extracción en fase sólida** (SPE, del inglés *solid-phase extraction*) está basada, generalmente, en el empleo de un sorbente sólido confinado en el interior de cartuchos o discos de extracción como medio de retención de los analitos al hacer pasar la disolución de la muestra a su través. Tras una etapa de limpieza, se hace pasar un disolvente por el que los analitos presentan una mayor afinidad que por la fase sólida y son por ello eluidos [2]. A pesar de que se disminuye el consumo de disolventes respecto a LLE, el tiempo necesario para llevar a cabo la extracción es considerable y, a menudo, se requiere la evaporación del disolvente de elución para preconcentrar el extracto obtenido. Además, la posible co-elución de otros compuestos de la matriz puede interferir en la

determinación de los analitos. También es necesario resaltar que los sorbentes presentan, a menudo, efectos memoria que conducen a una baja reproducibilidad.

Con el fin de solucionar los inconvenientes mencionados, en las últimas décadas se han introducido nuevas técnicas de extracción miniaturizadas [3-5]. Estas técnicas de preparación de la muestra, denominadas **técnicas de microextracción**, presentan interesantes ventajas sobre las técnicas convencionales anteriormente comentadas. Así, es posible reducir el consumo de disolventes orgánicos, eliminar etapas adicionales de limpieza (que representan un tiempo adicional y una fuente potencial de pérdida de analito o contaminación), así como mejorar la selectividad y el factor de preconcentración (definido como el cociente de la concentración de analito después y antes de la extracción, respectivamente). Las técnicas de microextracción se pueden aplicar a muestras de diferente naturaleza (sólida, líquida o gaseosa). A continuación se resumen las técnicas de microextracción más importantes y más empleadas en el campo analítico para la preparación y extracción de analitos en muestras de naturaleza líquida o en disolución.

1.2. Técnicas de microextracción en fase sólida

Las técnicas de microextracción en fase sólida se basan en la retención de los analitos sobre o en el interior de un material sorbente que actúa como medio de extracción. En función de las características del sorbente empleado, la retención se puede producir por adsorción (interacción física o química superficial entre el sorbente y los analitos) o por absorción (reparto de los analitos entre el absorbente y la muestra). Los compuestos son posteriormente desorbidos de manera selectiva, bien por elución con un pequeño volumen de disolvente (LD, del inglés *liquid desorption*), y su posterior introducción en el instrumento analítico, o bien por desorción térmica (TD, del inglés *thermal desorption*) en el puerto de inyección del instrumento seleccionado para la determinación final [6].

La **microextracción en fase sólida** (SPME, del inglés *solid-phase microextraction*) [7] se introdujo a principios de los años 90 como una clara miniaturización de la SPE, convirtiéndose en pocos años en unas de las técnicas de microextracción más empleadas. El principio básico de esta técnica de extracción es la adsorción/desorción de los analitos sobre una fibra de sílice fundida, químicamente inerte, recubierta por un polímero adsorbente. Esta fibra se encuentra en el interior de un soporte, similar a una jeringa con aguja, de modo que se expone directamente en la disolución a extraer o bien en el espacio de cabeza. Una vez que se ha completado la etapa de extracción, la fibra se retrae nuevamente en la aguja y los analitos se desorben en el correspondiente instrumento analítico para su medida. En la **Figura 1.1** se muestra un esquema de SPME en su modalidad de inmersión directa (a) y mediante espacio de cabeza (b).

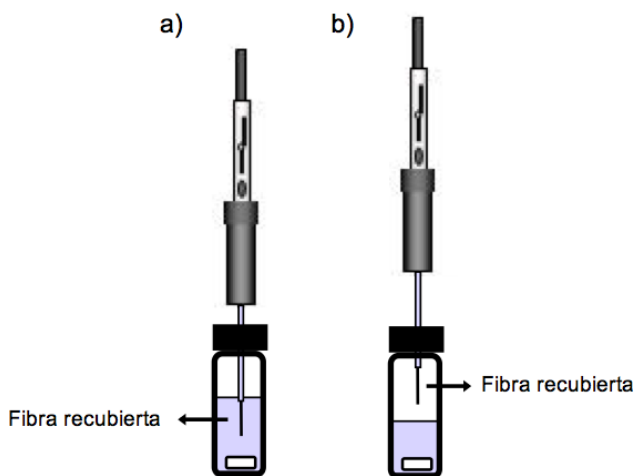


Figura 1.1. Esquema del modo de extracción en la técnica SPME en (a) inmersión directa y (b) espacio de cabeza

Existe una gran variedad de recubrimientos de diferente polaridad que ofrecen un amplio rango de posibilidades en función de los analitos, como polidimetilsiloxano (PDMS) para la extracción de compuestos no polares, las mezclas de polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB) y carboxen-divinilbenceno (CAR-DVB) para analitos semipolares, o bien de poliacrilato (PA) o de carbowax-divinilbenceno (CW-DVB) para la extracción de analitos polares. En los últimos años también se han

desarrollado nuevas fases que extienden la aplicabilidad de SPME, como los polímeros de impresión molecular (MIPs, del inglés *molecular imprinted polymers*) y los nanotubos de carbono [8, 9]. Todos estos recubrimientos están disponibles en diferentes espesores, generalmente entre 7 y 100 μm . No obstante, debido al pequeño volumen de fase de extracción empleado en SPME, de tan sólo 0.5 μL , el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio es elevado.

Para resolver las limitaciones que presentaba la SPME en cuanto a la cantidad de fase sorbente empleada, en 1999 fue introducida la **extracción por sorción sobre barra agitadora** (SBSE, del inglés *stir bar sorptive extraction*) [10]. Esta técnica de extracción se basa en el mismo principio que SPME, es decir, la partición del analito entre la muestra y un material sorbente como fase extractante, pero en lugar de usar fibras recubiertas, se emplean barras agitadoras de 10 – 20 mm recubiertas con 25 – 125 μL de sorbente [11]. Así pues, la superficie de extracción es mucho mayor que en SPME y se consiguen mejores rendimientos de extracción, y por tanto de sensibilidad. En esta técnica, la barra agitadora se sumerge en la muestra durante un periodo de tiempo determinado para llevar a cabo la adsorción de los analitos sobre el sorbente. Una vez acabada la extracción, la barra agitadora se introduce en un tubo de vidrio para llevar a cabo una desorción térmica, generalmente acoplada a cromatografía de gases o se sumerge en un disolvente adecuado para desorción líquida, lo que conlleva la dilución del extracto. En la **Figura 1.2** puede verse un esquema del imán recubierto utilizado en esta técnica (a), así como su modo de trabajo (b).

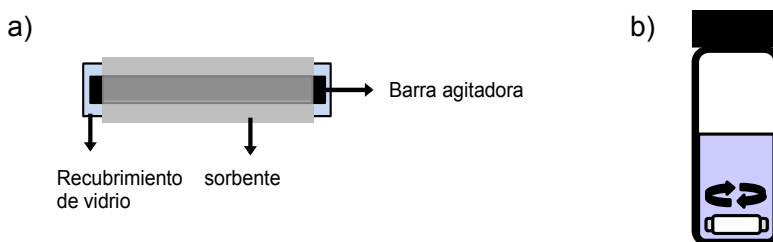


Figura 1.2. Representación esquemática de (a) la barra agitadora y (b) el modo de trabajo de la técnica SBSE

A pesar de su uso tan extendido, SPME y SBSE presentan algunas desventajas: las fibras y barras agitadoras recubiertas tienen precios elevados y están sujetas a patente comercial, presentan tiempos de vida relativamente cortos y efectos memoria entre extracciones sucesivas, y además el tiempo necesario para conseguir la extracción cuantitativa de los analitos es elevado, sin llegar a alcanzarse el equilibrio. Por otra parte las fibras son muy frágiles y no existe gran variedad de recubrimientos en el caso de las barras agitadoras. Cabe señalar que PDMS fue la primera fase extractante comercialmente disponible para SBSE y, por tanto, ha sido la más utilizada. Sin embargo, PDMS es un material hidrofóbico, idóneo para la extracción de compuestos no polares. Actualmente también hay comercialmente disponible el polímero polietilenglicol (PEG) modificado con silicona, que permite una mejor extracción de algunos compuestos polares a la vez que aumenta la sorción de compuestos apolares. En los últimos años, se han llevado a cabo diversos estudios centrados en el desarrollo de nuevos recubrimientos para SBSE con la intención de mejorar la extracción de compuestos polares, con alta capacidad de adsorción y buena regenerabilidad [12, 13]. De esta manera, se han descrito materiales monolíticos con interacciones por intercambio iónico entre los analitos y el adsorbente, empleando por ejemplo ácido metacrílico (MAA), divinilbenceno (DVB) o dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), o el uso de fritas de polietileno comerciales como material de sorción [14]. Pero la escasez en la variedad de recubrimientos también ha fomentado el desarrollo de nuevos enfoques, como la **técnica de microextracción adsorptiva sobre barra** (BA μ E, del inglés *bar adsorptive microextraction*) desarrollada por Nogueira et al. [15, 16]. En esta técnica, una barra de polipropileno se recubre por una cinta adhesiva donde se adhiere el material sorbente, elegido a medida en función de los analitos a extraer. Mediante una barra agitadora, se consigue provocar el movimiento de rotación de la disolución acuosa y, simultáneamente, la difusión de los analitos hacia la barra con la fase de extracción, la cual no se encuentra en contacto directo con las paredes del vial (**Figura 1.3**). No obstante, al igual que en SBSE, los tiempos de extracción siguen siendo largos. Por esta razón, el desarrollo de nuevos procedimientos y nuevos recubrimientos polares continua siendo una interesante área de investigación.

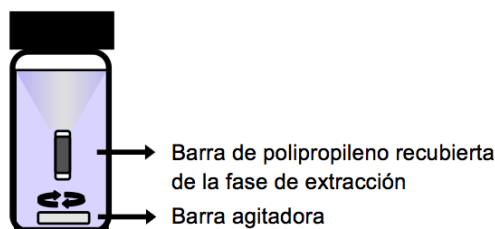


Figura 1.3. Esquema del modo de extracción en la técnica BAμE

Otra técnica considerada como una miniaturización de la SPE, aunque desarrollada con posterioridad a SPME y SBSE, es la denominada **microextracción mediante sorbentes empaquetados** (MEPS, del *inglés microextraction by packed sorbents*) [17]. En esta técnica los sorbentes se integran en el interior de una jeringa, en lugar de estar confinados en el interior de cartuchos o discos, y se hace pasar la muestra por succión. Posteriormente se eluyen los analitos al succionar un disolvente adecuado. MEPS emplea los mismos sorbentes que en SPE, por lo que permite trabajar en distintas fases en función de la polaridad de los analitos de interés. Además, los volúmenes empleados, tanto de muestra como de disolventes, son bastante inferiores que los empleados en SPE. En comparación con SPME, esta técnica es más robusta y permite mejorar el análisis de muestras más complejas como orina o plasma sanguíneo.

Por otra parte, Anastassiades et al. presentaron la técnica que denominaron **extracción en fase sólida dispersiva** (DSPE, del *inglés dispersive solid-phase extraction*) [18], que se ha convertido desde su aparición en 2003 en una técnica de extracción de uso muy extendido. En este caso, un sorbente, generalmente sílice modificada superficialmente, se dispersa en la disolución a extraer. La naturaleza del sorbente es similar a la de las fases habituales en SPE. Mediante la dispersión, el área de contacto entre el sorbente y los analitos es muy elevada y, por consiguiente, los rendimientos de extracción también son más altos y los tiempos de extracción menores. Después de la extracción, el sorbente conteniendo los analitos se separa por centrifugación y se procede a la elución mediante un disolvente apropiado. Esta técnica de extracción permite mejorar algunos de los inconvenientes de las técnicas anteriores, sin embargo, la recogida y manipulación del material sorbente tras la extracción es una tarea de varias etapas, lo que puede afectar a la

reproducibilidad del análisis y la recuperación de los analitos [19, 20]. Esta técnica también se conoce habitualmente bajo el término QuEChERS, que son la abreviaciones del inglés *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe* (rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro). En la **Figura 1.4** se muestra un esquema general del modo de trabajo en esta técnica.

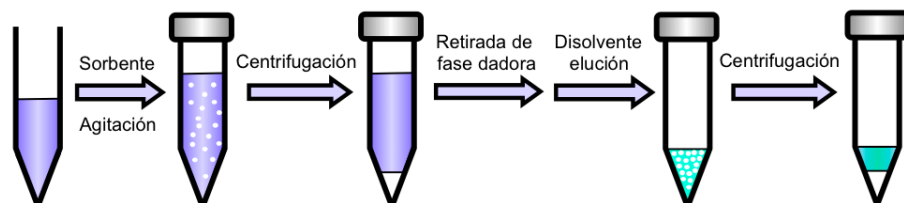


Figura 1.4. Esquema general del modo de trabajo en DSPE

Sin embargo, la incorporación en los últimos años de las **nanopartículas magnéticas** (MNPs, del inglés *magnetic nanoparticles*) a los procedimientos de DSPE como materiales sorbentes ha ofrecido una gran mejora en los factores de preconcentración debido a la gran proporción superficie – volumen de los sorbentes de tamaño nanométrico. Además, a diferencia de sus análogas no-magnéticas, las propiedades paramagnéticas de estas partículas permiten una eficaz separación de una suspensión mediante la atracción de un campo magnético externo sin magnetización residual, es decir, vuelven a su estado no-magnético original en ausencia del campo magnético [21, 22]. De esta manera, esta modalidad ofrece notables beneficios respecto a otros métodos de separación convencionales como centrifugación, decantación o filtración, ya que el sorbente se recupera rápida y cuantitativamente y los analitos se eluyen por medio de desorción líquida. En la **Figura 1.5** se muestra el modo de trabajo de esta modalidad.

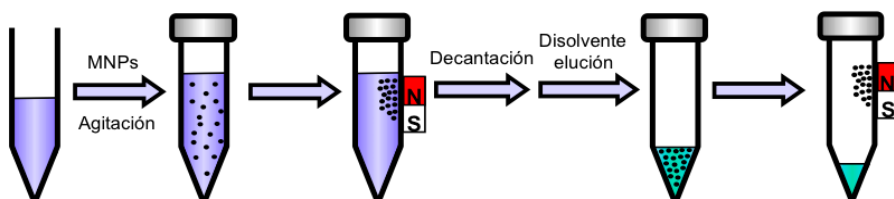


Figura 1.5. Esquema general del modo de trabajo en DSPE mediada por MNPs

Hay disponibles una gran variedad de MNPs. Generalmente, el núcleo de este tipo de nanopartículas está constituido por óxidos de metales magnéticos como hierro, níquel o cobalto. Las principales vías de síntesis de estos sólidos magnéticos son la co-precipitación química de las sales de estos metales en disolución básica o un proceso sol-gel. Además, la modificación adecuada del núcleo magnético con grupos activos específicos refuerza la selectividad para su uso en muestras con matrices complejas. Este revestimiento de la superficie de las MNPs se consigue mediante la fijación de componentes inorgánicos (sílice o alúmina) y/o moléculas orgánicas (polímeros, surfactantes, receptores biológicos, etc), proporcionándoles estabilidad química, especialmente evitando su oxidación cuando están expuestos al aire, que origina la pérdida de sus propiedades magnéticas [23]. Esta funcionalización les confiere propiedades multifuncionales para ser aplicadas en la extracción de gran variedad de analitos (aniones, cationes, compuestos polares o no polares, etc) de manera selectiva mediante diversos mecanismos: biocompatibilidad, reconocimiento de la forma, detección antígeno o fisisorción [23, 24]. En la **Figura 1.6** puede verse un esquema general de una MNP, así como una fotografía tomada mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM, del inglés *transmission electronic microscopy*).

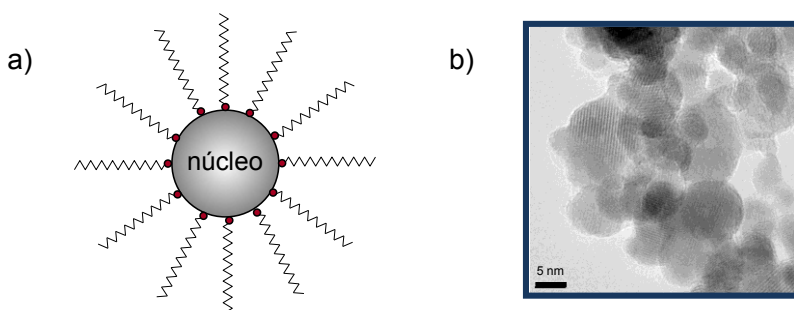


Figura 1.6. (a) Esquema general y (b) fotografía mediante TEM (200 kV) de MNPs de CoFe_2O_4 recubiertas de ácido oleico

En el caso de MNPs recubiertas por surfactantes, éstos pueden estar adsorbidos físicamente (fisisorbidos) o químicamente (quimisorbidos) dependiendo de la naturaleza de la interacción entre el surfactante y la MNP. En el primer caso, el surfactante puede desorberse fácilmente de la

superficie de la MNP durante la etapa de elución del analito, mientras que el eluato obtenido en el segundo caso queda libre de dicho surfactante [25] debido a la interacción más fuerte entre ambos, previniendo interferencias en el sistema cromatográfico.

Por otra parte, cabe añadir que también existen los materiales híbridos de MNPs y redes poliméricas dando lugar a los denominados *composites*. Concretamente, estos materiales se pueden clasificar en dos tipos atendiendo a su estructura: aquellos en los que una capa polimérica recubre la superficie de las partículas covalentemente o por interacciones electroestáticas, y aquellos en los que las MNPs se inmovilizan en la red polimérica ya existente [26, 27]. El interés por este tipo de materiales se debe a que las cadenas poliméricas pueden contener una gran variedad de grupos funcionales capaces de interaccionar con multitud de compuestos [26]. De esta manera, se combina la gran capacidad de sorción del material polimérico con el magnetismo de las nanopartículas que posibilita un mejor manejo [28].

Con el objetivo de contribuir al desarrollo de nuevas estrategias analíticas, en la presente Tesis Doctoral se ha desarrollado una nueva técnica de microextracción que combina los principios y ventajas de SBSE y DSPE, a la que se ha denominado **microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora** (SBSDME, del inglés *stir-bar sorptive-dispersive microextraction*). El modo de trabajo de esta nueva técnica se explica con detalle en los **Capítulos 5, 6 y 7**. Cabe mencionar que la extracción en esta modalidad está mediada por el uso de materiales magnéticos como fases extractantes.

Por otra parte, en los últimos años se ha propuesto la formación *in situ* de un microsorvente sólido basado en **hidróxidos dobles laminares** (LDH, del inglés *layered double hydroxides*) [29] para la extracción de compuestos aniónicos. En esta técnica, LDH pre-formados se dispersan en la fase dadora, se disuelven por disminución del pH y posteriormente se atrapan los analitos por precipitación *in situ* al restaurar el pH. A continuación, tras centrifugación, se acidifica la fase sedimentada para que el sorvente se disuelva y se pueda liberar el analito para su introducción directa en el instrumento analítico. Así pues, la etapa de elución del analito no es necesaria en esta metodología, a diferencia de las extracciones basadas en sorbentes convencionales. En la **Figura 1.7** puede verse la estructura que presenta un LDH.

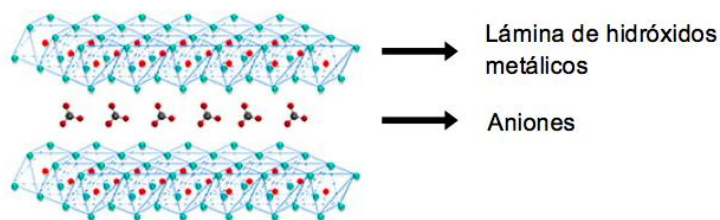


Figura 1.7. Esquema de una estructura de LDH

1.3. Técnicas de microextracción en fase líquida

De forma casi simultánea, a mediados de los años 90 comenzaron a desarrollarse las técnicas de microextracción en fase líquida (LPME, del inglés *liquid-phase microextraction*) como una alternativa a las técnicas de microextracción en fase sólida. Estas técnicas son una clara miniaturización de la LLE, donde la extracción tiene lugar entre una fase dadora, generalmente de naturaleza acuosa que contiene los analitos, y unos pocos microlitros de una fase extractante inmiscible en agua, también llamada fase aceptora [30-32]. Debido a la disminución drástica del volumen de fase aceptora que proporciona la LPME es posible alcanzar elevados factores de preconcentración.

La primera modalidad de LPME presentada fue la **microextracción en gota** (SDME, del inglés *single drop microextraction*) [33, 34]. Aunque en un principio presentaba una configuración más o menos compleja, pronto alcanzó gran popularidad. La técnica se basa en la distribución de los analitos entre la muestra de naturaleza acuosa y una microgota de tan sólo 1 – 10 μL de un disolvente orgánico inmiscible con la muestra expuesta directamente en contacto con ella, o bien en su espacio de cabeza, lo que permite la extracción de analitos volátiles o semivolátiles si se calienta la muestra a temperaturas moderadas [35]. Después de la extracción, la microgota se retrae en la microjeringa y el extracto se introduce en el sistema analítico. En la **Figura 1.8** puede observarse la SDME en su modalidad de inmersión directa (a) o mediante espacio de cabeza (b).

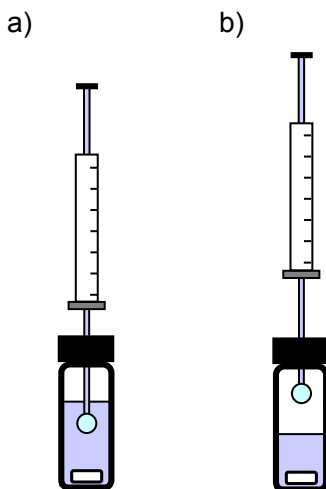


Figura 1.8. Esquema de la SDME en sus dos modalidades: (a) inmersión directa y (b) espacio de cabeza

No obstante, pese a presentar las ventajas de su bajo coste y de un mínimo uso de disolvente orgánico, esta técnica presenta algunos inconvenientes como son la inestabilidad de la gota y la rápida volatilización que puede sufrir la fase aceptora cuando se emplea la modalidad de espacio de cabeza. Por tanto, se trata de una técnica de baja robustez que requiere trabajar con sumo cuidado.

Como solución a este problema, en 2004 Jiang et al. [36] propusieron el empleo de **líquidos iónicos** (ILs, del inglés *ionic liquids*) como fase extractante en lugar de los disolventes orgánicos convencionales para los mismos fines. Estos compuestos son sales líquidas a temperatura ambiente que resultan de la combinación de un catión orgánico y un anión orgánico o inorgánico unidos por fuerzas atractivas más débiles que las sales iónicas convencionales. La mayor parte de los cationes tienen naturaleza aromática con átomos de nitrógeno en el anillo y heterociclos nitrogenados, destacando el N-alkilpiridino, tetraalkilamónio, N,N'-dialquilimidazolio y tetraalkilfosfonio. Por su parte, los aniones suelen estar constituidos por diferentes compuestos químicos como el hexafluorofosfato, trifluoroacetado o tetrafluoroborato [37].

Debido a sus propiedades físico-químicas, estos compuestos tienen la ventaja de presentar un buen rendimiento de extracción tanto para compuestos orgánicos como inorgánicos, además de posibilitar el empleo

de mayores volúmenes de gota en SDME. Además, los ILs también se han utilizado para solucionar el problema de la rápida evaporación de la gota, dado que presentan altos puntos de ebullición. Esta última propiedad es, además, una importante ventaja ya que permite sustituir a los disolventes orgánicos volátiles comunes y desarrollar unos procesos químicos más limpios y sostenibles (“Química Verde”) [38].

Sin embargo, la mayor limitación que presentan los ILs como fase extractante es que no pueden ser introducidos directamente en el sistema cromatográfico de gases ya que sin una interfase adecuada pueden bloquear la columna debido a su baja volatilidad. En este sentido, se han propuesto diversas estrategias para solventar dicha compatibilidad, como la interfase diseñada por Valcárcel et al. [39], la adaptación de un sistema de desorción térmica comercial propuesta por Chisvert et al. [40], así como otras estrategias modificando el puerto de inyección [41, 42].

Posteriormente a la aparición de la SDME, Pedersen-Bjergaard y Rasmussen propusieron en 1999 la denominada **microextracción en fase líquida con fibra hueca** (HFLPME, del inglés *hollow fiber liquid-phase microextraction*) [43, 44]. En esta técnica el disolvente orgánico queda protegido en el interior de una fibra hueca tubular y se aloja en sus poros formando una fina película, que se conoce como membrana líquida soportada (SLM, del inglés *supported liquid membrane*), la cual actúa como barrera de separación entre la fase dadora y la fase aceptora.

En comparación con SDME, la microgota no es tan inestable y tiene la gran ventaja de poder usarse agitación vigorosa para acelerar la cinética de extracción sin peligro de desprenderse la gota. En la **Figura 1.9** se muestra un esquema de HFLPME en sus dos modalidades de trabajo posibles, inmersión directa y mediante espacio de cabeza.

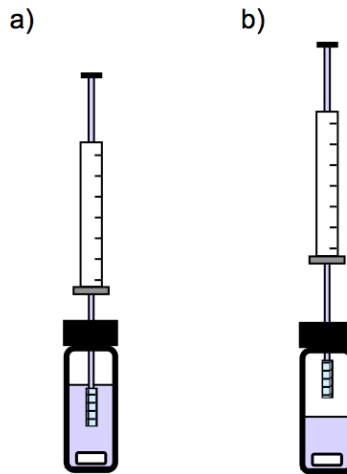


Figura 1.9. Esquema de la HFLPME en su modalidad de (a) inmersión directa y (b) espacio de cabeza

En la **Figura 1.10** se muestra el esquema del proceso de extracción en HFLPME.

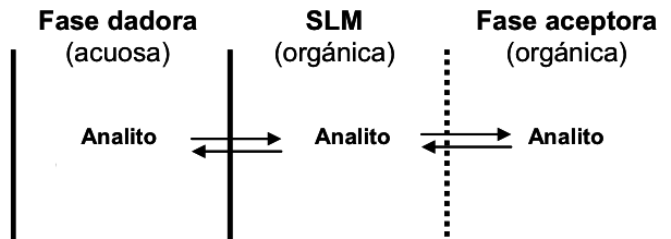


Figura 1.10. Esquema general del proceso de extracción en HFLPME

Otra de las ventajas de HFLPME es que también permite trabajar en sistemas de tres fases. En esta metodología, los analitos se extraen desde la fase dadora acuosa a través de la SLM, y posteriormente vuelven a extraerse a una fase aceptora también acuosa que se encuentra en el interior de la fibra. Con esta configuración, y en base a una diferencia de pH entre las dos fases acuosas, se puede extraer compuestos orgánicos que presenten un notable carácter ácido-base, de forma que la fase dadora se ajusta para que los compuestos no se encuentren ionizados y pasen así al disolvente orgánico que forma la SLM y posteriormente son

retroextraídos en la fase aceptora cuyo pH se ajusta de forma que provoca la ionización de los compuestos y evita su paso a la SLM, y por tanto su retorno a la fase dadora. Con esta modalidad se evita extraer multitud de compuestos que no experimentan ionización.

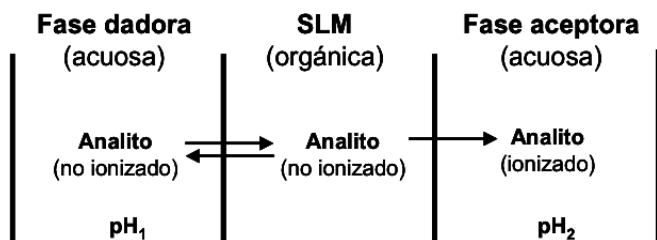


Figura 1.11. Esquema del proceso de extracción en HFLPME para sistemas de tres fases

Otra configuración, similar a la HFLPME, es la propuesta por Hauser et al. [45], en la que la membrana tiene forma de bolsa y cuyo extremo abierto se encuentra pegado al tapón de un vial, de forma que la bolsa se introduce en el interior del vial que contiene la muestra. Al igual que en HFLPME, la fase dadora se agita de forma mecánica, mientras que la fase aceptora se encuentra en reposo.

Este grupo de técnicas de extracción que hacen uso de membranas como interfase entre la muestra y el disolvente orgánico se engloban bajo el término de **extracción líquido-líquido asistida por membranas** (MALLE, del inglés *membrane assisted liquid-liquid extraction*) [46]. Posteriormente, se han desarrollado otras modalidades que hacen uso de este principio. En la **extracción líquido-líquido con membrana microporosa en vial asistida por agitación orbital** (OA-MALLE, del inglés *orbital agitation*) [47], se sustituye el septum del tapón de un vial de rosca que contiene la fase aceptora por una membrana plana de politetrafluoroetileno (PTFE), de modo que en los poros de dicha membrana se crea la SLM de disolvente orgánico, el cual se ensambla directamente a un matraz aforado que contiene la fase dadora. Ambas fases están en continua agitación orbital, lo que favorece la extracción de los compuestos. También se han propuesto sistemas de tres fases [48]. En la **Figura 1.12** puede observarse un esquema de OA-MALLE en sus dos modalidades.

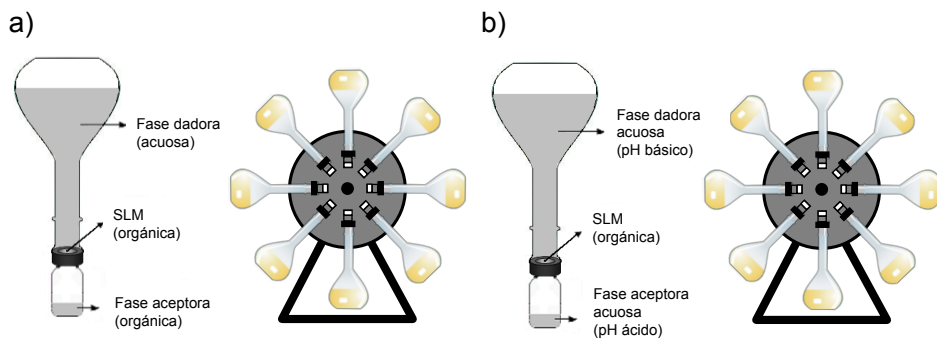


Figura 1.12. Esquema de la OA-MALLE para sistemas de (a) dos y (b) tres fases

En la denominada **extracción sobre membrana agitada** (SME, del inglés *stir membrane extraction*) [49], una carcasa de plástico, con un alambre a su través y cubierto con una membrana de PTFE, se deposita en el interior de la fase dadora y se agita mediante agitación magnética. Tras la extracción, la membrana se deja en contacto con un disolvente que permite la desorción de los analitos. Más tarde, los mismos autores propusieron dos variantes de esta estrategia en las que la carcasa se llena de disolvente orgánico, dando lugar a la denominada **microextracción líquido-líquido asistida por membrana agitada** (SM-LLME, del inglés *stir membrane liquid-liquid microextraction*) [50] (**Figura 1.13**), o bien haciendo uso de un sistema de tres fases [51], de modo que se rellena la carcasa de disolución acuosa y se inmoviliza el disolvente orgánico en la propia membrana.

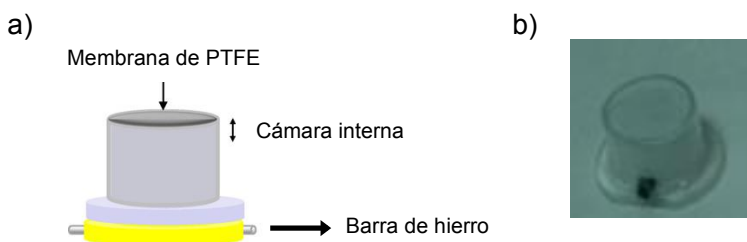


Figura 1.13. (a) Esquema y (b) fotografía del dispositivo empleado en SM-LLME

Las mayores ventajas de las técnicas basadas en MALLE son la posibilidad de automatización, la exclusión de componentes de la matriz, el bajo coste de las membranas y la posibilidad de trabajar en dos o tres fases. Sin embargo, todas estas técnicas suelen requerir tiempos de

extracción prolongados debido a la pequeña zona de contacto entre las fases dadora y aceptora.

Por otra parte, otra técnica de LPME que evitó los inconvenientes asociados a la SDME es la denominada **microextracción en gota suspendida** (DSDME, del inglés *directly-suspended drop microextraction*) [63]. En esta técnica, la gota de disolvente orgánico inmisible en agua se introduce en la superficie de la fase dadora acuosa y, una vez concluida la extracción, se recoge con ayuda de una microjeringa. La dificultad de este último paso propició la aparición de una nueva modalidad, que se conoce con el nombre de **microextracción por solidificación de la gota flotante** (SFODME, del inglés *solidification of floating organic drop microextraction*) [64], en la que la gota se congela por inmersión del vial de extracción en un baño de hielo, lo que provoca la solidificación del disolvente y, por tanto, facilitando su recogida. En la **Figura 1.16** se muestra un esquema de estas dos modalidades.

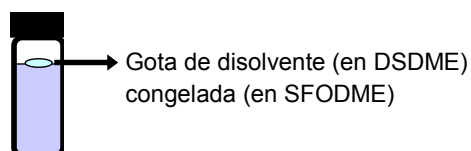


Figura 1.16. Esquema de las técnicas DSDME y SFODME

Otra técnica de microextracción en fase líquida que merece ser comentada es la **microextracción líquido-líquido dispersiva** (DLLME, del inglés *dispersive liquid-liquid microextraction*), que fue propuesta por Assadi et al. en 2006 [52]. Esta técnica supuso toda una revolución en este campo. La DLLME se basa en un sistema de disolventes ternario que incluye un disolvente dispersante, un disolvente de extracción y una muestra dadora de naturaleza acuosa. Cuando una mezcla apropiada de los dos disolventes se inyecta en la fase acuosa, se forma una microemulsión más o menos estable donde el disolvente dispersante provoca la dispersión del disolvente de extracción en forma de múltiples gotas de pequeño tamaño, de manera que la superficie de contacto entre el disolvente de extracción y la muestra es infinitamente grande. Tras la extracción, la separación de fases se consigue por centrifugación y la fase sedimentada conteniendo los analitos se recoge con una microjeringa para ser introducida en el

correspondiente instrumento analítico. En la **Figura 1.14** se puede observar el esquema de trabajo de la DLLME.

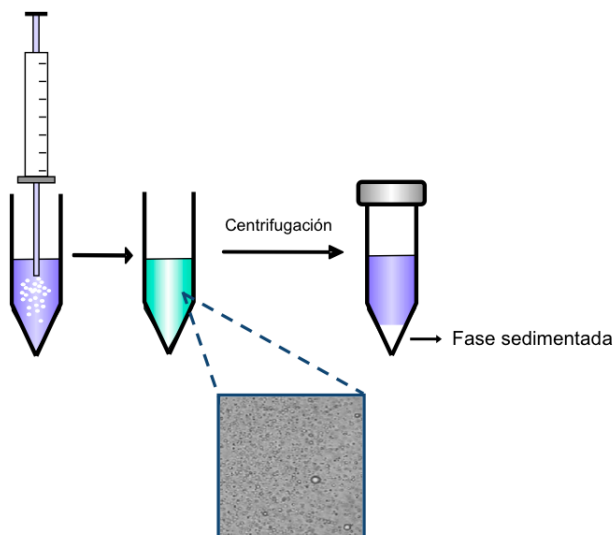


Figura 1.14. Esquema general de DLLME

A pesar de ser una técnica que destaca por los altos factores de preconcentración alcanzados, su bajo coste, fácil aplicación y su rapidez, ya que el equilibrio se consigue prácticamente de manera instantánea [53], el principal inconveniente es la baja selectividad en la extracción y la necesidad de un tercer componente (disolvente dispersante) que normalmente disminuye el coeficiente de partición de los analitos en el disolvente de extracción.

En los últimos años se han desarrollado distintas modalidades a partir de la DLLME original. Por una parte están aquellas en las que se modifica la forma de dispersar el disolvente extractante para mejorar el rendimiento de extracción, como por ejemplo mediante ultrasonidos (USA-DLLME, del inglés *ultrasound-assisted-DLLME*) [54] o bien mediante vórtex (VA-DLLME, del inglés *vortex-assisted-DLLME*) [55]. Por otra parte, Hashemi et al. [56] propusieron la DLLME en fase reversa (RP-DLLME, del inglés *reversed-phase DLLME*), en la que un pequeño volumen de agua, actuando como disolvente de extracción, se dispersa en la muestra de naturaleza orgánica. De este modo, se consigue extraer eficaz y

cuantitativamente compuestos de elevada polaridad que con la DLLME original no se hubiera conseguido. Cabe mencionar que los ILs también se han aplicado en una modalidad de DLLME en la que la temperatura se modifica para disolver y dispersar el IL y formar la microemulsión (IL-TC-DLLME, del inglés *ionic liquid-temperature controlled-DLLME*) [57]. No obstante, con el fin de mejorar la dispersión de los ILs en la disolución, se propuso otra técnica derivada de la DLLME, denominada **microextracción por formación *in situ* del disolvente** (ISFME, del inglés *in-situ solvent formation microextraction*) [58]. En esta técnica se añade un IL soluble a la muestra, generalmente acuosa y, a continuación, se añade una sal conteniendo un anión que forma un IL insoluble. De esta manera se genera la microemulsión maximizando la dispersión y, por tanto, la transferencia de masa entre la muestra y la fase aceptora. Además, la extracción es rápida, sin el uso de disolvente dispersante ni dispositivos adicionales como vórtex o ultrasonidos para asistir la emulsificación y no se ve afectada por variaciones en las concentraciones salinas de la fase dadora, siendo esta última una de sus principales ventajas respecto a las técnicas comentadas anteriormente.

Como alternativa a los disolventes de extracción comentados, también es posible la formación *in situ* de la fase de extracción en la propia muestra mediante el uso de los denominados **disolventes supramoleculares** (SUPRASs) [59], generándose a través de una etapa de auto-ensamblaje de moléculas anfífilas. En este proceso se forman agregados tridimensionales, principalmente micelas o vesículas, que 'coacervan' produciendo líquidos inmiscibles en agua constituidos por agregados supramoleculares grandes dispersados en una fase continua, generalmente agua. El auto-ensamblaje ocurre cuando dos componentes interactúan a través de un balance de interacciones atractivas y repulsivas, siendo estas interacciones generalmente débiles y no covalentes [60].

La principal ventaja del uso de SUPRASs en técnicas de extracción es la gran variedad de agregados con diferentes propiedades que se pueden formar a partir de las moléculas de origen (surfactantes no iónicos, micelas iónicas, vesículas). Así pues, estos disolventes permiten la extracción de una gran variedad de compuestos, pudiéndose dar la interacción a través de interacciones iónicas, puentes de hidrógeno, hidrofóbicas, etc. Además,

se caracteriza por tiempos de extracción cortos debido a la dispersión de la fase extractante y sin necesidad de disolventes.

Entre las técnicas que hacen uso de SUPRAs se encuentra la **extracción mediada por micelas** ó **extracción en punto de nube** (CPE, del inglés *cloud-point extraction*) [61] donde la separación de los analitos de la fase acuosa se hace por medio de pseudofases de micelas de surfactantes no iónicos. Por simple alteración de las propiedades de la disolución (temperatura, presión o contenido salino), las micelas se separan en dos fases isotrópicas: una fase compuesta casi en su totalidad por el surfactante con los analitos y una fase acuosa en la que la concentración del surfactante está cercano a la concentración micelar crítica. A continuación, la re-extracción del analito en un disolvente orgánico apropiado es necesaria para reducir las interferencias del surfactante en el instrumento analítico [62]. En la **Figura 1.15** se muestra un esquema del modo de trabajo en CPE.

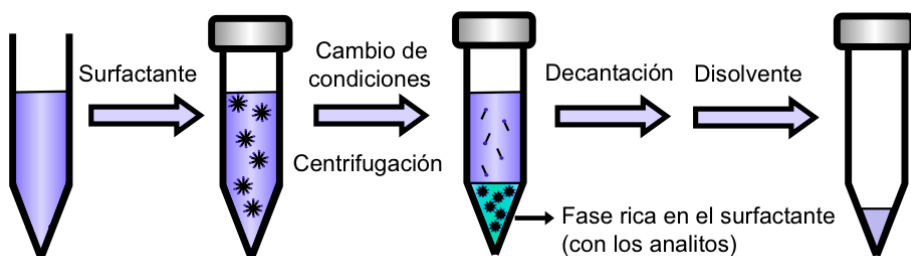


Figura 1.15. Esquema general del modo de trabajo en CPE

En esta Tesis Doctoral se presenta una nueva estrategia basada en la formación *in situ* de la fase extractante mediante la asociación de dos contraiones cargados opuestamente, formándose un agregado supramolecular como medio de extracción de compuestos orgánicos en disoluciones acuosas. A esta nueva técnica de microextracción se le ha denominado **microextracción sobre agregado formado in situ** (iSAME, del inglés *in situ suspended aggregate microextraction*) y se explica con detalle en el **Capítulo 4**.

Capítulo 2

Filtros UV

2.1. Los filtros UV en la Unión Europea

En los últimos años, la preocupación sobre los riesgos para la salud asociados con la radiación solar ultravioleta (UV) ha aumentado considerablemente.

La radiación UV que alcanza la superficie de la Tierra esta constituida por un 98 % de radiación UVA (320 – 400 nm) y un 2 % de la radiación UVB (290 – 320 nm), mientras que la radiación UVC (100 – 290 nm), que es la más nociva, es absorbida por el ozono de la estratosfera y no llega a la superficie terrestre [65]. No obstante, cabe señalar que la radiación UVA, aunque es la menos energética, es mucho más abundante, por lo que también puede resultar altamente dañina para la salud humana. De hecho, esta radiación penetra más profundamente en la piel, atravesando la dermis, mientras que la radiación UVB sólo consigue atravesar la epidermis.

Por ello, aunque una moderada exposición al sol proporciona importantes beneficios al organismo como el aumento de la producción de vitamina D, la absorción del calcio y la prevención del raquitismo [66, 67], un exceso puede provocar serios problemas para la salud humana. Algunos de los efectos dañinos que puede provocar esta sobreexposición a la luz solar son quemaduras en la piel, envejecimiento prematuro de la piel (arrugas o manchas) o el riesgo de desarrollar cáncer de piel [68, 69]. También puede producir afecciones a nivel ocular o daños en el sistema inmunológico.

En este sentido, desde hace varios años hay disponibles en el mercado una gran variedad de productos cosméticos que contienen los denominados **filtros UV** como ingredientes activos, con el fin de proteger la piel humana y prevenir o minimizar los efectos nocivos que la radiación UV puede provocar en el ser humano [70-72]. Cabe señalar que en la actualidad, los filtros UV no sólo se incorporan en los productos destinados específicamente a la protección solar, sino que también son adicionados a todo tipo de productos de uso cotidiano como cremas hidratantes, maquillaje o champús. El factor de protección solar (FPS) de los productos cosméticos es un indicador de la eficacia protectora del producto y está relacionada con la naturaleza de estos compuestos y la proporción en la que se encuentran [65]. Prácticamente todas estas formulaciones

cosméticas contienen una mezcla de filtros UV que cubre, en la medida de lo posible, un amplio espectro de longitudes de onda.

El Reglamento Europeo en materia de productos cosméticos (Reglamento (CE) N° 1223/2009) [73] define los filtros UV como “*las sustancias cuya finalidad exclusiva o principal sea proteger la piel contra determinadas radiaciones ultravioletas absorbiendo, reflejando o dispersando esta radiación*”. Concretamente, en el Anexo VI del citado Reglamento Europeo figura un listado con los compuestos químicos que pueden ser empleados como filtros UV, así como la concentración máxima autorizada para cada uno de ellos en el producto acabado (**Tabla 2.1**). Actualmente son 26 los compuestos autorizados como filtros UV.

Cabe mencionar que existen otras normativas reguladoras de productos cosméticos para la protección solar a nivel mundial, en las que también se indican los compuestos autorizados que pueden actuar como filtros UV, así como los límites de concentración permitidos [71, 72, 74]. Es interesante señalar que existen algunas divergencias tanto en los niveles máximos permitidos por las diferentes normativas como en los compuestos autorizados. Por otra parte hay que resaltar que la legislación (tanto europea como de otras partes del mundo) se encuentra siempre en constante adaptación en función de los nuevos conocimientos en materia de seguridad. Así, aunque el Reglamento Europeo se publicó en 2009, los anexos se han ido modificando desde entonces.

Tabla 2.1. Listado de los filtros UV admitidos en la actualidad (marzo 2016) en los productos cosméticos y sus concentraciones máximas permitidas en el producto acabado (% , m/m), según el Reglamento (CE) N° 1223/2009

Núm. de referencia ^a	Nombre Químico	Nomenclatura INCI ^b (Acrónimo) ^c	Cantidad máxima permitida
2	Metilsulfato de N,N,N-trimetil-4-(2-oxoborn-3-ilidinemetil) anilinio	Canfor benzalconio metosulfato (CBM)	6 %
3	Salicilato de 3,3,5-trimetil ciclohexilo (<i>homosalato</i>)	Homosalato (HS)	10 %
4	2-Hidroxi-4-metoxibenzofenona (<i>oxibenzona</i>)	Benzofenona-3 (BZ3)	10 %
6	Ácido 2-fenilbencimidazol-5-sulfónico y sus sales de potasio, sodio y trietanolamina/ <i>ensulizol</i>	Ácido fenilbencimidazol sulfónico (PBS)	8% (de ácido)
7	Ácido 3-3'-(1,4-fenilendimetileno) bis(7,7-dimetil-2-oxobiciclo-[2.2.1]hept-1-ilmetano sulfónico) y sus sales	Ácido tereftaliden dicanofo sulfónico (TDS)	10 % (de ácido)

Tabla 2.1. (Continuación)

Núm. de referencia ^a	Nombre Químico	Nomenclatura INCI ^b (Acrónimo) ^c	Cantidad máxima permitida
8	4-Tert-butil-4'-metoxidibenzoilmetano	Butil metoxidibenzoilmetano (BDM)	5 %
9	Ácido α -(2-oxoborn-3-iliden)-toluen-4-sulfónico y sus sales	Ácido benciliden canfor sulfónico (BCS)	6 % (de ácido)
10	2-Ciano-3,3-difenilacrilato de 2-etilhexilo	Octocrileno (OCR)	10% (de ácido)
11	Polímero de N-(2 y 4)-[(2-oxoborn-3-iliden)metil]bencil} acrilamida	Poliacrilamidometil benciliden canfor (PBC)	6 %
12	4-Metoxicinamato 2-etilhexilo	Etilhexil metoxicinamato (EMC)	10 %
13	4-Aminobenzoato de etilo etoxilado	PEG-25 PABA (P25)	10 %
14	4-Metoxicinamato de isoamilo (mezcla de isómeros)	Isoamil metoxicinamato (IMC)	10 %
15	2,4,6-Triamilina-(p-carbo-2'-etilhexil-1'-oxi)-1,3,5-triazina	Etilhexil triazona (ET)	5 %
16	2-(2H-Benzotriazol-2-il)-4-metil-6-[2-metil-3-(1,3,3,3-tetrametil-1-(trimetilsilil)oxi)disiloxanil]propil] fenol	Drometizol trisiloxano (DRT)	15 %
17	[4,4'-[[6-[[[(1,1-dimetiletil)amino] carbonil] fenil]amino]1,3,5-triazina-2,4-diil]diimino]bis-bis(2-etilhexil) benzoato	Dietilhexil butamido triazona (DBT)	10 %
18	3-(4'-Metilbenciliden) canfor	4-Metilbenciliden canfor (MBC)	4 %
20	Salicilato de 2-etilhexilo	Etilhexil salicilato (ES)	5 %
21	4-dimetilaminobenzoato de 2-etilhexilo	Etilhexil dimetil PABA (EDP)	8 %
22	Ácido 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona-5-sulfónico y su sal de sodio	Benzofenona-4 (BZ4)	5 % (de ácido)
23	2,2'-Metilen-bis-[4-(1,1,3,3-tetrametil butil)-6-(2H-benzotriazol-2-il)fenol]	Metilen bisbenzotriazolil tetrametilbutilfenol (MBP)	10 %
24	Ácido 2,2'-(1,4-fenil) bis-1H-bencimidazol-4,6-disulfónico (sal monosódica)	Ácido fenildibencimidazol tetrasulfónico (PDT)	10 % (de ácido)
25	2,2'-[6-(4-Metoxifenil)-1,3,5-triazina-2,4-diil]bis[5-[(2-etilhexil)oxil]fenol]	Bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazona (EMT)	10 %
26	Metil 3-[4-[2,2-bis(etoxicarbonil)etenil] fenoxi]propenil dimetil polisiloxano	Polisilicona-15 (P15)	10 %
27	Dióxido de titanio	Dióxido de titanio (TiO₂)	25 %
28	Hexilbenzoato de 2-[4-(dietilamino)-2-hidroxibenzoil]	Dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato (DHHB)	10 %
29	1,3,5-Triacina, 2,4,6-tris[1,1'-bifenil]-4-il-	Tris-biphenyl triazine (TBT)	10 %

^a Orden otorgado según el Reglamento Europeo

^b Nomenclatura internacional de ingredientes cosméticos (INCI, del inglés *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*)

^c Acrónimo utilizado en esta Tesis Doctoral

2.2. Clasificación de los filtros UV

Atendiendo a su naturaleza, los filtros UV pueden clasificarse en dos grandes grupos: filtros UV orgánicos e inorgánicos.

- Filtros UV orgánicos (o químicos)

Se trata de moléculas orgánicas formadas en general por uno o más anillos bencénicos, conjugados con dobles enlaces carbono-carbono y/o grupos carbonilo, permitiendo una elevada deslocalización electrónica, lo que les confiere un elevado coeficiente de absorción molar en la zona UVA y UVB.

Los filtros químicos actúan absorbiendo la radiación UV. Algunos de estos filtros pueden causar reacciones alérgicas y además también se han descrito posibles efectos secundarios de algunos de ellos debido a que pueden absorberse percutáneamente pasando al torrente sanguíneo (si bien en bajos niveles). Por otra parte, permiten que la piel transpire, por lo que su aplicación es confortable para el usuario, ya que la formulación de los productos que los contienen suele ser ligera e invisible.

- Filtros UV inorgánicos (o físicos)

Se trata generalmente de óxidos metálicos. Son impermeables a la radiación solar, de manera que impiden que ésta llegue a la piel, principalmente reflejándola y/o dispersándola. Los filtros físicos actúan formando una pantalla protectora sobre la piel, proporcionando protección inmediata sin ser absorbidos por ésta. No obstante, en dosis elevadas tienen una estructura opaca y espesa que puede tapar los poros e impide que la piel transpire, además de dejar una capa blanquecina sobre ésta. Además, el coste de las materias primas es más elevado que en el caso de los filtros químicos.

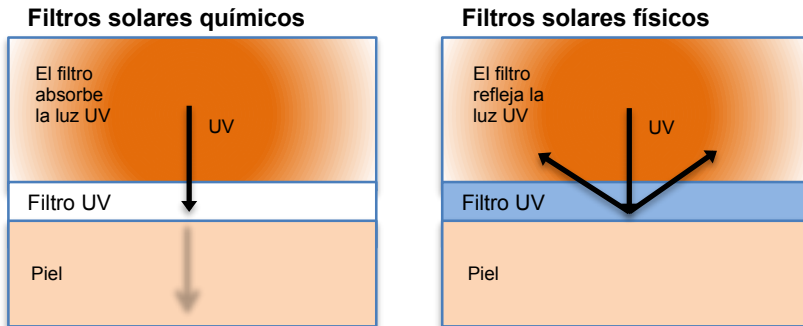


Figura 2.1. Principal actuación de los filtros UV químicos y físicos en la piel

De los 26 filtros UV permitidos actualmente por el Reglamento Europeo (**Tabla 2.1**), el único filtro UV inorgánico considerado es el dióxido de titanio, mientras que de los restantes 25 filtros UV orgánicos, 7 de ellos presentan carácter hidrofílico (BCS, BZ4, CBM, P25, PBS, PDT y TDS) y 18 presentan propiedades lipofílicas. Cabe mencionar que estos últimos son empleados más comúnmente en las formulaciones cosméticas debido a su resistencia al agua. Además, la síntesis de BCS y PBC está protegida por patentes de la empresa L’Oreal y actualmente no se fabrican ni se utilizan en productos cosméticos.

Los 25 filtros UV orgánicos autorizados por la Unión Europea se pueden clasificar en nueve grupos distintos atendiendo a su estructura química: 1) derivados de la benzofenona, 2) derivados del ácido p-aminobenzoico, 3) salicilatos, 4) metoxicinamatos, 5) derivados del canfor, 6) derivados de la triazina, 7) derivados del benzotriazol, 8) derivados del bencimidazol y 9) otros [71, 75].

En la presente Tesis Doctoral, en la que se ha desarrollado nuevos métodos analíticos basados en técnicas de microextracción, se han escogido algunos de estos filtros UV como analitos modelo. Concretamente, se han escogido 8 filtros UV lipofílicos (BZ3, EDP, EMC, ES, HS, IMC, MBC y OCR) atendiendo a su diferente naturaleza, para las técnicas desarrolladas en los **Capítulos 3, 4, 5 y 6** y 4 filtros UV hidrosolubles (BZ4, PBS, PDT y TDS) para la técnica desarrollada en el **Capítulo 7**, atendiendo a su naturaleza y a su mayor uso en las formulaciones cosméticas.

En la **Tabla 2.2** se muestran las estructuras moleculares de estos 12 filtros UV así como su número CAS y los valores de algunas propiedades físico-químicas de interés.

Tabla 2.2. Filtros UV orgánicos considerados en la presente Tesis Doctoral

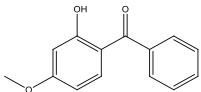
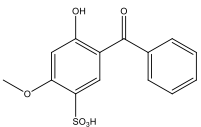
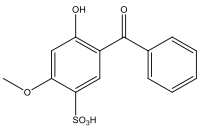
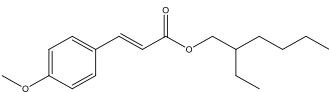
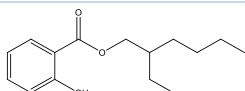
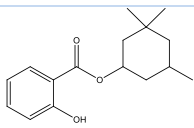
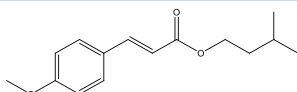
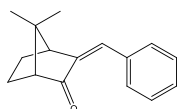
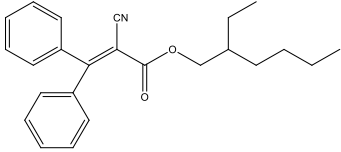
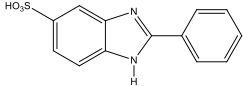
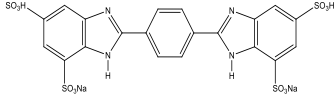
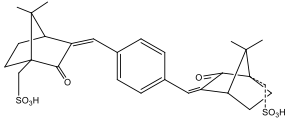
Filtro UV	Estructura molecular	Número CAS	pKa ^a	logP _{ow} ^a	P _{eb} (°C) ^a
BZ3		131-57-7	7.56	3.99	155
BZ4		4065-45-6	-0.70	0.993	491
EDP		21245-02-3	2.39	5.412	383
EMC		5466-77-3	-	5.921	145
ES		118-60-5	8.13	5.934	332
HS		118-56-9	8.10	5.947	163
IMC		71617-10-2	-	4.393	363
MBC		36861-47-9	-	3.385	199

Tabla 2.2. Continuación

Filtro UV	Estructura molecular	Número CAS	pKa ^a	logP _{ow} ^a	P _{eb} (°C) ^a
OCR		6197-30-4	-	6.893	479
PBS		27503-81-7	-0.87	-0.234	n.d.
PDT		180898-37-7	n.d.	-0.26	n.d.
TDS		92761-26-7	0.86	-1.820	n.d.

^a K_a: Constante de disociación ácido-base; P_{ow}: Coeficiente de partición octanol-agua; P_{eb}: Punto de ebullición; Calculados empleando el software Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) V11.02 de Solaris (©1994-2016 CD/Labs)

n.d.: No disponible

2.3. Métodos analíticos para la determinación de filtros UV

2.3.1. *Productos cosméticos*

Como se ha indicado anteriormente, en la actualidad existen numerosos productos cosméticos que incorporan filtros UV en su formulación. Aunque inicialmente estos compuestos sólo se añadían a los productos cosméticos destinados específicamente para protegerse de la radiación solar en la playa o en la nieve, actualmente también se encuentran en otros productos cosméticos de uso cotidiano. Así pues, es posible encontrarlos en todo tipo de cremas hidratantes, productos para después del afeitado, barras de labios, maquillaje, champús, etc [71]. Además, cabe añadir que aunque los filtros UV se añaden principalmente a los cosméticos, también se pueden incluir en otros productos como plásticos, adhesivos y pinturas con la finalidad de protegerlos de la degradación UV [76]. Resulta pues de gran interés el desarrollo de métodos analíticos eficientes y fiables que posibiliten la determinación de filtros UV en este tipo de productos, con tal de asegurar que el contenido de estos compuestos no sobrepasa los límites máximos establecidos por la legislación vigente. Aquellos lectores interesados pueden consultar diferentes artículos de revisión publicados por el grupo de investigación en el que se desarrolla la presente Tesis Doctoral acerca de la determinación de filtros UV en productos cosméticos [71, 75, 77], ya que este tema no se incluye en los objetivos de esta Tesis Doctoral.

No obstante, cabe resaltar que no existen en la actualidad métodos analíticos oficiales para la determinación de todos los filtros UV admitidos en la actual legislación. Tan sólo se dispone de la norma EN 16344:2013, en la que se considera la identificación y cuantificación de tan sólo 10 de estos compuestos. En este sentido, recientemente el grupo de investigación en el que se ha llevado a cabo la presente Tesis Doctoral ha propuesto al Comité Europeo de Normalización (CEN) un método analítico fácil, rápido y respetuoso con el medio ambiente que permite la determinación simultánea de los 22 filtros UV actualmente autorizados en el marco de la Unión Europea y que se emplean actualmente en las formulaciones cosméticas. Debe señalarse que la propuesta se encuentra

actualmente en la fase final del proceso de publicación como norma armonizada EN [78].

2.3.2. Cuerpo humano

Como se ha mencionado anteriormente, algunos filtros UV pueden ser parcialmente absorbidos a través de la piel tras la aplicación tópica del producto cosmético. Una vez que han atravesado las capas más profundas de la piel, son incorporados al torrente sanguíneo y distribuidos por todo el organismo [79-81]. A continuación, algunos de estos xenobióticos son fácilmente excretables y no necesitan que el organismo humano los someta a reacciones de biotransformación para modificar su estructura y transformarlos en otros más hidrosolubles (metabolitos), que son más fáciles de eliminar y, generalmente, menos tóxicos [82]. Sin embargo, los filtros UV que presentan una mayor naturaleza lipofílica tienden a acumularse en los entornos lipofílicos del organismo y generalmente precisan de reacciones de biotransformación para su eliminación. La principal ruta para la excreción de los filtros UV es la vía urinaria [83], aunque también existen evidencias de su eliminación por las heces [84]. Cabe señalar que algunos de ellos también se han encontrado en leche materna [85, 86], semen [87, 88] y placenta [89]. Actualmente se conoce la ruta metabólica de tres filtros UV autorizados por la Unión Europea, concretamente para BZ3 [83], EDP [90] y MBC [84].

Debe resaltarse que la absorción percutánea de algunos de estos compuestos o de sus metabolitos puede generar distintos efectos adversos para la salud, como dermatitis alérgica de contacto o fotoalergia de contacto [91, 92], y otros más preocupantes como alteraciones endocrinas [93, 94] o incluso carcinogénesis o mutagénesis [95].

Por todo ello, resulta muy interesante desarrollar métodos analíticos para la determinación de filtros UV y sus metabolitos en fluidos y tejidos biológicos. El objetivo de esta Tesis Doctoral no es la determinación de filtros UV en este tipo de matrices, por lo que los lectores interesados pueden consultar los artículos relacionados con esta temática en dos referencias recientes del grupo de investigación en el que se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral [77, 81].

2.3.3. Medio Ambiente: aguas y suelos de origen medioambiental

El aumento masivo del uso de los productos cosméticos que contienen filtros UV en su formulación ha provocado que estos compuestos alcancen el medio ambiente, llegando incluso a acumularse en él [79, 96]. Así pues, pueden alcanzar las aguas superficiales de forma directa liberándose de la piel al realizar actividades de ocio, baños y deportes acuáticos, o de forma indirecta a través de las plantas de tratamiento de aguas residuales procedentes de vertidos industriales o de actividades cotidianas como lavar la ropa o ducharse. Por ello se han detectado en aguas de origen medioambiental como ríos, lagos o mares [97-99].

Cabe añadir que los filtros UV son muy persistentes en el medioambiente debido a su extenso uso y a sus propiedades físico-químicas, principalmente de carácter lipofílico, pudiéndose acumular en los sedimentos, materia particulada o lodos de las plantas de tratamiento de aguas residuales mediante adsorción o sedimentación, especialmente cuando hay un alto contenido de materia orgánica [96, 100-102]. Estos lodos son utilizados en la agricultura, por lo que estos contaminantes que no han sido degradados se vuelven a introducir en el medio ambiente, pudiendo llegar incluso a la cadena alimentaria.

Por otra parte, los filtros UV también pueden bioacumularse en la biota del ecosistema (peces, crustáceos, mamíferos acuáticos, etc) [99, 105, 106]. Algunos estudios han demostrado que los filtros UV pueden alterar el sistema endocrino y la circulación sistemática, así como los tejidos del cuerpo de los seres humanos, mamíferos, anfibios y peces [95, 105-108]. Los niveles en biota y consideraciones sobre la bioacumulación y biomagnificación de los filtros UV se han resumido recientemente por Gago-Ferrero et al. [109]. Además se ha demostrado que bajo la radiación UV, algunos de los filtros UV orgánicos pueden generar especies oxidantes (O_2^- , H_2O_2), las cuales pueden dañar lípidos, proteínas y ADN y ocasionar un considerable nivel de estrés en organismos marinos [110, 111].

Por todas las razones anteriormente mencionadas, los filtros UV se han considerado recientemente como contaminantes emergentes. Desde 2005, se incluyen en los prestigiosos artículos de revisión anuales de Richardson en la revista *Analytical Chemistry* sobre la determinación de estos contaminantes, entre otros, en muestras de aguas de origen

medioambiental [112]. Por todo ello, se observa un creciente interés en el desarrollo de métodos analíticos sensibles y selectivos capaces de determinar estos compuestos en muestras de agua de origen medioambiental a nivel de trazas y que, por tanto, permitan estimar su potencial de bioacumulación en estos ecosistemas.

Con el fin de contribuir al estudio de la monitorización de los filtros UV en el medioambiente, las técnicas de microextracción desarrolladas en la presente Tesis Doctoral se han aplicado a la determinación de algunos de estos compuestos en muestras de agua de origen medioambiental

2.4. Antecedentes sobre la determinación de filtros UV en aguas de origen medioambiental

Existen en la bibliografía científica diversos artículos referentes a la determinación de filtros UV en aguas superficiales de origen medioambiental, que han sido recopilados en diferentes artículos de revisión [79, 98, 113].

A continuación se resumen las publicaciones (por orden cronológico) sobre este tema, indicando el tipo de muestra, la técnica de extracción, la técnica analítica y los límites de detección (LDD) encontrados (**Tabla 2.3**).

Tabla 2.3. Artículos publicados sobre de la determinación de filtros UV en muestras de agua de origen medioambiental (orden cronológico)

Filtro UV ^a	Muestra de agua	Técnica de extracción ^b (fase de extracción) ^c	Técnica analítica ^d	LDD (ng L ⁻¹)	Ref
BZ3, EDP	Mar Piscina	SPME (PDMS)	(TD)GC-MS(EI ⁺)	220-1340	[114]
BDM, BZ3, EMC, MBC	Mar Piscina	SPE (C18)	LC-UV GC-MS(EI ⁺)	7.3 0.21-0.42	[115]
BDM, BZ3, EMC, MBC, PBS	Mar	CPE-SBE (metanol/hexano)	LC-UV GC-MS(EI ⁺)	300-1270 2.2-30	[116]
BZ3	Río	SBSE (PDMS)	(TD)GC-MS(EI ⁺)	0.5-1	[117]
BZ3	Río Lago	LLE (acetato de etilo)	GC-MS(EI ⁺)	5-10	[118]
BDM, BZ3, EMC, HS, MBC, OCR	Mar Río Lago Piscina	SPE (PS-DVB/MP)	GC-MS(EI ⁺)	13-266	[119]
BZ3, BZ4	Río Depuradora	SPE (PVP-DVB/MCX)	LC-MS/MS(ESI ⁻)	0.1-30	[120]
BZ3	Río	SDME (tolueno)	GC-MS(EI ⁺)	10	[121]
BZ3	Río	SBSE (PDMS)	(TD)GC-MS(EI ⁺)	0.5-2	[122]
BDM, BZ3, EDP, EMC, ES, HS, IMC, MBC, OCR	Río Lago Depuradora	SBSE (PDMS)	(TD)GC-MS(EI ⁺)	0.2-63	[123]
BDM, BZ3, BZ4, EDP, IMC, MBC, OCR, PBS, PDT	Mar Río Depuradora	SPE (PVP-DVB)	LC-MS/MS(ESI ^{+/-})	7-46	[124]
BZ3, BZ4, EDP, EMC, IMC, MBC, OCR, PBS	Mar Grifo Depuradora	SPE (PVP-DVB)	LC-MS/MS(ESI ^{+/-})	0.6-30	[125]
BDM, BZ3, BZ4, EDP, EMC, ES, HS, IMC, MBC, OCR, PBS	Depuradora	SPE (PVP-DVB)	LC-MS/MS (ESI ^{+/-}) LC-MS/MS(APPI ^{+/-})	500-5950 700-8340	[126]
BZ3, ES, HS	Río Depuradora	SPME (PDMS-DVB)	(TD)GC-MS/MS(EI ⁺)	0.15-3	[127]
BDM, BZ3, EDP, EMC, ES, HS, IMC, MBC, OCR	Lago Depuradora	MALLE (propanol)	LC-MS/MS(APPI ^{+/-})	0.4-16	[128]
BZ3, OCR, EDP	Río Depuradora	SPE (PS-DVB/MH)	LC-MS/MS(ESI ^{+/-})	1-10	[129]

Tabla 2.3. Continuación

Filtro UV ^a	Muestra de agua	Técnica de extracción ^b (fase de extracción) ^c	Técnica analítica ^d	LDD (ng L ⁻¹)	Ref
BZ3, BZ4,	Río Depuradora	SPE (PVP-DVB)	LC-MS/MS(ESI ^{+/-})	0.1-9.7	[130]
BZ3, EMC, MBC, OCR	Río Depuradora	LLE (hexano)	GC-MS(EI ⁺)	4-30	[131]
OCR	Grifo Depuradora	SPE (PS-DVB/MP)	GC-MS(EI ⁺)	5-10	[132]
BZ3, EDP, ES, HS, MBC, OCR	Lago	SBSE (PDMS)	(DART)MS	0.28-4.3	[133]
BZ3, EDP, EMC IMC, MBC, OCR	Mar Río	IL-SDME ([C ₆ MIM][PF ₆])	LC-UV	60-3000	[134]
BZ3, BZ4, PBS	Río Depuradora	SPE (PVP-DVB)	LC-MS/MS(ESI ^{+/-}) LC-MS/MS(APCI ^{+/-})	0.15-115	[135]
BZ3, MBC, OCR, EMC	Lago Depuradora	MEPS (C8)	(LVI)GC-MS(EI ⁺)	35-87	[136]
BZ3, EDP, OCR	Río Depuradora	SBSE (PDMS)	LC-MS/MS(ESI ^{+/-})	2.5-10	[137]
BDM, BZ3, EMC, HS	Mar Piscina	(on-line)SPE (PVP-DVB)	LC-UV	450-3200	[138]
BZ3	Mar	DLLME (cloroformo)	GC-MS(EI ⁺)	32-50	[139]
BZ3, EDP, EMC, ES, HS, IMC, MBC, OCR	Río Piscina Depuradora	DLLME (clorobenceno)	GC-MS(EI ⁺)	0.6-4.2	[140]
BZ3, ES, MBC, OCR	Río	SPME (PDMS)	(TD)GC-MS(EI ⁺)	0.2-2.0	[141]
BZ3	Río	SPE (PS-DVB/MP)	GCxGC-MS(EI ⁺)	40	[142]
BZ3	Lago	MSA-DLLME (1-octanol)	LC-UV	200-800	[143]
BZ3, EDP, EMC, ES, HS, IMC, MBC, OCR	Río Piscina Depuradora	SPME (silicona)	(LVI)GC-MS(EI ⁺)	1-12	[144]
BZ3, EDP, EMC, ES, HS, IMC, MBC, OCR	Mar Río Grifo	DSPE (MNPs CoFe ₂ O ₄ @ ácido oléico)	GC-MS(EI ⁺)	0.2-6.0	[145]
BDM, BZ3, EMC, ES, HS, MBC, OCR	Depuradora	SPE (PS-DVB)	LC-UV	-	[146]
BZ3, EDP, EMC, ES, HS, OCR	Mar	SBSE (PDMS)	LC-MS/MS(APCI ^{+/-})	8-1200	[147]

Tabla 2.3. Continuación

Filtro UV ^a	Muestra de agua	Técnica de extracción ^b (fase de extracción) ^c	Técnica analítica ^d	LDD (ng L ⁻¹)	Ref
BZ3, EMC, MBC	Río Depuradora	SBSE (PDMS)	(TD)GCxGC-MS(EI)	0.02-0.18	[148]
BDM, BZ3, BZ4, EDP, EMC, OCR	Mar Grifo	SPE (PVP-DVB)	LC-MS/MS(ESI ⁺)	0.5-25	[149]
BZ3, EDP, EMC, MBC, OCR	Grifo Mineral	SPE (C18)	GC-MS(EI ⁺)	0.14-7.4	[150]
BZ3, MBC	Río Grifo	IL-HFLPME ([HMIM][FAP])	LC-UV	300-500	[151]
BZ3	Grifo	SPME (PA)	(TD)GC-MS(EI ⁺)	2-9	[152]
BZ3, ES, HS, MBC	Río	SPME (grafeno)	(TD)GC-MS(EI ⁺)	0.5-6.8	[153]
BZ3, ES, HS	Río Piscina Grifo	IL-USA-DLLME ([HMIM][FAP])	LC-UV	200-5000	[154]
BZ3, ES, HS	Río	VA-DLLME (tetracloroetano)	GC-MS(EI ⁺)	8-45	[155]
BZ3, MBC	Río Grifo	IL-USAEME ([HMIM][FAP])	LC-UV	500-1000	[156]
BZ3, EDP, EMC, ES, HS, OCR	Mar Río Depuradora	SBSE (PDMS)	LC-MS/MS(APCI ⁺)	0.6-114	[157] [158]
BDM, BZ3, EMC, MBC, PBS	Río Lago	CPE-DSPE (Fe ₂ O ₃ @C)	LC-UV	1430-7500	[159]
BZ3, BZ4	Mar Río Lago Depuradora	SPE (PVP-DVB)	LC-MS/MS(ESI ^{+/+})	0.1-12	[160]
BZ3, OCR	Mar Depuradora	SBSE (PDMS)	GC-MS(EI ⁺)	0.6-2	[161]
BZ3, ES, HS	Piscina Grifo	IL-TC-DLLME ([HMIM][FAP])	LC-UV	200-5000	[162]
BZ3, PBS	Río	(in-line)SPE (PVP-DVB/MCX)	CE-MS(ESI ⁻)	10-50	[163]
BZ3	Piscina	KWLPME (lana de poliéster)	LC-UV	20-30	[164]
BZ3	Lago Piscina Depuradora	IL-UDSA-DLLME ([C ₈ MIM][FAP])	LC-UV	200-1300	[165]
BZ3, BZ4, MBC	Río Depuradora	(on-line)SPE (PS-DVB)	LC-MS/MS(ESI ^{+/+})	0.3-10	[166]
BZ3	Río	SPME (Ag-C ₁₂)	LC-UV	580-1860	[167]

Tabla 2.3. Continuación

Filtro UV ^a	Muestra de agua	Técnica de extracción ^b (fase de extracción) ^c	Técnica analítica ^d	LDD (ng L ⁻¹)	Ref
BZ3, ES, HS	Río Depuradora	USA-DLLME (tetracloroetano)	GC-MS(EI ⁺)	1-2	[168]
BZ3, EDP, EMC, ES	Río Depuradora	IL-USA-DLLME ([OMIM][PF ₆])	LC-UV	60-160	[169]
BZ3	Mar Depuradora	BAμE (pirrolidona o carbón activo)	LC-UV	300-500	[170]
BZ3, EMC, ES, OCR	Depuradora	SPE (PS-DVB/MP)	GC-MS/MS(EI ⁺)	2	[171]
BDM, MBC,	Río	SPE (C18)	LC-MS/MS(ESI ^{+/-})	12	[172]
BZ3	Depuradora	SBSE (EGS)	LC-MS/MS(ESI ^{+/-})	5-10	[173]
BZ3, EDP, EMC, ES, HS, IMC, MBC, OCR	Mar	DLLME (cloroformo)	GC-MS(EI ⁺)	10-30	[174]*
BZ3	Mar Río Lago Grifo	SPE (PVP-DVB)	GC-MS(EI ⁺)	0.1-1.9	[175]
BZ3, ES, HS, MBC, EMC, EDP	Mar Río Depuradora	SBSE (PDMS)	GC-MS(APGC)	0.28-0.6	[176]
BZ3	Lago Grifo	SPME (MAA-EDMA)	LC-UV	300-800	[177]
BDM, BP3, DHHB, EDP, EMC, MBC, OCR, PBS	Lago Grifo	SPE (GCB)	LC-MS/MS(ESI ^{+/-})	0.7-3.5	[178]
BZ3	Río Mineral	SPE (Strata X)	FASI-CZE-UV	60-600	[179]
BZ3, EDP, EMC, ES, HS, IMC, MBC, OCR	Mar	SBSDME (MNPs CoFe ₂ O ₄ @ ácido oléico)	LC-UV	8.0-30.6	[180]*
BZ3, EDP, EMC, ES	Río Depuradora	SPME (ZrO ₂ NPs)	LC-UV	32-82	[181]
BZ3, EMC, ES, OCR	Depuradora	SPE (Strata X)	GC-MS/MS(EI ⁺)	7.1-23-5	[182]
BZ3, EDP, EMC, ES, HS, IMC, MBC, OCR	Mar Río Lago Laguna Delta Grifo	iSAME (SSA-CTAB)	LC-UV	300- 1700	[183]*
BZ3	Río Depuradora	DSPE (PVP-DVB)	(TD)GC-MS(EI ⁺)	0.5-2.0	[184]

Tabla 2.3. Continuación

Filtro UV ^a	Muestra de agua	Técnica de extracción ^b (fase de extracción) ^c	Técnica analítica ^d	LDD (ng L ⁻¹)	Ref
BDM, BZ3, EDP, EMC, ES, HS, IMC, MBC, OCR,	Depuradora	DLLME (tetracloroetano)	GC-MS(EI ⁺)	2-26	[185]
BZ3, EDP, EMC, ES, HS, IMC, MBC, OCR	Mar Río Piscina	SBSDME (MNPs CoFe ₂ O ₄ @ ácido oléico)	(TD)GC-MS(EI ⁺)	13-148	[186]*
ES, HS, IMC, MBC, EDP, EMC, OCR	Mar Río Piscina Spa	USAEME (cloroformo)	GC-MS/MS (EI ⁺)	0.080-1.3	[187]
BZ3, ES, HS, MBC, OCR	Mar Piscina	(on-line)MSA-DLLME ([C ₆ MIM][PF ₆])	LC-UV	620-40000	[188]
BZ3, EDP, EMC, ES, HS, IMC, MBC, OCR	Mar Río Piscina	SBSDME (composites CoFe ₂ O ₄ -nylon6)	LC-UV	1600-2900	[189]*

Marcados con * los trabajos pertenecientes a esta Tesis Doctoral

^a **BDM**: Butil metoxidibenzoilmetano; **BZ3**: Benzofenona-3; **BZ4**: Benzofenona-4; **EDP**: Etilhexil dimetil PABA; **EMC**: Etilhexil metoxicinamato; **ES**: Etilhexil salicilato; **HS**: Homosalato; **IMC**: Iosamil metoxicinamato; **MBC**: 4-Metilbenciliden canfor; **PBS**: Ácido fenilbencimidazol sulfónico; **PDT**: Ácido fenildibencimidazol tetrasulfónico; **OCR**: Octocrileno

^b **BAμE**: Microextracción adsorbtiva sobre barra; **CPE**: Extracción en punto de nube; **DLLME**: Microextracción líquido-líquido dispersiva; **DSPE**: Extracción en fase sólida dispersiva; **HFLPME**: Microextracción en fase líquida con fibra hueca; **IL**: Líquido iónico; **iSAME**: Microextracción sobre agregado formado in situ; **KWLPME**: Microextracción en fase líquida en lana de poliéster; **LLE**: Extracción líquido-líquido; **MALLE**: Extracción líquido-líquido asistida por membranas; **MEPS**: Microextracción mediante sorbentes empaquetados; **MSA**: Asistida por agitación magnética; **SBSDME**: Microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora; **SBSE**: Extracción por sorción sobre barra agitadora; **SDME**: Microextracción en gota; **SPE**: Extracción en fase sólida; **SPME**: Microextracción en fase sólida; **TC**: Temperatura controlada; **UDSA**: Asistida por agitador arriba-abajo; **USA**: Asistida por ultrasonidos; **USAEME**: Microextracción mediante emulsificación asistida por ultrasonidos; **VA**: Asistida por vórtex

^c **C18**: octadecil; **C8**: Octil; **[C₆MIM][PF₆]**: 1-hexil-3-metilimidazol hexafluorofosfato; **EGS**: Etilenglicol modificado con silicón; **GCB**: Carbón negro grafitado; **[HMIM][FAP]**: 1-hexil-3-metilimidazol tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato; **MAA-EDMA**: Ácido metacrílico-etilen dimetacrilato; **MNPs**: Nanopartículas magnéticas; **NPs**: Nanopartículas; **PA**: Poliacrilato; **PDMS**: Polidimetilsiloxano; **PS-DVB**: Poliestireno-divinilbenceno; **PS-DVB/MH**: PS-DVB modificado con grupos hidroxil; **PS-DVB/MP**: PS-DVB modificado con pirrolidona; **PVP-DVB**: Polivinilpirrolidona-divinilbenceno; **PVP-DVB/MCX**: PVP-DVB modificado con grupos de intercambio catiónico; **SSA-CTAB**: Ácido sulfosalicílico-bromuro de cetiltrimetilamonio

^d **APCI**: Ionización química a presión atmosférica; **APPI**: Fotoionización a presión atmosférica; **CE**: Electroforesis capilar; **CZE**: Electroforesis capilar zonal; **DART**: Análisis directo en tiempo real; **EI**: Ionización electrónica; **ESI**: Ionización por electrospray; **FASI**: Inyección de muestra con campo amplificado; **GC**: Cromatografía de gases; **GCxGC**: Cromatografía de gases bidimensional; **LC**: Cromatografía de líquidos; **LVI**: Inyección de gran volumen; **MS**: Espectrometría de masas; **MS/MS**: Espectrometría de masas en tándem; **TD**: Desorción térmica; **UV**: Espectrometría ultravioleta

2.4.1. Técnicas analíticas

Entre las técnicas analíticas, las cromatográficas son sin duda las más empleadas para identificar y cuantificar estos compuestos en un único análisis, ya que permiten la adecuada separación de los mismos. Además, aunque el pretratamiento de muestra elimina posibles interferentes de la matriz, algunos de ellos pueden permanecer en el extracto y por tanto es igualmente necesaria su separación. Generalmente, debido a las propiedades físico-químicas de los filtros UV, la cromatografía de líquidos (LC, del inglés *liquid chromatography*) es la técnica más adecuada para su determinación, pero la cromatografía de gases (GC, del inglés *gas chromatography*) también se ha utilizado, especialmente para los compuestos más volátiles, principalmente acopladas a detección por espectrometría de masas (MS, del inglés *mass spectrometry*) simple o en tándem (MS/MS), ya que permite alcanzar una mejor sensibilidad y menores límites de detección frente a otros detectores clásicos como espectrometría ultravioleta-visible (UV-Vis) para LC o detector de ionización en llama (FID, del inglés *flame ionization detection*) para GC. En este sentido, los límites de detección (LDD) generalmente obtenidos cuando se emplea LC-UV son del orden de $\mu\text{g L}^{-1}$, mientras que cuando se usa un detector MS/MS son del orden de ng L^{-1} , empleando la misma etapa de preconcentración.

Algunos filtros UV no presentan la suficiente volatilidad para ser determinados eficientemente por GC. Para aumentar su volatilidad, se suele llevar a cabo una etapa de derivatización previa a la inyección en el sistema cromatográfico. En este aspecto, la silylación con N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) [118, 119, 127], N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) [139, 145, 152, 153, 155, 168, 185] o N-(tert-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) [161] son las opciones preferidas en el caso de compuestos que presentan hidrógenos lábiles, aunque también se ha usado la acetilación con anhídrido acético [122]. En este caso, la acetilación *in situ* se llevó a cabo al mismo tiempo que SBSE, aumentando también el rendimiento de extracción ya que los derivados acetilados son más fácilmente extraíbles que los compuestos de origen. Por otra parte, se ha propuesto la formación de oximas mediante la reacción de grupos carbonilos con O-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)hidroxilamina (PFBHA) en el caso de compuestos sin hidrógenos lábiles [174]. En general, la derivatización se suele llevar a

cabo después de la extracción, por adición del agente derivatizante al extracto. No obstante, en algunos casos también se ha propuesto la sililación tras SPME, mediante la exposición de la fibra a los vapores del agente derivatizante [127, 152, 153]. Recientemente, Wu et al. [167] realizaron la sililación *in situ* mediante la adición del agente derivatizante al mismo tiempo que los disolventes dispersante y de extracción empleando la DLLME, incrementando de esta manera también el rendimiento de extracción.

Las publicaciones referentes al empleo de la electroforesis capilar (CE, del inglés *capillary electrophoresis*) como técnica de determinación de filtros UV son muy escasas [163, 179].

Por otra parte, cabe mencionar un artículo publicado por Haunschmidt et al. [132], en el que se llevó a cabo el análisis directo sin empleo de técnicas de separación. En este caso, los analitos se midieron directamente sobre la barra agitadora tras SBSE mediante análisis directo en tiempo real (DART, del inglés *direct analysis in real-time*).

2.4.2. Técnicas de extracción

Debido a que los filtros UV se encuentran a nivel de trazas en las muestras medioambientales, son necesarios métodos analíticos sensibles y selectivos para su determinación por lo que normalmente se requiere el uso de técnicas de preconcentración que mejoren los límites de detección.

Como se observa en la **Tabla 2.3**, la LLE tradicional se ha empleado escasamente para determinar filtros UV [118, 131], a diferencia de la SPE que ha sido ampliamente usada. Esta técnica normalmente hace uso de cartuchos comerciales rellenos con sorbentes de diferentes propiedades en función de la polaridad de los analitos a extraer. Por una parte, se han usado escasamente sorbentes hidrofóbicos de C18 [115, 150, 172], poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB) [146, 166] o carbón negro grafitado (GCB) [178] basados en interacciones no-polares para la determinación de filtros UV en muestras acuosas. Por otra parte, el copolímero polivinilpirrolidona-divinilbenceno (PVP-DVB) [124-126, 130, 135, 138, 149, 160, 175] o el poliestireno-divinilbenceno modificado con pirrolidona (PS-DVB/MP) [119, 132, 142, 162] o con grupos hidroxilo (PS-DVB/MH) [129] presentan una mayor interacción polar y por tanto se han usado en algunos casos para la determinación de los filtros UV con mayor carácter

polar como son las benzofenonas. En la determinación de compuestos con propiedades ácidas (BZ4 o PBS, por ejemplo), PVP-DVB modificado con un intercambiador de cationes (PVP-DVB/MCX) [120, 163] presenta mayores rendimientos que sin modificar. Dado que los filtros UV son compuestos moderadamente no-polares, la mayoría de los autores han empleado disolventes de polaridad intermedia como acetato de etilo, o disolventes no polares como el hexano o diclorometano, para la elución de los analitos. Cabe mencionar que la SPE-en línea también se ha utilizado en algunos casos [138, 163, 166] no sólo con el fin de reducir las cantidades de disolvente orgánico sino también para reducir la elevada manipulación de la muestra.

Además de SPE, y en menor medida LLE, las técnicas de microextracción en fase líquida y en fase sólida se han utilizado extensamente para la determinación de filtros UV teniendo en cuenta todas las ventajas que aportan, comentadas anteriormente en el **Capítulo 1**. Así pues, Giokas et al. [116] usaron por primera vez la LPME para la determinación de filtros UV en muestras acuosas. Estos autores emplearon CPE con el surfactante no-iónico Triton X-114 para la extracción de los analitos de muestras acuosas, los cuales fueron retroextraídos en metanol para evitar la entrada de la fase rica en surfactante en el sistema analítico. Posteriormente, Okanouchi et al. [121] y Vidal et al. [134] emplearon SDME usando disolventes convencionales y líquidos iónicos, respectivamente. Más tarde, Ge y Lee usaron HFLPME, en el que se sostuvo una gota del líquido iónico 1-hexil-3-metilimidazol tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato en el interior y en los poros de una fibra de polipropileno [151]. Por otra parte, el uso de SLM fue empleado por Rodil et al. [128] mediante MALLE, quienes emplearon una membrana de polietileno de baja densidad conteniendo 100 µL de propanol. Más recientemente, Zhang y Lee usaron lana de poliéster como soporte del disolvente de extracción [164].

Sin embargo, no fue hasta la aparición de la DLLME en 2006 cuando las técnicas de microextracción en fase líquida pudieron competir con las técnicas de microextracción en fase sólida. Así pues, Tarazona et al. [139] y Negreira et al. [140], y más recientemente Cunha et al. [185], propusieron el uso de la DLLME convencional con disolventes organoclorados y acetona como disolvente de extracción y dispersante, respectivamente, para la determinación de filtros UV en aguas ambientales. Con el fin de aumentar la dispersión del disolvente de extracción en las muestras

acuosas, Wu et al. [168] propusieron el uso de ultrasonidos para formar gotas extractantes más pequeñas mediante USA-DLLME. Sin embargo, para evitar la presencia del disolvente dispersante, que normalmente disminuye el coeficiente de partición de los analitos en el disolvente de extracción, Zhang et al. [143] y Zhang y Lee [155] propusieron agitación magnética y asistencia por vórtex, respectivamente, como fuerzas dispersantes del disolvente de extracción.

Los líquidos iónicos también han sido empleados como disolventes de extracción en DLLME obteniéndose buenas características analíticas del método. Sin embargo, debido a la alta viscosidad de estos líquidos iónicos, se han utilizado diferentes estrategias para dispersar los líquidos iónicos en la muestra acuosa. En primer lugar, Zhang y Lee [154], y posteriormente Xue et al. [169] propusieron IL-USA-DLLME. Ku et al. propusieron emplear un agitador mecánico en lugar de ultrasonidos [165]. Por otra parte, Ge y Lee [156], y recientemente Vila et al. [187], prefirieron evitar el disolvente dispersante sin sacrificar las ventajas que aporta el ultrasonidos como medio de dispersión mediante IL-USAEME. Finalmente, cabe mencionar que Zhang et al. [162] fueron los primeros en aplicar IL-TC-DLLME a la determinación de filtros UV.

A pesar del alto potencial analítico y numerosas ventajas que ofrece la DLLME, o cualquiera de sus modificaciones, respecto a otras técnicas de microextracción empleadas para la extracción de filtros UV en muestras medioambientales, sólo existe una publicación (perteneciente al grupo de investigación de la presente Tesis Doctoral [139]) en la que se desarrolló un método para la determinación de este tipo de compuestos en muestras de agua de mar mediante DLLME. Sin embargo, este trabajo estaba centrado en la determinación de sólo cuatro benzofenonas hidroxiladas. El objetivo del trabajo presentado en el **Capítulo 3** [174] de la presente Tesis Doctoral ha sido el desarrollo de un método analítico basado en el empleo de DLLME como etapa de extracción, previa al análisis mediante GC-MS, para la determinación de 8 filtros UV con carácter lipofílico de diferente naturaleza en muestras de agua de mar a nivel de trazas. Además, ninguna publicación previa a este trabajo determina el contenido de filtros UV en la fracción no soluble, centrándose únicamente en la fracción soluble.

Por otra parte, no existe en la bibliografía consultada ninguna publicación previa al trabajo desarrollado en el **Capítulo 4** [183] referente al empleo de

ISFME o a la formación de un fase agregada para la determinación de trazas de filtros UV en aguas ni en ningún otro tipo de matriz.

En cuanto a las técnicas de microextracción en fase sólida, la técnica más empleada ha sido la SPME en su modalidad de inmersión directa debido a la relativa baja volatilidad de los filtros UV [114, 127, 141, 143, 152, 153, 167, 177, 181]. Sin embargo, Lambropoulou et al. [114] compararon SPME tanto en inmersión directa como en espacio de cabeza, obteniendo resultados comparables para los compuestos estudiados, mientras que Negreira et al. [127] encontraron una clara mejora mediante el uso de SPME en su modalidad de inmersión directa en el caso de las benzofenonas. En cuanto a los sorbentes empleados, PDMS se ha usado en algunos de los casos [114, 141], proporcionando altos rendimientos de extracción para los compuestos poco polares, pero un bajo rendimiento de extracción para los compuestos relativamente polares como las benzofenonas hidroxiladas, las cuales son extraídas más eficazmente con sorbentes más polares como PDMS-DVB [127] o PA [152]. No obstante, se han propuesto nuevos sorbentes como alternativa a los disponibles comercialmente, como el recubrimiento sol-gel en base de grafeno [153], un alambre de plata recubierto con una cadena de dodecilo (Ag-C_{12}) [167] e incluso discos de silicona desechables [144]. Recientemente, se ha empleado con éxito una nueva fibra de Ti-TiO_2 recubierta de nanopartículas de ZrO_2 por electrodeposición para la determinación de cuatro filtros UV [181]. En lo que respecta a la etapa de desorción, la desorción térmica es la más frecuente cuando se usa GC [114, 127, 141, 152, 153], ya que toda la cantidad de analito retenida en la extracción se transfiere al puerto de inyección del sistema cromatográfico. Esto permite un aumento en la sensibilidad respecto al uso de la desorción líquida. Sin embargo, si se emplea LC, la desorción líquida es necesaria [167, 177].

Moeder et al. [136] también utilizaron MEPS, seguida de desorción líquida en 50 μL de acetate de etilo, los cuales se inyectaron en el sistema GC empleando el sistema de inyección de gran volumen (LVI, del inglés *large volume injection*).

SBSE también constituye otra técnica de microextracción frecuentemente empleada en la determinación de filtros UV en muestras de agua de origen medioambiental [117, 122, 123, 133, 137, 147, 148, 157, 158, 161, 173, 176]. En la gran mayoría de los casos, PDMS ha sido el recubrimiento empleado ya que era el más accesible, si bien el rendimiento de extracción

de compuestos relativamente polares era bajo. Kawaguchi et al. [122] propusieron una derivatización *in situ* con anhídrido acético para formar los derivados acetilados de benzofenonas, que presentan menor polaridad que los compuestos de partida. Recientemente, Gilart et al. [173] compararon el PDMS clásico con otros dos nuevos sorbentes (poliacrilato-poli(etilenglicol) (PA-PEG) y etilenglicol modificado con silicona (EGS)) concluyendo que EGS permite mejor extracción para algunos compuestos polares a la vez que mejora la extracción de compuestos apolares. Más recientemente, la falta de recubrimientos comercialmente disponibles en SBSE fomentó que Almeida et al. [170] emplearan la BA μ E, en la que compararon como sorbentes PS-DVB, una pirrolidona modificada, un derivado ciano y cinco carbonos activos de diferente superficie. Esta novedosa técnica de microextracción presenta una mayor versatilidad que SBSE ya que permite elegir a medida el sorbente en función de los analitos a extraer. También se han diseñado nuevos dispositivos para la determinación *in situ* de filtros UV mediante el empleo del polímero poli(ácido metacrilato-co(etileno dimetacrilato) (MAA-EDMA), que recubre una pequeña barra agitadora magnética sujeta a un microrotor [177].

Recientemente, Chung et al. [184] aplicaron DSPE con PVP-DVB como sorbente para la determinación de benzofenonas. El uso de nanopartículas magnéticas para la determinación de filtros UV fue propuesto por primera vez por Román et al. [145], empleando DSPE con MNPs de ferrita de cobalto recubiertas con ácido oleico (CoFe₂O₄@ácido oléico). En los **Capítulos 5 y 6** [180, 186] de la presente Tesis Doctoral también se han utilizado estas MNPs con carácter hidrofóbico para la determinación de 8 filtros UV lipofílicos mediante una nueva técnica desarrollada que se ha denominado microextracción dispersiva-por sorción sobre barra agitadora (SBSDME). Esta técnica combina los principios de SBSE y DSPE en un mismo método, siendo mediada por MNPs. Por otra parte, en el **Capítulo 7** [189] se ha empleado SBSMDME para la determinación de 4 filtros UV con carácter hidrofílico. En este caso, la extracción se lleva a cabo mediante el uso de un composite magnético de nylon 6, que posibilita la unión de los analitos con la fase extractante mediante interacciones electrostáticas debido a la alta afinidad que presentan los compuestos sulfónicos por las poliamidas como en nylon. Cabe indicar que es la primera vez que se usa este tipo de sorbentes para la extracción de filtros UV.

Por otra parte, Giokas et al. [159] combinaron las técnicas CPE y DSPE, secuencialmente, de manera que la fase con el surfactante se dispersaba con la ayuda de MNPs de Fe_2O_3 recubiertas de polisiloxano, evitando la necesidad de centrifugación o congelación para recoger la fase rica en el surfactante.

2.4.3. Muestras de agua analizadas

En cuanto al tipo de aguas de origen medioambiental analizadas, en la bibliografía se puede encontrar una amplia variedad de matrices: agua de grifo, aguas naturales (lagos, ríos, mares), agua de piscina y aguas de efluentes/afluentes de plantas depuradoras. Cabe mencionar que las concentraciones encontradas varían de unos pocos a miles de ng L^{-1} , dependiendo del filtro UV y del tipo de agua estudiada, ya que los altos niveles de filtros UV en aguas donde se realizan actividades acuáticas recreativas contrastan con los obtenidos en las aguas en las que no tienen lugar este tipo de actividades, donde los niveles son menores. Además, estas concentraciones no sólo depende del número de bañistas en cada área, sino también del número de usuarios de productos cosméticos, del grado de renovación del agua, de la marea o de la fecha de muestreo (invierno – verano), entre otros factores. En verano, las concentraciones son más elevadas debido al incremento que se produce en el consumo de protectores solares, mientras que en invierno también se han detectado filtros UV, en menor medida, por la presencia de estos compuestos en otros productos, como se ha indicado anteriormente.

También cabe destacar que, en general, las concentraciones encontradas en aguas tratadas son mucho menores que las halladas en las aguas de entrada a las plantas depuradoras, dependiendo del compuesto. No obstante, el hecho de que se sigan encontrando concentraciones considerables de filtros UV en los efluentes indica que la degradación de algunos de estos compuestos no es del todo efectiva mediante los procesos biológicos convencionales que se aplican en estas plantas. Algunas publicaciones en las que se han realizado estudios que muestran altas concentraciones de filtros UV lipofílicos en los lodos de las plantas de tratamiento residual indican que la adsorción es el factor principal de eliminación de estos compuestos [190, 191].

Además, las publicaciones anteriormente mencionadas se centran únicamente en la determinación de la fracción soluble, sin considerar la cantidad de filtros UV adherida a las partículas suspendidas en la muestra acuosa, que podría ser incluso mayor que el contenido soluble como se ha observado para trazas de otros componentes [192, 193]. Por todo ello, en el **Capítulo 3** de la presente Tesis Doctoral se ha desarrollado, por primera vez, un método analítico para la determinación de 8 filtros UV liposolubles no sólo en la fracción soluble de agua de mar, sino también en la fracción de materia particulada presente en la misma. De este modo, desde un punto de vista medioambiental, el método propuesto es útil ya que se determina el contenido total. De no ser así, los resultados no estarían completos ya que se estaría obviando una fracción importante. Para ello, es necesaria una etapa de lixiviación mediante tratamiento de ultrasonidos, previa a la extracción mediante DLLME convencional. Además, este método ha sido aplicado en un estudio medioambiental para la determinación de dos de los filtros UV en diferentes capas de las muestras de agua de mar, así como en muestras tomadas a diferentes horas a lo largo de un día [194]. En los **Capítulos 4, 5, 6 y 7** también se ha aplicado esta etapa de ultrasonidos en las muestras de diferente procedencia analizadas.

SECCIÓN II

RESUMEN DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES

Capítulo 3

Desarrollo de un método analítico para la determinación de filtros UV en las fracciones soluble y particulada de agua de mar mediante microextracción líquido-líquido dispersiva y cromatografía de gases-espectrometría de masas

El contenido de este capítulo ha sido publicado:

Determination of UV filters in both soluble and particulate fractions of seawaters by dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry,

J.L. Benedé, A. Chisvert, A. Salvador, D. Sánchez-Quiles, A. Tovar-Sánchez
Analytica Chimica Acta 812 (2014) 50-58

Y presentado como cartel:

XVIII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica, Úbeda, 2013

INTRODUCCIÓN

Objetivo

Desarrollar un método analítico que permita la determinación de filtros UV en muestras de agua de mar, tanto en la fracción soluble como en la materia particulada presente

Resumen

Los filtros UV se acumulan en el medio ambiente acuático debido al uso de productos cosméticos. Además, algunos de estos compuestos también se acumulan en las partículas suspendidas en el agua debido a sus propiedades lipofílicas. Los filtros UV orgánicos pueden presentar actividad de disrupción endocrina incluso a nivel de trazas, y se consideran en la actualidad contaminantes emergentes.

En el trabajo presentado en este capítulo se desarrolla, por primera vez, un método analítico para la determinación de ocho filtros UV orgánicos tanto en la fracción soluble como en la fracción de la materia particulada, es decir, aquella adherida a las partículas en suspensión, en muestras de agua de mar. De este modo, el método propuesto puede ser útil para propósitos de vigilancia medioambiental ya que se determina el contenido total. De no ser así, los resultados podrían no ser correctos desde un punto de vista medioambiental, ya que suele obviarse la fracción de la materia particulada.

Con este fin, se emplea la **DLLME** como técnica de microextracción para preconcentrar los analitos previa a su determinación por **cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas**. Además, para liberar los filtros UV desde las partículas en suspensión, se lleva a cabo un **tratamiento con ultrasonidos**. En las condiciones optimizadas, el método fue satisfactoriamente validado mostrando buena linealidad, altos factores de preconcentración (112 – 263), límites de detección y cuantificación del orden de ng L⁻¹ y buena repetibilidad intra- e inter-día (RSD < 15 %).

MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA

Variables estudiadas

- Tipo del disolvente dispersante y del disolvente de extracción
- Volumen del disolvente de extracción
- Volumen del disolvente dispersante
- Volumen de la fase dadora
- pH de la fase dadora
- Fuerza iónica de la fase dadora

Señal analítica

$y = A_i/A_{PI}$, donde A_i corresponde al área del pico cromatográfico del analito i y A_{PI} al área del pico cromatográfico del patrón interno

Corrección de la señal analítica

- El volumen de la fase sedimentada presenta una gran variabilidad dependiendo de las condiciones de extracción
- Para su corrección:
 - medir el volumen total de fase sedimentada (V_{sed}) en cada caso
 - añadir una alícuota de volumen fijo de patrón interno ($V_{PI} = 5 \mu\text{L}$)
 - calcular la señal analítica corregida:

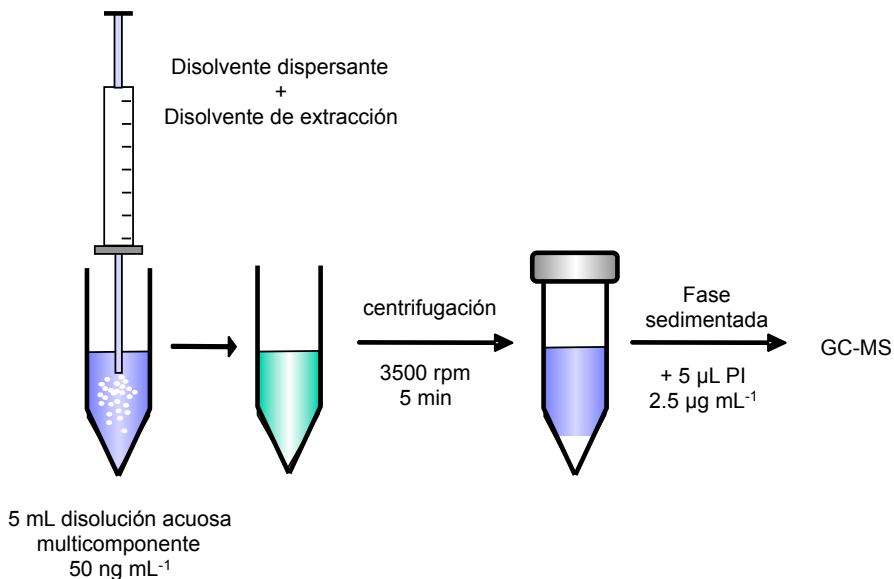
$$(A_i/A_{PI})_{corr} = (A_i/A_{PI}) (V_{PI}/V_{sed})$$

Disoluciones empleadas

- Disolución multicomponente de 50 ng mL^{-1} de los analitos en agua
- Disolución de $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PI en cloroformo

Procedimiento experimental general en la optimización

La mezcla de disolventes dispersante y de extracción se añade a la disolución formándose una dispersión (*cloudy solution*). Después de la extracción, se centrifuga para obtener la separación de fases, y la fase sedimentada se recoge para ser analizada por GC-MS



Estudio del tipo de disolvente dispersante y disolvente de extracción

Características del disolvente de extracción

- Inmiscible en la fase acuosa
- Capacidad de extracción de los analitos
- Densidad mayor que la del agua para facilitar su recogida
- Punto de ebullición bajo para inyectar en un equipo de GC

Características del disolvente dispersante

- Miscible en agua y en el disolvente de extracción
- Capacidad para formar la dispersión en el seno de la fase dadora

Disolventes de extracción estudiados

- Cloroformo (CHCl_3)
- Diclorometano (CH_2Cl_2)

Disolventes dispersantes estudiados

- Acetona
- Acetonitrilo
- Etanol

Procedimiento experimental

Se inyectan mezclas de 500 μL de cada disolvente dispersante y 60 μL de cada disolvente de extracción rápidamente en 5 mL de disolución acuosa multicomponente de 50 ng mL^{-1}

Resultados

- Con diclorometano como disolvente de extracción no se forma dispersión en ninguna de las tres combinaciones
- En la mezcla etanol-cloroformo no se produce separación de fases tras centrifugar
- Pequeñas diferencias entre las dos combinaciones restantes
- La acetona presenta un nivel de toxicidad inferior al acetonitrilo

Disolvente dispersante seleccionado: **acetona**

Disolvente de extracción seleccionado: **cloroformo**

Estudio del volumen de disolvente de extracción

Al aumentar el volumen de disolvente de extracción, se espera un aumento de la cantidad de analito extraído pero también aumenta el volumen de fase sedimentada y, por tanto, aumenta el efecto de la dilución

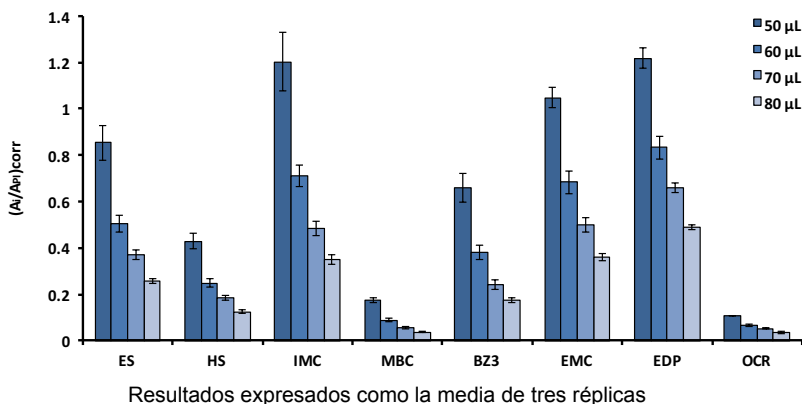
Volúmenes de disolvente de extracción estudiados

$$V_{\text{ext}} = 40 - 80 \mu\text{L}$$

Procedimiento experimental

Se inyectan mezclas de 500 μL de acetona y diferentes volúmenes de cloroformo rápidamente en 5 mL de disolución acuosa multicomponente de 50 ng mL^{-1}

Resultados



- Para $V_{\text{ext}} = 40 \mu\text{L}$, insuficiente volumen de fase sedimentada para recoger e inyectar en el GC-MS
- Las señales disminuyen considerablemente al aumentar el volumen

Volumen de disolvente de extracción seleccionado: 50 μL

Estudio del volumen de disolvente dispersante

El volumen del disolvente dispersante debe ser el adecuado para que el disolvente de extracción se disperse correctamente en la disolución acuosa en forma de pequeñas gotas

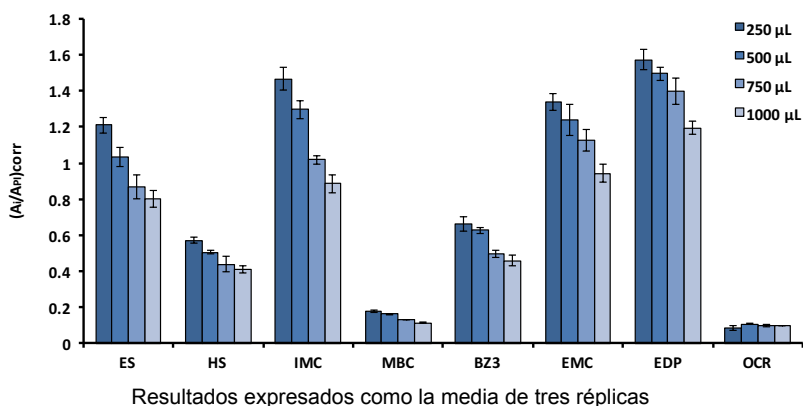
Volúmenes de disolvente dispersante estudiados

$$V_{\text{disp}} = 100 - 1000 \mu\text{L}$$

Procedimiento experimental

Se inyectan mezclas de diferentes volúmenes de acetona y 50 μL de cloroformo rápidamente en 5 mL de disolución acuosa multicomponente de 50 ng mL^{-1}

Resultados



- Para $V_{\text{disp}} = 100 \mu\text{L}$, insuficiente volumen de fase sedimentada para recoger
- Los mejores resultados se obtiene cuando se añaden menores volúmenes de disolvente dispersante
- Al aumentar el volumen de disolvente dispersante disminuye el coeficiente de partición de los analitos en el disolvente de extracción

Volumen de disolvente dispersante seleccionado: 250 μL

Estudio del volumen de la fase dadora

La proporción de volúmenes debe ser la adecuada para que el disolvente de extracción no se disuelva parcialmente en la fase dadora

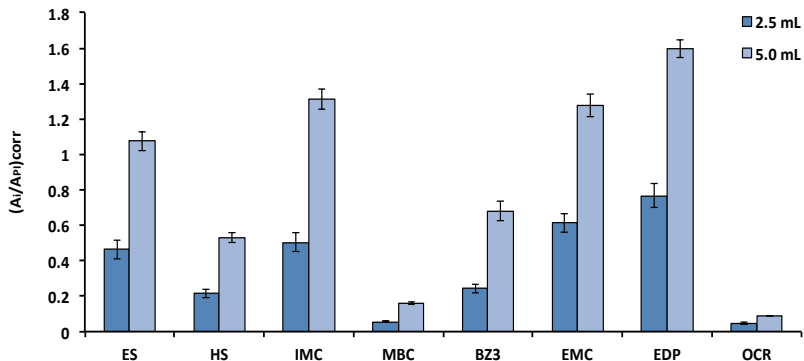
Volúmenes de fase dadora estudiados

$$V_{\text{dad}} = 2.5 - 7.5 \text{ mL}$$

Procedimiento experimental

Se inyectan mezclas de 250 μL de acetona y 50 μL de cloroformo rápidamente en diferentes volúmenes de disolución acuosa multicomponente de 50 ng mL^{-1}

Resultados



Resultados expresados como la media de tres réplicas

- Para $V_{\text{dad}} = 7.5 \text{ mL}$, insuficiente volumen de fase sedimentada para recoger e inyectar en el GC-MS

Volumen de fase dadora seleccionado: 5 mL

Estudio del pH de la fase dadora

La forma neutra de los compuestos orgánicos se extrae más eficazmente en el disolvente de extracción que la forma ionizada

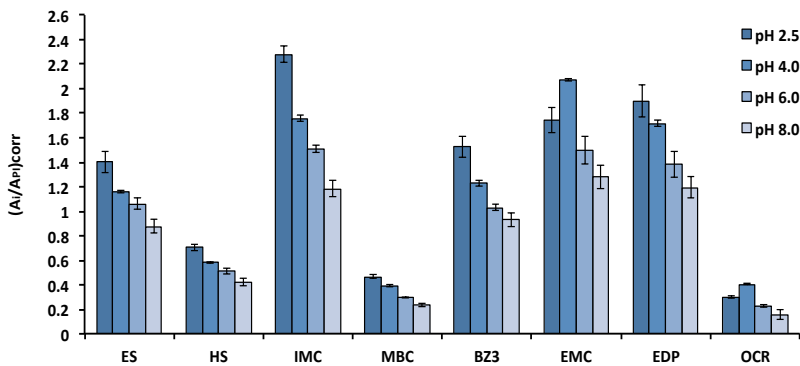
Valores de pH estudiados

pH = 2.5 – 8.0

Procedimiento experimental

Se inyectan mezclas de 250 μL de acetona y 50 μL de cloroformo rápidamente en 5 mL de disolución acuosa multicomponente de 50 ng mL^{-1} ajustada a diferentes valores de pH (con ácido acético glacial y/o hidróxido sódico)

Resultados



Resultados expresados como la media de tres réplicas

- Mejores resultados a pH ácido

pH de la fase dadora seleccionado: 2.5

Estudio de la fuerza iónica de la fase dadora

La fuerza iónica disminuye la solubilidad de los analitos en la fase dadora mejorando la extracción (efecto salino), pero aumenta el volumen de fase sedimentada (efecto de dilución)

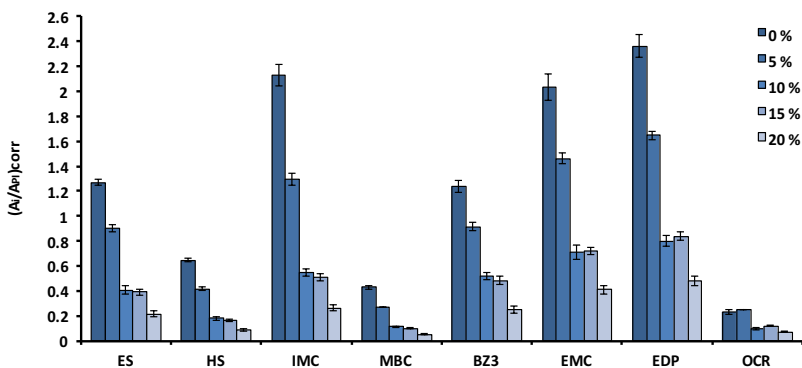
Contenidos salinos (% NaCl) estudiados

NaCl = 0 – 20 % (m/v)

Procedimiento experimental

Se inyectan mezclas de 250 µL de acetona y 50 µL de cloroformo rápidamente en 5 mL de disolución acuosa multicomponente de 50 ng mL⁻¹ ajustada a pH 2.5 conteniendo diferentes cantidades de NaCl

Resultados



Resultados expresados como la media de tres réplicas

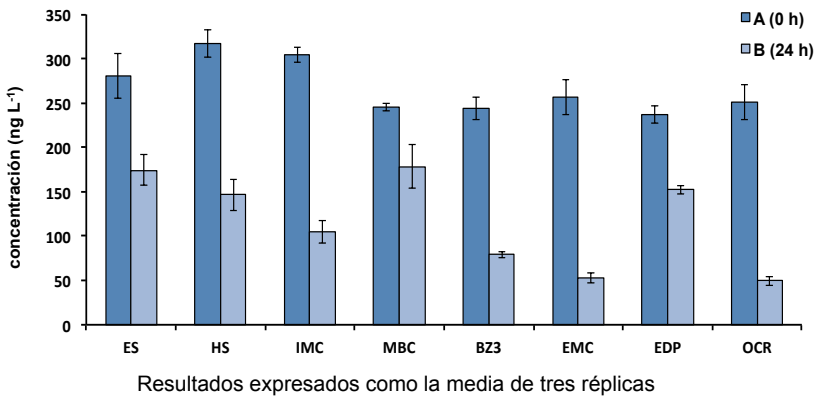
- A mayor fuerza iónica, menor es la respuesta debido a que el efecto de dilución prevalece sobre el efecto salino
- Este efecto se tendrá en cuenta en el análisis de muestras con alto contenido salino y se corregirá mediante la adición de patrón interno (pág.81)

Contenido salino adicionado: 0 %

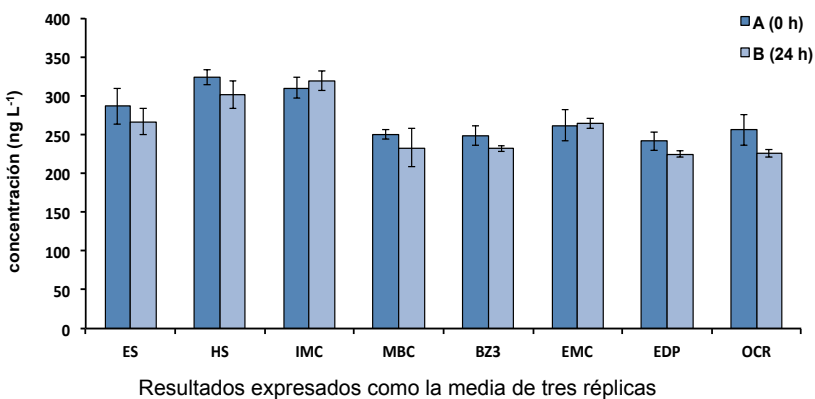
ESTUDIO DEL TIEMPO DE ULTRASONIDOS

Estudio previo

- Una muestra de agua de mar sin filtrar se fortificó con 250 ng L⁻¹ de los ocho filtros UV
- Una fracción (A) se analizó inmediatamente y otra fracción (B) transcurridas 24 horas tras la fortificación
- El descenso de la concentración indica que los filtros UV se adsorben sobre la superficie de las partículas



- Se hizo el mismo experimento paralelamente con muestra filtrada (sin partículas)



- Los resultados muestran que el descenso de la concentración de los filtros UV se debe a la adsorción a las partículas y no a su degradación o adsorción sobre las paredes del recipiente

Tratamiento de ultrasonidos

- Es necesario lixiviar los filtros UV de la superficie de las partículas antes de filtrar las muestras
- Los ultrasonidos aceleran la transferencia de masa entre un sólido y un disolvente debido al aumento de:
 - presión, que favorece la penetración y el transporte
 - temperatura, que mejora la solubilidad y la difusión

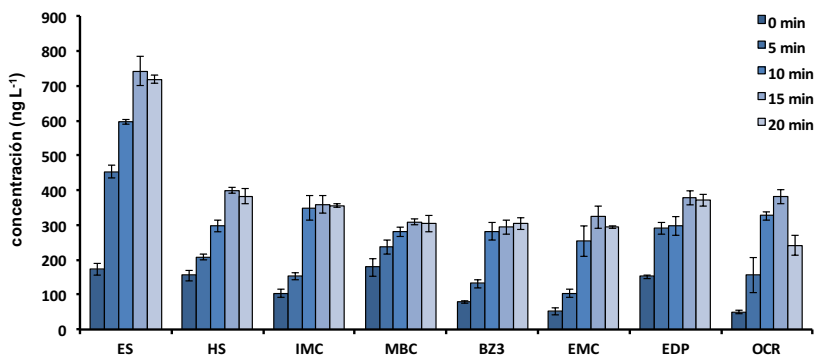
Tiempos de sonicación estudiados

t = 0 – 20 min

Procedimiento experimental

Se aplican diferentes tiempos de ultrasonidos (50 Hz, 360 W) a la porción B (24 horas después de la fortificación), se filtra y se analiza mediante el método DLLME-GC-MS propuesto

Resultados



Resultados expresados como la media de tres réplicas

- Las concentraciones aumentan con el tiempo de sonicación hasta 10 – 15 minutos, dependiendo del analito

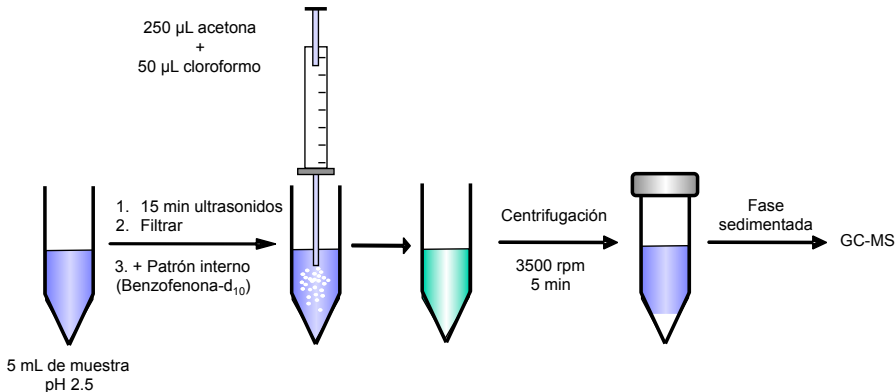
Tiempo de sonicación seleccionado: 15 min

Tabla 3.1. Contenido total de filtros UV obtenidos en el análisis de una muestra fortificada después de 15 minutos de ultrasonidos

Filtro UV	Concentración fortificada (ng L ⁻¹)	Concentración encontrada (ng L ⁻¹)	
		Antes fortificación	24 h después fortificación
ES	276	440 ± 20	740 ± 40
HS	276	157 ± 12	400 ± 10
IMC	286	118 ± 7	360 ± 30
MBC	267	< LOD	308 ± 8
BZ3	275	< LOQ	290 ± 20
EMC	269	91 ± 6	320 ± 30
EDP	263	163 ± 14	380 ± 20
OCR	286	< LOQ	362 ± 19

- Tras sonicar 15 minutos la fracción B (transcurridas 24 horas tras la fortificación), se obtienen las concentraciones fortificadas inicialmente, es decir, los analitos son lixiviados de las partículas

MÉTODO PROPUESTO



- Concentraciones de trabajo: 100 – 500 ng L⁻¹ para todos los analitos
- Patrón interno (BZ-d₁₀): 1 ng mL⁻¹

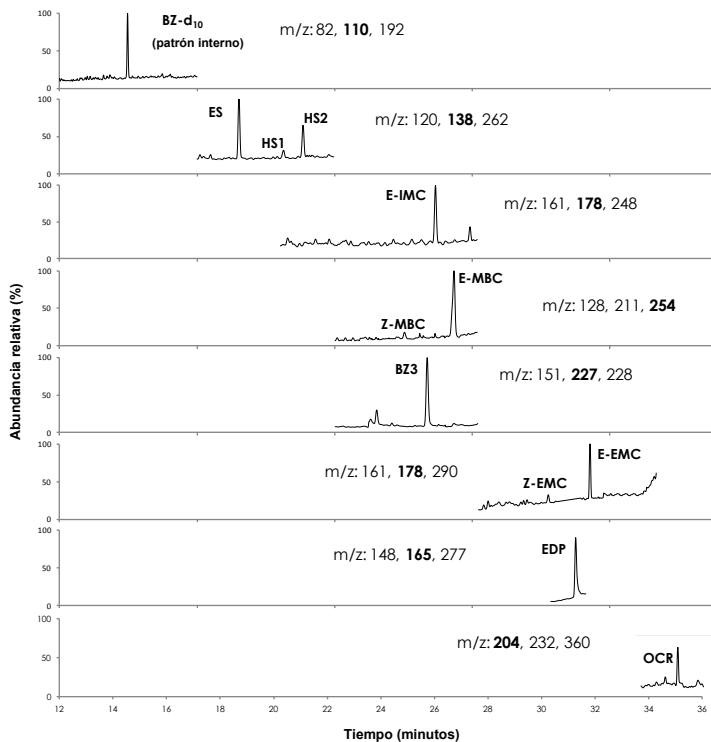
Tabla 3.2. Condiciones del GC-MS

Volumen de inyección	2 µL (sin división de flujo)	
Temperatura inyector	280 °C	
Temperatura interfase	280 °C	
Temperatura fuente	250 °C	
Flujo de Helio	1 mL min ⁻¹	
Columna	HP-5MS UI (95 % dimetil-5 % difenilpolisiloxano, 30 m, 0.25 mm d.i., 0.25 µm)	
Programa de temperaturas	70 °C (1 min), 10 °C min ⁻¹ hasta 170 °C, 2 °C min ⁻¹ hasta 200 °C y 10 °C min ⁻¹ hasta 280 °C (6 min)	

Tabla 3.3. Datos de interés del método de GC-MS para los compuestos objeto de estudio y el patrón interno (PI)

Filtro UV	Tiempo de retención (min)	Iones monitorizados (m/z)
BZ-d ₁₀ (PI)	14.44	82, 110 , 192
ES	18.45	120 , 138, 250
HS	20.04 (<i>HS</i> ₁), 20.75(<i>HS</i> ₂)	120, 138 , 262
IMC	21.20 (<i>Z</i>), 25.54 (<i>E</i>)	161, 178 , 248
MBC	24.50 (<i>Z</i>), 26.23 (<i>E</i>)	128, 211, 254
BZ3	25.33	151, 227 , 228
EMC	29.78 (<i>Z</i>), 31.22 (<i>E</i>)	161, 178 , 290
EDP	30.62	148, 165 , 277
OCR	35.04	204 , 232, 360

Cromatograma obtenido aplicando el método propuesto



Disolución patrón de 500 ng L⁻¹ de los filtros UV estudiados y 1 ng mL⁻¹ de patrón interno en agua desionizada

- En el proceso industrial de síntesis de HS se forman dos isómeros (HS1 y HS2) en una relación constante, y por ello aparecen dos picos en el cromatograma
- Los compuestos MBC, IMC y EMC presentan dos isómeros geométricos (E y Z). El isómero comercial E (mayoritario) experimenta isomerización al isómero Z cuando se expone a la luz.
- El método propuesto permite la separación de todos los isómeros y para cuantificar cada filtro UV se emplea la suma de ambos isómeros

CALIBRACIÓN

Calibración seleccionada

Calibración con adición de **patrón interno** para reducir la variabilidad de las medidas en GC y del proceso DLLME

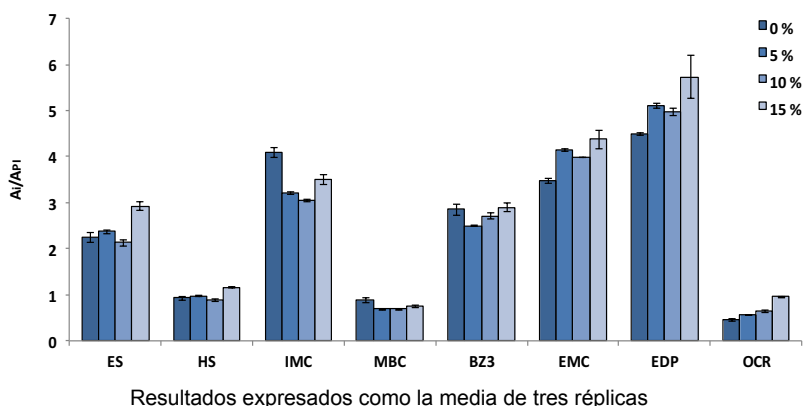
Señal analítica

$y = A_i/A_{PI}$, donde A_i corresponde al área del pico cromatográfico del analito i y A_{PI} al área del pico cromatográfico del patrón interno (BZ-d₁₀)

Patrón interno seleccionado

Benzofenona deuterada (BZ-d₁₀) fue seleccionada como patrón interno debido a:

- Adecuado para inyectar en GC-MS y se extrae correctamente en cloroformo mediante DLLME
- Su presencia en muestras de agua es poco probable
- Se ve afectado por la fuerza iónica de la misma manera que los analitos
- Cuando se usa A_i/A_{PI} como señal analítica, el contenido salino (fuerza iónica) no afecta significativamente a la extracción, por lo que muestras con diferente contenido salino no se verán afectadas



CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO PROPUESTO

Parámetros de calidad estudiados

- Factor de preconcentración (FP)
- Rendimiento de extracción (RE)
- Linealidad
- Límites de detección (LDD) y límites de cuantificación (LDC)
- Precisión intra-día e inter-día

Tabla 3.4. Parámetros analíticos del método propuesto

Filtro UV	FP	Pendiente $\pm s$ /10 ⁵ (ng L ⁻¹)	R ²	LDD (ng L ⁻¹)	LDC (ng L ⁻¹)	Precisión intra-día RSD (%)		Precisión inter-día RSD (%)	
						100 ng L ⁻¹	250 ng L ⁻¹	100 ng L ⁻¹	250 ng L ⁻¹
ES	157 \pm 4	56.20 \pm 0.10	0.999	26	85	6.9	5.0	11.3	6.8
HS	199 \pm 9	50 \pm 2	0.994	14	46	9.6	5.5	12.1	6.5
IMC	227 \pm 14	72 \pm 2	0.998	23	78	4.1	6.3	11.3	8.1
MBC	259 \pm 12	8.6 \pm 0.3	0.996	10	33	8.1	2.2	12.7	6.6
BZ3	262 \pm 18	91 \pm 3	0.997	30	99	10.6	6.2	13.9	8.7
EMC	181 \pm 13	63.3 \pm 1.8	0.998	14	47	7.8	3.1	9.9	8.0
EDP	263 \pm 21	111 \pm 3	0.997	29	98	10.1	6.7	12.3	8.9
OCR	112 \pm 8	11.4 \pm 0.5	0.994	27	91	11.7	8.2	14.1	10.5

Factor de preconcentración (Tabla 3.4)

- $FP = C_{sed}/C_0$, donde C_{sed} corresponde a la concentración en la fase sedimentada y C_0 a la concentración inicial en la fase acuosa
- Valores de **FP** comprendidos entre **112 y 262**

Rendimiento de extracción

- $RE = FP \cdot V_{fase\ sedimentada}/V_{inicial} \cdot 100 \%$
- Valores de **RE** comprendidos entre **40 y 95 %**

Linealidad (Tabla 3.4)

- **Linealidad** hasta, al menos, 10 ng mL⁻¹ en todos los casos
- **Intervalo de trabajo:** 100 – 500 ng L⁻¹, con coeficientes de regresión (R²) > 0.994

Límites de detección y cuantificación (Tabla 3.4)

- $LDD = 3 S_{y/x}/b$ $LDC = 10 S_{y/x}/b$
donde $S_{y/x}$ corresponde a la desviación estándar residual y b a la pendiente de la curva de calibrado obtenida
- **LDD** comprendidos entre **10 y 30 ng L⁻¹**
- **LDC** comprendidos entre **33 y 99 ng L⁻¹**
- El método propuesto permite la determinación de los compuestos estudiados a niveles de **(ultra)trazas**

Precisión intra-día e inter-día (Tabla 3.4)

- Expresada como desviación estándar relativa (% **RSD**)
- El método propuesto se aplicó a cinco réplicas de una disolución patrón a dos niveles de concentración (100 y 250 ng L⁻¹)
- Se analizaron en la misma sesión de trabajo (intra-día) y en cinco días consecutivos (inter-día)
- Valores entre **2 y 14 %**, indicando **buena precisión**

ANÁLISIS DE MUESTRAS

Muestras analizadas

- Tres muestras de agua de mar de diferentes playas recogidas durante la estación de verano
- Analizadas por triplicado empleando el método DLLME-GC-MS propuesto
- Se determinó el contenido de filtros UV tanto en la fracción soluble como la total (soluble más particulada)

Resultados (Tabla 3.5)

- Las concentraciones encontradas fueron mayores cuando se determinó la fracción particulada, además de la soluble
- Concentraciones en el contenido total similares en las muestras 1 y 2 (192 – 880 y 200 – 750 ng L⁻¹)
- Mayores concentraciones en la fracción particulada en la muestra 2 → mayor cantidad de partículas en la muestra
- Concentraciones más bajas en la muestra 3 (< 440 ng L⁻¹) → playa menos frecuentada

Tabla 3.5. Concentraciones encontradas de los filtros UV objeto de estudio en muestras de agua de mar tras aplicar el método DLLME-GC-MS propuesto

Filtro UV	Muestra 1			Muestra 2			Muestra 3		
	soluble	materia particulada	total	soluble	materia particulada	total	soluble	materia particulada	total
ES	680 ± 30	200 ± 40	880 ± 30	470 ± 20	280 ± 50	750 ± 50	387 ± 12	50 ± 20	440 ± 20
HS	200 ± 20	110 ± 30	310 ± 20	115 ± 10	165 ± 13	280 ± 9	75 ± 8	82 ± 14	157 ± 12
IMC	200 ± 3	80 ± 20	280 ± 20	123 ± 8	130 ± 20	251 ± 18	< LDC	118 ± 7	118 ± 7
MBC	125 ± 7	70 ± 20	192 ± 19	49 ± 4	170 ± 20	220 ± 20	< LDD	< LDD	< LDD
BZ3	182 ± 13	130 ± 20	308 ± 16	< LOQ	200 ± 2	200 ± 2	< LDC	< LDC	< LDC
EMC	144 ± 11	120 ± 20	260 ± 18	103 ± 13	150 ± 40	250 ± 40	53 ± 3	38 ± 7	91 ± 6
EDP	163 ± 11	83 ± 12	246 ± 5	199 ± 5	190 ± 40	390 ± 40	137 ± 15	30 ± 20	163 ± 14
OCR	187 ± 5	70 ± 30	260 ± 30	135 ± 14	182 ± 14	317 ± 2	< LDC	< LDC	< LDC

Estudios de recuperación

- Se calculó el **coeficiente de recuperación (%)**:

$$R = [(C_{M+P} - C_M) / C_P] \cdot 100 \%$$
 donde:
 C_M : concentración de la muestra sin fortificar
 C_{M+P} : concentración de la muestra fortificada
 C_P : concentración del patrón añadido a la muestra (concentración fortificada)
- Se fortificó, por triplicado, una muestra de agua de mar a dos niveles de concentración (100 y 250 ng L⁻¹) y el patrón interno (1 ng mL⁻¹)

Tabla 3.6. Coeficientes de recuperación (%) obtenidos en el estudio del efecto matriz

Filtro UV	Coeficiente de recuperación (%)	
	200 ng L ⁻¹	400 ng L ⁻¹
ES	112 ± 3	117 ± 8
HS	88 ± 10	97 ± 6
IMC	107 ± 4	97 ± 3
MBC	88 ± 4	82 ± 1
BZ3	111 ± 2	114 ± 6
EMC	87 ± 10	99 ± 9
EDP	90 ± 3	95 ± 3
OCR	91 ± 5	104 ± 1

- Valores entre **87 y 112 y %**, y **82 y 118 %**, respectivamente, indican que la matriz no afecta de forma significativa
- MÉTODO DE CALIBRACIÓN:** Calibración externa. Los patrones de calibración se preparan y se extraen empleando el método DLLME en las mismas condiciones que las muestras

ESTUDIO MEDIOAMBIENTAL

- El método fue adaptado y aplicado satisfactoriamente en la determinación de BZ3 y MBC en **diferentes capas** de muestras de agua de mar de la isla de Mallorca: microcapa superficial y agua superficial (a 1 cm de profundidad) [194]
- Se tomaron muestras a **diferentes horas** a lo largo del día: 06.00, 10.00, 14.00, 18.00, 22.00 y 02.00 h

Resultados

- Concentraciones más altas en la microcapa superficial (BZ3: 580 ± 50 ng L⁻¹ y MBC: 113 ± 7 ng L⁻¹) → Debido a las propiedades lipofílicas, se acumulan en las partículas de esta capa
- Máximas concentraciones entre las 14.00 y 18.00 h → máxima radiación solar y, por tanto, mayor grado de aplicación de cremas solares por los bañistas
- A estas horas, las concentraciones superaron un 60 – 90 % los valores de las muestras tomadas por la noche o temprano por la mañana, cuando la afluencia de bañistas es prácticamente nula
- Resultados similares se encontraron para otros elementos (Zn y Ti) y aniones inorgánicos (NO₃⁻, PO₄³⁻ y NH₄⁺), todos ellos presentes en las formulaciones cosméticas

CONCLUSIONES

- El método propuesto, basado en DLLME como técnica de extracción previa al análisis por GC-MS, permite la determinación de ocho filtros UV liposolubles a nivel de trazas en la fracción soluble y particulada de agua de mar
- Es la primera vez que se determina el contenido total (fracción soluble y particulada), obteniéndose resultados fiables desde un punto de vista medioambiental
- Se han obtenido buenos parámetros analíticos, incluyendo factores de preconcentración, límites de detección y repetibilidad
- Se ha validado satisfactoriamente empleando tres muestras de agua de mar de diferente procedencia
- El tratamiento con ultrasonidos es eficiente para la liberación de los filtros UV desde las partículas al agua
- Se trata de un método analítico simple, rápido, sensible y respetuoso con el medio ambiente y con el operario, ya que se utilizan cantidades muy pequeñas de disolventes orgánicos
- El estudio medioambiental realizado en muestras de agua de mar de Mallorca demostró que en la microcapa superficial y en el intervalo de horas de 14-18 h se obtiene las máximas concentraciones de dos de los filtros UV estudiados (BZ3 y MBC)

Capítulo 4

Desarrollo de una nueva técnica de microextracción: microextracción sobre agregado formado *in situ*. Aplicación a la determinación de filtros UV en muestras de agua

El contenido de este capítulo ha sido publicado:

In-situ suspended aggregate microextraction: A sample preparation approach for the enrichment of organic compounds in aqueous solutions,

Juan L. Benedé, Dimosthenis L. Giokas, Alberto Chisvert, Amparo Salvador

Journal of Chromatography A 1408 (2015) 63-71

Una parte de este capítulo se presentó como comunicación oral:

8th European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment, Ioannina (Grecia) 2014

Y otra parte se presentó como cartel:

6th International Conference and Exhibition on Analytical and Bioanalytical Techniques, Valencia, 2015

INTRODUCCIÓN

Objetivo

Desarrollar una nueva técnica de microextracción basada en la formación *in situ* de un agregado supramolecular como fase de extracción. Con el fin de evaluar su potencial analítico, se ha aplicado a la determinación de filtros UV en medio acuático

Resumen

Las técnicas de microextracción en fase líquida suponen una miniaturización de la extracción líquido-líquido. Una alternativa a estos métodos es la formación *in situ* de la fase de extracción de manera que los analitos son retenidos durante la formación de dicha fase.

En este capítulo se presenta una nueva técnica de microextracción, que se ha denominado **microextracción sobre agregado formado *in situ* (iSAME, del inglés *in-situ suspended aggregate microextraction*)**, que consiste en la formación *in situ* de un agregado supramolecular para la extracción de compuestos orgánicos en disoluciones acuosas. Este agregado se forma en la propia disolución a extraer mediante una asociación iónica entre dos iones voluminosos cargados opuestamente. El agregado suspendido formado, que contiene los analitos, se recoge en forma de una fina película en la superficie de un papel de filtro común por simple filtración a vacío. A continuación, debido a la baja estabilidad de los agregados surfactantes en disolventes orgánicos, la fase extractante se disuelve en un pequeño volumen de disolvente. Así pues, los analitos son liberados cuantitativamente y se lleva a cabo su análisis directo por **cromatografía de líquidos con detector UV/Vis**. Como demostración analítica de esta nueva técnica, se determinaron ocho filtros UV orgánicos en muestras de agua de diferente naturaleza. El método mostró buenas características analíticas en términos de linealidad, rendimientos de extracción (45 – 100 %), límites de detección (ng L^{-1}), repetibilidad intra- e inter-día ($\text{RSD} < 12 \%$) y coeficientes de recuperación relativa (80 – 112 %).

MICROEXTRACCIÓN SOBRE AGREGADO FORMADO IN SITU

Variables estudiadas

- Agregado supramolecular
- Papel de filtro
- Velocidad de filtración
- Disolvente de disolución
- Concentración de los iones reactivos
- pH
- Fuerza iónica y presencia de electrolitos inorgánicos
- Tiempo de extracción
- Volumen de muestra

Señal analítica

$y = A_i$, donde A_i corresponde al área del pico cromatográfico del analito i

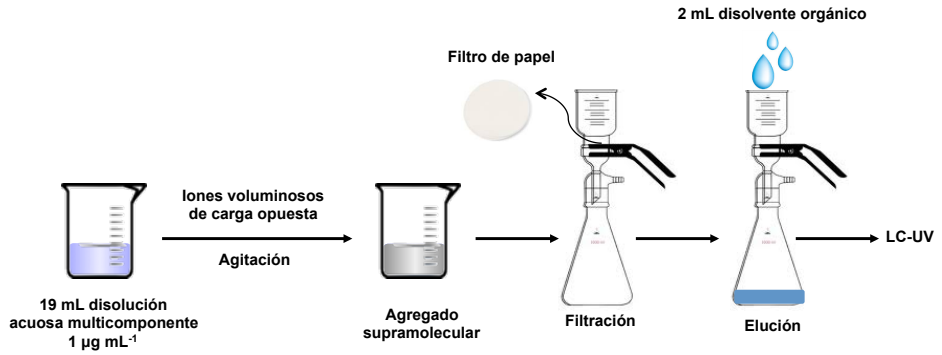
- La influencia de las variables se evaluó comparando el rendimiento de extracción (RE)

Disoluciones empleadas

- Disolución multicomponente de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de los analitos en agua

Procedimiento experimental general en la optimización

Se añaden volúmenes apropiados de disoluciones de dos iones voluminosos de carga opuesta a 19 mL de disolución multicomponente. La mezcla se agita para la formación de la fase agregada. Posteriormente, la mezcla se filtra por succión a vacío sobre un papel de filtro de modo que el agregado forma una fina película sobre el papel de filtro. Para la obtención de los analitos, se añaden 2 mL de disolvente orgánico sobre el filtro y el vacío se aumenta gradualmente de modo que el disolvente, conteniendo el agregado disuelto y por tanto los analitos, se recoge en un vial seco para ser analizado por LC-UV



En la imagen se observa el agregado en forma de fina película sobre el papel de filtro, obtenido tras ser filtrado por simple succión a vacío



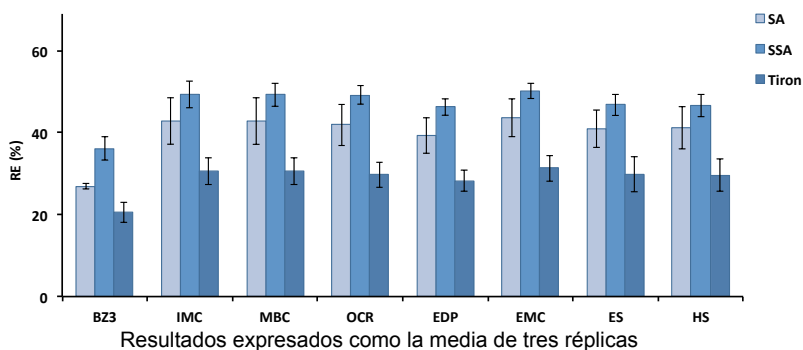
AGREGADO SUPRAMOLECULAR

Selección del agregado supramolecular

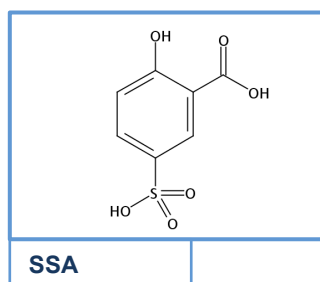
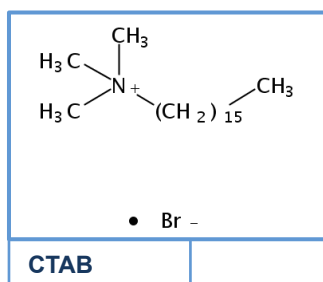
- Surfactantes de trimetilamonio de cadena larga, como el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) forman agregados con aniones bencensulfónicos [195]
- Se compararon:
 - Ácido sulfanílico (SA)
 - Ácido sulfosalicílico (SSA)
 - Ácido 4,5-dihidroxi-1,3-bencenedisulfónico (Tiron®)

Procedimiento experimental

Se añaden 0.5 mL de anión 0.2 M y 0.5 mL CTAB 0.02 M a 19 mL de disolución multicomponente. La mezcla se agita durante 10 min. Posteriormente, la mezcla se filtra por succión a vacío (200 mbar) sobre filtro Millipore AP40. A continuación, se añaden 2 mL de metanol sobre el filtro y se recoge en un vial seco para ser analizado por LC-UV

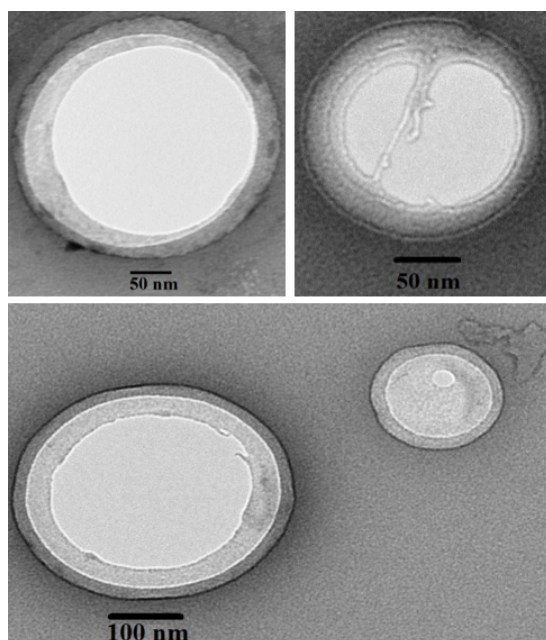


- Considerando los rendimientos de extracción de todos los analitos y la repetibilidad de la señal, se seleccionó SSA como contra-ión del CTAB



Caracterización del agregado

- Individualmente, SSA y CTAB forman disoluciones acuosas de baja viscosidad a temperatura ambiente
- Cuando se mezclan, se forma una suspensión turbia debido a la formación del agregado → Asociación iónica entre el grupo sulfonato ($-\text{SO}_3^-$) del SSA ($\text{pK}_a < 0$) y el grupo amino cuaternario del CTAB
- La visión de las características estructurales del agregado, obtenida por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) de tinción negativa, verifica la presencia de vesículas multilamelares (MLVs) de 2 o 3 anillos concéntricos y un diámetro medio de 0.3 – 0.4 μm



Selección del papel de filtro

Tipos de papel de filtro estudiados

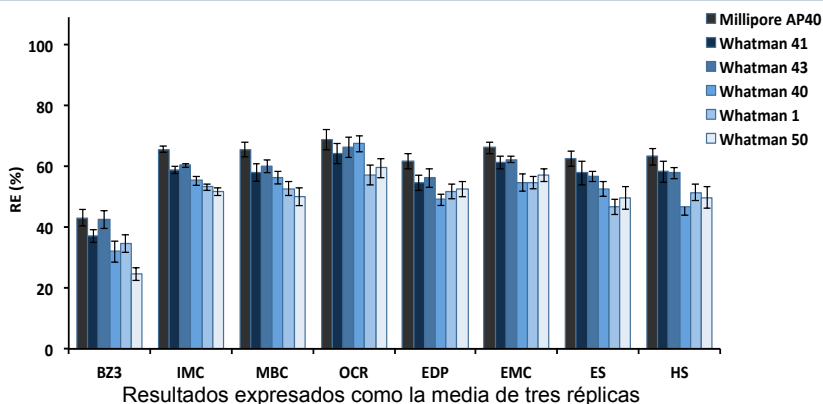
Tabla 4.1. Tipos de papel de filtro estudiados (47 mm de diámetro)

Nombre	Tipo	Peso (g m ⁻²)	Tamaño poro (µm)	Grosor (µm)
Millipore AP40	Fibra de vidrio	65	0.7	475
Whatman No. 41	Cuantitativo, sin cenizas	85	20-25	220
Whatman No. 43	Cuantitativo, sin cenizas	95	16	220
Whatman No. 40	Cuantitativo, sin cenizas	95	8	210
Whatman No. 1	Cualitativo	87	11	180
Whatman No. 50	Cuantitativo, bajas cenizas	97	2.7	115

Procedimiento experimental

Se añaden 0.5 mL de SSA 0.2 M y 0.5 mL CTAB 0.02 M a 19 mL de disolución multicomponente. La mezcla se agita durante 10 min. Posteriormente, la mezcla se filtra por succión a vacío (200 mbar) sobre diferentes tipos de papel de filtro. A continuación, se añaden 2 mL de metanol sobre el filtro y se recoge en un vial seco para ser analizado por LC-UV

Resultados



- Los RE mejoran con el grosor del papel de filtro, mientras que el tamaño del poro no juega un papel crucial en la extracción

Tipo de papel de filtro seleccionado: Millipore AP40

Estudio de la velocidad de filtración

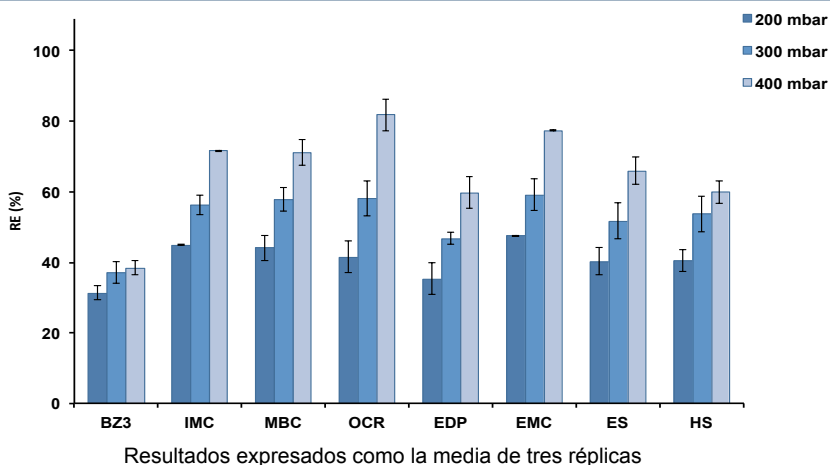
Presiones de vacío estudiadas

$P_{\text{vacío}} = 200 - 400 \text{ mbar}$

Procedimiento experimental

Se añaden 0.5 mL de SSA 0.2 M y 0.5 mL CTAB 0.02 M a 19 mL de disolución multicomponente. La mezcla se agita durante 10 min. Posteriormente, la mezcla se filtra por succión a diferentes presiones de vacío sobre un filtro Millipore AP40. A continuación, se añaden 2 mL de metanol sobre el filtro y se recoge en un vial seco para ser analizado por LC-UV

Resultados



- Altas presiones tienen un efecto beneficioso en el método ya que las MLVs son estables y resistentes a la deformación
- A bajas presiones es posible que haya fisión de las MLVs, provocando pérdida de los analitos y los RE son menores

Velocidad de filtración seleccionada: **400 mbar**

Estudio del disolvente de disolución

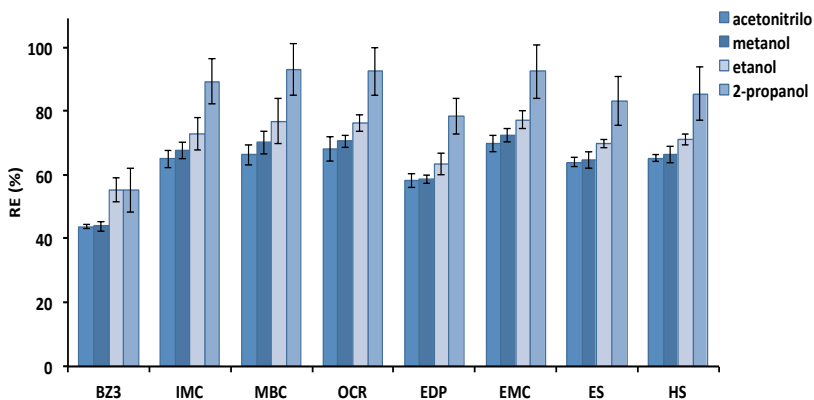
Disolventes orgánicos estudiados

- Acetonitrilo
- Metanol
- Etanol
- 2-propanol

Procedimiento experimental

Se añaden 0.5 mL de SSA 0.2 M y 0.5 mL CTAB 0.02 M a 19 mL de disolución multicomponente. La mezcla se agita durante 10 min. Posteriormente, la mezcla se filtra por succión a vacío (400 mbar) sobre un filtro Millipore AP40. A continuación, se añaden 2 mL de diferentes disolventes sobre el filtro y se recoge en un vial seco para ser analizado por LC-UV

Resultados



Resultados expresados como la media de tres réplicas

- La polaridad del disolvente disminuye los RE
- Se consigue recuperación cuantitativa de los analitos con 2 mL de disolvente

Disolvente de disolución seleccionado: 2-propanol

Estudio de la concentración de los iones reactivos

Concentraciones de SSA estudiadas (en disolución final)

- 1.25 – 10 mM

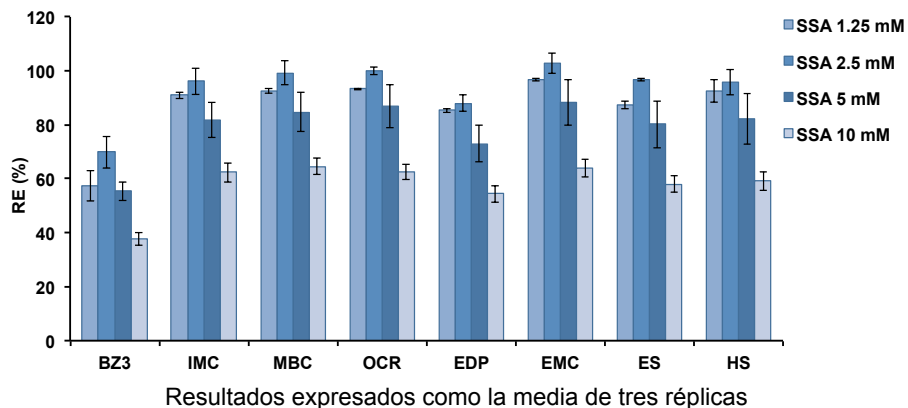
Concentraciones de CTAB estudiadas (en disolución final)

- 0.25 – 1 mM

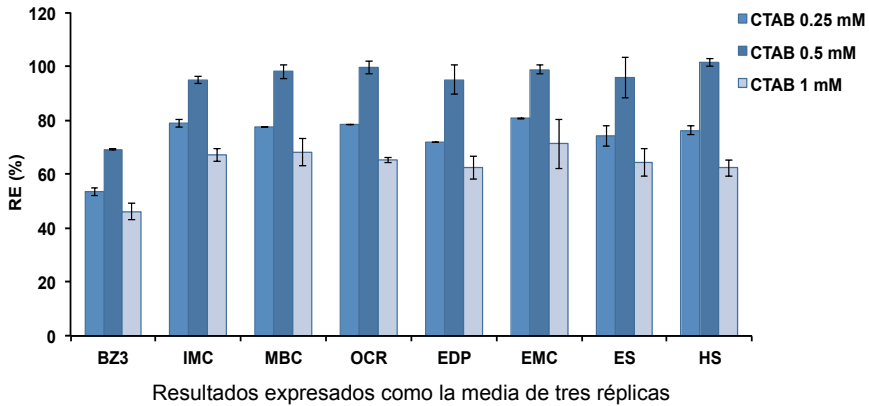
Procedimiento experimental

Se añaden 0.5 mL SSA y 0.5 mL CTAB de diferentes concentraciones a 19 mL de disolución multicomponente. La mezcla se agita durante 10 min. Posteriormente, la mezcla se filtra por succión a vacío (400 mbar) sobre un filtro Millipore AP40. A continuación, se añaden 2 mL de 2-propanol sobre el filtro y se recoge en un vial seco para ser analizado por LC-UV

Resultados



Concentración de SSA en disolución final seleccionada: 2.5 mM



- La variación de las concentraciones favorece la formación de otros tipos de agregados supramoleculares, los cuales no favorecen la extracción o no son retenidos eficazmente sobre el papel de filtro

Concentración de CTAB en disolución final seleccionada: 0.5 mM

Estudio del pH de la fase dadora

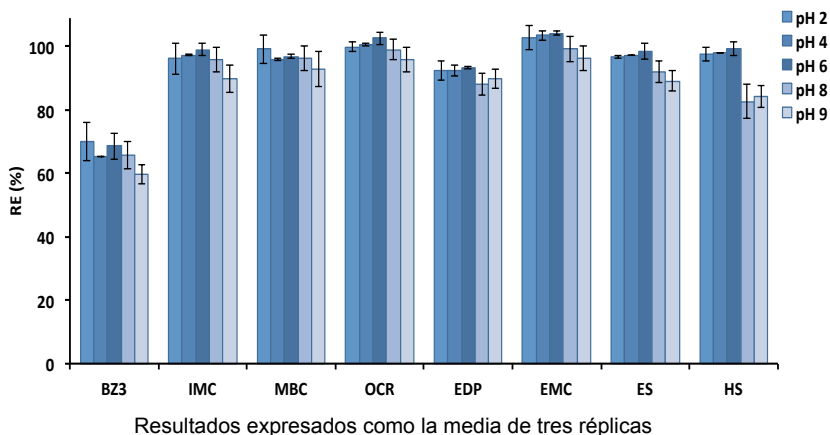
Valores de pH estudiados

pH = 2 – 9

Procedimiento experimental

Se añaden 0.5 mL de SSA 0.1 M y 0.5 mL CTAB 0.02 M a 19 mL de disolución multicomponente ajustada a diferentes valores de pH. La mezcla se agita durante 10 min. Posteriormente, la mezcla se filtra por succión a vacío (400 mbar) sobre un filtro Millipore AP40. A continuación, se añaden 2 mL de 2-propanol sobre el filtro y se recoge en un vial seco para ser analizado por LC-UV

Resultados



- Sin diferencias significativas en los RE en el intervalo de pH 2 – 8

pH de la fase dadora seleccionado: no ajustado (pH 2)

Estudio de la fuerza iónica y presencia de electrolitos inorgánicos

Sales estudiadas

- NaCl
- Na₂SO₄
- KCl

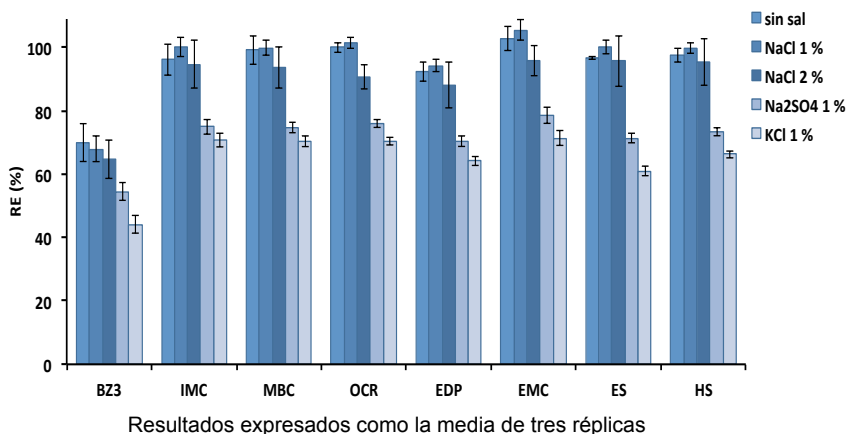
Contenidos NaCl (%) estudiados

- NaCl = 0 – 4 % (m/v)

Procedimiento experimental

Se añaden 0.5 mL de SSA 0.1 M y 0.5 mL CTAB 0.02 M a 19 mL de disolución multicomponente conteniendo diferentes cantidades de sal. La mezcla se agita durante 10 min. Posteriormente, la mezcla se filtra por succión a vacío (400 mbar) sobre un filtro Millipore AP40. A continuación, se añaden 2 mL de 2-propanol sobre el filtro y se recoge en un vial seco para ser analizado por LC-UV

Resultados



- Cuando se añaden iones con mayor radio iónico (K⁺ o SO₄²⁻) disminuyen los RE → mayor blindaje de las cargas de SSA y CTAB, respectivamente
- Al aumentar el contenido salino por encima de 2 %, los electrolitos inorgánicos crean un entorno de reacción competitiva alrededor de los dos contra-iones orgánicos y no se forma el agregado

Contenido salino seleccionado: 1 %

Estudio del pH tiempo de reacción

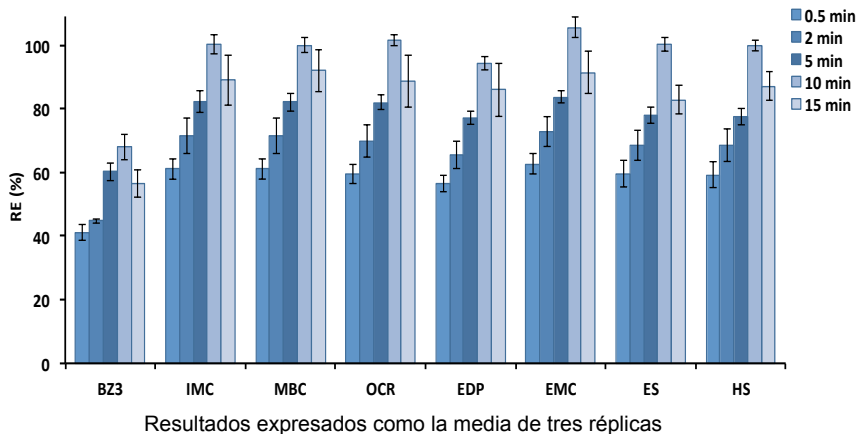
Tiempos de extracción estudiados

$$t_{\text{ext}} = 0.5 - 15 \text{ min}$$

Procedimiento experimental

Se añaden 0.5 mL de SSA 0.1 M y 0.5 mL CTAB 0.02 M a 19 mL de disolución multicomponente conteniendo 1 % NaCl. La mezcla se agita durante diferentes tiempos de extracción. Posteriormente, la mezcla se filtra por succión a vacío (400 mbar) sobre un filtro Millipore AP40. A continuación, se añaden 2 mL de 2-propanol sobre el filtro y se recoge en un vial seco para ser analizado por LC-UV

Resultados



- Máxima extracción obtenida a 10 min
- A mayores tiempos de extracción el agregado se vuelve más rígido, aumentando la turbidez y, por tanto, la velocidad de filtración disminuye

Tiempo de extracción seleccionado: 10 min

Determinación del volumen de muestra

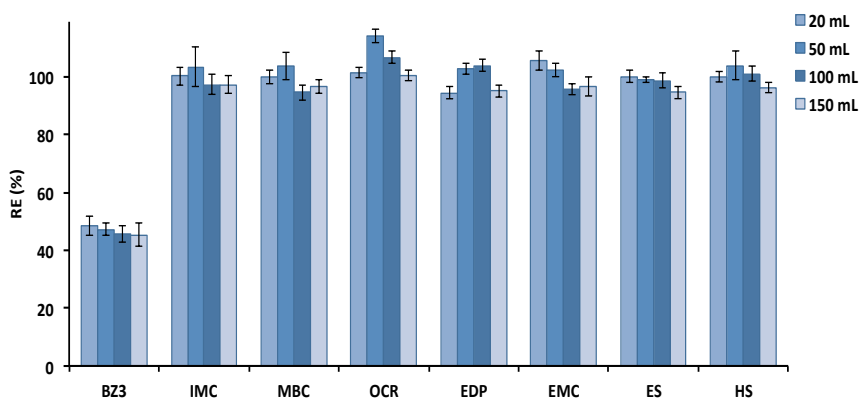
Volúmenes de muestra estudiados

V = 20 – 150 mL

Procedimiento experimental

Se añaden volúmenes apropiados de SSA 0.1 M y CTAB 0.02 M a diferentes volúmenes de disolución multicomponente conteniendo 1 % NaCl, para tener una concentración constante de ambos contra-iones. La mezcla se agita durante 10 min. Posteriormente, la mezcla se filtra por succión a vacío (400 mbar) sobre un filtro Millipore AP40. A continuación, se añaden 2 mL de 2-propanol sobre el filtro y se recoge en un vial seco para ser analizado por LC-UV

Resultados



Resultados expresados como la media de tres réplicas

- No se observa disminución de los RE hasta, al menos, 150 mL
- Al aumentar el volumen de muestra, el tiempo de filtración también aumenta:
 - 20 mL → < 10 min
 - 150 mL → 1 h

SELECTIVIDAD Y EFECTOS MATRIZ

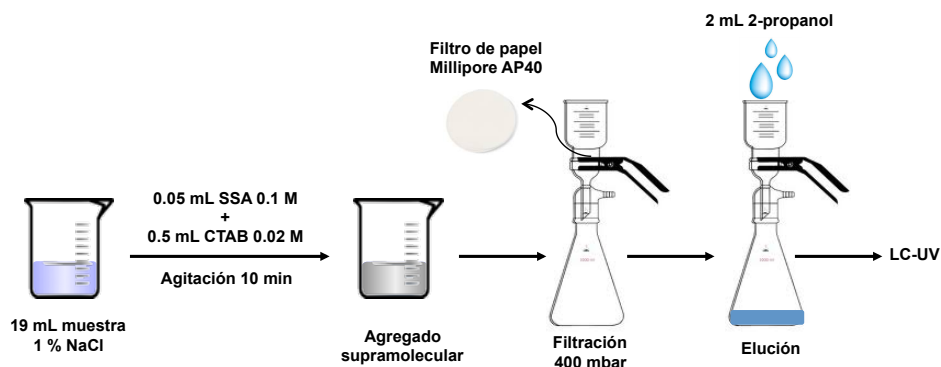
Selectividad

- El método extrae cuantitativamente los filtros UV hidrofóbicos estudiados ($RE \approx 100 \pm 3 \%$), y parcialmente el más hidrofílico, BZ3 ($RE = 47 \pm 2 \%$)
- No se detectó señal analítica de filtros muy hidrofílicos (BZ4, PBS, PDT y TDS) cuando se extrajo una disolución patrón de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$

Efectos matriz

- Como se ha visto en el estudio de la fuerza iónica, al añadir una concentración de cationes a la disolución de reacción, la turbidez de la misma disminuye, lo que es sinónimo de que el agregado no se forma correctamente y, por consiguiente, los RE de todos los compuestos también disminuyen → Cationes inorgánicos presentes en las muestras de origen medioambiental, principalmente Ca^{2+} y Mg^{2+} , afectan al proceso de formación de las MLVs reaccionando con la carga negativa de SSA, reduciendo su disponibilidad para reaccionar con la amina cuaternaria del CTAB
- SOLUCIÓN → Aumentar la concentración de SSA para compensar la competición de los iones inorgánicos y restablecer la formación adecuada del agregado:
 - Para muestras superficiales (grifo, río, lago y laguna) → 3.75 mM de SSA en la disolución de reacción (50 % más que en agua desionizada)
 - Para muestra salinas (delta y mar) → 7.5 mM de SSA en la disolución de reacción (200 % más que en agua desionizada)

MÉTODO PROPUESTO



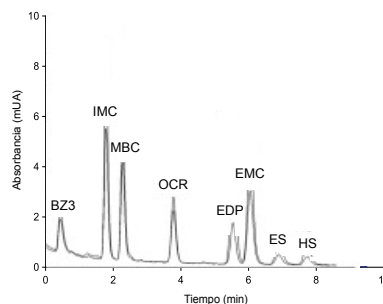
- Concentraciones de trabajo: 10 – 200 ng mL⁻¹ para todos los analitos
- Las muestras de agua a analizar se sonicen previamente 15 min para lixiviar los filtros UV de la materia particulada y determinar el contenido total, siguiendo el procedimiento desarrollado en el **Capítulo 3**

Tabla 4.2. Condiciones del LC-UV/Vis

Volumen de inyección	20 µL
Temperatura de la columna	45 °C
Longitud de onda de detección	313 nm
Caudal de la fase móvil	1 mL min ⁻¹
Columna	Hypersil ODS C18 (25 cm, 4.6 mm d.i., 5 µm tamaño de partícula)
Composición de la fase móvil	Disolvente A: Metanol Disolvente B: Agua
Modo elución	Isocrático: 75 % A : 25 % B (v/v)



Cromatograma obtenido aplicando el método propuesto a una disolución patrón de 30 ng mL⁻¹ de los filtros UV estudiados en agua desionizada



MECANISMO DE REACCIÓN

Estudio

- Se compararon los rendimientos de extracción de estos experimentos:

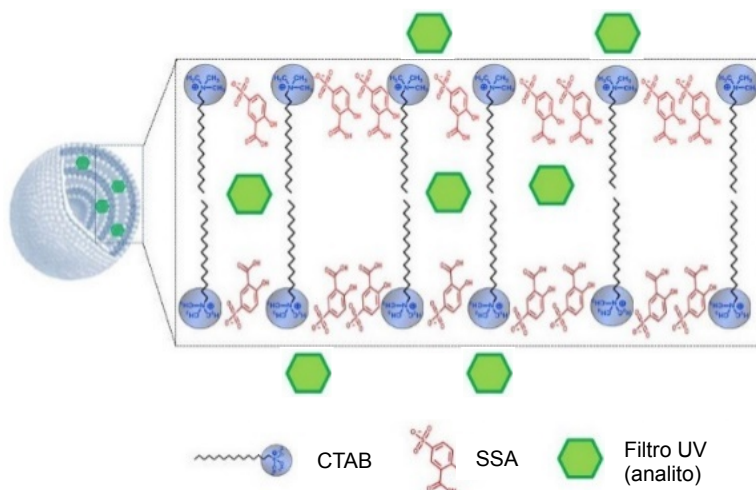
Formación previa del agregado y posterior adición a una disolución patrón acuosa conteniendo los analitos

RE = 31 ± 2 % – 51 ± 2 %

Formación del agregado in-situ en una disolución patrón acuosa conteniendo los analitos

RE = 48 ± 3 % – 106 ± 3 %

- Los analitos se extraen a través de **dos mecanismos**:
 - Los analitos quedan atrapados en el interior del dominio hidrofóbico de la bicapa durante el “auto-ensamblaje” espontáneo de las vesículas → mecanismo predominante
 - Durante la filtración, los analitos que permanecen en la disolución acuosa interaccionan con los dominios hidrofóbicos del exterior de la vesícula (grupo metilo de CTAB, principalmente) → mecanismo secundario



CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO PROPUESTO

Parámetros de calidad estudiados

- Factor de preconcentración (FP)
- Linealidad
- Límites de detección (LDD) y límites de cuantificación (LDC)
- Precisión intra-día e inter-día

Tabla 4.3. Parámetros analíticos del método propuesto

Filtro UV	FP	Pendiente $\pm s$ (ng mL ⁻¹)	R ²	LDD (ng mL ⁻¹)	LDC (ng mL ⁻¹)	Precisión intra-día RSD (%)		Precisión inter-día RSD (%)	
						100 ng mL ⁻¹	250 ng mL ⁻¹	100 ng mL ⁻¹	250 ng mL ⁻¹
BZ3	4.8 \pm 0.3	329 \pm 10	0.996	1.5	4.8	9.1	5.8	2.3	11.5
IMC	10.0 \pm 0.3	810 \pm 20	0.996	0.3	1.0	3.7	3.1	0.9	6.7
MBC	10.0 \pm 0.2	676 \pm 15	0.997	0.3	0.9	6.0	2.3	1.3	6.9
OCR	10.1 \pm 0.2	433 \pm 8	0.998	0.8	2.6	3.9	1.8	4.2	6.2
EDP	9.4 \pm 0.2	395 \pm 14	0.993	0.3	1.1	4.0	2.2	1.8	6.1
EMC	10.0 \pm 0.3	737 \pm 19	0.996	0.3	1.1	3.7	3.1	1.4	5.4
ES	10.0 \pm 0.2	132 \pm 5	0.992	1.7	5.7	4.3	2.1	2.9	4.3
HS	10.0 \pm 0.2	108 \pm 4	0.995	1.7	5.8	4.3	1.8	5.8	6.4

Factor de preconcentración (Tabla 4.3)

- $FP = C_{ext}/C_0$, donde C_{ext} corresponde a la concentración en el extracto final y C_0 a la concentración inicial en la fase acuosa
- Se determinaron FP para distintos volúmenes de muestra 20 – 150 mL
- Valores de **FP** en concordancia con los máximos valores esperados en cada caso considerando RE = 100 %, a excepción del BZ3 que sólo se extrae parcialmente (RE = 47 %)

Linealidad (Tabla 4.3)

- **Linealidad** desde 10 hasta 800 – 1000 ng mL⁻¹, dependiendo del analito
- **Intervalo de trabajo:** 10 – 200 ng mL⁻¹ con coeficientes de regresión (R²) > 0.992

Límites de detección y cuantificación (Tabla 4.3)

- $LDD = 3 S_{y/x}/b$ $LDC = 10 S_{y/x}/b$
donde $S_{y/x}$ corresponde a la desviación estándar residual y b a la pendiente de la curva de calibrado obtenida
- **LDD** comprendidos entre **0.3 y 1.7 ng mL⁻¹**
- **LDC** comprendidos entre **0.9 y 5.8 ng mL⁻¹**

Precisión intra-día e inter-día (Tabla 4.3)

- Expresada como desviación estándar relativa (% **RSD**)
- El método propuesto se aplicó a cinco réplicas de una disolución patrón a dos niveles de concentración (100 y 1000 ng mL⁻¹)
- Se analizaron en la misma sesión de trabajo (intra-día) y en cinco días consecutivos (inter-día)
- Valores entre **0.9 y 11.5 %**, indicando **buena precisión**

ANÁLISIS DE MUESTRAS

Muestras analizadas

- Seis muestras de agua de diferentes naturaleza recogidas durante la estación de verano
- Analizadas por triplicado empleando el método iSAME-LC-UV/Vis propuesto
- Por las razones mencionadas anteriormente, se ajustó la concentración de SSA para eludir la interferencia de cationes inorgánicos: 3.75 mM en aguas naturales y 7.5 mM en aguas salinas

Resultados

- Los resultados mostraron que todos los analitos estaban por debajo del límite de detección

Estudios de recuperación

- Se calculó el **coeficiente de recuperación (%)**:

$$R = [(C_{M+P} - C_M) / C_P] \cdot 100 \%$$
 donde:
 - C_M : concentración de la muestra sin fortificar
 - C_{M+P} : concentración de la muestra fortificada
 - C_P : concentración del patrón añadido a la muestra (concentración fortificada)
- Se fortificaron, por triplicado, las seis muestras de agua con 50 ng mL⁻¹ de los analitos

Tabla 4.4. Coeficientes de recuperación (%) obtenidos en el estudio del efecto matriz

Filtro UV	Coeficiente de recuperación (%)					
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
BZ3	109 ± 7	109 ± 4	108 ± 7	90 ± 4	103 ± 4	102 ± 8
IMC	100 ± 6	107 ± 6	96 ± 3	99 ± 2	99 ± 2	88 ± 6
MBC	105 ± 5	112 ± 7	100 ± 8	97 ± 3	104 ± 2	93 ± 7
OCR	94 ± 2	105 ± 6	99 ± 3	91 ± 5	95 ± 4	93 ± 2
EDP	87 ± 7	109 ± 6	91 ± 7	104 ± 4	92 ± 3	95 ± 2
EMC	97 ± 3	107 ± 5	97 ± 10	97 ± 6	98 ± 4	89 ± 3
ES	96 ± 4	99 ± 5	101 ± 7	98 ± 4	112 ± 6	80 ± 2
HS	91 ± 5	86 ± 6	98 ± 6	101 ± 13	108 ± 3	84 ± 2

Muestra 1: Agua de grifo (Ioannina, Grecia)

Muestra 2: Rio Louros (Grecia)

Muestra 3: Lago Pamvotis (Ioannina, Grecia)

Muestra 4: Laguna Rodia (Preveza, Grecia)

Muestra 5: Delta del rio Vovos (Preveza, Grecia)

Muestra 6: Playa Gallikkos Molos (Thesprotia, Grecia)

- Valores entre **86 y 109 %**, y **80 y 112 %** en aguas naturales y salinas, respectivamente, indican que la matriz no afecta de forma significativa
- **MÉTODO DE CALIBRACIÓN:** Calibración externa. Los patrones de calibración se preparan y se extraen empleando el método iSAME en las mismas condiciones que las muestras

CONCLUSIONES

- Se ha desarrollado una nueva técnica de extracción, que se ha denominado *microextracción sobre agregado formado in situ*, en la que se emplea un agregado supramolecular como fase de extracción
- Doble mecanismo de extracción: los analitos son atrapados durante la formación de la fase extractante y también existe una transferencia de masa de los analitos desde la fase acuosa a la fase supramolecular
- Se ha aplicado satisfactoriamente a seis muestras de diferente naturaleza en términos de repetibilidad, exactitud y linealidad, obteniéndose además altos factores de preconcentración
- La simplicidad del método propuesto, los cortos tiempos de análisis y el bajo coste asociado a su aplicación permiten que el método puede aplicarse al análisis rutinario en un laboratorio
- Se trata de un método analítico respetuoso con el medio ambiente y con el operario, ya que se utilizan cantidades pequeñas de disolventes orgánicos

Capítulo 5

Desarrollo de una nueva técnica de microextracción: microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora mediada por nanopartículas magnéticas. Aplicación a la determinación de filtros UV en muestras de agua

El contenido de este capítulo ha sido publicado:

Development of stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles and its analytical application to the determination of hydrophobic organic compounds in aqueous media,

Juan L. Benedé, Alberto Chisvert, Dimosthenis L. Giokas, Amparo Salvador

Journal of Chromatography A 1362 (2014) 25-33

Y presentado como cartel:

16th International Symposium on Advances in Extraction Technologies (ExTech), Chania (Grecia), 2014

INTRODUCCIÓN

Objetivo

Desarrollar una nueva técnica de microextracción que combina los principios y ventajas de SBSE y DSPE. Con el fin de evaluar su potencial, se ha aplicado a la determinación de filtros UV en medio acuático

Resumen

Las técnicas de microextracción basadas en un material sorbente, como la extracción por sorción sobre barra agitadora (SBSE) y la extracción en fase sólida dispersiva (DSPE) constituyeron notables mejoras a la tradicional extracción en fase sólida (SPE) en cuanto a sencillez, consumo de pequeños volúmenes de disolventes, alto grado de automatización, etc.

En este capítulo se presenta una nueva técnica de microextracción que combina los principios de SBSE y DSPE mediada por nanopartículas magnéticas (MNPs). La principal característica de la técnica propuesta, que se ha denominado **microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora (SBSDME)**, del inglés *stir-bar sorptive-dispersive microextraction*, es el uso de una barra agitadora de neodimio recubierta físicamente con MNPs de carácter hidrofóbico. Dependiendo de la velocidad de agitación, a baja velocidad las MNPs se mantienen retenidas en el imán y la extracción se lleva a cabo como en SBSE, o bien a mayor velocidad se dispersan en la disolución acuosa en analogía con DSPE. En este último caso, una vez se detiene la agitación, el fuerte campo magnético del imán vuelve a recuperar las MNPs dispersadas, sin la necesidad de un campo magnético externo adicional. A continuación, de forma similar a SBSE, la barra agitadora recubierta con las MNPs conteniendo los analitos se sumerge en un disolvente orgánico apropiado para la desorción líquida de los analitos y su posterior determinación por **cromatografía de líquidos con detector UV/Vis**.

Como demostración analítica de la utilidad de esta nueva técnica, se ha llevado a cabo la determinación de ocho filtros UV orgánicos en muestras de agua de mar usando MNPs de ferrita de cobalto recubiertas de ácido oléico (CoFe_2O_4 @ácido oléico) como material sorbente. El método mostró buenas características analíticas en términos de linealidad, factores de preconcentración (11 – 148), límites de detección (ng mL^{-1}), repetibilidad intra- e inter-día ($\text{RSD} < 11 \%$) y recuperaciones relativas (87 – 120 %).

NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Selección del recubrimiento de las nanopartículas

- La selección de CoFe_2O_4 @ácido oléico como material nanosorbente se hizo acorde a los resultados obtenidos en un trabajo anterior fruto de una colaboración del grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta Tesis Doctoral y el grupo de investigación del prof. A. Canals de la Universidad de Alicante [145]
- Tal y como se demostró, el carácter lipofílico del recubrimiento seleccionado es eficiente para la extracción y preconcentración de los filtros UV orgánicos, acorde con la polaridad de cada compuesto
- Compuestos menos polares ($\log K_{ow} > 5.4$) se extraen mejor que los compuestos más polares ($\log K_{ow} < 4.4$)

Síntesis de las nanopartículas CoFe_2O_4 @ácido oléico

- La nanopartículas magnéticas se sintetizaron por co-precipitación química [196], siguiendo el siguiente procedimiento:
- Se mezclan 100 mL de disolución acuosa de FeCl_3 0.4 M y 100 mL de disolución acuosa de CoCl_2 0.2 M
- Se adicionan 100 mL de NaOH 3 M gota a gota bajo agitación continua
- Se añade 2 mL de ácido oléico y la mezcla de reacción se calienta a 80 °C durante 1 hora
- El precipitado negro formado se deja enfriar lentamente hasta temperatura ambiente y las MNPs se lavan varias veces con agua ultrapura y etanol para eliminar el exceso de ácido oléico
- Finalmente, el precipitado se seca toda la noche a 100 °C y se pulveriza hasta obtener un polvo fino de color negro

Acondicionamiento y recubrimiento físico de las barras agitadoras

- Previo a su uso en la etapa de extracción, se dispersan 100 mg de MNPs secas en 10 mL de agua desionizada durante 10 minutos con la ayuda de una barra agitadora para solvatar las MNPs
- Una vez se detiene la agitación, las MNPs son atraídas fuertemente por la barra agitadora
- Las barras agitadoras recubiertas se sacan de las disoluciones con la ayuda de unas pinzas de plástico y se introducen en la disolución a extraer

MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA POR SORCIÓN SOBRE BARRA AGITADORA

Variables estudiadas

- Cantidad de nanopartículas
- Tiempo de extracción
- Velocidad de agitación
- pH de la fase dadora
- Fuerza iónica de la fase dadora
- Adición de modificador orgánico
- Disolvente de desorción
- Tiempo de desorción

Señal analítica

$y = A_i$, donde A_i corresponde al área del pico cromatográfico del analito i

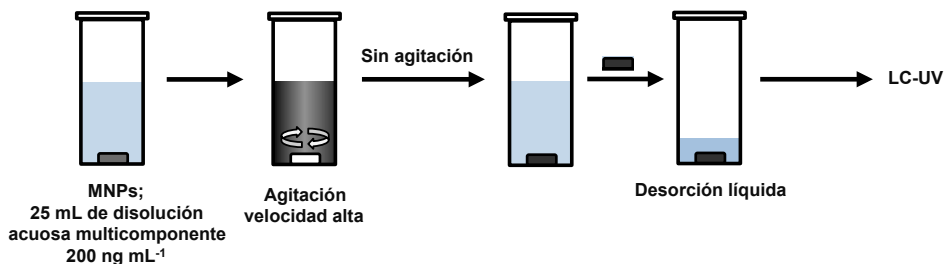
- La influencia de las variables se evaluó comparando el rendimiento de extracción (RE)

Disoluciones empleadas

- Disolución multicomponente de 200 ng mL^{-1} de los analitos en agua

Procedimiento experimental general en la optimización

La barra agitadora (11 mm x 6 mm) de neodimio recubierta con las MNPs, previamente acondicionadas, se introduce en la disolución y se agita a alta velocidad para que las MNPs se dispersen. Transcurrido el tiempo de extracción, la agitación se detiene y las MNPs se adhieren a la barra agitadora que se introduce en el mínimo volumen de disolvente de desorción para cubrir la barra agitadora. Finalmente, el extracto se analiza mediante LC-UV



Estudio de la cantidad de nanopartículas

La transferencia de masa de los analitos desde la fase dadora hasta la aceptora depende de la proporción entre el área del sorbente y el volumen de la disolución acuosa

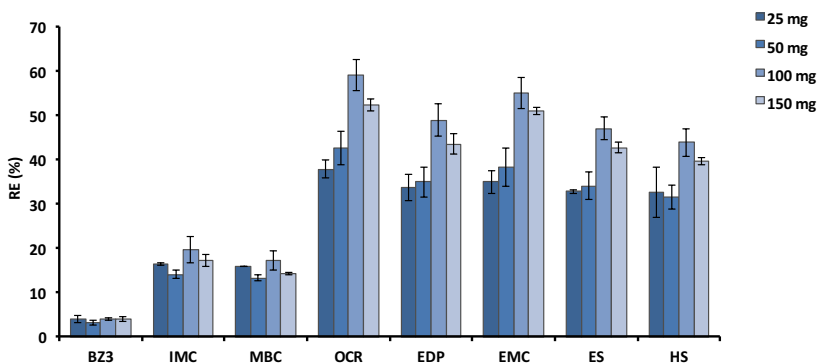
Cantidades de nanopartículas estudiadas

$$m_{\text{MNPs}} = 25 - 150 \text{ mg}$$

Procedimiento experimental

Se dispersan diferentes cantidades de MNPs a velocidad media durante 60 min en 25 mL de disolución acuosa multicomponente de 200 ng mL^{-1} ajustada a pH 4 y 1 % NaCl. Los analitos se desorben en 2.5 mL de etanol durante 5 min

Resultados



Resultados expresados como la media de tres réplicas

- Los RE aumentan al aumentar la cantidad de MNPs hasta 100 mg pero disminuye ligeramente a cantidades mayores
- El exceso de MNPs no se desorbe eficazmente debido al volumen de disolvente de desorción empleado

Cantidad de nanopartículas magnéticas seleccionada: 100 mg

Estudio del tiempo de extracción

El tiempo de contacto entre la fase dadora y el sorbente debe ser el suficiente para alcanzar el estado de equilibrio

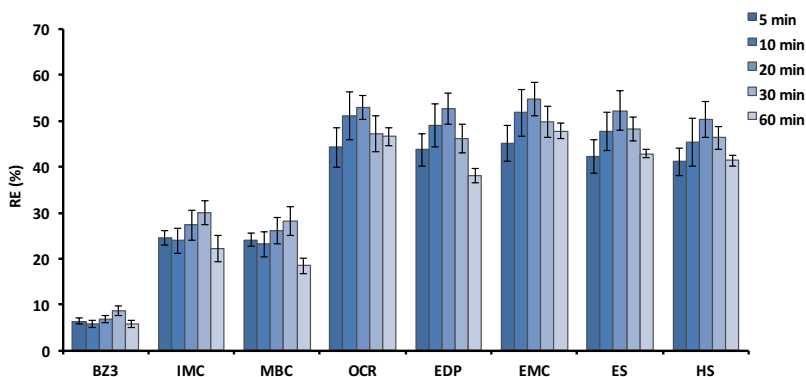
Tiempos de extracción estudiados

$t_{\text{ext}} = 5 - 60 \text{ min}$

Procedimiento experimental

Se dispersan 100 mg de MNPs a velocidad media durante diferentes tiempos de extracción en 25 mL de disolución acuosa multicomponente de 200 ng mL^{-1} ajustada a pH 4 y 1 % NaCl. Los analitos se desorben en 2.5 mL de etanol durante 5 min

Resultados



Resultados expresados como la media de tres réplicas

- Máxima extracción obtenida a 20 min
- Los tiempos de extracción menores comparados con SBSE (del orden de 1-3 horas) se deben a la dispersión de las MNPs en la disolución y, por tanto, al aumento del área de superficie de contacto

Tiempo de extracción seleccionado: 20 min

Estudio de la velocidad de agitación

A velocidad de agitación baja, las MNPs permanecen en la superficie de la barra agitadora como en SBSE. A velocidad alta, las fuerzas rotacionales superan al campo magnético y las MNPs se dispersan en la disolución como en DSPE

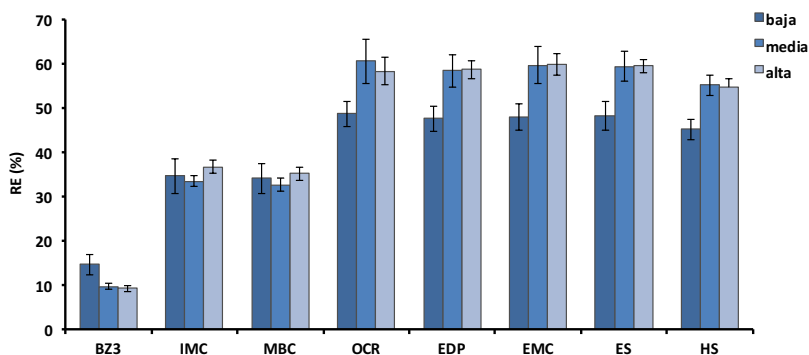
Velocidades de agitación estudiadas

$V_{agit} = \text{baja} - \text{alta}$

Procedimiento experimental

Se dispersan 100 mg de MNPs a diferentes velocidades durante 20 min en 25 mL de disolución acuosa multicomponente de 200 ng mL⁻¹ ajustada a pH 4 y 1 % NaCl. Los analitos se desorben en 2.5 mL de etanol durante 5 min

Resultados



Resultados expresados como la media de tres réplicas

- Los resultados sugieren que la extracción se lleva a cabo eficazmente en los dos modos
- La extracción de los analitos menos polares se favorece si las MNPs se dispersan en la disolución, debido a una mayor superficie de contacto

Velocidad de agitación seleccionada: media - alta

Estudio del pH de la fase dadora

Debido a la naturaleza no-polar del ácido oléico, la forma neutra de los analitos se extrae más eficazmente en el sorbente que la forma ionizada

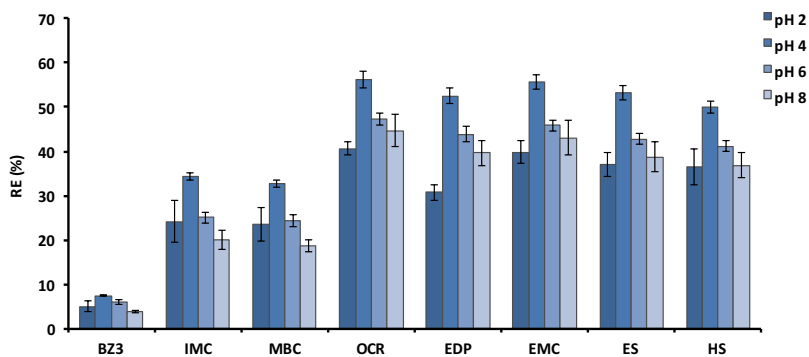
Valores de pH estudiados

pH = 2 – 8

Procedimiento experimental

Se dispersan 100 mg de MNPs a velocidad media durante 20 min en 25 mL de disolución acuosa multicomponente de 200 ng mL⁻¹ ajustada a diferentes valores de pH (ajustado con ácido fosfórico y/o hidróxido sódico) y 1 % NaCl. Los analitos se desorben en 2.5 mL de etanol durante 5 min

Resultados



Resultados expresados como la media de tres réplicas

- Mejores resultados a pH ácido

pH de la fase dadora seleccionado: 4

Estudio de la fuerza iónica de la fase dadora

La fuerza iónica disminuye la solubilidad de los analitos en la fase dadora mejorando la extracción (efecto salino)

Sales estudiadas

- NaCl
- NaNO₃
- KCl

Contenidos salinos (%) estudiados

- NaCl = 0 – 10 % (m/v)

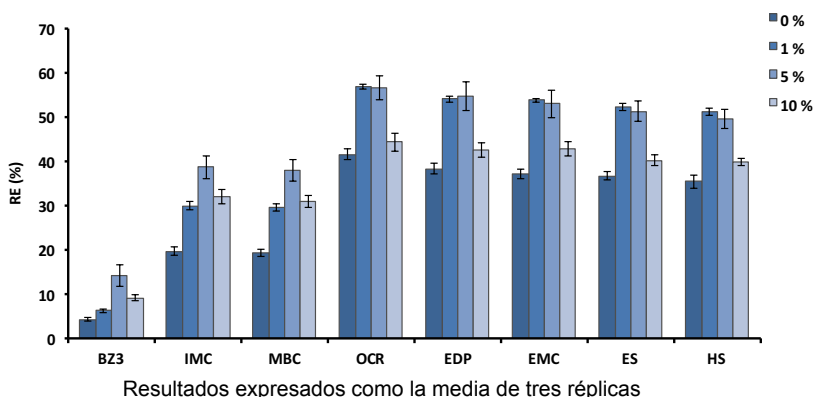
Procedimiento experimental

Se dispersan 100 mg de MNPs a velocidad media durante 20 min en 25 mL de disolución acuosa multicomponente de 200 ng mL⁻¹ ajustada a pH 4 conteniendo diferentes cantidades de sal. Los analitos se desorben en 2.5 mL de etanol durante 5 min

Resultados

- No se observaron diferencias entre las tres sales a una misma concentración (1 %)

Sal seleccionada: NaCl



- A 10 % de NaCl aumenta la viscosidad de la fase acuosa y se forman pequeñas burbujas en la superficie de la barra agitadora, reduciendo los RE

Contenido salino seleccionado: 5 %

Estudio de la adición de modificador orgánico

A nivel de trazas, la adsorción de los analitos en las paredes del vial que contiene la disolución a extraer (efecto pared) disminuye la concentración de los analitos de la disolución, llegando incluso a ser cuantitativa

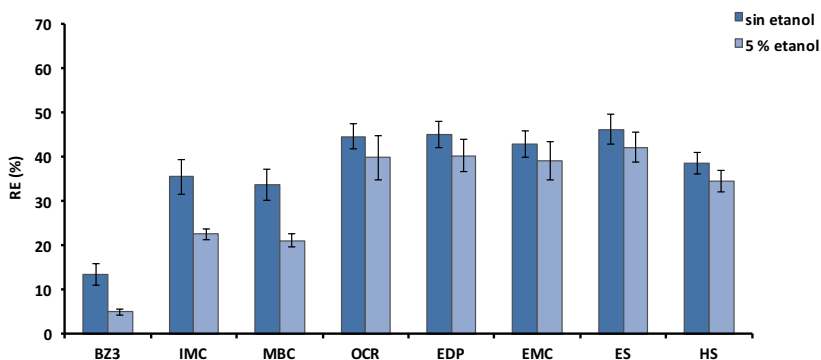
Concentraciones de etanol estudiadas

EtOH = 0 – 5 %

Procedimiento experimental

Se dispersan 100 mg de MNPs a velocidad media durante 20 min en 25 mL de disolución acuosa multicomponente de 200 ng mL⁻¹ ajustada a pH 4 y 1 % NaCl, conteniendo diferentes concentraciones de etanol. Los analitos se desorben en 2.5 mL de etanol durante 5 min

Resultados



Resultados expresados como la media de tres réplicas

- La presencia de etanol disminuye los RE, especialmente para los compuestos más hidrofílicos (BZ3, IMC y MBC)
- La adición de etanol aumenta la solubilidad de los analitos en el medio acuoso y, por tanto, disminuye la extracción

Sin adición de modificador orgánico

Estudio del disolvente de desorción

La elución se efectúa mediante un eluyente adecuado que elimine la interacción analito-sorbente y eluye la mayor cantidad posible de analito. El solvente adecuado tendrá una mayor afinidad con el analito (polaridad)

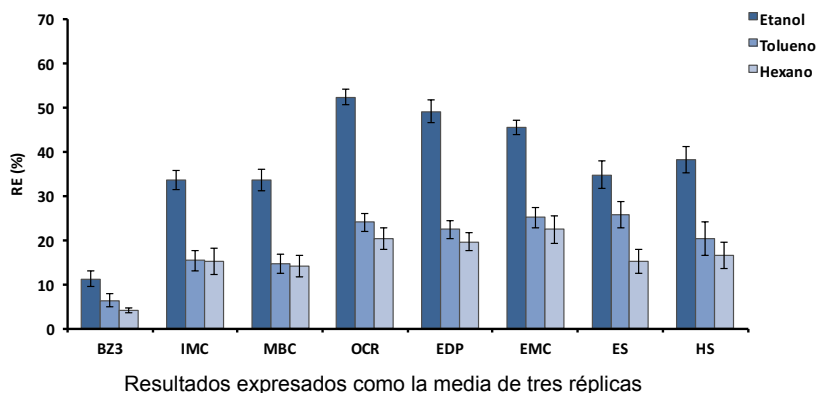
Disolventes de extracción estudiados

- Etanol
- Tolueno (V = 2.5 mL, que es el volumen mínimo para cubrir la barra agitadora)
- Hexano

Procedimiento experimental

Se dispersan 100 mg de MNPs a velocidad media durante 20 min en 25 mL de disolución acuosa multicomponente de 200 ng mL⁻¹ ajustada a pH 4 y 5 % NaCl. Los analitos se desorben en 2.5 mL de disolvente durante 5 min

Resultados



- Cuando la barra agitadora se sumerge en los disolventes inmiscibles en agua (tolueno y hexano), el agua residual sobre la superficie de las MNPs reduce el área de contacto y la desorción es menos eficaz

Disolvente de desorción seleccionado: etanol

Estudio del tiempo de desorción

El tiempo de contacto entre las MNPs (y por tanto el sorbente) y el disolvente de desorción debe ser el suficiente para desorber completamente los analitos

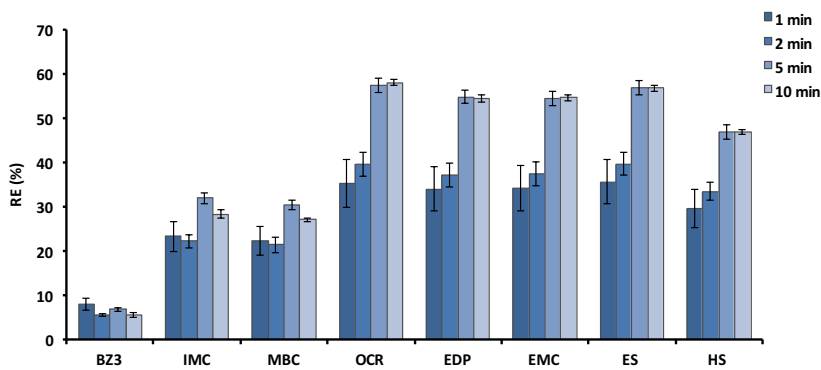
Tiempos de desorción estudiados

$t_{des} = 1 - 10 \text{ min}$

Procedimiento experimental

Se dispersan 100 mg de NPMs a velocidad media durante 20 min en 25 mL de disolución acuosa multicomponente de 200 ng mL^{-1} ajustada a pH 4 y 1 % NaCl. Los analitos se desorben en 2.5 mL de etanol durante diferentes tiempos

Resultados



Resultados expresados como la media de tres réplicas

- Completa desorción a los 5 min
- No se observa arrastre en sucesivas eluciones sobre la misma barra agitadora recubierta, indicando que la desorción es cuantitativa

Tiempo de desorción seleccionado: **5 min**

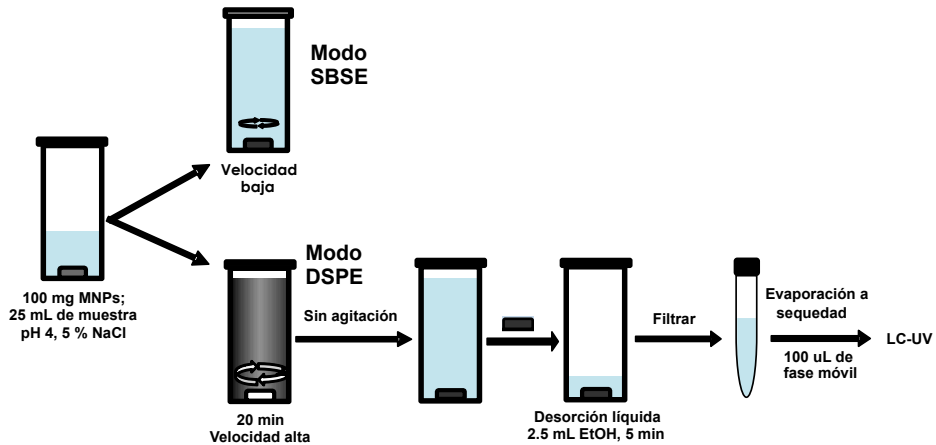
REUTILIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

- Se extrajeron secuencialmente ($n = 5$) diferentes disoluciones acuosas multicomponente con las mismas MNPs en las mismas condiciones experimentales
- T-test ANOVA al 95 % de probabilidad demostraron que hay cambios significativos para algunos los analitos
- Después del cuarto uso los RE disminuyen, probablemente debido a la hidrólisis del ácido oléico en las condiciones experimentales para la extracción
- Las MNPs se pueden regenerar con ácido oléico después del cuarto ciclo, aumentando de nuevo los RE a sus valores originales

ETAPA DE EVAPORACIÓN

- Para mejorar los factores de preconcentración, se añadió una etapa de evaporación de los 2.5 mL de disolvente de desorción y posterior reconstitución en un volumen menor
- Con corriente de nitrógeno → pérdida de analitos.
- Con evaporador concentrador miVac DUO → aparece residuo salino, conteniendo los analitos, en las paredes del tubo
- La adición de 100 μL de etanol no disuelve el residuo → adición de fase móvil (70 % EtOH – 30 % tampón acuoso)

MÉTODO PROPUESTO



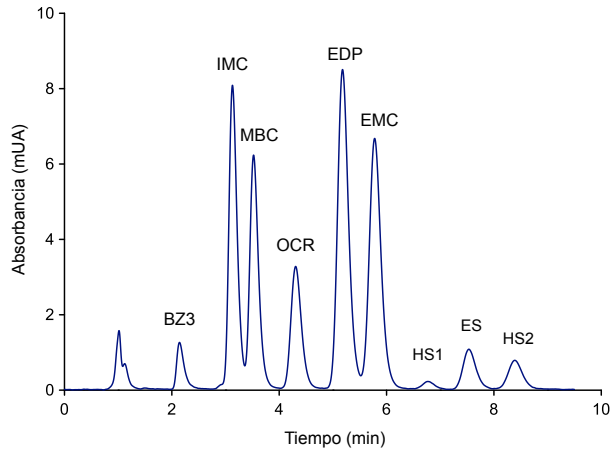
- Concentraciones de trabajo: 100 – 400 ng mL⁻¹ para BZ3 y 10 – 50 ng L⁻¹ para el resto de analitos
- Las muestras de agua de mar se sonicen previamente 15 min para lixiviar los filtros UV de la materia particulada y determinar el contenido total, siguiendo el procedimiento desarrollado en el **Capítulo 3**

Tabla 5.1. Condiciones del LC-UV/Vis

Volumen de inyección	20 µL
Temperatura de la columna	45 °C
Longitud de onda de detección	313 nm
Caudal de la fase móvil	1 mL min ⁻¹
Columna	Licrospher® 100RP-18 (12.5 cm, 4 mm d.i., 5 µm tamaño de partícula)
Composición de la fase móvil	Disolvente A: Etanol Disolvente B: ácido acético 1 %
Modo elución	Isocrático: 70% A : 30% B (v/v)



Cromatograma obtenido aplicando el método propuesto



Disolución patrón de 30 ng mL^{-1} de los filtros UV estudiados (300 ng mL^{-1} de BZ3) en agua desionizada

CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO PROPUESTO

Parámetros de calidad estudiados

- Factor de preconcentración (FP)
- Rendimiento de extracción (RE)
- Linealidad
- Límites de detección (LDD) y límites de cuantificación (LDC)
- Precisión intra-día e inter-día

Tabla 5.2. Parámetros analíticos del método propuesto

Filtro UV	FP	Pendiente $\pm s$ /10 ⁵ (ng L ⁻¹)	R ²	LDD (ng mL ⁻¹)	LDC (ng mL ⁻¹)	Precisión intra-día RSD (%)		Precisión inter-día RSD (%)	
						10 ng mL ⁻¹	30 ng mL ⁻¹	10 ng mL ⁻¹	30 ng mL ⁻¹
BZ3	11.0 \pm 0.5	0.085 \pm 0.004	0.998	30.6	100.1	10.6	7.6	9.5	5.5
IMC	62 \pm 2	1.37 \pm 0.04	0.993	2.4	8.0	10.9	4.6	7.4	6.4
MBC	57 \pm 2	1.02 \pm 0.04	0.999	3.2	10.7	4.8	1.3	10.1	7.5
OCR	148 \pm 7	2.77 \pm 0.09	0.999	2.7	9.1	4.2	4.7	4.3	7.1
EDP	133 \pm 6	7.1 \pm 0.3	0.996	3.0	9.9	2.7	4.2	10.0	4.8
EMC	136 \pm 6	6.3 \pm 0.2	0.997	2.4	8.0	2.0	5.7	8.5	5.4
ES	106 \pm 3	0.36 \pm 0.02	0.992	3.0	9.7	7.6	4.3	8.6	9.2
HS	114 \pm 3	0.40 \pm 0.02	0.998	3.2	10.7	9.8	7.2	6.8	5.1

Factor de preconcentración (Tabla 5.2)

- $FP = C_{ext}/C_0$, donde C_{ext} corresponde a la concentración en el extracto final y C_0 a la concentración inicial en la fase acuosa
- Valores de **FP** comprendidos entre **11 y 148**

Rendimiento de extracción

- $RE = FP \cdot V_{final}/V_{inicial} \cdot 100 \%$
- Valores de **RE** comprendidos entre **6.8 y 57.4 %**
- El método ofrece mayor selectividad para los compuestos menos polares

Linealidad (Tabla 5.2)

- **Linealidad** desde 10 hasta 200 – 500 ng mL⁻¹, dependiendo del analito
- **Intervalo de trabajo:** 100 – 400 ng mL⁻¹ para BZ3 y 10 – 50 ng mL⁻¹ para el resto de filtros UV, con coeficientes de regresión (R^2) > 0.992

Límites de detección y cuantificación (Tabla 5.2)

- $LDD = 3 S_{y/x}/b$ $LDC = 10 S_{y/x}/b$
donde $S_{y/x}$ corresponde a la desviación estándar residual y b a la pendiente de la curva de calibrado obtenida
- **LDD** comprendidos entre **2.4 y 3.2 ng mL⁻¹** (**30.6 ng mL⁻¹** para BZ3)
- **LDC** comprendidos entre **8.0 y 10.7 ng mL⁻¹** (**100.1 ng mL⁻¹** para BZ3)

Precisión intra-día e inter-día (Tabla 5.2)

- Expresada como desviación estándar relativa (% **RSD**)
- El método propuesto se aplicó a cinco réplicas de una disolución patrón a dos niveles de concentración (10 y 30 ng mL⁻¹)
- Se analizaron en la misma sesión de trabajo (intra-día) y en cinco días consecutivos (inter-día)
- Valores entre **1.3 y 10.9 %**, indicando **buena precisión**

ANÁLISIS DE MUESTRAS

Muestras analizadas

- Muestras de agua de mar de tres playas de diferente localización recogidas durante la estación de verano
- Analizadas por triplicado empleando el método SBS/DME-LC-UV/Vis propuesto
- Teniendo en cuenta el contenido salino en agua de mar (3 – 5 %), las muestras se fortificaron con 1 % de NaCl para regular la fuerza iónica hasta un 5 %

Resultados

- Los resultados mostraron que todos los analitos estaban por debajo del límite de detección

Estudios de recuperación

- Se calculó el **coeficiente de recuperación (%)**:
$$R = [(C_{M+P} - C_M) / C_P] \cdot 100 \%$$
donde:
 - C_M : concentración de la muestra sin fortificar
 - C_{M+P} : concentración de la muestra fortificada
 - C_P : concentración del patrón añadido a la muestra (concentración fortificada)
- Se fortificaron, por triplicado, las tres muestras de agua de mar analizadas con 30 ng mL⁻¹ de los analitos (200 ng mL⁻¹ para BZ3)

Tabla 5.3. Coeficientes de recuperación (%) obtenidos en el estudio del efecto matriz

Filtro UV	Coeficiente de recuperación (%)		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
BZ3	116 ± 1	92 ± 6	84 ± 6
IMC	116 ± 7	86 ± 7	79 ± 2
MBC	120 ± 4	102 ± 9	96 ± 9
OCR	98 ± 3	102 ± 5	103 ± 2
EDP	100 ± 3	105 ± 6	107 ± 4
EMC	97 ± 2	97 ± 5	107 ± 9
ES	95 ± 8	83 ± 4	89 ± 11
HS	87 ± 6	87 ± 3	97 ± 9

Muestra 1: Playa Santa Ponsa (Mallorca, España)

Muestra 2: Playa Malvarrosa (Valencia, España)

Muestra 3: Playa Pinedo (Valencia, España)

- Valores entre **87 y 120 %**, **83 y 105 %** y **79 y 107 %**, respectivamente, indican que la matriz no afecta de forma significativa
- **MÉTODO DE CALIBRACIÓN:** Calibración externa. Los patrones de calibración se preparan y se extraen empleando el método SBSDE en las mismas condiciones que las muestras

CONCLUSIONES

- Se ha desarrollado una nueva técnica de extracción, que se ha denominado *microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora*, que combina las ventajas de SBSE y DSPE en una misma estrategia analítica y está mediada por el uso de nanopartículas magnéticas modificadas superficialmente
- Se puede seleccionar la modalidad de trabajo en función de la velocidad de agitación de la barra agitadora
- Desde el punto de vista experimental, el método ofrece ventajas respecto a:
 - SBSE: menor tiempo de extracción y la posibilidad de elegir el recubrimiento sorbente más adecuado según el analito
 - DSPE: extracción y post-extracción más sencilla, reduciendo la intervención manual y el uso de campos magnéticos externos adicionales
- Se ha aplicado satisfactoriamente a tres muestras reales en términos de repetibilidad, exactitud y linealidad, obteniéndose además altos factores de preconcentración
- Se trata de un método analítico simple que no precisa de tiempos elevados para modificar la superficie de las nanopartículas, y respetuoso con el medio ambiente y con el operario, ya que se utilizan cantidades pequeñas de disolventes orgánicos

Capítulo 6

Desarrollo de un método analítico para la determinación de filtros UV mediante microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora acoplada a desorción térmica – cromatografía de gases – espectrometría de masas

El contenido de este capítulo ha sido publicado:

Determination of ultraviolet filters in bathing waters by stir bar sorptive-dispersive microextraction coupled to thermal desorption – gas chromatography – mass spectrometry,

Juan L. Benedé, Alberto Chisvert, Dimosthenis L. Giokas, Amparo Salvador

Talanta 147 (2016) 246-252

Y presentado como cartel:

XX Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica, Santiago de Compostela, 2015

INTRODUCCIÓN

Objetivo

Ampliar la utilidad analítica de SBS-DME, desarrollada y presentada en el capítulo anterior, como técnica de extracción y combinarla con la desorción térmica acoplada a cromatografía de gases con detección en espectrometría de masas para aumentar la sensibilidad de la determinación

Resumen

En el capítulo anterior se ha presentado una nueva técnica de microextracción que combina los principios de SBSE y DSPE en una misma estrategia, mediante el uso de barras agitadoras recubiertas de nanopartículas magnéticas como material sorbente. Como demostración analítica, se optimizó y validó para la determinación de ocho filtros UV, obteniéndose excelentes características analíticas. Sin embargo, la desorción líquida de los analitos del material sorbente aumenta la dilución y, por tanto, disminuye la sensibilidad. Además, sólo se inyecta una porción de los analitos extraídos.

En este capítulo se amplía la utilidad analítica de **SBS-DME** acoplándola a **desorción térmica**, previo al análisis por **cromatografía de gases – espectrometría de masas**, como una etapa de desorción efectiva y sin necesidad de disolvente. En este caso, la desorción térmica permite la introducción directa de la cantidad total de analitos extraídos en el instrumento de análisis.

La metodología se aplicó al análisis de dos muestras medioambientales (agua de río y mar) y una muestra de agua de piscina, con buenas características analíticas en términos de linealidad, factores de preconcentración (68 – 690), límites de detección (bajo ng L^{-1}) y repetibilidad intra- e inter-día ($\text{RSD} < 12 \%$) y coeficientes de recuperación relativa (80 – 116 %).

DESORCIÓN TÉRMICA

Variables estudiadas

- Temperatura de desorción
- Tiempo de desorción

Señal analítica

$y = A_i$, donde A_i corresponde al área del pico cromatográfico del analito i

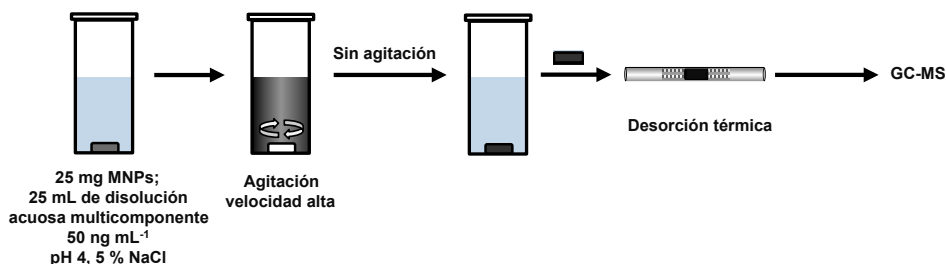
Disoluciones empleadas

- Disolución multicomponente de 50 ng mL^{-1} de los analitos en agua

Procedimiento experimental general en la optimización

La barra agitadora recubierta con las MNPs, previamente acondicionadas (véase **Capítulo 5**), se introduce en la disolución y se agita a alta velocidad para que las nanopartículas se dispersen. Transcurrido el tiempo de extracción, la agitación se detiene y las MNPs se adhieren a la barra agitadora, que se introduce en un tubo de vidrio para llevar a cabo la desorción térmica y análisis por GC-MS

Se han seleccionado las condiciones de extracción optimizadas en el capítulo anterior, a excepción del tamaño de las barras agitadoras (6.4 mm x 3.1 mm) y la cantidad de MNPs (25 mg) para no sobrepasar la capacidad de carga del tubo de desorción empleado



Estudio de la temperatura de desorción

La temperatura de desorción debe ser lo suficientemente alta para desorber todos los analitos cuantitativamente. Temperaturas muy elevadas pueden provocar perturbaciones en la señal analítica por la liberación del ácido oléico de las MNPs

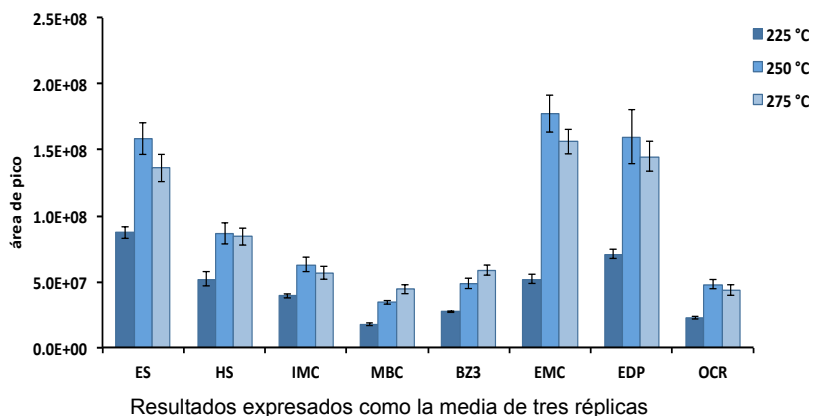
Temperaturas de desorción estudiadas

$$T_{\text{des}} = 225 - 275 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

Procedimiento experimental

Se dispersan 25 mg de MNPs a velocidad alta durante 20 min en 25 mL de disolución acuosa multicomponente de 50 ng mL⁻¹ ajustada a pH 4 y 5 % NaCl. Los analitos se desorben a diferentes temperaturas de desorción durante 10 min

Resultados



- Aumento de las señales al aumentar la temperatura de desorción

Temperatura de desorción seleccionada: 250 °C

Estudio del tiempo de desorción

Debe dejarse tiempo suficiente a la temperatura de desorción para que los analitos se desorban cuantitativamente

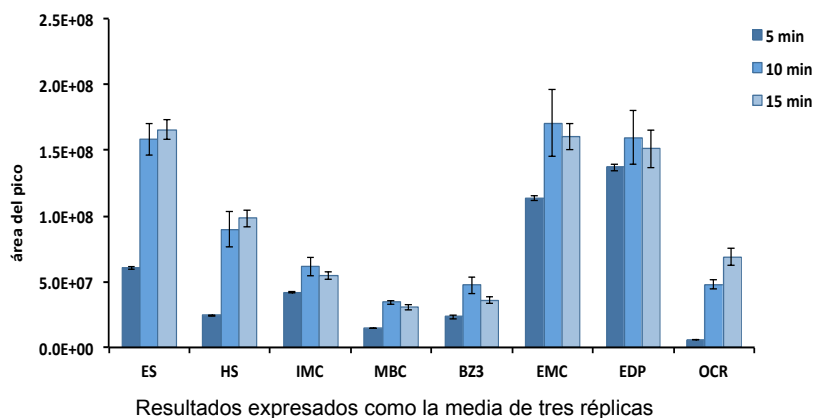
Tiempos de desorción estudiados

$t_{des} = 5 - 15 \text{ min}$

Procedimiento experimental

Se dispersan 25 mg de MNPs a velocidad alta durante 20 min en 25 mL de disolución acuosa multicomponente de 50 ng mL^{-1} ajustada a pH 4 y 5 % NaCl. Los analitos se desorben a $250 \text{ }^\circ\text{C}$ durante diferentes tiempos

Resultados



- Aumento considerable de 5 a 10 min, permaneciendo prácticamente constante hasta 15 min

Tiempo de desorción seleccionado: 10 min

Estudio del tiempo de extracción

A pesar de haber realizado este estudio con anterioridad (**Capítulo 5**) es necesario volver a estudiar los perfiles del tiempo de extracción puesto que la cantidad de MNPs empleadas en este capítulo es menor que en el anterior

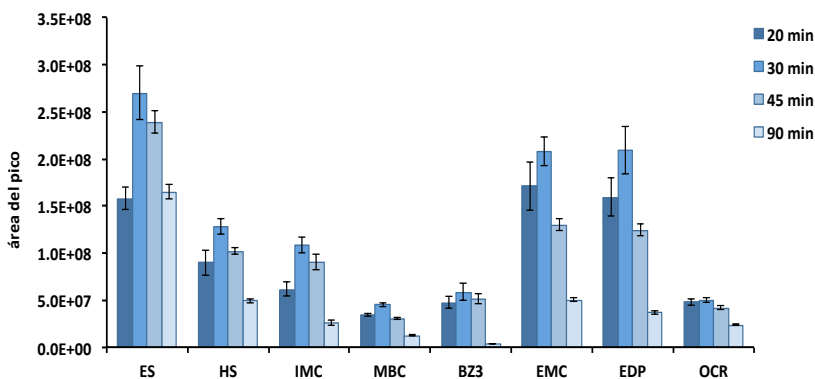
Tiempos de extracción estudiados

$t_{\text{ext}} = 20 - 90 \text{ min}$

Procedimiento experimental

Se dispersan 25 mg de MNPs a velocidad alta durante diferentes tiempos de extracción en 25 mL de disolución acuosa multicomponente de 50 ng mL^{-1} ajustada a pH 4 y 5 % NaCl. Los analitos se desorben a $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min

Resultados

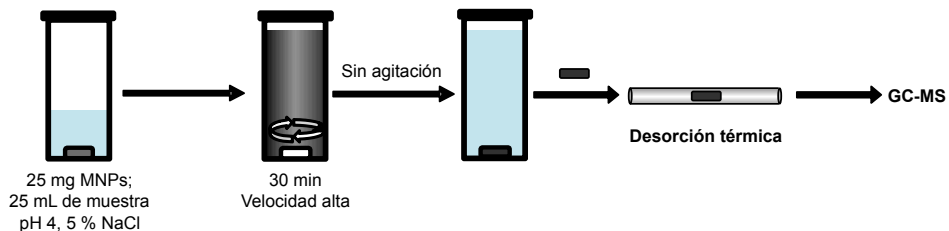


Resultados expresados como la media de tres réplicas

- Máxima extracción obtenida para 30 min
- El ácido oléico (y por tanto los analitos retenidos) puede liberarse de la superficie de las MNPs durante tiempos prolongados en condiciones de pH ácido

Tiempo de extracción seleccionado: 30 min

MÉTODO PROPUESTO



- Concentraciones de trabajo: 500 – 2500 ng L⁻¹ para BZ3 y 100 – 500 ng L⁻¹ para los otros analitos
- Patrón interno (BZ-d₁₀): 1 ng mL⁻¹
- Las muestras de agua a analizar se sonicen previamente 15 min para lixiviar los filtros UV de la materia particulada y determinar el contenido total, siguiendo el procedimiento desarrollado en el **Capítulo 3**

Tabla 6.1. Condiciones del TD

Temperatura interfase	200 °C
Temperatura de trampa fría	- 10 °C
Programa de temperaturas desorción	50 °C (2 min), 250 °C (10 min)
Programa de temperaturas de la trampa fría	-10 °C, 16 °C s ⁻¹ hasta 250 °C (3 min)

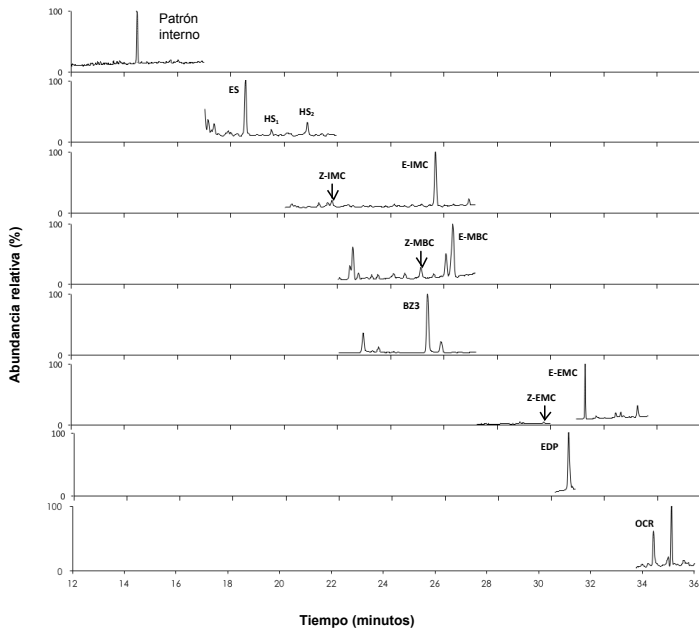
Tabla 6.2. Condiciones del GC-MS

Temperatura interfase	280 °C
Temperatura fuente	250 °C
Flujo de Helio	1 mL min ⁻¹
Columna	HP-5MS UI (95 % dimetil-5 % difenilpolisiloxano, 30 m, 0.25 mm d.i., 0.25 µm)
Programa de temperaturas	70 °C (1 min), 10 °C min ⁻¹ hasta 170 °C, 2 °C min ⁻¹ hasta 200 °C y 10 °C min ⁻¹ hasta 280 °C (6 min)

Tabla 6.3. Datos de interés del método de GC-MS para los compuestos objeto de estudio y el patrón interno (PI)

Filtro UV	Tiempo de retención (min)	Iones monitorizados (m/z)
BZ-d ₁₀ (PI)	14.44	82, 110 , 192
ES	18.45	120 , 138, 250
HS	20.04 (<i>HS</i> ₁), 20.75(<i>HS</i> ₂)	120, 138 , 262
IMC	21.20 (<i>Z</i>), 25.54 (<i>E</i>)	161, 178 , 248
MBC	24.50 (<i>Z</i>), 26.23 (<i>E</i>)	128, 211, 254
BZ3	25.33	151, 227 , 228
EMC	29.78 (<i>Z</i>), 31.22 (<i>E</i>)	161, 178 , 290
EDP	30.62	148, 165 , 277
OCR	35.04	204 , 232, 360

Cromatograma obtenido aplicando el método propuesto



Disolución patrón de 200 ng L⁻¹ de los filtros UV estudiados y 1 ng mL⁻¹ de patrón interno en agua desionizada

CALIBRACIÓN

Calibración seleccionada

Calibración con adición de **patrón interno** para reducir la variabilidad de las medidas en GC y de todo el proceso

Señal analítica

$y = A_i/A_{PI}$, donde A_i corresponde al área del pico cromatográfico del analito i y A_{PI} al área del pico cromatográfico del patrón interno (BZ-d₁₀)

Patrón interno seleccionado

Benzofenona deuterada (BZ-d₁₀) fue seleccionada como patrón interno debido a:

- Adecuado para inyectar en GC-MS y se extrae correctamente mediante SBS/DME
- Su presencia en muestras de agua es poco probable
- Se ve afectado por la fuerza iónica de la misma manera que los analitos

CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO PROPUESTO

Parámetros de calidad estudiados

- Factor de preconcentración (FP)
- Linealidad
- Límites de detección (LDD) y límites de cuantificación (LDC)
- Precisión intra-día e inter-día

Tabla 6.4. Parámetros analíticos del método propuesto

Filtro UV	FP	Pendiente $\pm s$ / 10^{-5} (ng L ⁻¹)	R ²	LDD (ng L ⁻¹)	LDC (ng L ⁻¹)	Precisión intra-día RSD (%)	Precisión inter-día RSD (%)
ES	314 \pm 3	15.5 \pm 0.4	0.997	23	77	3.9	7.5
HS	264 \pm 30	138.4 \pm 1.5	0.999	13	43	1.5	5.4
IMC	108 \pm 10	21.9 \pm 0.8	0.995	28	95	5.4	11.3
MBC	68 \pm 5	16.3 \pm 0.6	0.995	23	78	8.6	8.9
BZ3	68 \pm 7	41.5 \pm 1.3	0.997	148	493	3.6	5.5
EMC	538 \pm 30	206 \pm 7	0.996	28	95	5.2	10.2
EDP	164 \pm 5	139 \pm 5	0.997	30	99	4.4	7.0
OCR	690 \pm 40	51.9 \pm 1.6	0.996	27	91	7.2	8.4

Factor de preconcentración (Tabla 6.4)

- $FP = C_{ext}/C_0$, donde C_{ext} corresponde a la concentración en el extracto final y C_0 a la concentración inicial en la fase acuosa
- Valores de **FP** comprendidos entre **68 y 690**

Linealidad (Tabla 6.4)

- **Linealidad** hasta, al menos, 50 ng mL⁻¹ en todos los casos
- **Intervalo de trabajo:** 0.5 – 2.5 ng mL⁻¹ para BZ3 y 100 – 500 ng L⁻¹ para el resto de filtros UV, con coeficientes de regresión (R²) > 0.995

Límites de detección y cuantificación (Tabla 6.4)

- $LDD = 3 S_{y/x}/b$ $LDC = 10 S_{y/x}/b$
donde $S_{y/x}$ corresponde a la desviación estándar residual y b a la pendiente de la curva de calibrado obtenida
- **LDD** comprendidos entre **13 y 32 ng L⁻¹ (148 ng L⁻¹ para BZ3)**
- **LDC** comprendidos entre **43 y 99 ng L⁻¹ (493 ng L⁻¹ para BZ3)**
- Los límites de detección se han reducido 85 – 250 (según el analito) respecto al empleo de la desorción líquida (véase capítulo anterior)

Precisión intra-día e inter-día (Tabla 6.4)

- Expresada como desviación estándar relativa (% **RSD**)
- El método propuesto se aplicó a cinco réplicas de una disolución patrón de 200 ng L⁻¹ (500 ng L⁻¹ para BZ3)
- Se analizaron en la misma sesión de trabajo (intra-día) y en cinco días consecutivos (inter-día)
- Valores entre **1.5 y 11.3 %**, indicando **buena precisión**

ANÁLISIS DE MUESTRAS

Muestras analizadas

- Una muestra de agua de mar y una muestra de agua de piscina recogidas durante la estación de verano, y una muestra de agua de río recogida durante la estación de invierno
- Analizadas por triplicado empleando el método SBS-DME-TD-GC-MS propuesto
- Teniendo en cuenta el contenido salino inicial en cada muestra (0.05 % en río, 0.5 % en piscina y 4 % en mar), se añadió NaCl para regular la fuerza iónica hasta un 5 %

Resultados (Tabla 6.5)

- Niveles muy bajos en agua de río → el muestreo fue en invierno
- Concentraciones elevadas en agua de mar y piscina → temporada alta de actividades de baño y mayor uso de cremas solares
- En general, concentraciones más bajas en agua de piscina ($< \text{LDC} - 732 \text{ ng L}^{-1}$) que en agua de mar ($174 - 914 \text{ ng L}^{-1}$) → la ducha previa al baño reduce la incorporación de filtros UV en el agua de piscina por parte de los bañistas

Tabla 6.5. Concentraciones encontradas de los filtros UV objeto de estudio tras aplicar el método propuesto

Filtro UV	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
ES	126 ± 15	914 ± 14	732 ± 50
HS	219 ± 3	369 ± 40	366 ± 9
IMC	< LDC	174 ± 11	283 ± 30
MBC	< LDC	169 ± 30	178 ± 14
BZ3	< LDD	603 ± 50	538 ± 50
EMC	220 ± 15	691 ± 40	338 ± 30
EDP	< LDC	212 ± 20	< LDC
OCR	164 ± 2	406 ± 20	624 ± 50

Muestra 1: Río Turia (Valencia, España)

Muestra 2: Playa de la Patacona (Valencia, España)

Muestra 3: Piscina de Almudaina (Alicante, España)

Estudios de recuperación

- Se calculó el **coeficiente de recuperación (%)**:

$$R = [(C_{M+P} - C_M) / C_P] \cdot 100 \%$$
 donde:
 C_M : concentración de la muestra sin fortificar
 C_{M+P} : concentración de la muestra fortificada
 C_P : concentración del patrón añadido a la muestra (concentración fortificada)
- Se fortificaron, por triplicado, las tres muestras de agua analizadas con 200 ng L⁻¹ de los analitos (500 ng L⁻¹ para BZ3)

Tabla 6.6. Coeficientes de recuperación (%) obtenidos en el estudio del efecto matriz

Filtro UV	Coeficiente de recuperación (%)		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
ES	115 ± 6	109 ± 14	80 ± 8
HS	96 ± 9	112 ± 12	96 ± 12
IMC	86 ± 2	104 ± 5	84 ± 5
MBC	97 ± 9	112 ± 13	110 ± 5
BZ3	110 ± 5	103 ± 15	91 ± 6
EMC	115 ± 7	88 ± 6	91 ± 4
EDP	88 ± 5	111 ± 13	116 ± 13
OCR	98 ± 19	89 ± 9	105 ± 4

Muestra 1: Río Turia (Valencia, España)

Muestra 2: Playa de la Patacona (Valencia, España)

Muestra 3: Piscina de Almudaina (Alicante, España)

- Valores entre **86 y 115 %**, **88 y 112 %** y **80 y 116 %**, respectivamente, indican que la matriz no afecta de forma significativa
- MÉTODO DE CALIBRACIÓN:** Calibración externa. Los patrones de calibración se preparan y se extraen empleando el método SBS DME en las mismas condiciones que las muestras

CONCLUSIONES

- Se ha presentado un método SBSDME-TD-GC-MS para la determinación de ocho filtros UV en muestras acuosas
- La principal ventaja de la metodología propuesta es la combinación de:
 - SBSDME como técnica de extracción: menor tiempo de extracción que en otras técnicas de extracción y simplicidad del proceso
 - Desorción térmica (TD) como etapa de desorción: se evitan etapas de evaporación y posterior reconstitución, además de dilución del extracto
- Se ha aplicado satisfactoriamente a tres muestras reales en términos de repetibilidad, exactitud y linealidad, obteniéndose además altos factores de preconcentración
- El método presenta una alta sensibilidad, con bajos LDD que permiten la determinación de los compuestos estudiados a niveles de (ultra)trazas
- Se trata de un método analítico simple que no precisa de tiempos elevados para modificar la superficie de las nanopartículas, y respetuoso con el medio ambiente y con el operario, ya que se utilizan cantidades pequeñas de disolventes orgánicos

Capítulo 7

Desarrollo de un método analítico para la determinación de filtros UV hidrofílicos mediante microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora mediada por composites magnéticos

El contenido de este capítulo ha sido aceptado para su publicación:
Stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles-nylon 6 composite for the extraction of hydrophilic organic compounds in aqueous media

Juan L. Benedé, Alberto Chisvert, Dimosthenis L. Giokas, Amparo Salvador

Analytica Chimica Acta (2016), *en prensa*

INTRODUCCIÓN

Objetivo

Desarrollar un método analítico para la determinación de compuestos altamente hidrofílicos mediante la técnica SBSDME, desarrollada y presentada en el **Capítulo 5**, empleando un composite hidrofílico de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -nylon 6 como material sorbente

Resumen

En este capítulo se presenta un nuevo método analítico que permite la extracción y determinación de compuestos orgánicos con un fuerte carácter hidrofílico. Para ello se emplea la técnica de microextracción **SBSDME**, presentada en los capítulos anteriores, previa al análisis por **cromatografía de líquidos con detector UV/Vis**. La principal novedad radica en que, en este caso, las barras agitadores se recubren por un composite constituido por MNPs que se incrustan en una red polimérica, concretamente nylon 6, siendo éste un compuesto polar. De este modo se consigue disponer de un sorbente polar idóneo para extraer los compuestos objeto de estudio debido a la alta afinidad que los compuestos sulfonados presentan por las poliamidas como el nylon.

Como demostración analítica de esta nueva técnica, se determinaron cuatro filtros UV orgánicos en cuatro muestras medioambientales de diferente naturaleza (río y mar) y una muestra de agua de piscina. El método mostró buenas características analíticas en términos de linealidad, factores de preconcentración (105 – 145), límites de detección (ng mL^{-1}), repetibilidad intra- e inter-día ($\text{RSD} < 13 \%$) y coeficientes de recuperación relativa (90 – 115 %).

COMPOSITE DE $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -nylon 6

Selección

- La selección del composite $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -nylon 6 como material sorbente se hizo acorde a la capacidad del nylon para retener compuestos cargados negativamente, debido a los grupos amino terminales

Síntesis de los composites de MNPs-nylon 6

- Los composites se sintetizaron mediante un proceso que consiste en tres etapas:

1) Síntesis de MNPs de CoFe_2O_4 por co-precipitación [196]

- Se mezclan 100 mL de disolución acuosa de FeCl_3 0.4 M y 100 mL de disolución acuosa de CoCl_2 0.2 M
- Se adicionan 100 mL de NaOH 3 M gota a gota bajo agitación continua
- El precipitado negro formado se deja enfriar lentamente hasta temperatura ambiente y las MNPs se lavan varias veces con agua ultrapura y etanol
- Finalmente, el precipitado se seca toda la noche a 100 °C y se pulveriza hasta obtener un polvo fino de color negro

2) Recubrimiento de las MNPs con silica [197]

- Las MNPs de CoFe_2O_4 se dispersan homogéneamente en una mezcla de 500 mL de etanol y 120 mL de agua ultrapura durante 15 min
- Se adicionan 15 mL de disolución acuosa de amoníaco concentrado y 25 mL de tetraetilortosilicato (TEOS)
- Se agita magnéticamente durante 24 h a temperatura ambiente
- Finalmente, el precipitado se lava varias veces con agua ultrapura y etanol, y se deja secar

3) Síntesis de la red polimérica de nylon 6 con las MNPs incrustadas [27]

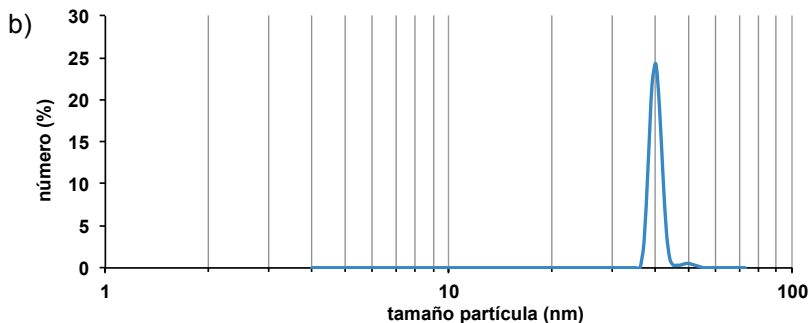
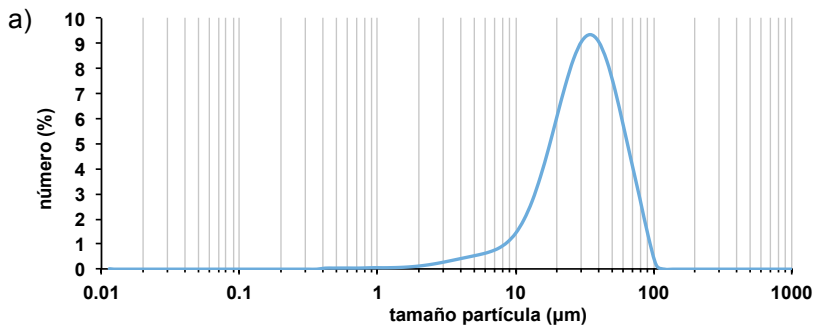
- Se disuelven 750 mg de nylon 6 en 25 mL de ácido fórmico
- A continuación se dispersa 1 g de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ en la disolución anterior durante 5 min y, seguidamente, la dispersión se añade a un vaso que contiene 250 mL de agua ultrapura
- En este paso, la solidificación del nylon 6 alrededor de las nanopartículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ se consigue por cambio de disolvente, ya que el nylon-6 es insoluble en medio acuoso
- Finalmente, el sólido obtenido se lava varias veces con agua ultrapura y etanol y se deja secar

Acondicionamiento y recubrimiento físico de las barras agitadoras

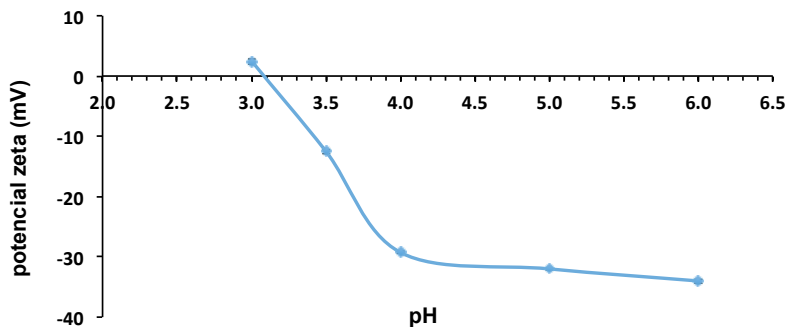
- Previo a su uso en la etapa de extracción, 100 mg de composite seco se dispersa en 10 mL de agua desionizada durante 10 minutos con la ayuda de una barra agitadora
- Una vez se detiene la agitación, el composite es atraído fuertemente por la barra agitadora
- Las barras agitadoras recubiertas se sacan de las disoluciones con la ayuda de unas pinzas de plástico y se introducen en la disolución a extraer

Caracterización

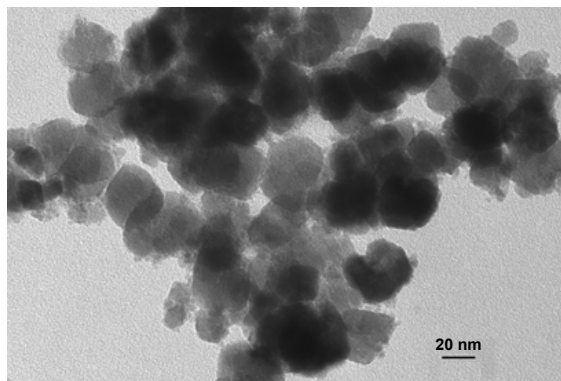
- Se determinó el **tamaño de partícula** de (a) las nanopartículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ y (b) del composite $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -nylon 6 mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz
- El tamaño medio obtenido para una dispersión de 10 mg mL^{-1} de estos materiales fue 40 nm y $35 \mu\text{m}$, respectivamente



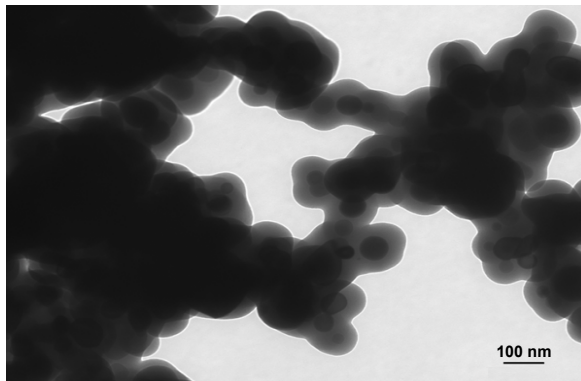
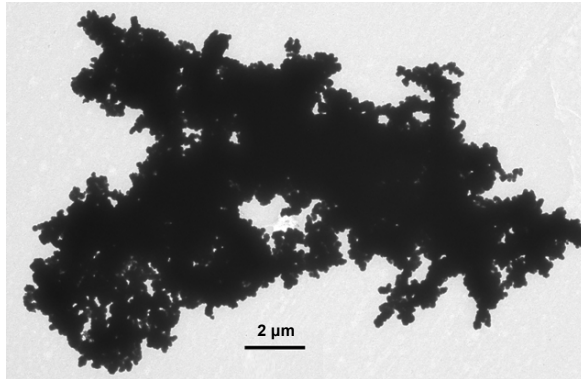
- Se llevaron a cabo medidas del potencial zeta para determinar el **punto de carga cero** (pzc) del composite
- La representación del potencial zeta frente al pH de diferentes suspensiones del composite, ajustadas a distintos valores de pH, determina el pH en el cual la superficie del material es neutro (pH_{pzc}). A valores de $\text{pH} < \text{pH}_{\text{pzc}}$, la superficie del composite tiene una carga neta positiva, mientras que la superficie tendrá una carga neta negativa a $\text{pH} > \text{pH}_{\text{pzc}}$
- El valor obtenido para una suspensión del composite de 10 mg mL^{-1} en disoluciones de ácido o-fosfórico 1 mM ajustadas a diferentes valores de pH fue $\text{pH}_{\text{pzc}} = 3.1$



- La observación de las nanopartículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) demuestra que las MNPs son esféricas con un diámetro medio de 40 nm



- La visión de la morfología del composite $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -nylon 6 muestra cómo las MNPs están embebidas en la red polimérica, manteniendo su tamaño original



MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA POR SORCIÓN SOBRE BARRA AGITADORA

Variables estudiadas

- Cantidad de composite
- Tiempo de extracción
- pH de la fase dadora
- Fuerza iónica de la fase dadora
- Disolvente de desorción
- Tiempo de desorción

Señal analítica

$y = A_i$, donde A_i corresponde al área del pico cromatográfico del analito i

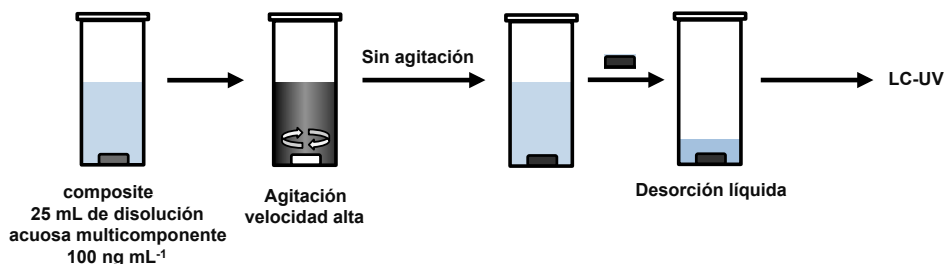
- La influencia de las variables se evaluó comparando el rendimiento de extracción (RE)

Disoluciones empleadas

- Disolución multicomponente de 100 ng mL^{-1} de los analitos en agua

Procedimiento experimental general en la optimización

La barra agitadora (11 mm x 6 mm) recubierta con el composite, previamente acondicionado, se introduce en la disolución y se agita a alta velocidad para que el composite se disperse. Transcurrido el tiempo de extracción, la agitación se detiene y el composite se adhiere a la barra agitadora que se introduce en el mínimo volumen de disolvente de desorción para cubrir la barra agitadora. Finalmente, el extracto se analiza por LC-UV



Estudio de la cantidad de composite

La transferencia de masa de los analitos desde la fase dadora hasta la aceptora depende de la proporción entre el área del sorbente y el volumen de la disolución acuosa

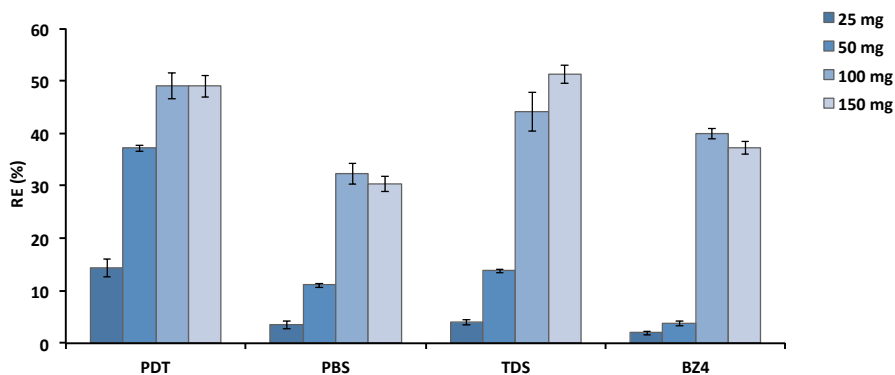
Cantidades de composites estudiadas

$$m_{\text{composites}} = 25 - 150 \text{ mg}$$

Procedimiento experimental

Se dispersan diferentes cantidades de composite durante 20 min en 25 mL de disolución acuosa multicomponente de 100 ng mL⁻¹. Los analitos se desorben en 2.5 mL de etanol:HCl 1 M (60:40) durante 5 min

Resultados



Resultados expresados como la media de tres réplicas

- Los RE aumentan al aumentar la cantidad de composite. Entre 100 y 150 mg no se observan cambios significativos

Cantidad de composite seleccionada: 100 mg

Estudio del tiempo de extracción

El tiempo de contacto entre la fase dadora y el sorbente debe ser el suficiente para alcanzar el estado de equilibrio

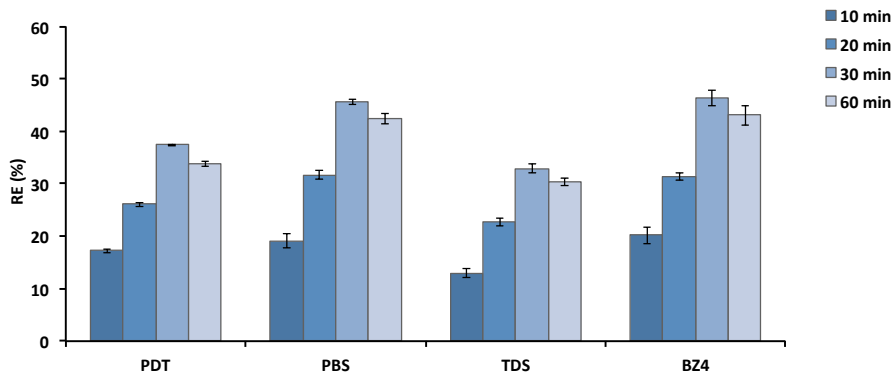
Tiempos de extracción estudiados

$t_{\text{ext}} = 10 - 60 \text{ min}$

Procedimiento experimental

Se dispersan 100 mg de composite durante diferentes tiempos de extracción en 25 mL de disolución acuosa multicomponente de 100 ng mL^{-1} . Los analitos se desorben en 2.5 mL de etanol:HCl 1 M (60:40) durante 5 min

Resultados



Resultados expresados como la media de tres réplicas

- Máxima extracción obtenida para 30 min. A mayor tiempo de extracción no se observan cambios significativos
- Los tiempos de extracción menores comparados con los métodos tradicionales se deben a la dispersión de las MNPs en la disolución y, por tanto, aumento del área de superficie de contacto

Tiempo de extracción seleccionado: 30 min

Estudio del pH de la fase dadora

Teniendo en cuenta la forma ionizada de los analitos, la carga de la superficie del composite influirá en las fuerzas electroestáticas para la interacción analito-sorbente

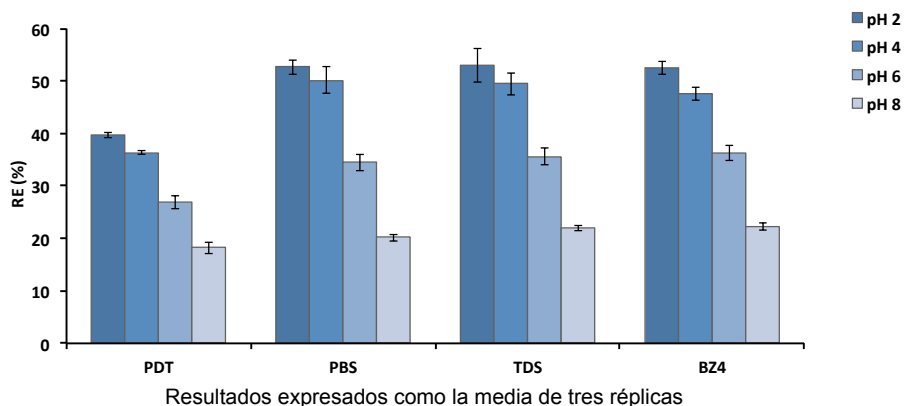
Valores de pH estudiados

pH = 2 – 8

Procedimiento experimental

Se dispersan 100 mg de composite durante 20 min en 25 mL de disolución acuosa multicomponente de 100 ng mL^{-1} ajustada a diferentes valores de pH (con ácido fosfórico y/o hidróxido sódico). Los analitos se desorben en 2.5 mL de etanol:HCl 1 M (60:40) durante 5 min

Resultados



- Mejores resultados a pH ácido → la superficie del composite está cargada positivamente ($\text{pH}_{\text{pzc}} = 3.1$) y las fuerzas electroestáticas son atractivas ya que los analitos se encuentran disociados al tener bajo pk_a
- A valores de pH más altos hay repulsión electrostática entre la superficie del composite cargado negativamente y las moléculas desprotonadas de los analitos

pH de la fase dadora seleccionado: 2

Estudio de la fuerza iónica de la fase dadora

El aumento de la fuerza iónica puede disminuir la capacidad de adsorción cuando las fuerzas electrostáticas son atractivas

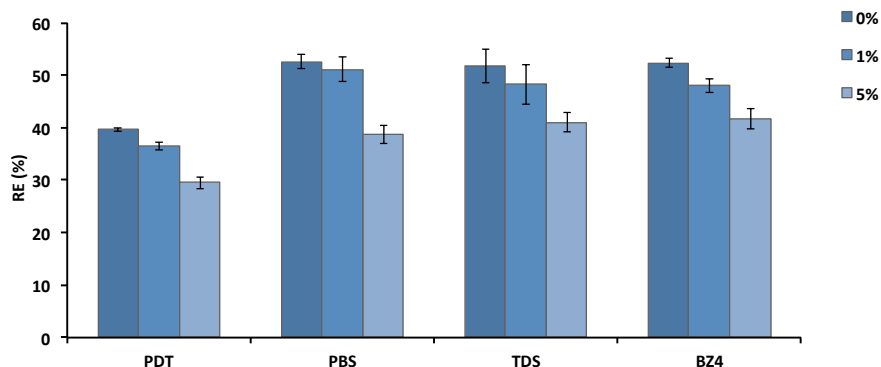
Contenidos salinos (% NaCl) estudiados

NaCl = 0 – 5 % (m/v)

Procedimiento experimental

Se dispersan 100 mg de composite durante 30 min en 25 mL de disolución acuosa multicomponente de 100 ng mL⁻¹ ajustada a pH 2 conteniendo diferentes cantidades de sal. Los analitos se desorben en 2.5 mL de etanol:HCl 1 M (60:40) durante 5 min

Resultados



Resultados expresados como la media de tres réplicas

- A mayor contenido salino, menores RE
- Este efecto se tendrá en cuenta en el análisis de muestras con alto contenido salino y se corregirá mediante la adición de patrón interno (pág.168)

Contenido salino de la fase dadora: **0 %**

Estudio del disolvente de desorción

La elución se efectúa mediante un eluyente adecuado que elimine la interacción analito-sorbente y eluya la mayor cantidad posible de analito.

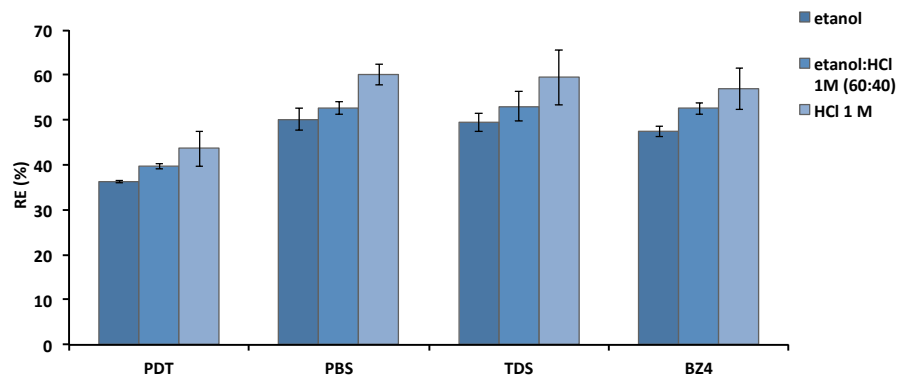
Disolventes de extracción estudiados

- Etanol
- Etanol:HCl 1 M (60:40)
- HCl 1 M

Procedimiento experimental

Se dispersan 100 mg de composite durante 30 min en 25 mL de disolución acuosa multicomponente de 100 ng mL^{-1} ajustada a pH 2. Los analitos se desorben en 2.5 mL de disolvente durante 5 min

Resultados



Resultados expresados como la media de tres réplicas

Disolvente de desorción seleccionado: HCl 1 M

Estudio del tiempo de desorción

El tiempo de contacto entre el composite (y por tanto el sorbente) y el disolvente de desorción debe ser suficiente para desorber completamente los analitos

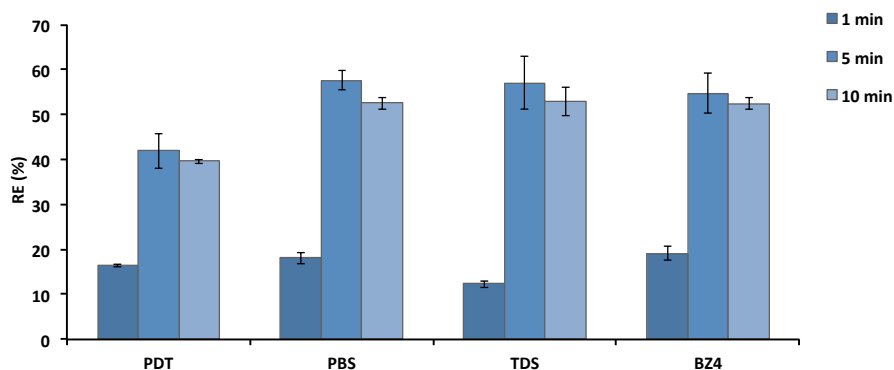
Tiempos de desorción estudiados

$t_{des} = 1 - 10 \text{ min}$

Procedimiento experimental

Se dispersan 100 mg de composite a velocidad media durante 20 min en 25 mL de disolución acuosa multicomponente de 100 ng mL^{-1} ajustada a pH 2. Los analitos se desorben en 2.5 mL de HCl 1 M durante diferentes tiempos de desorción

Resultados



Resultados expresados como la media de tres réplicas

- Completa desorción a los 5 min
- No se observa arrastre en sucesivas eluciones sobre la misma barra agitadora recubierta, indicando que la desorción es cuantitativa

Tiempo de desorción seleccionado: 5 min

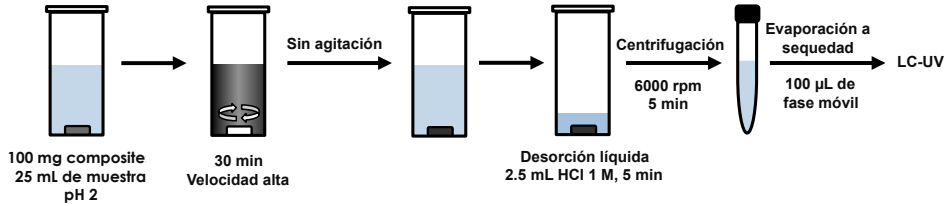
REUTILIZACIÓN DE LOS COMPOSITES

- Se extrajeron secuencialmente (n = 5) diferentes disoluciones acuosas multicomponente con el mismo composite en las mismas condiciones experimentales
- Se observó cambios significativos en las señales de todos los analitos desde el segundo uso
- El composite se descompone parcialmente en medio ácido debido a que el nylon presenta baja estabilidad en este medio

ETAPA DE EVAPORACIÓN

- Para mejorar los factores de preconcentración, se añadió una etapa de evaporación de los 2.5 mL de disolvente de desorción y posterior reconstitución en un volumen menor
- Se empleó un evaporador concentrador miVac DUO hasta total evaporación del disolvente
- Se reconstituyó con 100 μ L de fase móvil (30 % EtOH – 70 % tampón acuoso)

MÉTODO PROPUESTO

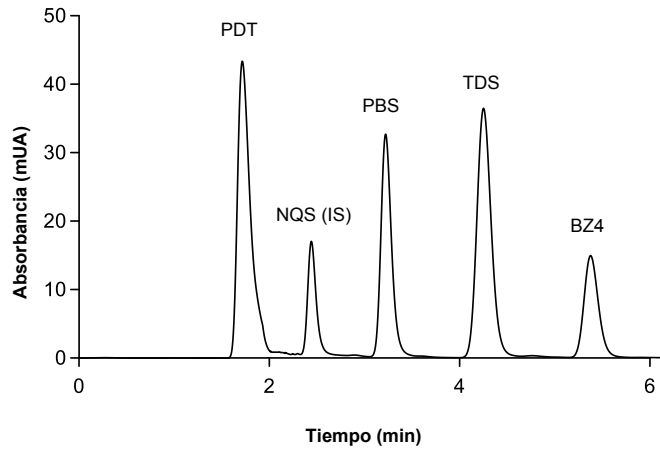


- Concentraciones de trabajo: 10– 50 ng mL⁻¹ para los otros analitos
- Patrón interno (NQS): 250 ng mL⁻¹
- Las muestras de agua a analizar se sonicen previamente 15 min para lixiviar los filtros UV de la materia particulada y determinar el contenido total, siguiendo el procedimiento desarrollado en el Capítulo 3

Tabla 7.1. Condiciones del LC-UV/Vis

Volumen de inyección	20 µL	
Temperatura de la columna	45 °C	
Longitud de onda de detección	320 nm	
Caudal de la fase móvil	0.5 mL min ⁻¹	
Columna	Licrospher® 100RP-18 (12.5 cm, 4 mm d.i., 5 µm tamaño de partícula)	
Composición de la fase móvil	Disolvente A: Etanol Disolvente B: ácido acético 1 %	
Modo elución	Isocrático: 30% A : 70% B (v/v)	

Cromatograma obtenido aplicando el método propuesto



Disolución patrón de 30 ng mL^{-1} de los filtros UV
estudiados (250 ng mL^{-1} de PI) en agua desionizada

CALIBRACIÓN

Calibración seleccionada

Calibración con adición de **patrón interno** para reducir la variabilidad del proceso SBSDE

Señal analítica

$y = A_i/A_{PI}$, donde A_i corresponde al área del pico cromatográfico del analito i y A_{PI} al área del pico cromatográfico del patrón interno (NQS)

Patrón interno seleccionado

Ácido 1,2-naftoquinona-4-sulfónico (NQS) fue seleccionado como patrón interno debido a:

- Presenta grupo sulfónico en su estructura, al igual que los analitos
- Su presencia en muestras de agua es poco probable
- Se ve afectado por la fuerza iónica de la misma manera que los analitos
- Cuando se usa A_i/A_{PI} como señal analítica, el contenido salino (fuerza iónica) no afecta a la extracción

CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO PROPUESTO

Parámetros de calidad estudiados

- Factor de preconcentración (FP)
- Rendimiento de extracción (RE)
- Linealidad
- Límites de detección (LDD) y límites de cuantificación (LDC)
- Precisión intra-día e inter-día

Tabla 7.2. Parámetros analíticos del método propuesto

Filtro UV	FP	Pendiente $\pm s$ /10 ⁻⁴ (ng mL ⁻¹)	R ²	LDD (ng mL ⁻¹)	LDC (ng mL ⁻¹)	Precisión intra-día RSD (%)		Precisión inter-día RSD (%)	
						10 ng mL ⁻¹	30 ng mL ⁻¹	10 ng mL ⁻¹	30 ng mL ⁻¹
PDT	105 \pm 8	350 \pm 7	0.998	1.9	6.3	2.6	5.6	12.3	11.5
PBS	145 \pm 5	253 \pm 7	0.997	2.8	9.2	4.0	4.7	8.6	8.8
TDS	143 \pm 9	384 \pm 10	0.997	2.9	9.6	2.2	5.3	7.7	9.3
BZ4	137 \pm 8	155 \pm 2	0.999	1.6	5.4	3.3	5.8	6.5	8.6

Factor de preconcentración (Tabla 7.2)

- $FP = C_{ext}/C_0$, donde C_{ext} corresponde a la concentración en el extracto final y C_0 a la concentración inicial en la fase acuosa
- Valores de **FP** comprendidos entre **105 y 145**

Rendimiento de extracción

- $RE = FP \cdot V_{final}/V_{inicial} \cdot 100 \%$
- Valores de **RE** comprendidos entre **45 y 58 %**

Linealidad (Tabla 7.2)

- **Linealidad** desde 10 hasta, al menos, 500 ng mL⁻¹ para todos los analitos
- **Intervalo de trabajo:** 10 – 50 ng mL⁻¹ para todos los analitos, con coeficientes de regresión (R²) > 0.997

Límites de detección y cuantificación (Tabla 7.2)

- $LDD = 3 S_{y/x}/b$ $LDC = 10 S_{y/x}/b$
donde $S_{y/x}$ corresponde a la desviación estándar residual y b a la pendiente de la curva de calibrado obtenida
- **LDD** comprendidos entre **1.6 y 2.9 ng mL⁻¹**
- **LDC** comprendidos entre **5.4 y 9.6 ng mL⁻¹**

Precisión intra-día e inter-día (Tabla 7.2)

- Expresada como desviación estándar relativa (% **RSD**)
- El método propuesto se aplicó a cinco réplicas de una disolución patrón a dos niveles de concentración (10 y 30 ng mL⁻¹)
- Se analizaron en la misma sesión de trabajo (intra-día) y en cinco días consecutivos (inter-día)
- Valores entre **2.2 y 12.3 %**, indicando **buena precisión**

ANÁLISIS DE MUESTRAS

Muestras analizadas

- Tres muestras de agua de mar de diferentes playas y una muestra de agua de piscina recogidas durante la estación de verano, y una muestra de agua de río recogida durante la estación de invierno
- Analizadas por triplicado empleando el método SBS/DME-LC-UV/Vis propuesto

Resultados

- Los resultados mostraron que todos los analitos estaban por debajo del límite de detección

Estudios de recuperación

- Se calculó el **coeficiente de recuperación (%)**:

$$R = [(C_{M+P} - C_M) / C_P] \cdot 100 \%$$
 donde:
 C_M : concentración de la muestra sin fortificar
 C_{M+P} : concentración de la muestra fortificada
 C_P : concentración del patrón añadido a la muestra (concentración fortificada)
- Se fortificaron, por triplicado, las cinco muestras de agua con 30 ng mL⁻¹ de los analitos (250 ng mL⁻¹ de patrón interno)

Tabla 7.3. Coeficientes de recuperación (%) obtenidos en el estudio del efecto matriz

Filtro UV	Coeficiente de recuperación (%)				
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
PDT	91 ± 8	94 ± 9	97 ± 8	96 ± 5	90 ± 7
PBS	104 ± 5	109 ± 5	115 ± 2	93 ± 8	101 ± 8
TDS	97 ± 5	99 ± 4	105 ± 5	92 ± 5	100 ± 8
BZ4	95 ± 6	97 ± 5	103 ± 6	99 ± 5	92 ± 5

Muestra 1: Playa Santa Ponsa (Mallorca, España)

Muestra 2: Playa Pinedo (Valencia, España)

Muestra 3: Playa Patacona (Valencia, España)

Muestra 4: Río Túria (Valencia, España)

Muestra 5: Piscina de Almudaina (Alicante, España)

- Valores entre **91 y 115 %**, **92 y 99 %** y **90 y 101 %**, respectivamente, indican que la matriz no afecta de forma significativa
- **MÉTODO DE CALIBRACIÓN:** Calibración externa. Los patrones de calibración se preparan y se extraen empleando el método SBSDE en las mismas condiciones que las muestras

CONCLUSIONES

- Se ha desarrollado un método analítico, basado en SBS/DME, para la determinación de cuatro filtros UV con fuerte carácter hidrofílico en muestras de agua de origen medioambiental
- Como medio de extracción se utiliza un composite formado por nanopartículas magnéticas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@SiO_2$ incrustadas en una red polimérica de nylon 6
- Se ha aplicado satisfactoriamente a cinco muestras reales en términos de repetibilidad, exactitud y linealidad, obteniéndose además altos factores de preconcentración
- Se trata de un método analítico simple que no requiere de mucho tiempo para la fabricación de los composite, y respetuoso con el medio ambiente y con el operario, ya que se utilizan cantidades pequeñas de disolventes orgánicos

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido el desarrollo de nuevas estrategias analíticas sensibles que permitan la extracción y determinación de compuestos orgánicos en muestras de agua de origen medioambiental. Con el fin de evaluar el potencial analítico de estas metodologías, se han aplicado a la determinación de filtros UV, compuestos de gran interés por su uso cada vez más extendido y por el impacto negativo que provocan en el medioambiente acuático. Esto ha provocado que estos ingredientes se hayan catalogado como contaminantes emergentes, ya que llegan con relativa facilidad al medioambiente por diferentes vías, tanto directas como indirectas.

Se ha intentado, en la medida de lo posible, que estos métodos analíticos cumplan con las directrices de la denominada Química Verde, ya que se ha reducido el empleo de disolventes orgánicos de elevada toxicidad a cantidades de unos pocos microlitros.

Las aportaciones de las nuevas estrategias analíticas desarrolladas se indican a continuación:

Lixiviación mediante ultrasonidos previa a la microextracción líquido-líquido dispersiva

En el **Capítulo 3** se ha desarrollado un método analítico basado en el empleo de la denominada microextracción líquido-líquido dispersiva, con un tratamiento previo de ultrasonidos para la liberación de los analitos adsorbidos sobre las partículas en suspensión presentes en la muestra acuosa. Aplicando este método, es posible llevar a cabo la determinación del contenido total de filtros UV, es decir, tanto en la fracción soluble como en la materia particulada, fracción esta última a menudo obviada en estudios previos.

Es la primera vez que se determina el contenido total, obteniéndose resultados fiables que pueden ser válidos desde el punto de vista de la vigilancia medioambiental.

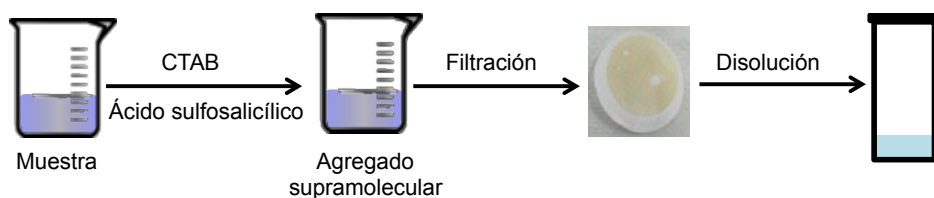
El método propuesto ha sido correctamente validado y se ha aplicado al análisis de tres muestras de agua de mar de diferente procedencia, obteniéndose concentraciones más elevadas cuando también se determinó el contenido en la materia particulada. El método también ha sido aplicado a la determinación de dos filtros UV en diferentes capas de muestras de agua de mar de la isla de Mallorca, así como a muestras tomadas a diferentes horas a lo largo del día. Los resultados mostraron que en la microcapa superficial y en el intervalo de horas de 14-18 h se obtienen las máximas concentraciones.

Microextracción sobre agregado formado *in situ*

En el **Capítulo 4** se ha presentado una nueva estrategia basada en la formación *in situ* de la fase de extracción, de modo que los analitos son atrapados durante la formación de dicha fase extractante en el seno de la muestra, a la que se ha denominado microextracción sobre agregado formado *in situ* (iSAME).

El método propuesto ha sido correctamente validado y se ha aplicado al análisis de seis muestras de diferente naturaleza.

La simplicidad del método propuesto, los cortos tiempos de análisis y el bajo coste asociado a su aplicación permiten que el método pueda aplicarse al análisis rutinario en un laboratorio.



Microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora

En el **Capítulo 5** se ha desarrollado una nueva técnica de microextracción que combina los principios de las denominadas microextracción por sorción sobre barra agitadora (SBSE) y microextracción dispersiva en fase

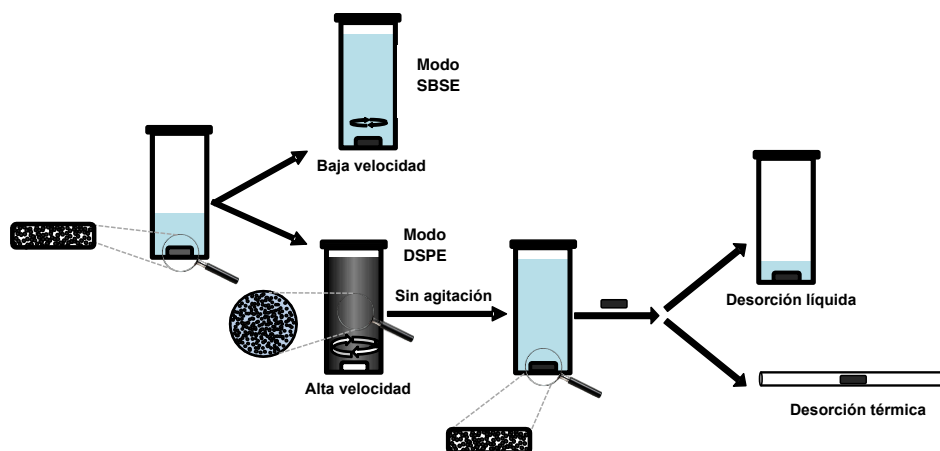
sólida (DSPE), empleando nanopartículas magnéticas como fase de extracción, en una única técnica. A esta nueva técnica se le ha denominado microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora (SBSDME).

Desde el punto de vista experimental, el método ofrece ventajas respecto a SBSE (menor tiempo de extracción y la posibilidad de elegir el recubrimiento sorbente más adecuado según el analito) y DSPE (extracción y post-extracción más sencilla, reduciendo la intervención manual y el uso de campos magnéticos externos adicionales).

Esta nueva estrategia se ha validado para la determinación de filtros UV en muestras de agua, empleando cromatografía de líquidos con detector UV/Vis.

En el **Capítulo 6** se ha acoplado SBSBME a la cromatografía de gases – espectrometría de masas, para lo que se ha empleado la desorción térmica como técnica de desorción, de manera que se evitan etapas de evaporación y posterior reconstitución, a la vez que se introduce toda la cantidad de analito extraído, con el consiguiente aumento en la sensibilidad.

Esta novedosa técnica de microextracción también se ha aplicado satisfactoriamente para la extracción y determinación de filtros UV hidrofílicos en muestras de agua de origen medioambiental de diferente naturaleza, empleando composites de nylon 6 y nanopartículas magnéticas como fase de extracción (**Capítulo 7**).



FINAL CONCLUSIONS

FINAL CONCLUSIONS

The aim of this PhD thesis has been the development of new sensitive analytical strategies for the extraction and determination of organic compounds in environmental water samples. As proof-of-concept, these methodologies have been applied for the determination of UV filters. These compounds are of great interest due to its increasingly widespread use and the harmful effects caused in the aquatic environment. Moreover, these ingredients have been cataloged as emergent contaminants since they have reached the aquatic environment by direct and/or indirect sources.

As far as possible, the principles of Green Chemistry have been followed. In this sense, the use of highly toxic organic solvents has been minimized to only a few microliters.

The contributions of the developed analytical methods are:

Lixiviation by ultrasounds treatment followed by dispersive liquid-liquid microextraction

An analytical method based on dispersive liquid-liquid microextraction technique, with a previous ultrasounds treatment for the release of the adsorbed analytes onto the particulate fraction, has been developed in **Chapter 3**. In this way, the total content (i.e. not only in the soluble fraction but also in the particulate one) is determined.

This is the first time that the total content of the UV filters has been determined, thus obtaining reliable results from an environmental point of view, that would not be possible if particulate fraction was ignored.

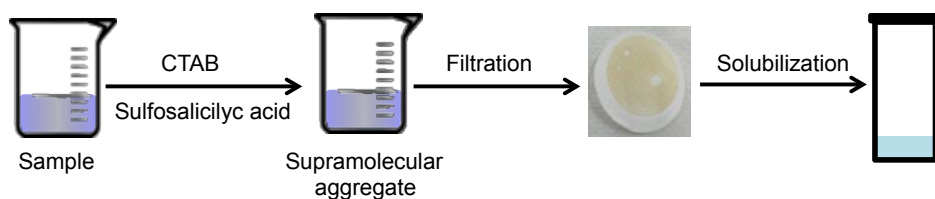
The proposed method was successfully validated and applied to the analysis of three seawater samples. The found concentrations were higher when particulate fraction was also determined. The method was also adapted and applied to determine two UV filters in different sub-layers of seawater samples sampled at different hours throughout a day within the framework of an environmental study carried out in Majorca Island. The highest concentrations were found in the surface microlayer at 2-6 pm range.

In-situ suspended aggregate microextraction

A new approach based on the formation of the extractant phase in-situ in the sample so the analytes are collected during the formation of the extractant phase is presented for the first time in **Chapter 4**. This approach has been labeled as in-situ suspended aggregate microextraction (iSAME).

The proposed method has been successfully validated and applied to the analysis of six natural waters of different matrix composition.

The method offers many advantages to sample preparation including simplicity, rapid analysis time, cost-effectiveness. These features render the method ideal for routine use in a lab.



Microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora

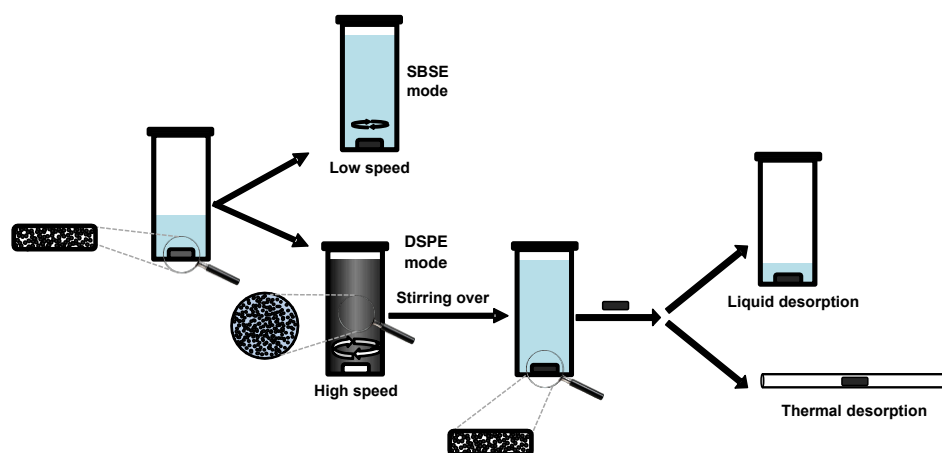
A novel microextraction technique that combines the principles of stir bar sorptive extraction (SBSE) and dispersive solid-phase extraction (DSPE), into a single method is presented in **Chapter 5**. This new method, termed stir bar sorptive-dispersive microextraction (SBSDME), is mediated by the use of magnetic nanoparticles as extractant phase.

From the experimental viewpoint, the method affords a series of advantages to both SBSE (lower extraction time and the ability to select the most suitable sorbent coatings for each particular type of application) and DSPE (easier extraction and post-extraction treatment, reducing the manual intervention and the use of external magnetic fields).

This method has been validated and applied to the determination of UV filters in water samples, and liquid chromatography-UV/Vis detection was used as analytical technique.

In **Chapter 6**, SBSDME has been combined with thermal desorption coupled to gas chromatography-mass spectrometry analysis, as an effective and solvent-free desorption step. Thus, this new methodology does not require solvent evaporation and reconstitution steps since enables direct insertion of the entire quantity of the extracted analytes and thus achieving a higher sensitivity.

This novel microextraction technique has been also successfully applied to the extraction and determination of highly hydrophilic UV filters in environmental water samples by using magnetic nanoparticles-nylon 6 composites as extractant phase (**Chapter 7**).



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Smith RM (2003) Before the injection – modern methods of sample preparation for separation techniques, *J. Chromatogr. A* 1000, 3-27
- [2] Cela R, Lorenzo R, Casais C (2002) En: *Técnicas de separación en química analítica*, Ed. Síntesis S.A.
- [3] Nerín C, Salafranca J, Aznar M, Batlle R (2009) Critical review on recent developments in solventless techniques for extraction of analytes, *Anal. Bioanal. Chem.* 393, 809-833
- [4] Costa R (2014) Newly introduced sample preparation techniques: Towards miniaturization, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 44, 299-310
- [5] Pena-Pereira F (2014) From conventional to miniaturized analytical systems. En: Pena-Pereira F (eds.) *Miniaturization in sample preparation*, De Gruyter Open, Warsaw/Berlin
- [6] Ramos L (2012) Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques, *J. Chromatogr. A* 1221, 84-98
- [7] Arthur C, Pawliszyn J (1990) Solid-phase microextraction with thermal-desorption using fused-silica optical fibers, *Anal. Chem.* 62, 2145-2148
- [8] Turiel E, Tadeo J, Martín-Esteban (2007) Molecularly imprinted polymeric fibers for solid-phase microextraction, *Anal. Chem.* 79, 3099-3104
- [9] Lü J, Liu J, Wei Y, Jiang K, Fan S, Liu J, Jiang G (2007) Preparation of single-walled carbon nanotube fiber coating for solid-phase microextraction of organochlorine pesticides in lake water and wastewater, *J. Sep. Sci.* 30, 2138-2143
- [10] Baltussen E, Sandra P, David F, Cramers CA (1999) Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles, *J. Microcol. Sep.* 11, 737-747
- [11] David F, Sandra P (2007) Stir bar sorptive extraction for trace analysis, *J. Chromatogr. A* 1152, 54-69

- [12] Nogueira JMF (2012) Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: a review on SBSE and related techniques, *Anal. Chim. Acta* 757, 1-10
- [13] Camino-Sánchez FJ, Rodríguez-Gómez R, Zafra-Gómez A, Santos-Fandila A, Vílchez JL (2014) Stir bar sorptive extraction: Recent applications, limitations and future trends, *Talanta*, 130, 388-399
- [14] Roldán-Pijuán M, Alcudia-León MC, Lucena R, Cárdenas S, Valcárcel M (2012) Stir frit microextraction: An approach for the determination of volatile compounds in water by headspace-gas chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1251, 10-15
- [15] Neng NR, Silva ARM, Nogueira JMF (2010) Adsorptive microextraction techniques-novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media, *J. Chromatogr. A* 1217, 7303-7310
- [16] Almeida C, Nogueira JMF (2012) Comparison of the selectivity of different sorbent phases for bar adsorptive microextraction-application to trace level analysis of fungicides in real matrices, *J. Chromatogr. A* 1265, 7-16
- [17] Abdel-Rehim M (2004) New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 801, 317-321
- [18] Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ (2003) Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce, *J. AOAC Int.* 86, 412-431
- [19] González-Curbelo MA, Herrera-Herrera AV, Hernández-Borges J, Rodríguez-Delgado MA (2013) Analysis of pesticides residues in environmental water samples using multiwalled carbon nanotubes dispersive solid-phase extraction, *J. Sep. Sci.* 36, 556-563
- [20] Wu X, Hong H, Liu X, Guan W, Meng L, Ye Y, Ma Y (2013) Graphene-dispersive solid-phase extraction of phthalate acid esters from environmental water, *Sci. Total Environ.* 444, 224-230

- [21] Aguilar-Arteaga K, Rodríguez JA, Barrado E (2010) Magnetic solids in analytical chemistry: a review, *Anal. Chim. Acta* 674, 157-165
- [22] Giakisikli G, Anthemidis AN (2013) Magnetic materials as sorbents for metal/metalloid preconcentration and/or separation. A review, *Anal. Chim. Acta* 789, 1-16
Psillakis E, Kalogerakis N (2003) Developments in liquid-phase microextraction, *Trends Anal. Chem.* 22, 565-574
- [23] de Dios AS, Díaz-García ME (2010) Multifunctional nanoparticles: analytical prospects, *Anal. Chim. Acta* 666, 1-22
- [24] Horák D, Babic M, Macková H, Benes MJ (2007) Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations, *J. Sep. Sci.* 30, 1751-1772
- [25] Ballesteros-Gómez A, Rubio S (2009) Hemimicelles of alkyl carboxylates chemisorbed onto magnetic nanoparticles: Study and application to the extraction of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples, *Anal. Chem.* 81, 9012-9020
- [26] Mahouche-Chergui S, Guerrouache M, Carbonnier B, Chehimi MM (2013) Polymer-immobilized nanoparticles, *Colloid. Surface. A* 439, 43-68
- [27] Reyes-Gallardo EM, Lucena R, Cárdenas S, Valcárcel M (2014) Magnetic nanoparticles-nylon 6 composite for the dispersive micro solid phase extraction of selected polycyclic aromatic hydrocarbons from water samples, *J. Chromatogr. A* 1345, 43-49
- [28] Reyes-Gallardo EM, Lasarte-Aragonés G, Lucena R, Cárdenas S, Valcárcel M (2013) Hybridization of commercial polymeric microparticles and magnetic nanoparticles for the dispersive micro-solid phase extraction of nitroaromatic hydrocarbons from water, *J. Chromatogr. A* 1271, 50-55
- [29] Tang S, Lee HK (2013) Application of dissolvable layered double hydroxides as sorbent in dispersive solid-phase extraction and extraction by co-precipitation for the determination of aromatic acid anions, *Anal. Chem.* 85, 7426-7433
- [30] Psillakis E, Kalogerakis N (2003) Developments in liquid-phase microextraction, *Trends. Anal. Chem.* 22, 565-574

- [31] Sarafraz-Yazdi A, Amiri A (2010) Liquid-phase microextraction, *Trends Anal. Chem.* 29, 1-14
- [32] Chisvert A (2012) The large tentacles of liquid-phase microextraction, *J. Chromatogr. Sep. Tech.* 3, 3-7
- [33] Jeannot M, Cantwell (1996) Solvent microextraction into a single drop, *Anal. Chem.* 68, 2236-2240
- [34] He Y, Lee H (1997) Liquid-phase microextraction in a single drop of organic solvent by using a conventional microsyringe, *Anal. Chem.* 69, 4634-4640
- [35] Psillakis E, Kalogerakis N (2002) Developments in single-drop microextraction, *Trends Anal. Chem.* 21, 53-63
- [36] Liu JF, Jiang GB, Chi YG, Cai YQ, Zhou QX, Hu JT (2003) Use of ionic liquids for liquid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Anal. Chem.* 75, 5870-5876
- [37] Seddon K, Stark A, Torres MJ (2000) Influence of chloride, water, and organic solvents on the physical properties of ionic liquids, *Pure Appl. Chem.* 72, 2275-2287
- [38] Zhao H, Xia S, Ma P (2005) Use of ionic liquids as “green” solvents for extractions, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80, 1089-1096
- [39] Aguilera-Herrador E, Lucena R, Cárdenas S, Valcárcel M (2008) Direct coupling of ionic liquid based single-drop microextraction and GC/MS, *Anal. Chem.* 80, 793-800
- [40] Chisvert A, Román IP, Vidal L, Canals A (2009) Simple and commercial readily-available approach for the direct use of ionic liquid-based single-drop microextraction prior to gas chromatography: Determination of chlorobenzenes in real water samples as model analytical application, *J. Chromatogr. A* 1216, 1290-1295
- [41] Zhao F, Lu S, Du W, Zeng B (2009) Ionic liquid-based headspace single-drop microextraction coupled to gas chromatography for the determination of chlorobenzene derivatives, *Microchim. Acta* 165, 29-33
- [42] Vallecillos L, Pocurull E, Borrull F (2012) Fully automated ionic liquid-based headspace single drop microextraction coupled to GC–MS/MS

- to determine musk fragrances in environmental water samples, *Talanta* 99, 824-832
- [43] Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE (1999) Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 71, 2650-2656
- [44] Rasmussen K, Pedersen-Bjergaard S (2004) Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction, *Trends Anal. Chem.* 23, 1-10
- [45] Hauser B, Popp P, Kleine-Benne E (2002) Membrane-assisted solvent extraction of triazines and other semi-volatile contaminants directly coupled to large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. A* 963, 27-36
- [46] Jönsson JA, Mathiasson L (2000) Membrane-based techniques for simple enrichment, *J. Chromatogr. A* 902, 205-225
- [47] March JG, Palou J, Chisvert A, Salvador A (2009) A simple novel configuration for in-vial microporous membrane liquid-liquid extraction, *J. Chromatogr. A* 1216, 5160-5163
- [48] Pedrón I, Chisvert A, March JG, Salvador A, Benedé JL (2011) Development of a new three-phase membrane-assisted liquid-phase microextraction method: determination of nitrite in tap water samples as model analytical application, *Anal. Bioanal. Chem.* 400, 595-601
- [49] Alcudia-León MC, Lucena R, Cárdenas S, Valcárcel M (2009) Stir membrane extraction: A useful approach for liquid sample pretreatment, *Anal. Chem.* 81, 8957-8961
- [50] Alcudia-León MC, Lucena R, Cárdenas S, Valcárcel M (2011) Stir membrane liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A* 1218, 869-874
- [51] Alcudia-León MC, Lucena R, Cárdenas S, Valcárcel M (2011) Determination of phenols in waters by stir membrane liquid-liquid-liquid microextraction coupled to liquid chromatography with ultraviolet detection, *J. Chromatogr. A* 1218, 2176-2181

- [52] Rezaee M, Assadi Y, Milani Hosseini M, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S (2006) Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A* 1116, 1-9
- [53] Rezaee M, Yamini Y, Faraji M (2010) Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method, *J. Chromatogr. A* 1217, 2342-2357
- [54] Zgola-Grzeskowiak A, Grzeskowiak T (2011) Dispersive liquid-liquid microextraction, *TRAC Trends Anal. Chem.* 30, 1382-1399
- [55] Yiantzi E, Psillakis E, Tyrovola K, Kalogerakis N (2010) Vortex-assisted liquid-liquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol-A, *Talanta* 80, 2057-2062
- [56] Hashemi P, Raeisi F, Ghiasvand AR, Rahimi A (2010) Reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction with central composite design optimization for preconcentration and HPLC determination of oleuropein, *Talanta* 80, 1926-1931
- [57] Zhou Q, Bai H, Xie G, Xiao J (2008) Temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid phase micro-extraction, *J. Chromatogr. A* 1177, 43-4
- [58] Baghdadi M, Shemirani F (2009) In situ solvent formation microextraction based on ionic liquids: a novel sample preparation technique for determination of inorganic species in saline solutions, *Anal. Chim. Acta* 634, 186-191
- [59] Ballesteros-Gómez A, Rubio S, Pérez-Bendito D (2009) Potential of supramolecular solvents for the extraction of contaminants in liquid foods, *J. Chromatogr. A* 1216, 530-539
- [60] Ballesteros-Gómez A, Sicilia MD, Rubio S (2010) Supramolecular solvents in the extraction of organic compounds. A review, *Anal. Chim. Acta* 677, 108-130
- [61] Watanabe H, Tanka H (1978) Nonionic surfactant as a new solvent for liquid-liquid-extraction of Zinc(II) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol, *Talanta* 25, 585-589
- [62] Xie S, Paa MC, Li CF, Xiao D, Choi MMF (2010) Separation and preconcentration of persistent organic pollutants by cloud point extraction, *J. Chromatogr. A* 1217, 2306-2317

- [63] Lu Y, Lin Q, Luo G, Dai Y (2006) Directly suspended droplet microextraction, *Anal. Chim. Acta* 566, 259-264
- [64] Zanjani MRK, Yamini Y, Shariati S, Jönsson JA (2007) A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop, *Anal. Chim. Acta* 585, 286-293
- [65] Chisvert A (2003) Desarrollo de métodos analíticos para el control de filtros UV de naturaleza orgánica en productos cosméticos para la protección solar. Departamento de Química Analítica, Universidad de Valencia, Valencia
- [66] Grant WB (2003) Health benefits of solar UV-B radiation through the production of vitamin D – Comment. *Photochem, Photobiol. Sci.* 2, 1307-1308
- [67] Osmancevic A, Landin-Wilhelmsen K, Larkö O, Krogstad AL (2010) Vitamin D status in psoriasis patients during different treatments with phototherapy, *J. Photoch. Photobio. B*, 101, 117-123
- [68] Meunier L, Raison-Peyron N, Meynadier J (1998) UV-induced immunosuppression and skin cancers, *Rev. Med. Interne* 19, 247-254
- [69] Owens DM, Watt FM (2003) Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours, *Nat. Rev. Cancer* 3, 444-451
- [70] Gaspar LR, Campos PMBG (2007) Photostability and efficacy studies of topical formulations containing UV-filters combination and vitamins A, C and E, *Int. Pharm.* 343, 181-189
- [71] Chisvert A, Salvador A (2007) UV filters in sunscreens and other cosmetics. Regulatory aspects and analytical methods. En: Salvador A, Chisvert A (eds). *Analysis of Cosmetics Products*, Elsevier, Amsterdam, pág. 83-120
- [72] Osterwalder U, Sohn M, Herzog B (2014) Global state of sunscreens, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 30, 62-80
- [73] Reglamento (CE) No. 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de Noviembre de 2009 sobre los productos cosméticos

- [74] Farah K. Ahmed (2008) Worldwide regulation of UV filters: Current status and future trends, pág. 65-82. En: Clinical Guide to Sunscreens and Photoprotection, Informa Healthcare
- [75] Salvador A, Chisvert, A (2005) Sunscreen analysis: A critical survey on UV filters determination, Anal. Chim. Acta 537, 1-14
- [76] Gackowska A, Przybytek M, Studzinski W, Gaca J (2014) Experimental and theoretical studies on the photodegradation of 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate in the presence of reactive oxygen and chlorine species, Cent. Eur. J. Chem. 12, 612-623
- [77] Tarazona I (2015) Desarrollo de métodos analíticos para la determinación de filtros UV: de los productos cosméticos al cuerpo humano y al medio ambiente. Departamento de Química Analítica, Universidad de Valencia, Valencia
- [78] Cosmetics - Analytical methods - LC-UV/vis method for the identification and quantitative determination in cosmetic products of the 22 organic UV filters in use in the EU, CEN/TC 392/WG 1, *en prensa*
- [79] Giokas DL, Salvador A, Chisvert A (2007) UV filters: From sunscreens to human body and the environment, Trends Anal. Chem. 26, 360-374
- [80] León-González Z (2012) Desarrollo de métodos analíticos para el estudio de procesos derivados de la absorción percutánea de los filtros UV contenidos en los productos cosméticos para la protección solar. Departamento de Química Analítica, Universidad de Valencia, Valencia
- [81] Chisvert A, León-González Z, Tarazona I, Salvador A, Giokas DL (2012) An overview of the analytical methods for the determination of organic ultraviolet filters in biological fluids and tissues, Anal. Chim. Acta 752, 11-29
- [82] Jeon HK, Sarma SN, Kim YJ, Ryu JC (2008) Toxicokinetics and metabolisms of benzophenone-type UV filters in rats, Toxicology 248, 89-95

- [83] Okereke CS, Kadry AM, Abdel-Rahman MS, Davis RA, Friedman MA (1993) Metabolism of benzophenone-3 in rats, *Drug. Metab. Dispos.* 21, 788-791
- [84] Völkel W, Colnot T, Schauer UMD, Broschard TH, Dekant W (2006) Toxicokinetics and biotransformation of 3-(4-methylbenzylidene)camphor in rats after oral administration, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 216, 331-338
- [85] Hany J, Nagel R (1995) Determination of sunscreen agents in human breast-milk, *Dtsch. Lebensm. Rundsh.* 91, 341-345
- [86] Ye X, Bishop AM, Needham LL, Calafat AM (2008) Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method with peak focusing for measuring parabens, triclosan and other environmental phenols in human milk, *Anal. Chim. Acta* 622, 150-156
- [87] León Z, Chisvert A, Tarazona I, Salvador A (2010) Solid-phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry analytical method for the determination of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone and its metabolites in both human urine and semen, *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 831-843
- [88] León-González Z, Ferreiro-Vera C, Priego-Capote F, Luque de Castro MD (2011) Bioaccumulation assessment of the sunscreen agent 2-ethylhexyl 4-(N,N-dimethylamino)benzoate in human semen by automated online SPE-LC-MS/MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 401, 1003-1011
- [89] Vela-Soria F, Rodriguez I, Ballesteros O, Zafra-Gomez A, Ballesteros L, Cela R, Navalon A (2014) Simplified matrix solid phase dispersion procedure for the determination of parabens and benzophenone-ultraviolet filters in human placental tissue samples, *J. Chromatogr. A* 1371, 39-47
- [90] León Z, de Vlieger J, Chisvert A, Salvador A, Lingeman H, Irth H, Giera M (2010) Identification of the biotransformation products of 2-ethylhexyl 4-(N,N-dimethylamino)benzoate, *Chromatographia* 71, 55-63

- [91] Darvay A, White IR, Rycroft RJ, Jones AB, Hawk JL, McFadden JP (2001) Photoallergic contact dermatitis is uncommon, *Br. J. Dermatol.* 145, 597-601
- [92] Maier T, Korting HC (2005) Sunscreens - Which and what for?, *Skin Pharmacol. Pysiol.* 18, 253-262
- [93] Ma RS, Cotton B, Lichtensteiger W, Schlumpf M (2003) UV filters with antagonistic action at androgen receptors in the MDA-kb2 cell transcriptional-activation assay, *Toxicol. Sci.* 74, 43-50
- [94] Wielogórska E, Elliot CT, Danaher M, Connolly L (2015) Endocrine disruptor activity of multiple environmental food chain contaminants, *Toxicol. In Vitro* 29, 211-220
- [95] Schlumpf M, Schmid P, Durrer S, Conscience M, Maerkel K, Henseler M, Gruetter M, Herzog I, Reolon S, Ceccatellia R, Faass O, Stutz E, Jarry H, Wuttke W, Lichtensteiger W (2004) Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters - an update, *Toxicology* 205, 113-122
- [96] Díaz-Cruz MS, Barceló D (2009) Chemical analysis and ecotoxicological effects of organic UV-absorbing compounds in aquatic ecosystems, *Trends Anal. Chem.* 28, 708-717
- [97] Balmer ME, Buser HR, Müller MD, Poiger T (2005) Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters and in fish from Swiss lakes, *Environ. Sci. Technol.* 39, 953-962
- [98] Chisvert A, Salvador A (2014) Analytical methodologies for the determination of personal care products in water samples. En: Díaz-Cruz MS, Barceló D (eds). *Personal care products in the aquatic environment*, Springer, Berlin
- [99] Ramos S, Homem V, Alves A, Santos L (2015) Advances in analytical methods and occurrence of organic UV-filters in the environment – A review, *Sci. Total Environm.* 526, 278-311
- [100] Plagellat C, Kupper T, Furrer R, de Alencastro LF, Grandjean D, Tarradellas J (2006) Concentrations and specific loads of UV filters in sewage sludge originating from a monitoring network in Switzerland, *Chemosphere* 62, 915-925

- [101] Zhang Z, Ren N, Li YF, Kunisue T, Gao D, Kannan K (2011) Determination of benzotriazole and benzophenone UV filters in sediment and sewage sludge, *Environm. Sci. Tech.* 45, 3909-3916
- [102] Tarazona I, Chisvert A, Salvador A (2014) Development of a gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of ultraviolet filters in beach sand samples, *Anal. Methods* 6, 7772-7780
- [103] Fent K, Zenker A, Rapp M (2010) Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland, *Environm. Pol.*
- [104] Bachelot M, Li Z, Munaron D, Le Gall P, Casellas C, Fenet H, Gomez E (2012) Organic UV filter concentrations in marine mussels from French coastal regions, *Sci. Total. Environm.* 420, 273-279
- [105] Kunz PY, Galicia HF, Fent K (2006) Comparison of in vitro and in vivo estrogenic activity of UV filters in fish, *Toxicol. Sci.* 90, 349-361
- [106] Weisbrod CJ, Kung PY, Zenker AK, Fent K (2007) Effects of the UV filter benzophenone-2 on reproduction in fish, *Toxicol. Appl. Pharm.* 225, 255-266
- [107] Coronado M, de Haro H, Deng X, Rempel MA, Lavado R, Schlenk D (2008) Estrogenic activity and reproductive effects of the UV-filter oxybenzone (2-hydroxy-4-methoxyphenyl-methanone) in fish, *Aquat. Toxicol.* 90, 182-187
- [108] Krause M, Klit A, Blomberg M, Soeborg T, Frederiksen H, Schlumpf M, Lichtensteiger W, Skakkebaek NE, Drzewiecki KT (2012) Sunscreens: are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters, *Int. J. Androl.* 35, 424-436
- [109] Gago-Ferrero P, Díaz-Cruz MS, Barceló D (2012) An overview of UV-absorbing compounds (organic UV-filters) in aquatic biota, *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 2597-2610
- [110] Hanson KM, Gratton E, Bardeen CJ (2006) Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin, *Free Radic. Biol. Med.* 41, 1205-1212

- [111] Lesser MP (2006) Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology, *Annu. Rev. Physiol.* 68, 253-278
- [112] Richardson SD, Ternes TA (2005) Water analysis: Emerging contaminants and current issues, *Anal. Chem.* 77, 3807-3838
- [113] Gago-Ferrero P, Díaz-Cruz MS, Barceló D (2013) Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the multi-residue analysis of organic UV-Filters and their transformation products in the aquatic environment, *Anal. Methods* 5, 355-366
- [114] Lambropoulou DA, Giokas DL, Sakkas VA, Albanis TA, Karayannis MI (2002) Gas chromatographic determination of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone and octyldimethyl-p-aminobenzoic acid sunscreen agents in swimming pool and bathing waters by solid-phase microextraction, *J. Chromatogr. A* 967, 243-253
- [115] Giokas DL, Sakkas VA, Albanis TA (2004) Determination of residues of UV filters in natural waters by solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-photodiode array detection and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1026, 289-293
- [116] Giokas DL, Sakkas VA, Albanis TA, Lampropoulou DA (2005) Determination of UV-filter residues in bathing waters by liquid chromatography UV-diode array and gas chromatography-mass spectrometry after micelle mediated extraction-solvent back extraction, *J. Chromatogr. A* 1077, 19-27
- [117] Kawaguchi M, Ito R, Endo N, Sakui N, Okanouchi N, Saito K, Sato N, Shiozaki T, Nakazawa H (2006) Stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for trace analysis of benzophenone and its derivatives in water sample, *Anal. Chim. Acta* 557, 272-277
- [118] Jeon H-K, Chung Y, Ryu J-C (2006) Simultaneous determination of benzophenone-type UV filters in water and soil by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1131, 192-202
- [119] Cuderman P, Heath E (2007) Determination of UV filters and antimicrobial agents in environmental water samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1343-1350

- [120] Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ (2008) Multiresidue methods for the analysis of pharmaceuticals, personal care products and illicit drugs in surface water and wastewater by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 1293-1308
- [121] Okanouchi N, Honda H, Ito R, Kawaguchi M, Saito K, Nakazawa H (2008) Determination of benzophenones in river-water samples using drop-based liquid phase microextraction coupled with gas chromatography/mass spectrometry, *Anal. Sci.* 2008, 627-630
- [122] Kawaguchi M, Ito R, Honda H, Endo N, Okanouchi N, Saito K, Seto N, Nakazawa H (2006) Simultaneous analysis of benzophenone sunscreen compounds in water sample by stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1200, 260-263
- [123] Rodil R, Moeder M (2008) Development of a method for the determination of UV filters in water samples using stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1179, 81-88
- [124] Rodil R, Quintana JB, López-Mahía P, Muniategui-Lorenzo S, Prada-Rodríguez D (2008) Multiclass determination of sunscreen chemicals in water samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 80, 1307-1315
- [125] Rodil R, Quintana JB, López-Mahía P, Muniategui-Lorenzo S, Prada-Rodríguez D (2009) Multi-residue analytical method for the determination of emerging pollutants in water by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216, 2958-2969
- [126] Rodil R, Schrader S, Moeder M (2009) Comparison of atmospheric pressure photoionization and electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of UV filters, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23, 580-588
- [127] Negreira N, Rodríguez I, Ramil M, Rubí E, Cela R (2009) Sensitive determination of salicylate and benzophenone type UV filters in water samples using solid-phase microextraction, derivatization and gas

- chromatography tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 638, 36-44
- [128] Rodil M, Schrader S, Moeder M (2009) Non-porous membrane-assisted liquid-liquid extraction of UV filter compounds from water samples, *J. Chromatogr. A* 1216, 4887-4894
- [129] Pedrouzo M, Borrull F, Marcé RM, Pocurull E (2009) Ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determining the presence of eleven personal care products in surface and wastewaters, *J. Chromatogr. A* 1216, 6994-7000
- [130] Negreira N, Rodríguez I, Ramil M, Rubí E, Cela R (2009) Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of hydroxylated benzophenone UV absorbers in environmental water samples, *Anal. Chim. Acta* 654, 162-170
- [131] Gómez MJ, Gómez-Ramos MM, Agüera A, Mezcua M, Herrera S, Fernández-Alba AR (2009) A new gas chromatography/mass spectrometry method for the simultaneous analysis of target and non-target organic contaminants in waters, *J. Chromatogr. A* 1216, 4071-4082
- [132] Pietrogrande MC, Basaglia G, Dondi F (2009) Signal processing to evaluate parameters affecting SPE for multi-residue analysis of personal care products, *J. Sep. Sci.* 32, 1249-1261
- [133] Haunschmidt M, Klampfl CW, Buchberger W, Hertsens R (2010) Determination of organic UV filters in water by stir bar sorptive extraction and direct analysis in real-time mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 269-275
- [134] Vidal L, Chisvert A, Canals A, Salvador A (2010) Ionic liquid-based single-drop microextraction followed by liquid chromatography-ultraviolet spectrophotometry detection to determine typical UV filters in surface water samples, *Talanta* 81, 549-555
- [135] Wick A, Fink G, Ternes TA (2010) Comparison of electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization for multi-residue analysis of biocides, UV-filters and benzothiazoles in

- aqueous matrices and activated sludge by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217, 2088-2103
- [136] Moeder M, Schrader S, Winkler U, Rodil R (2010) At-line microextraction by packed sorbent-gas chromatography-mass spectrometry for the determination of UV filter and polycyclic musk compounds in water samples, *J. Chromatogr. A* 1217, 2925-2932
- [137] Pedrouzo M, Borrull F, Marcé RM, Pocurull E (2010) Stir-bar-sorptive extraction and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous analysis of UV filters and antimicrobial agents in water samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 2833-2839
- [138] Oliveira HM, Segundo MA, Lima JLFC, Miró M, Cerdá V (2010) On-line renewable solid-phase extraction hyphenated to liquid chromatography for the determination of UV filters using bead injection and multisyringe-lab-on-valve approach, *J. Chromatogr. A* 1217, 3575-3582
- [139] Tarazona I, Chisvert A, León Z, Salvador A (2010) Determination of hydroxylated benzophenone UV filters in sea water samples by dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217, 4771-4778
- [140] Negreira N, Rodríguez I, Rubí E, Cela R (2010) Dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for the rapid and sensitive determination of UV filters in environmental water samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 995-1004
- [141] Liu H, Liu L, Xiong Y, Yang X, Luan T (2010) Simultaneous determination of UV filters and polycyclic musks in aqueous samples by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217, 6747-6753
- [142] Matamoros V, Jover E, Bayona JM (2010) Part-per-trillion determination of pharmaceuticals, pesticides, and related organic contaminants in river water by solid-phase extraction followed by comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Chem.* 82, 699-706

- [143] Zhang P-P, Shi Z-G, Yu Q-W, Feng Y-Q (2011) A new device for magnetic stirring-assisted dispersive liquid-liquid microextraction of UV filters in environmental water samples, *Talanta* 83, 1711-1715
- [144] Negreira N, Rodríguez I, Rubí E, Cela R (2011) Silicone discs as disposable enrichment probes for gas chromatography-mass spectrometry determination of UV filters in water samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 400, 603-611
- [145] Román IP, Chisvert A, Canals A (2011) Dispersive solid-phase extraction based on oleic acid-coated magnetic nanoparticles followed by gas chromatography-mass spectrometry for UV-filter determination in water samples, *J. Chromatogr. A* 1218, 2467-2475
- [146] Vosough M, Mojdehi NR (2011) Fast liquid chromatography-diode array detection assisted by chemometrics for quantification of seven ultraviolet filters in effluents wastewater, *Talanta* 85, 2175-2181
- [147] Nguyen KTN, Scapolla C, Di Carro M, Magi E (2011) Rapid and selective determination of UV filters in seawater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with stir bar sorptive extraction, *Talanta* 85, 2375-2384
- [148] Gómez MJ, Herrera S, Solé D, García-Calvo E, Fernández-Alba AR (2011) Automatic searching and evaluation of priority and emerging contaminants in wastewater and river water by stir bar sorptive extraction followed by comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Chem.* 83, 2638-2647
- [149] Bratkovics S, Sapozhnikova Y (2011) Determination of seven commonly used organic UV filters in fresh and saline waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Methods* 3, 2943-2950
- [150] Díaz-Cruz MS, Gago-Ferrero P, Llorca M, Barceló D (2012) Analysis of UV filters in tap water and other clean waters in Spain, *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 2325-2333
- [151] Ge D, Lee HK (2012) Ionic liquid based hollow fiber supported liquid phase microextraction of ultraviolet filters, *J. Chromatogr. A* 1229, 1-5

- [152] Basaglia G, Pietrogrande MC (2012) Optimization of a SPME/GC/MS method for the simultaneous determination of pharmaceuticals and personal care products in waters, *Chromatographia* 75, 361-370
- [153] Zhang H, Lee HK (2012) Simultaneous determination of ultraviolet filters in aqueous samples by plunger-in-needle solid-phase microextraction with graphene-based sol-gel coating as sorbent coupled with gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 742, 67-73
- [154] Zhang Y, Lee HK (2012) Ionic liquid-based ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed high-performance liquid chromatography for the determination of ultraviolet filters in environmental water samples, *Anal. Chim. Acta* 750, 120-126
- [155] Zhang Y, Lee HK (2012) Determination of ultraviolet filters in water samples by vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1249, 25-31
- [156] Ge D, Lee HK (2012) A new 1-hexyl-3-methylimidazolium tris(pentafluoroethyl)trifluorophosphate ionic liquid based ultrasound-assisted emulsification microextraction for the determination of organic ultraviolet filters in environmental water samples, *J. Chromatogr. A* 1251, 27-32
- [157] Magi E, Di Carro M, Scapolla C, Nguyen KTN (2012) Stir bar sorptive extraction and LC-MS/MS for trace analysis of UV filters in different water matrices, *Chromatographia* 75, 973-982
- [158] Magi E, Scapolla C, Di Carro M, Rivaro P, Nguyen KTN (2013) Emerging pollutants in aquatic environments: monitoring of UV filters in urban wastewater treatment plants, *Anal. Methods* 5, 428-433
- [159] Giokas DL, Zhu Q, Pan Q, Chisvert A (2012) Cloud point-dispersive u-solid phase extraction of hydrophobic organic compounds onto highly hydrophobic core-shell Fe₂O₃@C magnetic nanoparticles, *J. Chromatogr. A* 1251, 33-39
- [160] Gracia-Lor E, Martínez M, Sancho JV, Peñuela G, Hernández F (2012) Multi-class determination of personal care products and pharmaceuticals in environmental and wastewater samples by ultra-

- high performance liquid-chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta* 99, 1011-1023
- [161] Pintado-Herrera MG, González-Mazo E, Lara-Martín PA (2013) Environmentally friendly analysis of emerging contaminants by pressurized hot water extraction-stir bar sorptive extraction-derivatization and gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 401-411
- [162] Zhang Y, Lee HK (2013) Determination of ultraviolet filters in environmental water samples by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction, *J. Chromatogr. A* 1271, 56-61
- [163] Maijón I, Fontanals N, Borrull F, Neusüß C, Calull M, Aguilar C (2013) Determination of UV filters in river water samples by in-line SPE-CE-MS, *Electrophoresis* 34, 374-382
- [164] Zhang Y, Lee HK (2013) Liquid phase microextraction using knitting wool as the extractant phase holder before chromatographic analysis: a new approach for trace analysis, *J. Chromatogr. A* 1273, 12-17
- [165] Ku Y-C, Leong M-I, Wang W-T, Huang S-D (2013) Up-and-down shaker-assisted ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction of benzophenone-type ultraviolet filters, *J. Sep. Sci.* 36, 1470-1477
- [166] Gago-Ferrero P, Mastroianni N, Díaz-Cruz MS, Barceló D (2013) Fully automated determination of nine ultraviolet filters and transformation products in natural waters and wastewaters by on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1294, 106-116
- [167] Li J, Ma L, Tang M, Xu L (2013) C12-Ag wire as solid-phase microextraction fiber for determination of benzophenone ultraviolet filters in river water, *J. Chromatogr. A* 1298, 1-8
- [168] Wu J-W, Chen H-C, Ding W-H (2013) Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction plus simultaneous silylation for rapid determination of salicylate and benzophenone-type ultraviolet filters in aqueous samples, *J. Chromatogr. A* 1302, 20-27

- [169] Xue L-K, Ma W-M, Zhang D-X, Du X-Z (2013) Ultrasound-assisted liquid-liquid microextraction based on an ionic liquid for preconcentration and determination of UV filters in environmental water samples, *Anal. Methods* 5, 4213-4219
- [170] Almeida C, Stepkowska A, Alegre A, Nogueira JMF (2013) Determination of trace levels of benzophenone-type ultra-violet filters in real matrices by bar adsorptive micro-extraction using selective sorbent phases, *J. Chromatogr. A* 1311, 1-10
- [171] Da Silva CP, Emídio ES, de Marchi MRR (2013) UV filters in water samples: experimental design on the SPE optimization followed by GC-MS/MS analysis, *J. Braz. Chem. Soc.* 24, 1433-1441
- [172] Caldas SS, Bolzan CM, Guilherme JR, Silveira MAK, Escarrone ALV, Primel EG (2013) Determination of pharmaceuticals, personal care products, and pesticides in surface and treated waters: method development and survey, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 5855-5863
- [173] Gilart N, Miralles N, Marcé RM, Borrull F, Fontanals N (2013) Novel coatings for stir bar sorptive extraction to determine pharmaceuticals and personal care products in environmental waters by liquid chromatography and tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 774, 51-60
- [174] Benedé JL, Chisvert A, Salvador A, Sánchez-Quiles, Tovar-Sánchez A (2014) Determination of UV filters in both soluble and particulate fractions of seawaters by dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 812, 50-58
- [175] Kotnik K, Kosjek T, Krajnc U, Heath E (2014) Trace analysis of benzophenone-derived compounds in surface waters and sediments using solid-phase extraction and microwave-assisted extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 3179-3190
- [176] Pintado-Herrera MG, González-Mazo E, Lara-Martín PA (2014) Atmospheric pressure gas chromatography-time-of-flight-mass spectrometry (APGC-ToF-MS) for the determination of regulated and emerging contaminants in aqueous samples after stir bar sorptive extraction (SBSE), *Anal. Chim. Acta* 851, 1-13

- [177] Li J, Xu L, Yu Q-W, Shi Z-G, Zhang T, Liu Y (2014) Construction of a portable sample preparation device with a magnetic poly(methacrylic acid-co-ethylene dimethacrylate) monolith as the extraction medium and its application in the enrichment of UV filters in water samples, *J. Sep. Sci.* 37, 2732-2737
- [178] Capriotti AL, Cavaliere C, Piovesana S, Samperi R, Stampachiacchiere S, Ventura S, Laganà A (2014) Multiresidue determination of UV filters in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry analysis, *J. Sep. Sci.* 37, 2882-2891
- [179] Purrà M, Cinca R, Legaz J, Núñez O (2014) Solid-phase extraction and field-amplified sample injection-capillary zone electrophoresis for the analysis of benzophenone UV filters in environmental water samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 6189-6202
- [180] Benedé JL, Chisvert A, Giokas DL, Salvador A (2014) Development of stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles and its analytical application to the determination of hydrophobic organic compounds in aqueous media, *J. Chromatogr. A* 1362, 25-33
- [181] Li Y, Yang Y, Liu H, Wang X, Du X (2014) Fabrication of a novel Ti-TiO₂-ZrO₂ fiber for solid-phase microextraction followed by high-performance liquid chromatography for sensitive determination of UV filters in environmental water samples, *Anal. Methods* 6, 8519-8525
- [182] Pereira-da Silva C, Soares-Emídio E, Rodrigues-de Marchi MR (2015) Method validation using weighted linear regression models for quantification of UV filters in water samples, *Talanta* 131, 221-227
- [183] Benedé JL, Giokas DL, Chisvert A, Salvador A (2015) In-situ suspended aggregate microextraction: A sample preparation approach for the enrichment of organic compounds in aqueous solutions, *J. Chromatogr. A* 1408, 63-71
- [184] Chung W-H, Tzing S-H, Ding W-H (2015) Optimization of dispersive micro solid-phase extraction for the rapid determination of benzophenone-type ultraviolet absorbers in aqueous samples, *J. Chromatogr. A* 1411, 17-22

- [185] Cunha SC, Pena A, Fernandes JO (2015) Dispersive liquid-liquid microextraction followed by microwave-assisted silylation and gas chromatography-mass spectrometry analysis for simultaneous trace quantification of bisphenol A and 13 ultraviolet filters in wastewaters, *J. Chromatogr. A* 1414, 10-21
- [186] Benedé JL, Chisvert A, Giokas DL, Salvador A (2016) Determination of ultraviolet filters in bathing waters by stir bar sorptive-dispersive microextraction coupled to thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry, *Talanta* 147, 246-252
- [187] Vila M, Lamas JP, Garcia-Jares C, Dagnac T, Llompарт M (2016) Ultrasound-assisted emulsification microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of UV filters in water, *Microchem. J.* 124, 530-539
- [188] Suárez R, Clavijo S, Avivar J, Cerdà V (2016) On-line in-syringe magnetic stirring assisted dispersive liquid-liquid microextraction HPLC-UV method for UV filters determination using 1-hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate as extractant, *Talanta* 148, 589-595
- [189] Benedé JL, Chisvert A, Giokas DL, Salvador A (2016) Stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles-nylon 6 composites for the extraction of hydrophilic organic compounds in aqueous media, *Anal. Chim. Acta*, *enviado*
- [190] Gago-Ferrero P, Díaz-Cruz MS, Barceló D (2011) Occurrence of multiclass UV-Filters in treated sewage sludge from wastewater treatments plants, *Chemosphere* 84, 1158-1165
- [191] Montesdeoca-Esponda, Vega-Morales T, Sosa-Ferrera Z, Santana-Rodríguez JJ (2014) Analysis of personal care products in sediments and soils. En: Díaz-Cruz MS, Barceló D (eds). *Personal care products in the aquatic environment*, Springer, Berlin
- [192] Munksgaard NC, Parry DL (2001) Trace metals, arsenic and lead isotopes in dissolved and particulate phases of North Australian coastal and estuarine seawater, *Mar. Chem.* 75, 165-184

- [193] Tovar-Sánchez A, Sañudo-Wilhelmy SA, Flegal AR (2004) Temporal and spatial variations in the biogeochemical cycling of cobalt in two urban estuaries: Hudson River Estuary and San Francisco Bay, *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 60, 717-728
- [194] Tovar-Sánchez A, Sánchez-Quiles D, Basterretxea G, Benedé JL, Chisvert A, Salvador A, Moreno-Garrido I, Blasco J (2013) Sunscreen products as emerging pollutants to coastal waters, *Plos One* 8, e65451
- [195] Endo M, Suzuki K, Abe S (1998) Novel preconcentration technique for trace metal ions by aggregate film formation. Spectrophotometric determination of copper (II), *Anal. Chim. Acta* 364, 13-17
- [196] Maaz K, Mumtaz A, Hasanain SK, Ceylan A (2007) Synthesis and magnetic properties of cobalt ferrite nanoparticles prepared by wet chemical route, *J. Magn. Magn. Mater.* 308, 289-295
- [197] Andrade AL, Souza DM, Pereira MC, Fabris JD, Domingues RZ (2009) Synthesis and characterization of magnetic nanoparticles coated with silica through a sol-gel approach, *Cerâmica* 55 420-424

LISTA DE ACRÓNIMOS

ACRÓNIMOS

APCI

Ionización química a presión atmosférica

APPI

Fotoionización a presión atmosférica

BA μ E

Microextracción adsorbtiva sobre barra

BDM

Butil metoxidibenzoilmetano

BZ3

Benzofenona-3

BZ4

Benzofenona-4

BZ-d₁₀

Benzofenona deuterada

C18

Octadecil

[C₆MIM][PF₆]

1-hexil-3-metilimidazol hexafluorofosfato

C8

Octil

CE

Electroforesis capilar

CPE

Extracción en punto de nube

CTAB

Bromuro de cetiltrimetilamonio

CZE

Electroforesis capilar zonal

DART

Análisis directo en tiempo real

DLLME

Microextracción líquido-líquido dispersiva

DSDME

Microextracción en gota suspendida

DSPE

Extracción en fase sólida dispersiva

EDP

Etilhexil dimetil PABA

EGS

Etilenglicol modificado con silicona

EI

Ionización electrónica

EMC

Etilhexil metoxicinamato

ES

Etilhexil salicilato

ESI

Ionización por electrospray

FASI

Inyección de muestra con campo amplificado

FP

Factor de preconcentración

FPS

Factor de protección solar

GC

Cromatografía de gases

GCB

Carbón negro grafitado

GCxGC

Cromatografía de gases bidimensional

HFLPME

Microextracción en fase líquida con fibra hueca

[HMIM][FAP]

1-hexil-3-metilimidazol
tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato

HS

Homosalato

IL

Líquido iónico

IMC

Isoamil metoxicinamato

iSAME

Microextracción sobre agregado
formado in situ

ISFME

Microextracción por formación in situ
del disolvente

KWLPME

Microextracción en fase líquida en
lana de poliéster

LC

Cromatografía de líquidos

LD

Desorción líquida

LDC

Límite de cuantificación

LDD

Límite de detección

LLE

Extracción líquido-líquido

LPME

Microextracción en fase líquida

LVI

Inyección de gran volumen

MAA-EDMA

Ácido metacrílico-etilen dimetacrilato

MALLE

Extracción líquido-líquido asistida por
membranas

MBC

4-metilbenciliden canfor

MEPS

Microextracción mediante sorbentes
empaquetados

MLVs

Vesículas multilamelares

MNPs

Nanopartículas magnéticas

NPs

Nanopartículas

MS

Espectrometría de masas

MS/MS

Espectrometría de masas en tándem

MSA

Asistida por agitación magnética

OA-MALLE

Extracción líquido-líquido con
membrana microporosa en vial
asistida por agitación orbital

OCR

Octocrileno

PA

Poliacrilato

PBS

Ácido fenilbencimidazol sulfónico

PDMS

Polidimetilsiloxano

PDT

Disodio fenil dibencimidazol
tetrasulfonato

PI

Patrón interno

PS-DVB

Poliestireno-divinilbenceno

PS-DVB/MH

PS-DVB modificado con grupos
hidroxil

PS-DVB/MP

PS-DVB modificado con pirrolidona

PVP-DVB

Polidivinilpirrolidona-divinilbenceno

PVP-DVB/MCX

PVP-DVB modificado con grupos de intercambio catiónico

RE

Rendimiento de extracción

RP-DLLME

Microextracción líquido-líquido dispersiva en fase reversa

RSD

Desviación estándar relativa

SBSDME

Microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora

SBSE

Extracción por sorción sobre barra agitadora

SDME

Microextracción en gota

SLM

Membrana líquida soportada

SME

Extracción sobre membrana agitada

SM-LLME

Microextracción líquido-líquido asistida por membrana agitada

SOFD

Solidificación de la gota flotante

SPE

Extracción en fase sólida

SPME

Microextracción en fase sólida

SSA

Ácido sulfosalicílico

TC

Temperatura controlada

TD

Desorción térmica

TEM

Microscopía electrónica de transmisión

TDS

Ácido tereftaliden dicloro sulfónico

UDSA

Asistida por agitación arriba-abajo

UE

Unión Europea

USA

Asistida por ultrasonidos

USAEME

Microextracción asistida por ultrasonidos

UV

Ultravioleta

VA

Asistida por vórtex

ANEXO
ARTÍCULOS PUBLICADOS

Determination of UV filters in both soluble and particulate fractions of seawaters by dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry

Publicado en **Analytica Chimica Acta** 812 (2014) 50-58



Determination of UV filters in both soluble and particulate fractions of seawaters by dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry



J.L. Benedé^{a,*}, A. Chisvert^{a,*}, A. Salvador^a, D. Sánchez-Quiles^b, A. Tovar-Sánchez^{b,c}

^a Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universitat de València, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

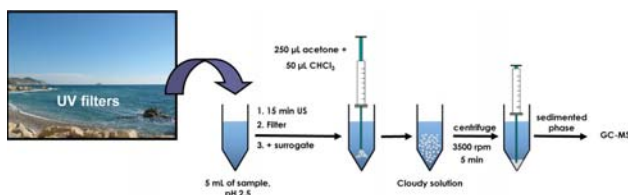
^b Department of Global Change Research, Mediterranean Institute for Advanced Studies, (UIB-CSIC), 07190 Esporles, Balearic Islands, Spain

^c Department of Ecology and Coastal Management, Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (CSIC), Campus Rio San Pedro, 11510 Puerto Real (Cadiz) Spain

HIGHLIGHTS

- UV filters are determined in both the soluble and particulate fractions of seawater.
- It is the first time that these compounds are determined in the particulate fraction.
- The method has been developed and validated obtaining good analytical features.
- Real seawater samples of different origin have been successfully analyzed.
- The contents of UV filters in the particulate fraction are significant.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 October 2013

Received in revised form

19 December 2013

Accepted 24 December 2013

Available online 3 January 2014

Keywords:

Dispersive liquid–liquid microextraction

UV filters

Seawater analysis

Gas chromatography–mass spectrometry

Trace analysis

Ultrasound treatment

ABSTRACT

An analytical method to determine the total content (i.e., not only in the soluble fraction but also in the particulate one) of eight commonly used UV filters in seawater samples is presented for the first time. Dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) is used as microextraction technique to pre-concentrate the target analytes before their determination by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). In order to release the UV filters from the suspended particles an ultrasound treatment is performed before DLLME. The ultrasound treatment time was studied in order to achieve a quantitative lixiviation of the target analytes. The type and volume of both disperser and extraction solvent, the sample volume, the pH and the ionic strength involved in the DLLME have been optimized to provide the best enrichment factors. Under the optimized conditions, the method was successfully validated showing good linearity, enrichment factors between 112 and 263 depending on the analyte, limits of detection and quantification in the low ng L⁻¹ range (10–30 ng L⁻¹ and 33–99 ng L⁻¹, respectively) and good intra- and inter-day repeatability (RSD <15%). No significant matrix effects were found. Finally, the method was satisfactorily applied to the analysis of three seawater samples from different origin. Results showed significant amounts of UV filters in the particulate fraction that would have been ignored if only the soluble fraction had been considered. This fact shows that the UV filters are also accumulated in the suspended particles contained in water, what should be taken into account from an environmental standpoint.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author at: University of Valencia, Analytical Chemistry, Doctor Moliner Street, 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain. Tel.: +34 96 354 49 00; fax: +34 96 354 44 36.

E-mail address: alberto.chisvert@uv.es (A. Chisvert).

1. Introduction

In the last years, concerns about the health risks associated with solar ultraviolet (UV) radiation exposure have increased considerably. Skin burns, photosensitivity, premature aging or even skin cancer are some of the main harmful effects that an overexposure to sunlight can cause. As a result, there are nowadays many cosmetic products, in addition to those exclusively designed for sun protection (i.e., sunscreens), that contain UV filters as ingredients in their formulation, taking advantage of their capacity to absorb or reflect in both UVA and UVB ranges [1,2]. The compounds that can be used as UV filters in cosmetic products, and their maximum allowed concentrations are regulated by the legislations in force in each country [1–3].

Due to this increasing use of UV filters, these chemicals have reached the aquatic environment by direct sources (e.g., sunbathing or swimming) and/or indirect sources (wastewater-treatment plants, showering or domestic washing), thus being accumulated in sea, lake or river waters [4,5]. Moreover, due to the lipophilic properties of some of these chemical compounds, they might also be accumulated in the suspended particles contained in the water, sediments or sludge [5–8]. On the other hand, different studies have demonstrated that organic UV filters, even at trace levels, could cause hormonal disruption on the reproduction of fish [9,10], and possess endocrine activity [11]. For all this, UV filters have been recently cataloged as emergent contaminants, and hence there is a growing need to develop sensitive and selective analytical methods for their determination at trace levels in the aquatic environment.

Several methodologies based on both liquid chromatography (LC) and gas chromatography (GC), mostly coupled to mass spectrometry (MS) are available in the literature for the determination of these emerging pollutants in surface waters, which have been compiled in different interesting reviews [4,12,13]. In addition, taking into account that the UV filters are in the ng L^{-1} range in environmental samples, enrichment techniques are usually employed to improve the sensitivity and limits of detection. In this way, solid-phase based extraction techniques, such as solid-phase extraction (SPE) [14–17], solid-phase microextraction (SPME) [18–20], stir-bar sorptive extraction (SBSE) [21–24] and dispersive solid-phase extraction (dSPE) [25] have been employed prior to chromatographic analysis. Liquid-phase based extraction techniques, such as liquid–liquid extraction (LLE), have been also employed to determine UV filters in aquatic samples [26], although in a much lower frequency, maybe because this technique requires large amounts of both sample and organic solvents and is time-consuming. However, the high and recent popularity of the liquid-phase microextraction (LPME) techniques [27], where the organic solvent amounts are only a few microliters, have gained general attention, which has also been reflected in the field of the determination of UV filters in environmental water samples. Thus, single drop microextraction (SDME) [28,29] and membrane-assisted liquid–liquid extraction (MALLE) [30] have been used, although they still have some drawbacks such as the instability of the drop in SDME, high extraction times and that often equilibrium state is not reached [27]. Later, our research group proposed the determination of benzophenone-type UV filters by dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) taking advantage of its simplicity, rapidness, low cost and the high enrichment factors achieved with it [31]. Negreira et al. also used DLLME for different determination of different UV filters [32]. Other DLLME-related microextraction approaches, such as magnetic stirring-assisted [33], vortex-assisted [34], and ultrasound-assisted [35] DLLME using conventional organic solvents have been also used for the determination of different types of UV filters, mainly benzophenones, and salicylates. Similarly, but using ionic liquids (IL) instead of conventional organic solvents, IL-based DLLME [36], IL-based ultrasound-assisted DLLME [37],

temperature-controlled IL-DLLME [38] and IL-based ultrasound-assisted emulsification microextraction [39] techniques, have been also employed for the same purposes. Regarding the water origin, tap [37–39], swimming pool [32,36–38], river [32,34,35,37,39], lake [36], reservoir [34], sea [31], and waste [32,35,36] water samples have been analyzed by DLLME-related techniques. However, it should be pointed out that despite the high potential offered by DLLME (or any of its modifications) as microextraction technique, only one of these publications is referred to seawater analysis [31], place where it is expected that finally UV filters will accumulate [4,5]. Moreover, to our knowledge, the publications mentioned above focus only in the determination of the soluble fraction, thus ignoring the amount adhered to the suspended particles fraction, which could be even higher than that in the soluble content, as found for other trace elements [40,41].

In this sense, the aim of this work is to develop, for the first time, an analytical method based on DLLME to determine eight of the most commonly used UV filters (Table 1) not only in the soluble fraction, but also in the particulate fraction (i.e., that adhered to suspended particles), of seawater samples. In this way, the method could be useful for environmental surveillance purposes since the total content is determined, thus obtaining reliable amounts of these emerging contaminants in the aquatic environment. Otherwise, if only the soluble fraction is measured, the results from an environmental point of view, and thus the conclusions achieved, might not be correct. To our knowledge this is the first study focused on the determination of UV filters in both, the soluble and particulate fraction of seawater.

2. Experimental

2.1. Reagents and samples

2-Ethylhexyl salicylate (ES) 99%, 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (benzophenone-3 (BZ3)) 98%, 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate (EMC) 99.8% and 2-ethylhexyl 4-(dimethylamino)benzoate (ethylhexyl dimethyl PABA (EDP)) 98% from Sigma–Aldrich, 3,3,5-trimethylcyclohexyl salicylate (homosalate (HS)) >98% from Merck (Darmstadt, Germany), isoamyl 4-methoxycinnamate (IMC) 99.3% from Haarmann and Reimer (Parets del Vallés, Spain), 3-(4'-methylbenzylidene)camphor (MBC) 99.7% from Guinama S.L. (Valencia, Spain) and 2-ethylhexyl 2-cyano-3,3-diphenylacrylate (octocrylene (OCR)) >98% from F.Hoffman-La Roche Ltd. (Basel, Switzerland) were used as standards. Deuterated benzophenone (benzophenone- d_{10} (BZ- d_{10})) from Sigma–Aldrich (Miami, USA) was used as surrogate.

LC-grade absolute ethanol from Scharlau (Barcelona, Spain) was used as solvent to prepare the multicomponent standard stock solution. Working standard solutions were freshly prepared daily by dilution with deionized water obtained by a Nanopure II water purification system from Barnstead (Boston, MA, USA).

Analytical reagent grade dichloromethane and extra pure chloroform from Scharlau (Barcelona, Spain) were tested as extraction solvents. EtOH, extra pure acetone, and LC-grade acetonitrile from Scharlau (Barcelona, Spain) were tested as disperser solvents.

Analytical reagent grade sodium chloride 99.5% from Scharlau (Barcelona, Spain) was used to adjust the ionic strength. Glacial acetic acid and analytical reagent grade sodium hydroxide from Scharlau (Barcelona, Spain) were used to adjust the pH.

High purity helium (99.9999%) from Carbueros Metálicos S.A. (Paterna, Spain) was used as carrier gas in the GC–MS system.

Seawater samples were all collected along different beaches in Western Mediterranean Sea: Palmira beach (Majorca Island, Spain) in August 2011 (Sample 1), Malvarrosa beach (Valencia, Spain) and

Table 1
Chemical structure and some relevant data of the target compounds.

UV filter	Chemical structure	Molecular formula	CAS number
2-ethylhexyl salicylate (ES)		C ₁₅ H ₂₂ O ₃	118-60-5
Homosalate (HS) ^a		C ₁₆ H ₂₂ O ₃	118-56-9
Isoamyl 4-methoxycinnamate (IMC) ^b		C ₁₅ H ₂₀ O ₃	71617-10-2
3-(4-methylbenzylidene) camphor (4-MBC) ^b		C ₁₈ H ₂₂ O	36861-47-9
Benzophenone-3 (BZ3)		C ₁₄ H ₁₂ O ₃	131-57-7
2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate (EMC) ^b		C ₁₈ H ₂₆ O ₃	5466-77-3
Ethylhexyl dimethyl PABA (EDP)		C ₁₇ H ₂₇ NO ₂	21245-02-3
Octocrylene (OCR)		C ₂₄ H ₂₇ NO ₂	6197-30-4

^a There are two isomers (HS₁ and HS₂).

^b There are two geometrical isomers (*Z* and *E*) when it is exposed to light.

Pinedo beach (Valencia, Spain) in May 2013 (Samples 2 and 3, respectively). All samples were collected in 1 L topaz glass bottles and stored in the dark at 4 °C until their analysis.

All used glass material was previously soaked in HNO₃:H₂O (50:50) and dried at 220 °C after each session to prevent background contamination.

2.2. Apparatus

A Focus GC gas chromatograph, equipped with an AS3000 autosampler and coupled to a DSQ II mass spectrometry detector (operated in positive electron ionization mode at ionization energy of 70 eV), from Thermo Fisher Scientific (Austin, TX, USA) was employed.

An EBA 21 centrifuge from Hettich (Tuttlingen, Germany) was used for phase separation, a Basic 20 pH meter from Crison (Alella, Spain) was used for the pH adjustments and an ultrasound bath (50 Hz, 360 W) from J.P. Selecta S.A. (Barcelona, Spain) was used in the lixiviation of UV filters from particles.

2.3. Proposed method

2.3.1. Standards preparation

A stock solution containing 500 µg mL⁻¹ of the eight target UV filters was prepared in ethanol. Then, an aliquot of this solution was properly diluted with deionized water to prepare a multi-component aqueous stock solution (25 ng mL⁻¹). This last solution was used to prepare the multicomponent aqueous working

Table 2
GC–MS features of the target compounds.

UV filter	Retention time (min)	Selected ions ^a	Acquisition time window (min)
BZ-d ₁₀ (surrogate)	14.44	82, 110 , 192	10.0–17.0
ES	18.45	120 , 138, 250	17.0–22.0
HS	20.04 (HS ₁), 20.75 (HS ₂)	120, 138 , 262	17.0–22.0
IMC	21.20 (Z), 25.54 (E)	161, 178 , 248	20.0–27.2
MBC	24.50 (Z), 26.23 (E)	128, 211, 254	22.0–27.2
BZ3	25.33	151, 227 , 228	22.0–27.2
EMC	29.78 (Z), 31.22 (E)	161, 178 , 290	27.2–30.0 (Z) 31.0–33.7 (E)
EDP	30.62	148, 165 , 277	30.0–31.0
OCR	35.04	204 , 232, 360	33.7–40.0

^a The *m/z* values used as quantifiers are shown in bold.

solutions (100–500 ng L⁻¹), which were adjusted to pH 2.5 with glacial acetic acid.

Different aliquots of 5 mL of each one of the aqueous working solutions were transferred to 7.5 mL glass centrifuge tubes to which 50 µL of a surrogate 100 ng mL⁻¹ aqueous solution were added. Then, they were subjected to DLLME by rapid injection of pre-mixed 250 µL of acetone (as disperser solvent) and 50 µL of chloroform (as extraction solvent). Once the cloudy solutions were formed, they were centrifuged at 3500 rpm for 5 min. After centrifugation, the organic sedimented phases were collected and transferred into 100 µL inserts placed inside 1.5 mL injection vials for GC–MS analysis.

2.3.2. Sample preparation

To determine the soluble fraction, water samples were pH-adjusted to 2.5 with glacial acetic acid and filtered through 0.45 µm nylon membrane filters. Then, by triplicate, aliquots of 5 mL were subjected to the DLLME procedure as previously described for standards. To determine the total content (i.e., soluble fraction plus particulate fraction), unfiltered water samples were sonicated for 15 min and then pH-adjusted and filtered before being subjected to the DLLME procedure.

2.3.3. GC–MS analysis

The chromatographic separations were carried out in a HP-5MS Ultra Inert (95% dimethyl-5% diphenylpolysiloxane, 30 m length, 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness) column from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA).

Two microliters of each sedimented phase were injected into the GC–MS system. The inlet temperature was 280 °C and the injection was accomplished in splitless mode (splitless time 1.5 min). The separation was run at a 1 mL min⁻¹ helium constant flow rate. The oven temperature program was: from 70 °C (1 min) to 170 °C at 10 °C min⁻¹, then to 200 °C at 2 °C min⁻¹ and finally to 280 °C (6 min) at 10 °C min⁻¹. The transfer line and ion source temperatures were set at 280 and 250 °C respectively. The chromatograms were recorded in selected ion monitoring (SIM) mode at the mass/charge (*m/z*) ratios for each analyte shown in Table 2.

Fig. 1 shows examples of the obtained chromatograms for: an aqueous standard solution containing the eight target analytes and the surrogate (a); and a seawater sample before (b) and after (c) 15 min. of ultrasound treatment, all of them subjected to the described DLLME–GC–MS method.

Calibration was performed by plotting A_i/A_{sur} (where A_i is the peak area of the target analyte and A_{sur} that of the surrogate (i.e.,

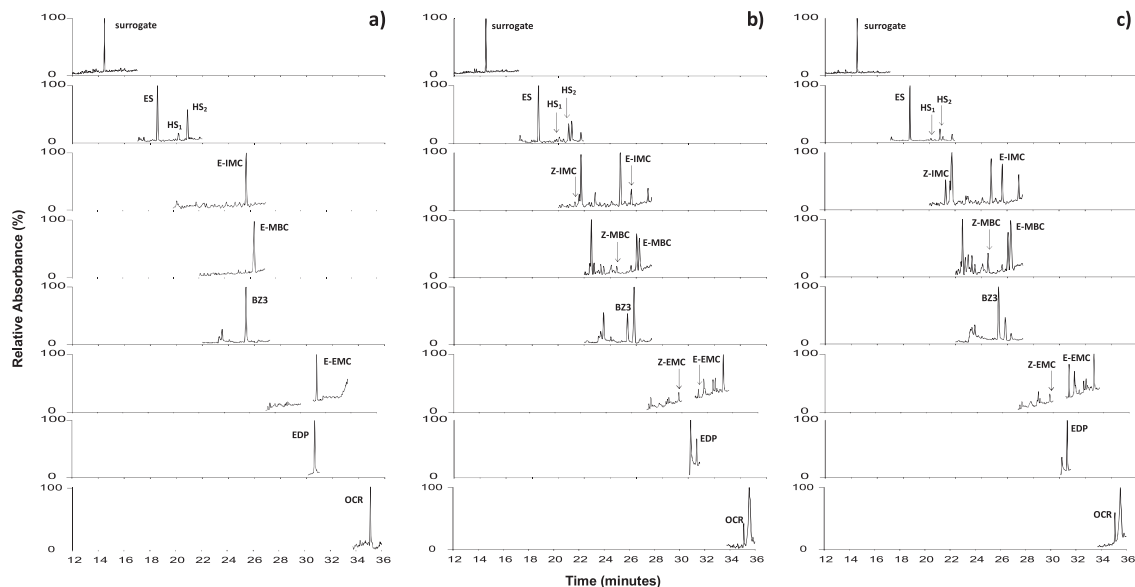


Fig. 1. Chromatograms obtained applying the proposed DLLME–GC–MS method to (a) an aqueous standard solution containing the eight target UV filters at 500 ng L⁻¹ (a); a real seawater sample before ultrasound treatment (b) and a real seawater sample after 15 min of ultrasound treatment (c).

BZ-d₁₀), each one obtained by its quantifier ion) versus target analyte concentration.

3. Results and discussion

3.1. Study of the experimental variables involved in the DLLME procedure

Previous optimization of the experimental DLLME variables is required in order to obtain the highest enrichment factors, and thus the lowest limits of detection. Several experimental parameters may affect the extraction process such as type and volume of both disperser and extraction solvent, sample volume, pH or ionic strength. Thereby, the influence of all these variables was studied and evaluated in terms of the ratio of the peak area of each target analyte to that of BZ-d₁₀, which was added after each extraction, and thus used as internal standard to minimize the injection deviations of the GC injections (A_i/A_{is}). Taking into account that the sedimented phase volume depends on the extraction conditions, especially in the optimization of the extraction solvent volume, the ratio was corrected as $(A_i/A_{is})_{corr} = (A_i/A_{is}) \times (V_{is}/V_s)$, where V_{is} is the volume of the internal standard solution added and V_s is the volume of the sedimented phase recollected and introduced in the injection vial. For this purpose, an aqueous standard solution containing 50 ng mL⁻¹ of each target analyte was subjected to the DLLME procedure and used to evaluate the influence of the mentioned variables. Five microliters of a 2.5 μg mL⁻¹ BZ-d₁₀ solution in chloroform were added as internal standard.

3.1.1. Type of extraction solvent and disperser solvent

The selection of a right combination of both extraction and disperser solvent is an essential parameter in DLLME. The main recommended characteristics of extraction solvent are low water solubility and higher density than water, whereas disperser solvent must be miscible in both extraction solvent and water to achieve a good dispersion.

In this way, dichloromethane and chloroform were tested as extraction solvents, whereas ethanol, acetone, and acetonitrile were tested as possible disperser solvents. Combinations of all of them were subjected to the DLLME procedure. Thus, mixtures of 500 μL of disperser solvent and 60 μL of extraction solvent were injected into 5 mL of the aqueous standard solution. No dispersion was observed when dichloromethane was used, whereas no phase separation was achieved after centrifugation with the ethanol–chloroform combination. When comparing the other two

combinations, not large differences were observed, and then the chloroform–acetone combination was chosen considering the lower toxicity of acetone.

3.1.2. Extraction solvent volume

As previously mentioned, the extraction solvent volume greatly affects to the sedimented phase volume, and therefore higher amounts are expected to be extracted when higher extraction solvent volumes are used. But at the same time, the dilution effect also increases and thus this can decrease the enrichment factor.

To study this variable, mixtures of 500 μL of acetone and different volumes of chloroform (ranging from 40 to 80 μL) were injected into 5 mL of the aqueous standard solution. When 40 μL of chloroform were used for the extraction, insufficient volume of sedimented phase was obtained and thus it was rejected. As can be seen in Fig. 2, the responses decrease considerably when the volume of the extraction solvent increases, probably due to the dilution effect. Thus, 50 μL of extraction solvent was selected for further experiments.

3.1.3. Disperser solvent volume

The use of disperser solvent is needed to achieve a good dispersion, increasing the surface area between the donor phase and extraction solvent. In this case, mixtures of different volumes of acetone (ranging from 250 to 1000 μL) and 50 μL of chloroform were injected into 5 mL of the aqueous standard solution. Fig. 3 shows that the best result was obtained when lower volumes of acetone were added, most probably due to the fact that high disperser solvent volumes decrease the partition coefficient of analytes into the extraction solvent. Thus, 250 μL was chosen as disperser solvent volume.

3.1.4. Donor phase volume

In order to study this variable, mixtures of 250 μL of acetone and 50 μL of chloroform were injected into different volumes of the aqueous standard solution (ranging from 2.5 to 7.5 mL). The best result was obtained with 5 mL of donor phase. When 7.5 mL of aqueous phase was used the amount of sedimented phase was insufficient to be collected. This could be explained by the fact that the ratio of volumes was too high and the extraction solvent was partially dissolved in the donor phase.

3.1.5. pH of the donor phase

This study was carried out injecting mixtures of 250 μL of acetone and 50 μL of chloroform into 5 mL of the aqueous standard solutions adjusted to different pH values ranging from 2.5 to 8,

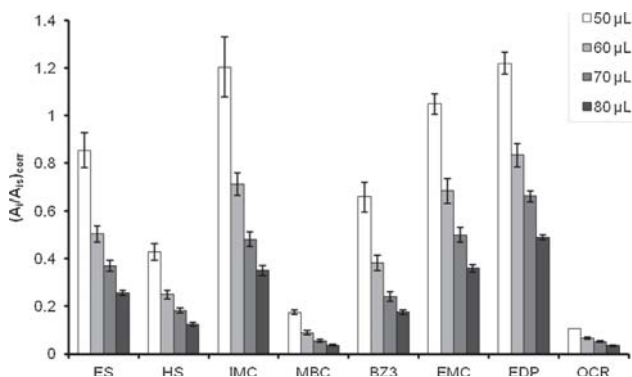


Fig. 2. Effect of the extraction solvent volume on the DLLME process. Extraction conditions: 5 mL sample volume, 500 μL of disperser solvent containing different volumes of chloroform as extraction solvent.

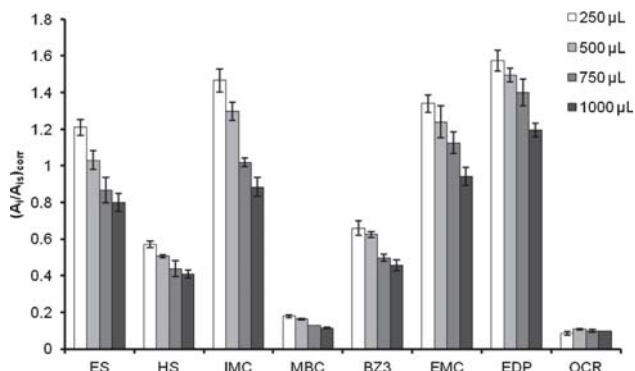


Fig. 3. Effect of the disperser solvent volume on the DLLME process. Extraction conditions: 5 mL sample volume, different volumes of acetone as disperser solvent containing 50 μL of extraction solvent.

by using glacial acetic acid and/or sodium hydroxide. The results shown in Fig. 4 revealed that, in general terms, the best responses are obtained when the aqueous donor phase is adjusted to pH 2.5. Thus, this pH was set for further experiments.

3.1.6. Ionic strength of donor phase

On one hand the ionic strength of the aqueous donor phase can decrease the solubility of analytes in the aqueous phase and enhance their transfer to the organic phase, due to the so-called salting-out effect. On the other hand, the presence of salts also decreases the solubility of the extraction solvent, thereby the phase sedimented volume increases causing a dilution effect.

The influence of the ionic strength was studied with the addition of different concentrations of sodium chloride (ranging from 0 to 20% (w/v)) to the donor phase adjusted to pH 2.5, and subsequent injection of mixtures of 250 μL of acetone and 50 μL of chloroform into 5 mL of the standard solution. As can be seen in Fig. 5, the more ionic strength, the lesser is the response due to the fact that the dilution effect prevails over the salting-out effect. According to these results, no salt was added in further experiments.

Nevertheless, the fact that the salt content in seawater samples can reach up to 3–5% (w/v) could cause serious problems in sample extractions. The influence of the ionic strength was also evaluated on the extraction of BZ-d₁₀ and it was found that it was affected in the same way as analytes, i.e., its response also decreases when

increasing sedimented phase volume. In this sense, for further experiments, BZ-d₁₀ was added before the extraction is accomplished, i.e., as surrogate, thus correcting the possible deviations due to the difference in the salt content.

3.2. Study of ultrasound time in the lixiviation of UV filters from particles

An unfiltered seawater sample was spiked with the target compounds at 250 ng L^{-1} , and then, the sample was divided into two portions. One of them (portion A) was immediately filtered and analyzed according to the DLLME-GC-MS proposed method under optimized conditions. The other one (portion B) was left 24 h, and then filtered and analyzed. As can be seen in Fig. 6, a considerable concentration decrease of the target UV filters was observed in the soluble fraction 24 h after the spiking, thus showing that UV filters might be adsorbed onto the particles surface. However, in order to discard that UV filters were not being degraded, instead of being adsorbed, the same experiment was done using a filtered water sample (i.e., without particles). In this case, no decrease was observed, what strengthens the hypothesis that UV filters are being adsorbed. Then, if only the UV filters content in the soluble fraction is determined, it is obvious that no reliable results would be obtained from an environmental point of view. For this reason, in order to determine the UV filters content adhered to suspended

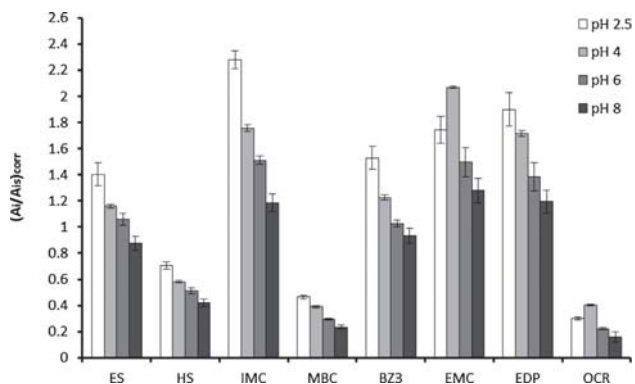


Fig. 4. Effect of the pH of the donor phase on the DLLME process. Extraction conditions: 5 mL sample volume adjusted to different pH values, 250 μL of disperser solvent containing 50 μL of extraction solvent.

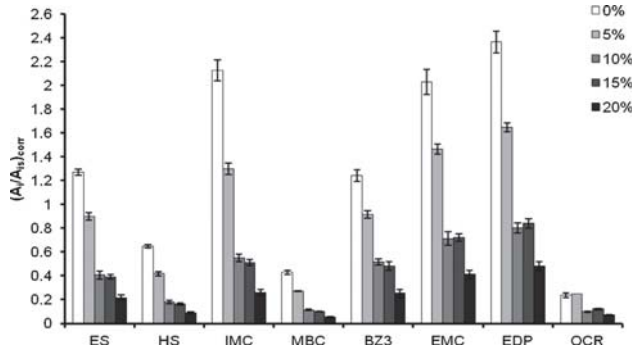


Fig. 5. Effect of the ionic strength of the donor phase on the DLLME process. Extraction conditions: 5 mL sample volume adjusted to pH 2 and to different ionic strength values, 250 μ L of disperser solvent containing 50 μ L of extraction solvent.

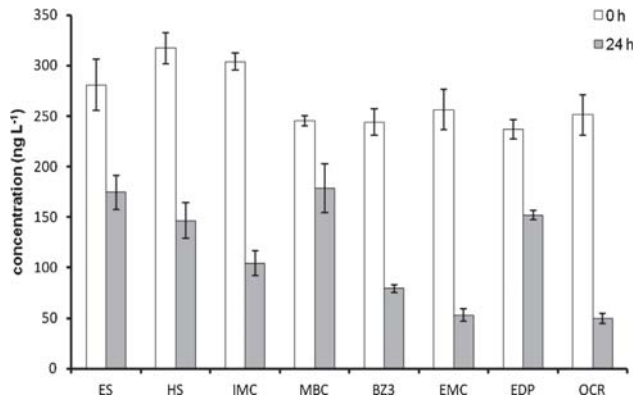


Fig. 6. Concentration of the eight target analytes in a seawater sample spiked at 250 ng L^{-1} at 0 and at 24 h after the spiking.

particles, i.e., in the particulate fraction, it is necessary to lixiviate the UV filters from the particle surface before filtering the samples. Preliminary experiments showed that simple shaking was not enough. The ultrasound treatment is an efficient tool to accelerate the mass-transfer between a solid and a solvent because

of the increase of both pressure and temperature, which on one hand favors penetration and transport, and on the other improves solubility, and diffusivity, respectively [42]. Thus, a real seawater sample was sonicated for 5 min in an ultrasound bath before filtering. The signal for the target UV filters when the ultrasound

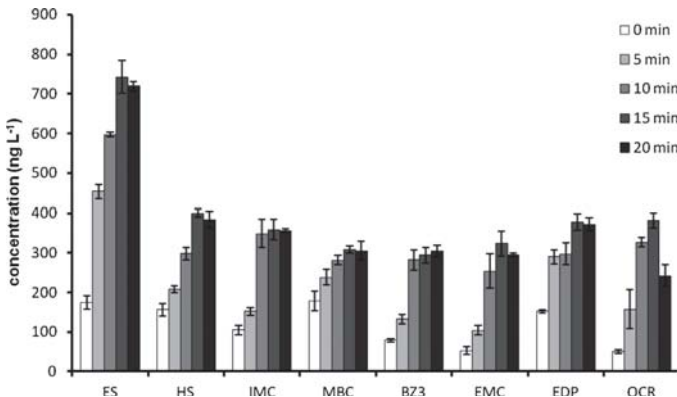


Fig. 7. Effect of ultrasound treatment time on the determination of the UV filters in total content (soluble and particulate fractions) applying the optimized extraction conditions.

In-situ suspended aggregate microextraction: A simple preparation approach for the enrichment of organic compounds in aqueous solutions

Publicado en **Journal of Chromatography A** 1408 (2015) 63-71



In-situ suspended aggregate microextraction: A sample preparation approach for the enrichment of organic compounds in aqueous solutions



Juan L. Benedé^{a,b}, Dimosthenis L. Giokas^{a,*}, Alberto Chisvert^{b,*}, Amparo Salvador^b

^a Department of Chemistry, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece

^b Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Valencia, 46100 Burjassot, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 March 2015

Received in revised form 28 May 2015

Accepted 9 July 2015

Available online 14 July 2015

Keywords:

In-situ suspended aggregate

microextraction

Multilamellar vesicles

UV filters

Natural waters

ABSTRACT

This work presents in-situ suspended aggregate microextraction (iSAME) as a new and expedient sample preparation method. This new concept capitalizes on the general principles of in-situ solvent formation microextraction, in the sense that extraction is carried out in a supramolecular aggregate phase, which is formed in-situ in the sample through one-step process involving ion-association between a cationic surfactant and a benzene sulfonic acid derivative. The suspended aggregate containing the analytes is then collected in the form of a thin-film on the surface of a common filter paper by suction filtration. The entrapped analytes are released by completely dissolving the thin-film with a small volume of an organic solvent which is used for analysis. Using a series of organic UV filters as model analytes, the experimental variables pertaining to the operation of this new extraction approach were optimized and validated to the analysis of genuine water samples of different nature and with different matrix complexity (tap, river, lake, lagoon, delta and sea). The satisfactory analytical performance of the method in terms of recovery rates (80–112%), precision (0.9–11.5%), high linearity of the calibration curves over a concentration range of 3 orders of magnitude, the high selectivity along with its simplicity and low resource requirements render the method as an attractive alternative to the routine assessment of organic compounds in environmental water samples.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Liquid–liquid extraction (LLE) has unambiguously been a great tool in sample preparation. However, its disadvantages related to lengthy turnaround times, large consumption of organic solvents and sample volume requirements as well as tedious and slow post-extraction treatment (e.g. solvent evaporation) has gradually led to its replacement by more convenient and environmental friendly techniques [1–3]. A diversity of extraction methods including cloud point extraction (CPE) [4], membrane assisted liquid–liquid extraction (MALLE) [5], and liquid-phase microextraction in its different approaches, such as single drop microextraction (SDME) [6,7], dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) [8], etc., have been developed as alternatives to LLE. The wide range of analytical

applications published to date bear testimony to the fact that these methods are fast, convenient, cost-effective and efficient for sample preparation [9–11].

An alternative approach to these methods is to form the extractant phase in-situ in the sample so that the analytes are collected during the formation of the extractant phase. Ionic liquids (ILs) were used for the first time as building blocks for the in-situ formation of the extractant phase in the so-called in-situ solvent formation microextraction (ISFME) [12,13]. In this method, a small amount of ion-pairing agent is added to the aqueous donor phase containing a water-miscible IL. An insoluble ionic liquid is then formed which creates a turbid suspension of fine microdroplets increasing the surface area of the extractant solvent. In this manner, mass transfer is maximized and the analytes are recovered quantitatively. Since the formation process of the extractant phase is fast, extraction is accomplished in a shorter time without the need of disperser solvents [13]. Additionally, this method is not affected by variations in the salt concentrations of the aqueous donor phase. The IL microdroplets are then separated by centrifugation and

* Corresponding authors.

E-mail addresses: dgiokas@cc.uoi.gr (D.L. Giokas), alberto.chisvert@uv.es (A. Chisvert).

collected for further processing and analysis. More recently, the in-situ formation of a solid micro-sorbent based on disolvable layered double hydroxides (LDH) has been proposed [14]. In this approach, pre-formed LDH are dispersed into the donor phase, then dissolved by lowering the pH and subsequently precipitated in-situ by restoring the pH thus entrapping the target analytes. The analyte-rich LDH precipitate is separated by centrifugation, dissolved by changing the pH and finally analyzed.

With the aim of contributing to the development of sample preparation, we present herein a new and expedient approach labeled as in-situ suspended aggregate microextraction (iSAME). This approach accommodates extraction in a supramolecular aggregate phase which self-assembles in-situ in the sample solution through ion-association between two appositively charged counter-ions. The aggregate phase is then collected in the form of a thin film onto the surface of a plain filter paper by simple vacuum filtration. By exploiting the low stability of surfactant aggregates in organic solvents, the aggregate phase is dissolved with a small volume of organic solvent thus releasing the analytes. Under these conditions, recoveries are maximized, since (a) extraction is accomplished both by entrapment and mass transfer of the target analytes and (b) the total amount of the extractant phase is collected. Moreover, the lack of a centrifugation step enables higher sample volumes to be processed since limitations associated with the capacity of the centrifuge are alleviated.

On the basis of this principle, a series of organic UV filters were used as model compounds for investigating the parameters pertaining to the performance characteristics and operation of this novel extraction procedure. Using these findings, we demonstrate its successful application to the analysis of genuine water samples with very satisfactory analytical features in terms of linearity, precision, accuracy, simplicity and analysis time.

2. Experimental

2.1. Materials and chemicals

All reagents were procured from major suppliers. 2-Ethylhexyl salicylate (ES) 99%, 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (benzophenone-3 (BZ3)) 98%, 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate (EMC) 99.8% and 2-ethylhexyl 4-(dimethylamino)benzoate (ethylhexyl dimethyl PABA (EDP)) 98% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany); 3,3,5-trimethylcyclohexyl salicylate (homosalate (HS)) >98% (Merck, Darmstadt, Germany), isoamyl 4-methoxycinnamate (IMC) 99.3% (Haarmann and Reimer Parets del Vallés, Spain), 3-(4-methylbenzylidene)camphor (MBC) 99.7% (Guinama S.L., Valencia, Spain) and 2-ethylhexyl 2-cyano-3,3-diphenylacrylate (octocrylene (OCR)) >98% (F.Hoffman-La Roche Ltd., Basel, Switzerland) were used as standards. The chemical structure and some relevant information are given in Table S1 (Supporting information).

Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), sulfosalicylic acid (SSA), 4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic acid disodium salt (Tiron®) and sulfanilic acid were all procured from Sigma-Aldrich. HPLC-grade methanol, ethanol, water, 2-propanol and acetonitrile were from Fisher Scientific (Loughborough, UK). Inorganic salts (sodium chloride, potassium chloride and potassium sulfate) were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain).

A series of hydrophilic filter papers with variable technical specifications were purchased from Millipore and Whatman. Details concerning the filter types, commercial names and technical specifications are listed in Table S2 (Supporting information).

2.2. Instrumentation and apparatus

The Shimadzu HPLC system, including a LC-10AD high-pressure solvent delivery pump, a DGU-20A₃ degasser, a 20- μ L Rheodyne® sample loop injector, a CTO-10A column oven and a SPD-10AV UV/Vis detector, was controlled by LC Solution software (v.1.25-SP4). The chromatographic separation of UV filters was performed on a thermostated (45 °C) Hypersil ODS C18 column (250 mm length, 4.6 mm I.D., 5 μ m particle size) from MZ Analysentechnik (Mainz, Germany). The mobile phase, delivered at 1.0 mL min⁻¹, consisted of MeOH and water at a mixing ratio of 75:25 (v/v). Peak area was monitored at 313 nm for all analytes.

A Millipore filtration system composed of a 47 mm all-glass vacuum filter holder and a ground glass bass with stopper was used for the extractions. Microscopic images of the aggregate phase were obtained with a JEM-1010 (JEOL) of 100 kV equipped with an AMT RX80 (8.0 Mpx) digital camera. The preparation of the samples was made with the negative-staining technique.

2.3. Preparation of standard solutions and genuine water samples

A stock solution containing 1000 μ g mL⁻¹ of each of the eight UV filters was prepared in HPLC-grade methanol and stored in the refrigerator at 4 °C protected from light. Working standard solutions were prepared daily in deionized water at known concentrations (10–200 ng mL⁻¹).

Prior to sampling all glassware was thoroughly cleaned by soaking in HNO₃:H₂O (50:50) and drying at 220 °C. Genuine water samples were collected in 1 L topaz glass bottles from the local water distribution network (Ioannina, Greece), Louros River (NW Greece), Rodia lagoon (Preveza, Greece), Pamvotis Lake (Ioannina, Greece), Vovos river delta (Preveza, Greece) and Gallikos Molos sea coastline (Thesprotia, Greece) in July 2014. All samples were filtered through 0.45 μ m nylon membrane filters (Millipore S-PAK) and stored in the dark at 4 °C until analysis.

2.4. Experimental procedure of in-situ suspended aggregate microextraction (iSAME)

The experimental setup of the iSAME procedure is illustrated in Fig. 1. Appropriate volumes of a 0.05 M SSA solution (1 mL for distilled water, 1.5 mL for surface waters and 3 mL for salt-rich waters) and 0.5 mL of 0.02 M CTAB solution were added in tandem to 20 mL aqueous standard solutions or real water samples previously fortified with 1% (w/v) NaCl. The mixture was magnetically stirred for 10 min and a cloudy solution gradually appeared signifying the formation of the aggregate phase. Subsequently, the mixture was filtered by suction filtration at ~400 mbar on a Millipore AP-40 glass-fiber filter paper and the aggregate was collected on the filter surface in the form of a thin-film (thickness \leq 0.1 mm). The vacuum was maintained for a few minutes to remove water residues. For the elution step, 2 mL of 2-propanol were applied on the top of the filter to dissolve the thin-film and the vacuum was gradually increased so that all solvent was collected into a dry flask. The extract was routinely filtered through nylon mesh of 0.22 μ m pore size and a 20 μ L aliquot was injected into the LC-UV system for analysis.

3. Results and discussion

The selection of CTAB as cationic surfactant and benzenesulfonic acid derivatives as counter-anions was made on the basis of earlier findings concerning on the aggregation of long chain trimethylammonium surfactants with benzene sulfonic anionic counter parts having at least three negatively dissociable functional groups, two of which are located adjacently [15]. To this

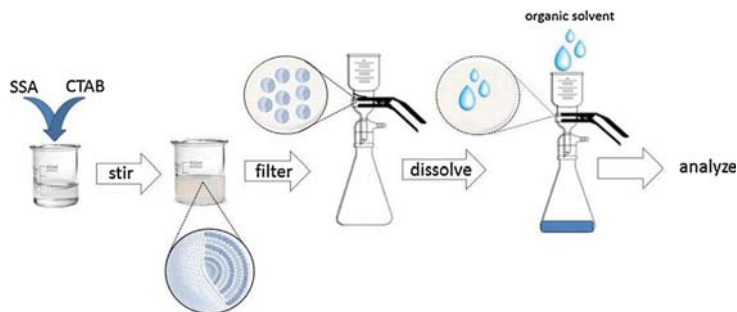


Fig. 1. Schematic of the in-situ suspended aggregate microextraction procedure.

end, sulfanilic acid, sulfosalicylic acid and Tiron[®] at a concentration of 2×10^{-2} M were examined for their efficiency to extract the target analytes from 20 mL aqueous standard solutions in the presence of 1×10^{-3} M CTAB. Judging from the average recovery of all analytes (SSA > Tiron[®] > sulfanilic acid) and signal repeatability (SSA > sulfanilic acid > Tiron[®]), SSA seems to excel those of Tiron[®] and sulfanilic acid in terms of analytical expeditiousness; therefore it was selected for further work.

3.1. Characterization of the aggregate phase

Both counter-ions used in this work, SSA and CTAB, form transparent, optically isotropic low viscosity solutions in water at 25 °C. When their solutions are mixed, an optically isotropic turbid solution is obtained which is an indication that an aggregate has been formed. The formation of this aggregate can be attributed to the ion-association between the sulfonate group of SSA and the quarternary amine of CTAB. This interaction is inferred from the fact that SSA solutions are strongly acidic (pH < 2) due to the dissociation of the benzenesulfonic group of SSA ($-\text{SO}_3\text{H}$; $\text{pK}_a < 0$) [16]. Therefore, the two remaining acid protons of SSA ($-\text{COOH}$; $\text{pK}_a = 2.9$ and $-\text{OH}$; $\text{pK}_a = 11.8$) [16] are protonated and cannot associate with CTAB. This ion-pair can be categorized to the general category of cationic aggregates which are known to self-assemble into diverse bilayer-type assemblies as a function of the molar ratio and the molecular structure of their monomer components [17–20]. We believe that these aggregates are multilamellar vesicles (MLVs) and not worm-like micelles because samples with worm-like micelles are usually transparent and, for CTAB micelles, usually viscous [21,22]. An insight into the structural features of the aggregate phase, obtained by TEM, verifies the presence of multilamellar vesicles with 2 or 3 concentric rings and an average diameter of approximately 0.4–0.5 μm (Fig. 2). However, these images are only indicative and not definite because the sample preparation method employed (negative-staining technique) may affect both the measured size and structure of the surfactant vesicles due to the solubilized staining dye and the drying process [23].

3.2. Mechanism of extraction

In order to elucidate the extraction mechanism, the aggregate phase was initially formed in an aqueous solution in the absence of analytes. Then an aqueous standard solution containing the target UV filters was added into the sample and the mixture was equilibrated under stirring for 10 min. The extraction efficiencies (EEs) obtained from this experiment ranged between $31 \pm 2\%$ and $51 \pm 2\%$, which is noticeably inferior to that observed when the aggregate phase was formed in-situ (from $48 \pm 3\%$ to $106 \pm 3\%$). On the grounds of these findings, the predominant extraction

mechanism reasonably involves the in-situ entrapment of the analytes inside the hydrophobic domain of the bilayer during the spontaneous self-assembly of the vesicles. A similar mechanism has also been recognized in our previous studies and it adequately explains the entrapment of hydrophobic analytes within charged vesicle assemblies [24–26]. A plausible route of this extraction mechanism is depicted in Fig. 3.

The partial extraction observed with the use of the pre-formed aggregate phase indicates that a secondary mechanism is also effective. As vesicles are retained on the filter surface they create a thin film which is practically a three-dimensional layer of supramolecular assemblies [27]. During sample percolation, the analytes present in the water phase may interact with the somewhat hydrophobic domains in the vesicle corona which can be accredited to the presence of methyl group in the CTAB molecule [28] and the local shielding of the headgroup charge from the anion-cation pairs of SSA and CTAB.

3.3. Optimization of the experimental variables

Optimization of the experimental parameters was accomplished by conducting triplicate tests that involved extraction of $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ of each analyte from 20 mL of aqueous standard solution under a variety of conditions (different type of filters, 200–400 mbar vacuum pressure, dissolution solvents of variable polarity, 1.25–10.0 mM SSA, 0.25–1.0 mM CTAB, pH 2–9, 1–5% (w/v) NaCl and 0.5–15 min mixing time). The optimum conditions were established in terms of extraction efficiencies (EE), defined as the percentage recovery of the solutes from an aqueous standard solution.

3.3.1. Selection of filter support

Various types of filters (47 mm diameter) with different properties and technical specifications were tested for their ability to collect the suspended aggregate phase (Table S2, Supporting information). The results depicted in the bar plots of Fig. 4 show that all filters examined could retain the aggregate phase to some extent. By comparing the EEs with filter properties it is revealed that paper thickness is the most crucial parameter, since EEs improved with paper thickness. On the contrary, pore size did not seem to play any significant role in the extraction. On the basis of these results, the glass fiber filter (Millipore AP 40, thickness 475 μm) was used as a solid support for extraction.

3.3.2. Effect of filtration rate

The importance of filtration rate on the extraction efficiencies was then investigated by varying the applied vacuum pressure. MLVs are stable and resist deformation during filtration [29], therefore elevated vacuum pressures (i.e. higher suction speed) had a

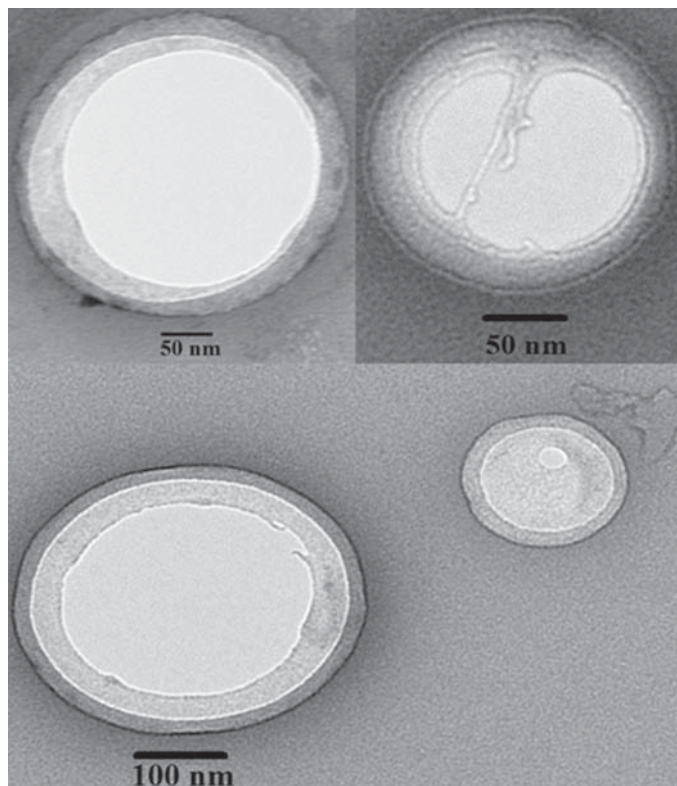


Fig. 2. TEM images of the aggregate phase obtained with the negative staining technique.

beneficial effect on the performance of the method (line plots, Fig. 4). On the other hand, at lower vacuum pressure, a decrease in the extraction efficiency of all compounds was observed which may be explained from the fact that vesicles undergo budding of small vesicles or fission of lipid material upon pressurization at lower pressures (e.g. 200–300 mbar) [30]. It is therefore possible that leaking of membrane materials or vesicle fission has caused loss of analytes during low vacuum filtration. Based on these considerations, a relatively high vacuum pressure (400 mbar) was

adopted, a feature which is also advantageous for sample throughput.

3.3.3. Influence of elution solvent

To dissolve the aggregate phase and quantitatively release the target analytes, organic solvents with different polarity such as acetonitrile, methanol, ethanol and 2-propanol were examined. Judging from the EEs, as the polarity of the solvent decreased, the extraction performance improved (Fig. S1, Supporting

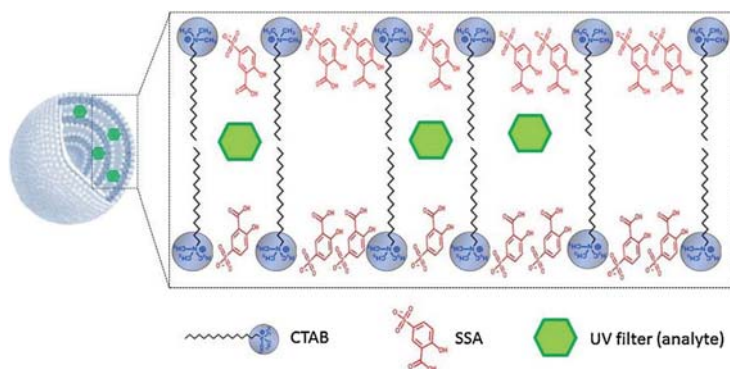


Fig. 3. Graphical demonstration of the extraction mechanism. The number of CTAB, SSA and UV filter molecules as well as their assembly into the bilayer are only indicative.

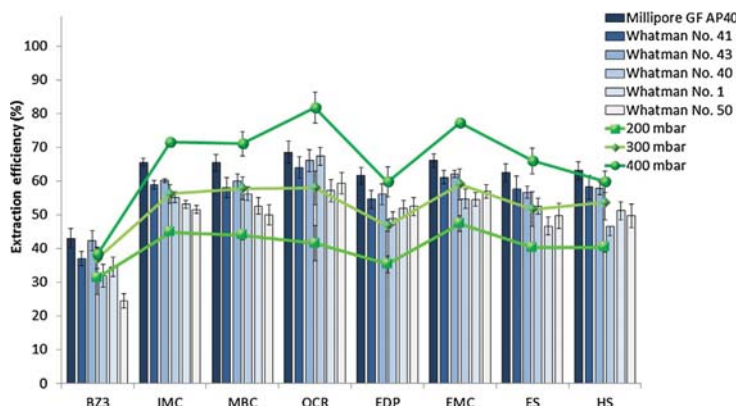


Fig. 4. Evaluation of different filters and vacuum pressures for retaining the aggregate phase suspension. Bar plots correspond to different types of filters while line plots refer to different vacuum pressures using the optimum filter (Millipore AP40). Other experimental conditions as defined in the text.

information). Thus, 2-propanol was selected for further experiments. Complete release of the analytes in a single step was accomplished with 2 mL of 2-propanol by applying the solvent on top of the filter surface for 1 min before initiating the vacuum. Using this procedure the extraction yield exceeded 90% for most compounds while direct elution under pre-applied vacuum resulted in relatively lower recoveries (about 80%). Importantly, no carryover was observed after repeated additions of solvent (three times) to the same paper filter paper, suggesting that the analytes are quantitatively recovered in a single-step.

3.3.4. Effect of ion-pair reagents concentration

With regards to the concentration of ion-pair reagents, the optimum performance was achieved with 2.5 mM SSA and 0.5 mM CTAB. Upon changing the SSA and CTAB concentrations above or below the optimum values, the EEs of all compounds decreased. On the basis of our understanding, variable molar concentrations of SSA and CTAB (Fig. 5) favor the formation of other types of supramolecular assemblies which either do not favor the extraction or are not effectively retained on the filter paper. It is noteworthy that EEs almost reached 100% at the optimum ion-pair reagents concentrations, except for BZ3, which is more polar.

3.3.5. Effect of pH

Regulation of pH of the sample solution had a trivial influence on the performance of the method. As shown in Fig. S2 (Supporting information) adjustment of the pH over the range of 2–8 had no significant impact on the extraction efficiencies of most compounds. Upon increasing the pH to 9, increased hydrolysis may have contributed to the lower EEs, of the more ionizable compounds, such as BZ3 (pKa = 7.56), ES (pKa = 8.13) and HS (pKa = 8.10). Similar results with the same analytes have been observed in previous works from our groups with a variety of sorbents and extraction phases [31–34], which supports the notion that the reduction in the EEs at elevated pH is related to the ionizable nature of the analytes and not to the properties of extraction medium. It should also be highlighted that at higher pH values filtration became more difficult as evidenced by the fact that suction rate decreased. This is ascribed to the deprotonation of the carboxylate anion in the SSA molecule, thus introducing an additional negative charge to the membrane bilayer, causing the membrane to swell due to electrostatic repulsion among adjacent molecules in the bilayer domain. On the grounds of these results all experiments were conducted without pH adjustment (i.e. pH ~ 2).

3.3.6. Influence of ionic strength and inorganic electrolytes

The modification of the ionic strength of the solution was also examined as means for enhancing the non-polar interactions between the analytes and the hydrophobic bilayer core (salting out effect). However, the addition of an inorganic salt could only afford minor improvement in the extraction yield and mainly at low concentrations (i.e. 1% NaCl, w/v) (Fig. S3, Supporting information). Upon increasing salt content, the inorganic electrolytes could shield the charge of vesicles or create a competitive reaction environment around the two organic counter-ions leading to structural deformations which have a negative effect on the extraction. This competition can be observed for NaCl concentrations up to 4% NaCl (w/v), above which the formation of the aggregate phase is obstructed (i.e. transparent solutions). However, increasing SSA concentration can effectively counterbalance this problem (*vide infra*).

Besides of concentration, the nature and properties of the electrolyte counter ions play a critical role in the performance of the method. When Na⁺ and Cl⁻ ions were replaced with the bulkier K⁺ and SO₄²⁻ ions, the EEs decreased (Figure S3-Supporting information). This may be accredited to the fact that both K⁺ and SO₄²⁻ have higher ionic radius thus shielding more effectively the ionic charge of the SSA⁻ and CTA⁺, respectively, leading to charges in the effective headgroup area of the vesicle, thereby driving the vesicles to aggregates of different structures such as bent bilayers, cylindrical micelles, etc. Such salt-induced transformations in vesicle structure and properties are rather common in vesicle systems [35,36]. On the basis of these results, extractions were carried out in the presence of 1% NaCl (w/v).

3.3.7. Effect of extraction time and temperature

The incubation time of the ion-pair reagents in the aqueous sample phase and the working temperature were investigated in the range of 0.5–15 min and 20–60 °C, respectively. The data show that the overall process is kinetically satisfied within 10 min at room temperature (Fig. S4, Supporting information). At longer incubation times the aggregate becomes stiffer, turbidity increases and filtration rate slows down. Accordingly, as temperature increases the EEs decrease while at temperatures higher than 45 °C the solution becomes transparent due to thermal perturbations in the aggregate structure, most probably involving a transition from vesicles to worm-like micelles [37].

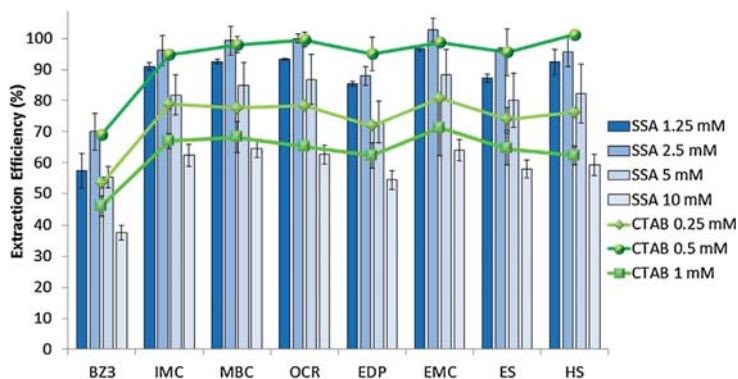


Fig. 5. Optimization of ion-pair reagents concentration. Bar plots correspond to different concentrations of SSA while line plots refer to different concentrations of CTAB at the optimum SSA concentration (2.5 mM). Other experimental conditions as defined in the text.

3.4. Determination of sample breakthrough volume

The maximal sample volume that can be extracted without impairing the EEs was examined by analyzing 20–150 mL of aqueous standard solutions considering that insufficient extraction occurs when it decreases below 90%. The amount of ion-pair reagents was scaled up according to the sample volume to maintain a constant concentration of SSA and CTAB and ensure adequate formation of the aggregate phase. The breakthrough volume profiles for all compounds suggest that the 90% criterion is satisfied at least up to 150 mL of sample (Fig. S5, Supporting information). However, as the sample volume increases, filtration time also increases. For example, at 400 mbar vacuum pressure, it takes less than 10 min to extract 20 mL of sample volume but almost 1 h for 150 mL. Therefore, the extraction of larger sample volumes was not investigated. Instead, a stronger oil pump was used to test the efficiency of the method in extracting the target analytes from 150 mL of an aqueous standard solution. Although no pressure gauge was installed to monitor the applied vacuum pressure, extraction time was reduced by almost 50%, with no impact on the EEs of all compounds suggesting that the use of strong vacuum is desirable. Besides, the applied vacuum pressure of 400 mbar, corresponds to a flow rate of $0.5 \text{ mL min}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ ($\sim 173 \text{ s } 100 \text{ mL}^{-1}$) whereas the Millipore AP40 glass fiber filter is designed to withstand to flow rates up to $6 \text{ mL min}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ ($\sim 14.4 \text{ s } 100 \text{ mL}^{-1}$). Additionally, the use of filters with larger diameters (e.g. 90 mm) could conceivably reduce extraction time even further and expand method utility to larger sample volumes.

Table 1
Analytical figures of merit.

UV filter	Slope $\pm s_b$ (ng mL^{-1})	Regression coefficient R^2	Linear range (ng mL^{-1})	LOD ^a (ng mL^{-1})	LOQ ^a (ng mL^{-1})	Precision (%RSD) ^b			
						Repeatability		Reproducibility	
						100 ng mL^{-1}	1000 ng mL^{-1}	100 ng mL^{-1}	1000 ng mL^{-1}
BZ3	329 ± 10	0.996	10–800	1.5	4.8	9.1	5.8	2.3	11.5
IMC	810 ± 20	0.996	10–1000	0.3	1.0	3.7	3.1	0.9	6.7
MBC	676 ± 15	0.997	10–1000	0.3	0.9	6.0	2.3	1.3	6.9
OCR	433 ± 8	0.998	10–1000	0.8	2.6	3.9	1.8	4.2	6.2
EDP	395 ± 14	0.993	10–1000	0.3	1.1	4.0	2.2	1.8	6.1
EMC	737 ± 19	0.996	10–1000	0.3	1.1	3.7	3.1	1.4	5.4
ES	132 ± 5	0.992	10–1000	1.7	5.7	4.3	2.1	2.9	4.3
HS	108 ± 4	0.995	10–1000	1.7	5.8	4.3	1.8	5.8	6.4

^a LOD: limit of detection, calculated as 3 times the signal-to-noise ratio; LOQ: limit of quantification, calculated as 10 times the signal-to-noise ratio.

^b Relative standard deviation (%RSD) from five replicates.

3.5. Investigation of selectivity and matrix effects

From the previous study it was revealed that the method favors the extraction of hydrophobic compounds (EEs $\sim 100 \pm 3.2\%$) while more hydrophilic species such as BZ3 are only partially extracted (EE = $47 \pm 2\%$). Therefore, the selectivity of the method was further examined by extracting a series of highly hydrophilic UV filters (Table S1, Supporting information) from 20 mL aqueous standard solutions containing $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ of each compound. No detectable peaks were observed for none of the hydrophilic species although most of the compounds examined have at least one aromatic sulfonate moiety, which could also bind to CTAB similarly to SSA. Moreover, the strongly acidic conditions of the aqueous suspension could suppress their ionization in favor of their protonated (non-ionized) forms therefore make the compounds accessible to the hydrophobic aggregate core through non-polar interactions. On the basis of these findings we inferred that hydrophobic organic compounds with limited water solubility are favorably extracted.

In contrast to other methods, where the sample is desalted during extraction, the use of a strong complexing agent such as SSA renders the presence of metal ions an important parameter in method application. In fact, inorganic cations, mainly Ca^{2+} and Mg^{2+} which are the most abundant metal ions in environmental water samples, were found to affect the ion-pair formation process by reacting with the SSA thus reducing its availability for the ternary amine of CTAB. This is evidenced by the decrease in the turbidity of the solutions with increasing cation concentration and the concomitant decrease in the EEs of all compounds. To circumvent

Table 2Relative recoveries obtained by applying the method to six spiked natural water samples. Spiking concentration 50 ng mL⁻¹.

UV filter	Tap water	River water	Lake water	Lagoon water	Delta water	Seawater
BZ3	109 ± 7.1	109 ± 3.7	108 ± 7.4	90 ± 3.7	103 ± 4.0	102 ± 7.5
IMC	100 ± 6.0	107 ± 5.7	96 ± 2.5	99 ± 2.2	99 ± 0.8	88 ± 5.8
MBC	105 ± 5.2	112 ± 6.7	100 ± 7.8	97 ± 3.0	104 ± 0.7	93 ± 7.4
OCR	94 ± 2.4	105 ± 5.5	99 ± 3.4	91 ± 5.2	95 ± 4.4	93 ± 1.3
EDP	87 ± 6.7	109 ± 6.3	91 ± 7.1	104 ± 3.6	92 ± 3.2	95 ± 2.0
EMC	97 ± 2.5	107 ± 5.0	97 ± 9.7	97 ± 5.6	98 ± 3.7	89 ± 3.2
ES	96 ± 3.7	99 ± 4.6	101 ± 7.4	98 ± 36.7	112 ± 5.7	80 ± 0.7
HS	91 ± 5.4	86 ± 5.7	98 ± 6.1	101 ± 13.1	108 ± 2.8	84 ± 2.2

this interference we increased the concentration of SSA in order to counterbalance the competition from inorganic ions and restore the formation of the aggregate phase. Since natural waters may contain variable amounts of alkaline earth metal ions, we investigated the optimum concentration of SSA using genuine water samples fortified with 1 µg mL⁻¹ of target UV filters. For surface waters such as tap, river, lake and lagoon water the EEs were restored with 3.75 mM of SSA (50% higher concentration of SSA in the final solution than in deionized water) while delta and seawater required an increase of SSA concentration up to 7.5 mM (plus 200% compared to deionized water). Using these generic values as a rule of thumb, the extraction of all compounds was restored needless of sample-specific optimization even for samples with high-salt content such as seawater (vide infra).

With regards to inorganic anions such as Cl⁻, SO₄²⁻, NO₃²⁻, PO₄³⁻, and organic matter in the form of humic acids no interference was observed at environmentally relevant concentrations (10 µg mL⁻¹) because SSA was in large excess, therefore the presence of other anions could not exert any significant interference.

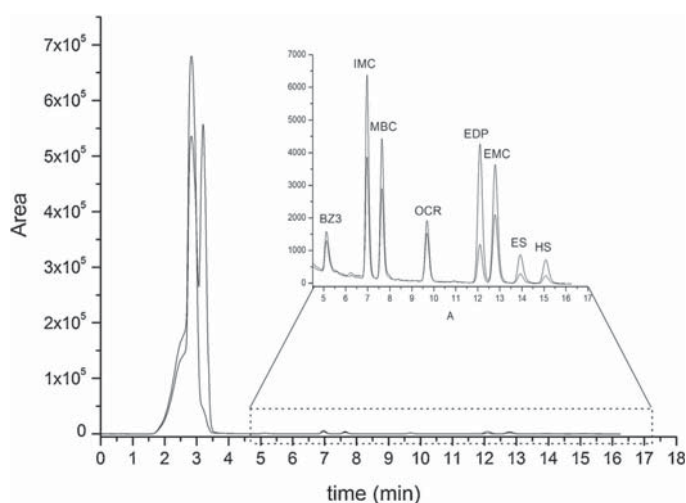
3.6. Analytical figures of merit

On the basis of the above results, a series of experiments with regard to the enrichment factor (EF), the linearity of the dose-response curves, the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) and precision were performed, in order to validate the developed method at the optimized conditions. The results obtained are listed in Table 1.

The calibration curves were rectilinear over a wide concentration range (10–1000 ng mL⁻¹) with very satisfactory regression coefficients ($r^2 = 0.992\text{--}0.998$). The LODs for the UV filters, calculated at a signal-to-noise of 3, ranged from 0.3 to 1.7 ng mL⁻¹ by preconcentrating only 20 mL of sample volume and reconstituting with 2 mL of 2-propanol. Therefore, further improvement can be accomplished by preconcentrating larger sample volumes (at least up to 150 mL, as previously discussed) and/or by evaporating the extraction solvent to lower volume under mild conditions [31]. Additional improvement can be accomplished by resorting to the use of more sensitive detection strategies such as mass spectrometric detectors [32,33]. However, in the case of these detectors, back extraction into a water immiscible organic solvent should be considered to reduce the co-extraction of the surfactant [31,38].

The enrichment factors (EF), defined as the ratio between the concentration of the compound after extraction (C_{ext}) to the initial concentration in the aqueous donor phase (C_0) were calculated for a series of sample volumes ranging between 20 and 150 mL (Table S3, Supporting information). With the exception of BZ3, which is hydrophilic and is partially extracted (EE 47 ± 2%), the calculated EF values are in excellent agreement with the maximum expected EFs, i.e. the ratio of sample volume ($V_0 = 20\text{--}150$ mL) to that of the final extract ($V_{\text{ext}} = 2$ mL), assuming quantitative recovery of the analytes (EF = EE × V_0/V_{ext} , EE = 100%).

Finally, the precision of the method, expressed as relative standard deviation (RSD %) of five replicates at two different concentration levels was evaluated. Repeatability (intra-day precision) ranged from 1.8 to 9.1% while reproducibility (inter-day precision) from 0.9 to 11.5%, illustrating the good precision achieved by the

**Fig. 6.** LC-UV chromatogram of a seawater sample spiked with 50 ng mL⁻¹ of the UV filters.

procedure. As expected, both measures of precision are noticeably better for hydrophobic compounds as compared to the more hydrophilic BZ3.

3.7. Application to the analysis of genuine natural water samples

As a proof-of-concept, the developed method was put into practice for the determination of hydrophobic UV filters in real water samples. Six natural waters of different matrix composition (i.e. tap, river, lagoon, lake, delta and sea water) were spiked with 50 ng mL⁻¹ of the target UV filters and analyzed using external calibration. For the reasons alluded to above, the concentration of SSA was adjusted as appropriate to circumvent the interference from inorganic cations (i.e. 3.75 mM for surface waters and 7.5 mM for saline waters). The relative recoveries, defined as the ratio of the concentration found in spiked water samples to that determined from the extraction of an aqueous standard solution of the same concentration, are summarized in Table 2. The relative recovery rates for all compounds ranged between 86 and 109% in natural waters and 80–112% in saline waters, indicating the good accuracy of the method and the lack of matrix effects from samples generally representative of most environmental waters. A characteristic chromatogram of a fortified seawater sample is depicted in Fig. 6.

4. Conclusions

We have demonstrated the development of a new concept in sample preparation which exploits the in-situ formation of a supramolecular aggregate phase as a microextraction approach for the extraction of organic compounds from aqueous solutions. This aggregate phase is formed in-situ in the sample solution through ion association between two counter-ions, and then quantitatively collected as a thin film on a simple filter paper by vacuum filtration. In this manner, a dual extraction mechanism is effective that combines entrapment and mass transfer of the analytes from the aqueous to the supramolecular phase. The analytes are finally released by completely dissolving the film into an appropriate organic solvent. Using a supramolecular aggregate phase formed from the ion-pairing of CTAB and SSA and a series of organic UV filters as model analytes, we demonstrate that the method offers many advantages to sample preparation including simplicity, rapid analysis time, cost-effectiveness, as well as very satisfactory analytical features in terms of linearity of calibration curves, precision, accuracy and recoveries from surface and saline water samples. Considering the vast structural diversity of vesicle assemblies, the method holds great promise to the extraction of a large variety of analytes with different polarities. Importantly, the simplicity of the overall procedure and the low cost associated with its application render the method ideal for routine use.

Acknowledgements

Authors acknowledge the financial support of the University of Valencia (Project UV-INV-AE13-137567). J.L. Benedé thanks the Generalitat Valenciana for his predoctoral contract (ACIF/2012/073) and for his fellowship to work at the University of Ioannina (Greece), which allowed the achievement of this work.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.039>

References

- [1] E. Psillakis, N. Kalogerakis, Developments in liquid-phase microextraction, *TrAC: Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 565–574.
- [2] C. Nerin, J. Salafranca, M. Aznar, R. Batlle, Critical review on recent developments in solventless techniques for extraction of analytes, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 809–833.
- [3] A. Sarafraz-Yazdi, A. Amiri, Liquid-phase microextraction, *Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 1–14.
- [4] E.K. Paleologos, D.L. Giokas, M.I. Karayannis, Micelle-mediated separation and cloud-point extraction, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 426–436.
- [5] M. Moeder, F. Lange, Membrane-assisted liquid–liquid extraction trace analysis of pharmaceutical compounds in aquatic environments, *LC GC Europe* 20 (2007) 97–103.
- [6] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, Mass transfer characteristics of solvent extraction into a single drop at the tip of a syringe needle, *Anal. Chem.* 69 (1997) 235–239.
- [7] Y. He, H.K. Lee, Liquid phase microextraction in a single drop of organic solvent by using a conventional microsyringe, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4634–4640.
- [8] M. Rezaee, Y. Assadi, H.M. Milani, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1–9.
- [9] L. Ramos, Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques, *J. Chromatogr. A* 1221 (2012) 84–98.
- [10] H. Prosen, Applications of liquid-phase microextraction in the sample preparation of environmental solid samples, *Molecules* 19 (2014) 6776–6808.
- [11] A. Chisvert, The large ‘tentacles’ of liquid-phase microextraction, *J. Chromatogr. Sep. Tech.* 3 (2012), <http://dx.doi.org/10.4172/21577064.1000e108>
- [12] M. Baghdadi, F. Shemirani, In situ solvent formation microextraction based on ionic liquids: a novel sample preparation technique for determination of inorganic species in saline solutions, *Anal. Chim. Acta* 634 (2009) 186–191.
- [13] C. Yao, J.L. Anderson, Dispersive liquid–liquid microextraction using an in situ metathesis reaction to form an ionic liquid extraction phase for the preconcentration of aromatic compounds from water, *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 1491–1502.
- [14] S. Tang, H.K. Lee, Application of dissolvable layered double hydroxides as sorbent in dispersive solid-phase extraction and extraction by co-precipitation for the determination of aromatic acid anions, *Anal. Chem.* 85 (2013) 7426–7433.
- [15] M. Endo, K. Suzuki, S. Abe, Novel preconcentration technique for trace metal ions by aggregate film formation. Spectrophotometric determination of copper (II), *Anal. Chim. Acta* 364 (1998) 13–17.
- [16] I.P. Pozdnyakov, V.F. Plyusnin, V.P. Grivin, D.Y. Vorobyev, N.M. Bazhin, E. Vauthey, Photolysis of sulfosalicylic acid in aqueous solutions over a wide pH, *J. Photochem. Photobiol. A* 181 (2006) 37–43.
- [17] D. Grabner, L. Zhai, Y. Talmon, J. Schmidt, N. Freiberger, O. Glatter, B. Herzog, H. Hoffmann, Phase behavior of aqueous mixtures of 2-phenylbenzimidazole-5-sulfonic acid and cetyltrimethylammonium bromide: hydrogels, vesicles, tubules, and ribbons, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 2901–2908.
- [18] E.W. Kaler, A.K. Murthy, B.E. Rodriguez, J.A.N. Zasadzinski, Spontaneous vesicle formation in aqueous mixtures of single-tailed surfactants, *Science* 245 (1989) 1371–1374.
- [19] J. Hao, H. Hoffmann, K. Horbaschek, A novel cationic/anionic surfactant system from a zwitterionic alkyldimethylamine oxide and dihydroperfluorooctanoic acid, *Langmuir* 17 (2001) 4151–4160.
- [20] J. Hao, W. Liu, G. Xu, L. Zheng, H. Hoffmann, Vesicles from salt-free cationic and anionic surfactant solutions, *Langmuir* 19 (2003) 10635–10640.
- [21] L. Zhai, B. Herzog, M. Drechsler, H. Hoffmann, Novel nanotubes from a cationic surfactant and an anionic stiff aromatic counter-ion, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 17697–17701.
- [22] S.J. Candau, E. Hirsch, R. Zana, M. Delsanti, Rheological properties of semi-dilute and concentrated aqueous-solutions of cetyltrimethylammonium bromide in the presence of potassium-bromide, *Langmuir* 5 (1989) 1225–1229.
- [23] O. Pornsunthorntawe, S. Chavadej, R. Rujiravanit, Characterization and encapsulation efficiency of rhamnolipid vesicles with cholesterol addition, *J. Biosci. Bioeng.* 112 (2011) 102–106.
- [24] D.L. Giokas, G.Z. Tsogas, A.G. Vlessidis, M.I. Karayannis, Metal ion determination by flame atomic absorption spectrometry through reagentless coacervate phase separation-extraction into lamellar vesicles, *Anal. Chem.* 76 (2004) 1302–1309.
- [25] G.Z. Tsogas, D.L. Giokas, A.G. Vlessidis, N.P. Evmiridis, A single-reagent method for the spectiation of chromium in natural waters by flame atomic absorption spectrometry based on vesicular liquid coacervate extraction, *Spectrochim. Acta Part B* 59 (2004) 957–965.
- [26] G.Z. Tsogas, D.L. Giokas, E.K. Paleologos, A.G. Vlessidis, N.P. Evmiridis, Single-step coacervate-mediated preconcentration of metals and metal-chelates in supramolecular vesicular surfactant assemblies and determination by flame atomic absorption spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 537 (2005) 239–248.
- [27] N.A. Parisis, D.L. Giokas, A.G. Vlessidis, N.P. Evmiridis, Concentration of organic compounds in water with solid phase dispersion based on advesic modified silica prior to liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1097 (2005) 17–24.
- [28] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2342–2357.
- [29] Y. Tamba, H. Terashima, M. Yamazaki, A membrane filtering method for the purification of giant unilamellar vesicles, *Chem. Phys. Lipids* 164 (2001) 351–358.

- [30] C. Nicolini, A. Celli, E. Gratton, R. Winter, Pressure tuning of the morphology of heterogeneous lipid vesicles: a two-photon-excitation fluorescence microscopy study, *Biophys. J.* 91 (2006) 2936–2942.
- [31] D.L. Giokas, Q. Zhu, Q. Pan, A. Chisvert, Cloud point-dispersive μ -solid phase extraction of hydrophobic organic compounds onto highly hydrophobic core-shell $\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{C}$ magnetic nanoparticles, *J. Chromatogr. A* 1251 (2012) 33–39.
- [32] I.P. Román, A. Chisvert, A. Canals, Dispersive solid-phase extraction based on oleic acid-coated magnetic nanoparticles followed by gas chromatography-mass spectrometry for UV-filter determination in water samples, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2467–2475.
- [33] J.L. Benedé, A. Chisvert, A. Salvador, D. Sánchez-Quiles, A. Tovar-Sánchez, Determination of UV filters in both soluble and particulate fractions of seawaters by dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 812 (2014) 50–58.
- [34] J.L. Benedé, A. Chisvert, D.L. Giokas, A. Salvador, Development of stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles and its analytical application to the determination of hydrophobic organic compounds in aqueous media, *J. Chromatogr. A* 1362 (2014) 25–33.
- [35] N.I. Kapakoglou, D.L. Giokas, G.Z. Tsogas, A.G. Vlessidis, Coacervation of surface-functionalized polymerized vesicles derived from ammonium bromide surfactants. Application to the selective speciation of chromium in environmental samples, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9787–9796.
- [36] N.I. Kapakoglou, D.L. Giokas, G.Z. Tsogas, A.G. Vlessidis, Analytical application of surface-affinity polymerized vesicular membranes to trace metal analysis by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Microchim. Acta* 169 (2010) 99–107.
- [37] T.S. Davies, A.M. Ketner, S.R. Raghavan, Self-assembly of surfactant vesicles that transform into viscoelastic wormlike micelles upon heating, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 6669–6675.
- [38] D.L. Giokas, V.A. Sakkas, T.A. Albanis, D.A. Lampropoulou, Determination of UV-filter residues in bathing waters by liquid chromatography UV-diode array and gas chromatography mass spectrometry after micelle mediated extraction-solvent back extraction, *J. Chromatogr. A* 1077 (2005) 19–27.

SUPPORTING INFORMATION

In-situ suspended aggregate microextraction: a new sample preparation approach for the enrichment of organic compounds in aqueous solutions

Juan L. Benedé,^{a,b} Dimosthenis L. Giokas,^a Alberto Chisvert,^{b*} Amparo Salvador^b

^aDepartment of Chemistry, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece

^bDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Valencia, 46100 Burjassot, Spain

TABLE OF CONTENTS

Effect of organic solvents	S-2
Effect of pH	S-2
Effect of ionic strength and inorganic counter-ions	S-3
Effect of mixing time	S-3
Breakthrough volume profiles	S-4
Chemical structure and properties of the UV filters	S-5
Paper filters and technical specifications	S-6
Enhancement and preconcentration factors	S-7

* Corresponding authors. Email: dgiokas@cc.uoi.gr (D.L. Giokas) and alberto.chisvert@uv.es (A. Chisvert)

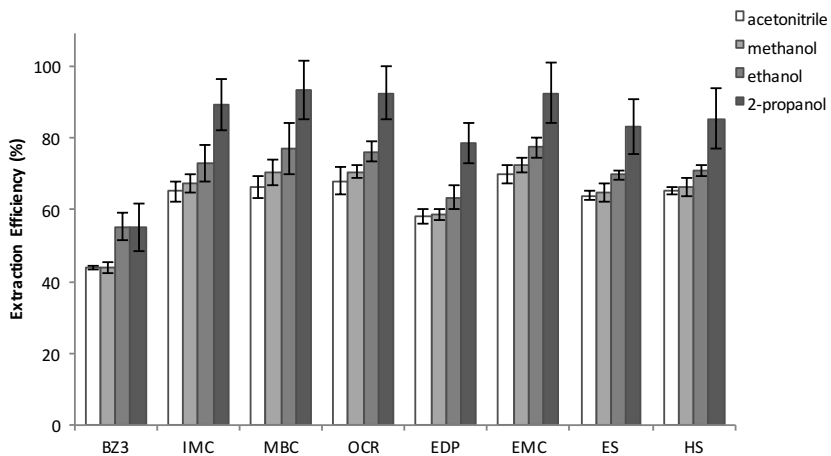


Figure S1. Influence of various polar organic solvents on the dissolution of UV filters.

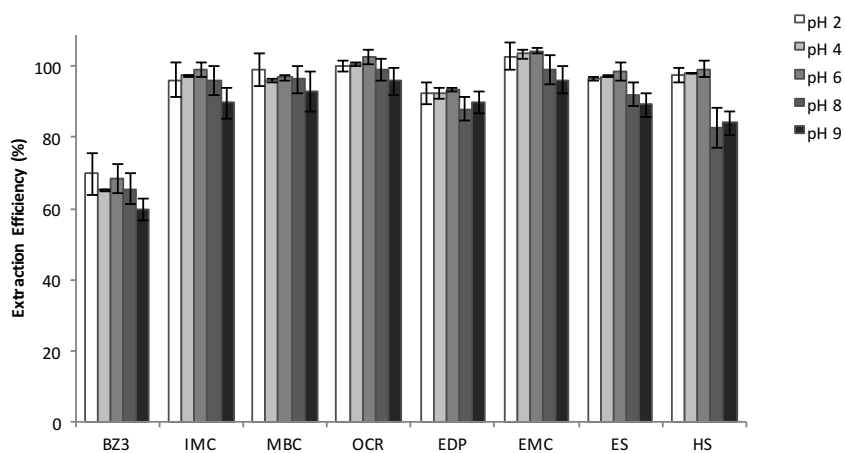


Figure S2. Extraction efficiencies as a function of pH.

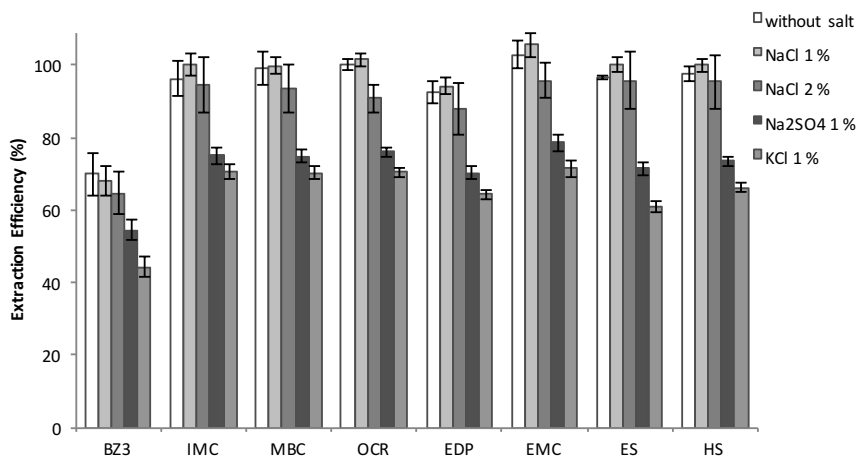


Figure S3. Effect of the ionic strength of the aqueous donor phase and inorganic counter-ions on the performance of the method.

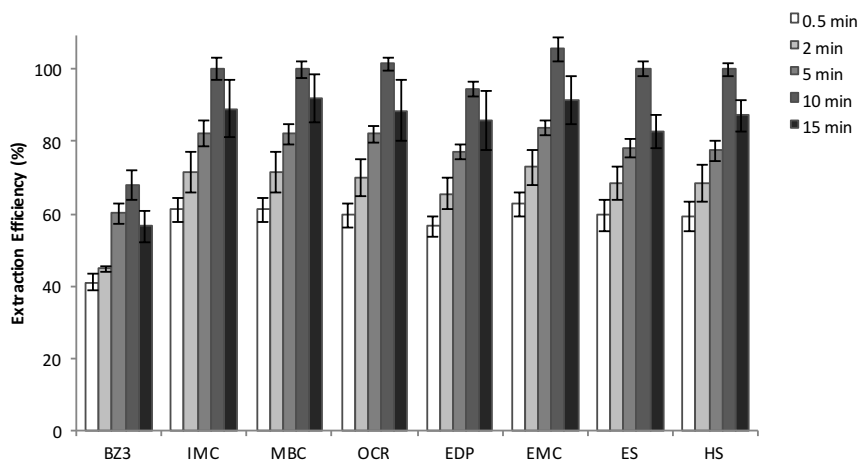


Figure S4. Variation of the extraction efficiencies at different mixing times.

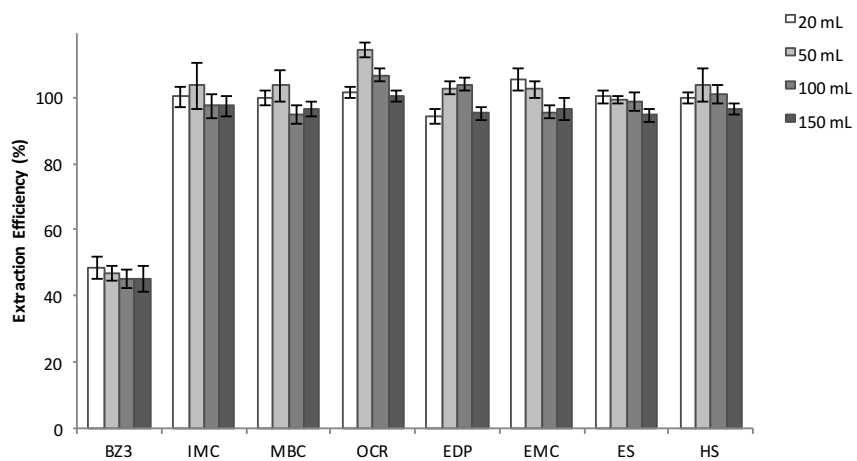
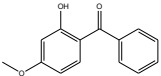
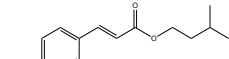
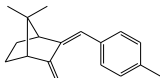
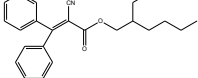
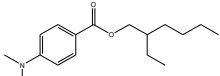
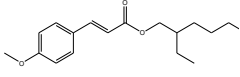
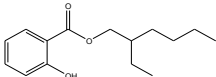
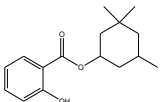
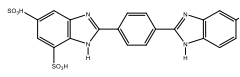
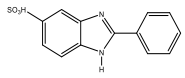
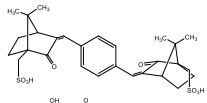
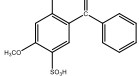
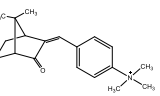


Figure S5. Breakthrough volume profile of the target UV filters with increasing sample volume.

Table S1. Chemical structure and relevant properties of the UV filters examined in this work. The last five compounds marked with an apteryx (*) were used only for the selectivity study.

UV filter	Chemical structure	Water solubility at 25°C (mg L ⁻¹) ^a	log K _{ow} ^a
Benzophenone-3 (BZ3)		68.6	3.15
Isoamyl 4-methoxycinnamate (IMC)		4.86	4.39
3-(4-methylbenzylidene) camphor (4-MBC)		0.19	5.92
Octocrylene (OCR)		3.80×10 ⁻³	6.88
Ethylhexyl dimethyl PABA (EDP)		0.19	5.77
2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate (EMC)		0.16	5.80
2-ethylhexyl salicylate (ES)		0.72	5.97
Homosalate (HS)		0.42	6.16
Phenyldibenzimidazole tetrasulphonate (PDT) *		1.23×10 ⁵	-6.79
Phenylbenzimidazole sulphonic acid (PBS) *		2.36×10 ⁴	-0.16
Terephthalidene dicamphor sulphonic acid (TDS) *		973.85	1.35
Benzophenone-4 (BZ4) *		2.03×10 ⁴	0.37
Camphor benzalkonium methosulfate (CBM) *		2.73×10 ⁴	-1.06

^a Software-calculated values from U.S.EPA EPI Suite v.4.1 and Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software v11.02 (for TDS only). Values vary depending on calculation method.

Table S2. Types of paper filters examined and technical specifications

Filter	Type	Basis weight (g m⁻²)	Pore size (µm)	Thickness (µm)	Flow rate (sec 100 mL⁻¹)
Millipore AP40	Glass fiber	65	0.7	475	14.4
Whatman No. 1	Qualitative	87	11	180	150
Whatman No. 40	Qualitative, ashless	95	8	210	240
Whatman No. 41	Quantitative, ashless	85	20-25	220	54
Whatman No. 43	Quantitative, ashless	95	16	220	155
Whatman No. 50	Quantitative, hardened, low ash	97	2.7	115	2685

Table S3. Enrichment factors (EFs) determined from the extraction of $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ of UV filters from aqueous standard solutions of variable volume.

UV filter	20 mL	50 mL	100 mL	150 mL
	Enrichment factors (EFs) ^a			
BZ3	5	12	23	34
IMC	10	26	48	73
MBC	10	26	48	72
OCR	10	29	53	75
EDP	9	26	53	71
EMC	11	26	48	72
ES	10	25	49	71
HS	10	26	50	72
Maximun expected EF	10	25	50	75

^a EF= ratio between the concentration of the compound after extraction (C_{ext}) to the initial concentration in the aqueous donor phase (C_0)

Development of stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles and its analytical application to the determination of hydrophobic organic compounds in aqueous media

Publicado en **Journal of Chromatography A** 1362 (2014) 25-33



Development of stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles and its analytical application to the determination of hydrophobic organic compounds in aqueous media



Juan L. Benedé^a, Alberto Chisvert^{a,*}, Dimosthenis L. Giokas^{b,**}, Amparo Salvador^a

^a Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universitat de València, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

^b Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 June 2014

Received in revised form 31 July 2014

Accepted 6 August 2014

Available online 15 August 2014

Keywords:

Dispersive solid phase extraction

Magnetic nanoparticles

Seawater analysis

Stir bar sorptive extraction

Trace analysis

UV filters

ABSTRACT

A novel microextraction technique combining the principles of stir bar sorptive extraction (SBSE) and dispersive micro-solid phase extraction (D μ SPE) is presented. The main feature of the method is the use of a neodymium-core stirring bar physically coated with a hydrophobic magnetic nanosorbent. Depending on stirring speed, the magnetic sorbent either acts as a coating material to the stir bar, thus affording extraction alike SBSE, or as a dispersed nanosorbent medium for the collection and extraction of the target analytes, in close analogy to D μ SPE. Once the stirring process is finished, the strong magnetic field of the stir bar prevails again and rapidly retrieves the dispersed MNPs. Alike SBSE, the stir bar is collected and the analytes are back-extracted by liquid desorption into an appropriate organic solvent, which is used for analysis. This enrichment technique is easy to prepare since it does not require special surface modification procedures, uses low volumes of non-toxic organic solvents and most importantly imbues SBSE with additional functionalities against a wide range of analytes (since nanosorbents with various coatings can be employed) while it affords additional merits to D μ SPE in terms of extraction and post-extraction treatment. As proof-of-concept this new approach was applied to the determination of organic UV filters in seawater samples using oleic acid-coated cobalt ferrite (CoFe₂O₄/oleic acid) magnetic nanoparticles as sorbent material. The method showed good analytical features in terms of linearity, enrichment factors (11–148), limits of detection (low ng mL⁻¹), intra- and inter-day repeatability (RSD < 11%) and relative recoveries (87–120%).

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Sorption-based microextraction techniques such as solid-phase microextraction (SPME) [1], stir bar sorptive extraction (SBSE) [2] and dispersive solid phase extraction (DSPE) [3] constitute remarkable improvements of the traditional solid phase extraction (SPE) technique. They offer a wide variety of advantages such as simplicity, lower turnaround times, higher sample throughput, low sample volume requirements, use of small volumes of environmental benign and user friendly solvents, high degree of automation, etc. [4–9]. Although different in their application, all these techniques rely on the same principle: the trapping of solutes on a

suitable sorbent which in turn is controlled by the partitioning coefficient of the solutes between the sorbent phase and the aqueous phase [4]. In SBSE, the sorption of the analytes takes place, usually, onto a film of polydimethylsiloxane (PDMS) which is coated on a magnetic stir bar whereas in SPME the analytes are adsorbed onto a fused-silica fiber coated with an appropriate sorbent layer. On the other hand, in DSPE analytes are adsorbed on the surface of micro or nanometer sized particles which are dispersed into the donor phase thus offering higher contact area.

Each of these techniques offer unique advantages [10–13] but they also have some drawbacks. SPME is a simple, high screening/high throughput method but it encounters problems related to robustness and reproducibility due to aging or sensitivity of the fiber. On the other hand, SBSE offers improved extraction efficiencies as compared to SPME, because the surface area of the stir bar is higher than that of the SPME fiber. However, only a few types of stir bar coatings are available, which limits its application to certain kinds of analytes. For this reason, over the last years a large amount

* Corresponding author. Tel.: +34 96 354 49 00; fax: +34 96 354 44 36.

** Corresponding author. Tel.: +30 26510 08402; fax: +30 26510 08781.

E-mail addresses: alberto.chisvert@uv.es (A. Chisvert), dgiokas@cc.uoi.gr (D.L. Giokas).

of research has been focused on the development of new coatings with high adsorption capacity, good regenerability and reusability [14,15], along with the development of novel approaches such as adsorptive microextraction techniques [16–18]. Nevertheless, extraction time is still long which reduces sample throughput. DSPE alleviates these drawbacks because dispersion increases considerably the contact area between the sorbent and the target compounds, thus affording reduced equilibrium time and improved extraction efficiencies [19]. However, the collection and post-extraction handling of the dispersed sorbent material is a multi-step and sometimes arduous undertaking [20–22] which jeopardizes the reproducibility of the analysis and the recovery of the analytes.

In the last years, the introduction of magnetic nanoparticles to DPSE procedures has offered a significant simplification along with enhanced enrichment factors due to the large surface-to-volume ratios of nanometer sized sorbents. In contrast to their non-magnetic analogs, magnetic nanoparticles can effectively be isolated by an external magnetic field without residual magnetization [23,24]. In this manner, the sorbent is rapidly and quantitatively retrieved and the target analytes can easily be eluted by means of liquid desorption with an appropriate solvent [25]. Additionally, MNPs can be conveniently coated with a large variety of chemicals (e.g. surfactants, polymers, highly hydrophobic substances, etc.) which confers multifunctional properties that enable their effective application in a large variety of different analytes (anions, cations, polar and non-polar organic compounds, etc.) [26,27]. To our knowledge, almost all studies employing magnetic nanosorbents [28–32] use external means (e.g. agitation by vortex or ultrasounds) to accomplish efficient dispersion of the MNPs since in the presence of a magnetic or metallic stirring bar, part of MNPs can adhere on it thus complicate both the collection and the elution procedure. Therefore, these external means could become impractical in case of having high volumes of sample to agitate unless specialized equipment is available (large vortex agitators, potent ultrasound sources, etc.).

In this work we introduce a new combined microextraction method relying on the principles of SBSE and D μ SPE mediated by magnetic nanoparticles, termed as stir bar sorptive-dispersive microextraction (SBSDD μ E). The new method involves the convenient coating of neodymium-core magnetic stir bars with MNPs by means of physical methods (i.e. magnetism). Upon immersing the coated magnetic bar into a sample solution and as long as the stirring rate is maintained at low speed, magnetism is strong enough to retain MNPs resisting rotational (centrifugal) forces. Therefore, extraction is accomplished in a manner similar to SBSE. As stirring rate increases, the MNPs are dispersed into the aqueous solution, in close analogy to DSPE. When the stirring process is over, the strong magnetic field of the stir bar prevails again and rapidly retrieves the dispersed MNPs, without the requirement of an additional external magnetic field. In this manner, this enrichment technique takes into account the benefits provided by the stirring process and the dispersion of MNPs simultaneously. To prove its utility, eight of the most popular organic UV filters were extracted from aqueous sample solutions using the lipophilic oleic acid-coated cobalt ferrite (CoFe₂O₄@oleic acid) MNPs [28] as sorbent. The applicability of the method was examined in genuine seawater samples with satisfactory analytical features.

2. Experimental

2.1. Reagents

All reagents were procured from major suppliers. 2-Ethylhexyl salicylate (ES) 99%, 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (benzophenone-3 (BZ3)) 98%, 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate

(EMC) 99.8% and 2-ethylhexyl 4-(dimethylamino)benzoate (ethylhexyl dimethyl PABA (EDP)) 98% from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany); 3,3,5-trimethylcyclohexyl salicylate (homosalate (HS)) >98% from Merck (Darmstadt, Germany); isoamyl 4-methoxycinnamate (IMC) 99.3% from Haarmann and Reimer Paret del Vallés, Spain; 3-(4'-methylbenzylidene)camphor (MBC) 99.7% from Guinama S.L. (Valencia, Spain) and 2-ethylhexyl 2-cyano-3,3-diphenylacrylate (octocrylene (OCR)) >98% from F. Hoffman-La Roche Ltd. (Basel, Switzerland) were used as standards. The chemical structure and some relevant information are given in Table S1. A stock solution containing 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ all eight UV filters was prepared in ethanol. Working solutions (100–400 ng mL^{-1} for BZ3 and 10–50 ng mL^{-1} for the other UV filters), were prepared by appropriate dilution with doubly distilled water. Cobalt(II) chloride hexahydrate (CoCl₂·6H₂O) and iron(III) chloride hexahydrate (FeCl₃·6H₂O) were purchased from Acros Organics (New Jersey, USA) while oleic acid (90%) was obtained from Sigma–Aldrich. HPLC-grade ethanol (EtOH), n-hexane (96%) and toluene (analytical-grade) were procured from Scharlau (Barcelona, Spain). The deionized water used in this work was obtained from a Nanopure II water purification system provided by Barnstead (Boston, MA, USA). Sodium chloride (99.5%, analytical grade) and ortho-phosphoric acid (85%, analytical grade) that were used as ionic strength and pH regulators, respectively, were purchased from Scharlau.

2.2. Genuine water samples

Prior to sampling all glassware was thoroughly cleaned by soaking in HNO₃:H₂O (50:50) and drying at 220 °C. Seawater samples were collected from the coastline of Western Mediterranean Sea: Santa Ponsa beach (Majorca Island, Spain) (Sample 1), Malvarrosa beach (Valencia, Spain) and Pinedo beach (Valencia, Spain) (Samples 2 and 3, respectively) in May 2013. All samples were collected in 1 L topaz glass bottles and stored in the dark at 4 °C. Before analysis the samples were left to reach room temperature.

To determine the total content of UV filters in the seawater samples (i.e. soluble fraction plus particulate fraction), 25 mL of unfiltered water samples were sonicated for 15 min to lixiviate the UV filters from particles following the procedure developed in our previous work [33].

2.3. Apparatus

An Agilent 1220 Infinity LC system comprised of a degasser, a quaternary pump, an autosampler, a thermostated column oven and a UV/vis detector was employed throughout the study. Separations were carried out in a LiChrospher® 100 RP-18 (12.5 cm length, 4 mm I.D., 5 μm particle size) column (Merck). A Basic 20 pH meter from Crison (Alella, Spain) was used for the adjustment of solutions pH. Magnetic stirrer hotplates (Stuart Scientific, Staffordshire, United Kingdom) were used as stirrers in the extraction procedure. A miVac DUO concentrator with miVac SpeedTrap from GeneVac (Ipswich, United Kingdom) was used for mild evaporation of the elution solvent (i.e. ethanol) to dryness.

2.4. Synthesis of cobalt ferrite coated with oleic acid nanoparticles

The synthesis of the magnetic nanoparticles was performed by wet chemical coprecipitation [34] by mixing 100 mL of a 0.4 M FeCl₃ aqueous solution and 100 mL of a 0.2 M CoCl₂ aqueous solution. Then, 100 mL of a 3 M sodium hydroxide aqueous solution were added dropwise under continuous stirring. Finally, 2 mL of oleic acid were added and the reaction mixture was heated to 80 °C for 1 h. The black precipitate product was slowly cooled to

room temperature and the MNPs were washed several times with ultrapure water and ethanol for removing the excess of oleic acid from the solution. Finally, the precipitate was dried overnight at 100 °C and pulverized into a black fine powder. The so-produced MNPs were 5–20 nm in size with a surface area of 97.3 m² g⁻¹. Detailed characterization of the MNPs has been reported elsewhere [28].

2.5. Preconditioning and physical coating of neodymium magnetic stirring bars

For the preconditioning and physical modification process, 100 mg of dry MNPs were dispersed in 10 mL of deionized water contained in a glass vial. The stir bars were introduced into the vials and stirred for 10 min at medium/high stirring rate to solvate the nanoparticles. By stopping the stirrer, the nanoparticles were strongly attracted by neodymium, that was located at the edges of the bars, leaving the middle area clean. Then, the coated stir bars were removed from the solutions with the aid of plastic thumb forceps.

2.6. SBSD μ E extraction procedure

A coated stir bar was immersed in 25 mL aqueous standard or sample solutions and stirred for 20 min at room temperature. Medium/high stirring speed was used to detach nanoparticles from the stir bars and enable their dispersion into the solution facilitating the adsorption of the analytes. By halting stirring, nanoparticles rapidly returned on the stir bars. After nanoparticles were collected, the stir bars were removed with plastic thumb forceps, gently rinsed with deionized water and placed into a vial containing 2.5 mL of ethanol for 5 min accompanied by mild agitation to accomplish liquid desorption of the analytes. The extracts were routinely filtered through 0.45 μ m nylon membrane filters and transferred into glass tubes, evaporated to dryness at room temperature with a vacuum concentration and reconstituted with 100 μ L of mobile phase (a mixture of EtOH:acetic acid 1% 70:30 (v/v)). Fig. 1 shows a schematic diagram of the experimental procedure.

After each use, the coated stir bars were sequentially soaked and stirred for 5 min in deionized water, ethanol and acetone to prevent possible background contamination and then finally dried.

2.7. LC-UV analysis

Twenty microliters of each extract were injected into the liquid chromatograph. Separation of the UV filters was carried out at 1 mL min⁻¹ by isocratic elution using EtOH and acetic acid 1% at a mixing ratio of 70:30 (v/v). The column temperature was maintained constant at 45 °C. Monitoring of peak area was performed at 313 nm for all the target analytes. Calibration curves were constructed by plotting the peak area of the target analyte versus concentration.

3. Results and discussion

3.1. Study of the experimental variables involved in the SBSD μ E procedure

In order to obtain the highest enrichment factors, the coating of the nanosorbent material and the amount of MNPs, the extraction time, the stirring rate, the pH and the ionic strength of the donor phase were optimized. The variables that could affect the desorption process such as the desorption solvent and desorption time were also investigated. In all experiments the extraction efficiencies (EE%) were evaluated by extracting an aqueous standard solution containing 200 ng mL⁻¹ of each analyte. All studies were carried out in triplicate.

3.1.1. Coating of magnetic nanoparticles

The selection of the nanosorbent material is a crucial parameter for the extraction of the target analytes. The selection of CoFe₂O₄@oleic acid MNPs was based on our previous work [28], in which different kinds of MNPs were evaluated for the extraction and concentration of organic UV filters. The lipophilic (oleic acid) coating of these MNPs was proven very efficient for the partitioning of organic UV filters and in agreement with the polarity of each compound (i.e. less polar analytes with log P_{ow} > 5.4 were extracted more efficiently than more polar analytes with log P_{ow} < 4.4).

3.1.2. MNPs amount

The mass transfer of the analytes from the donor to the acceptor phase strongly depends on the ratio between the sorbent area and the volume of the aqueous solution. To investigate this variable,

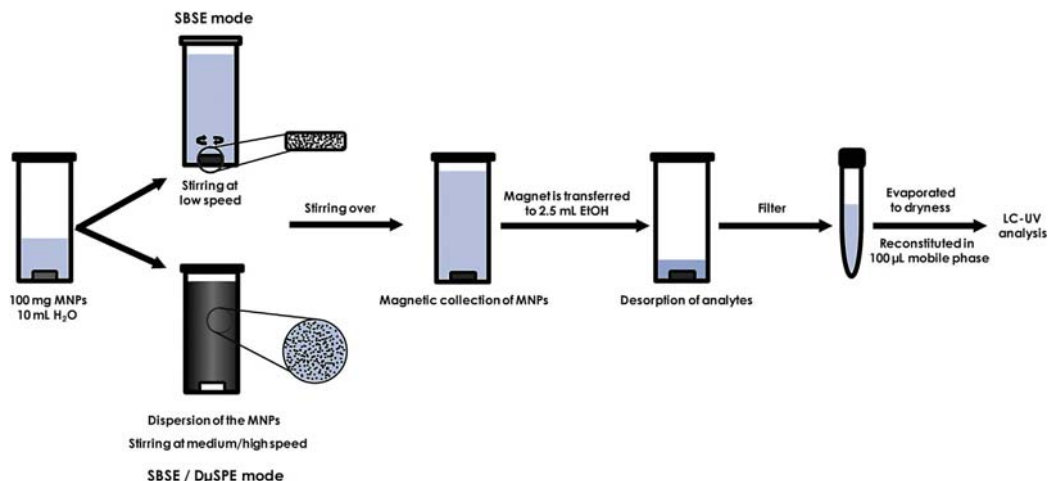


Fig. 1. Schematic diagram of the proposed method.

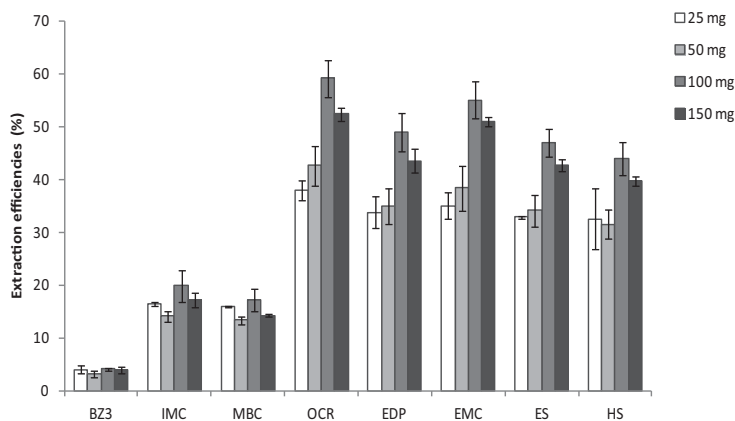


Fig. 2. Effect of the MNPs amount on the extraction efficiencies. Extraction conditions: 25 mL sample volume adjusted to pH 4 and to 1% NaCl, 60 min extraction time. Desorption conditions: 5 mL EtOH, 5 min desorption time.

the CoFe_2O_4 @oleic acid MNPs amount was varied in the range of 25–150 mg. As can be seen in Fig. 2, the EEs improve as the amount of MNPs is increased up to 100 mg but gradually attenuate at higher amounts. This observation is most likely due to the excess MNPs not being effectively desorbed due to inadequate volume of the elution solvent. Similar results have been observed in previous studies with magnetic nanosorbents [35,36]. Therefore, 100 mg was selected for further experiments.

3.1.3. Extraction time

The importance of extraction time on the EEs of the target compounds was investigated in the range of 5–60 min. The optimum extraction was accomplished within 20 min, while longer contact times had a negative effect on the EEs (Fig. 3). The short extraction time, compared to traditional SBSE methods, can be attributed to the dispersion of MNPs in the aqueous donor phase thus capitalizing on the large surface area, the short diffusion route and absence of internal diffusion resistance of the MNPs [35,37]. At prolonged contact time, a shift of the equilibrium in the opposite direction may

be the reason why a reduction in the apparent EEs was observed (Fig. 3). Similar observations have been attained for various magnetic nanosorbent materials and analytes [35,38,39]. Based on these results, an extraction of 20 min was adopted.

3.1.4. Stirring rate

The stirring rate is an important parameter in the developed method because it controls the extraction mode. At lower stirring rate, MNPs remain on the surface of the magnet since rotational forces are not strong enough to overcome the magnetic field responsible for their attachment on the surface of the stir bars. Thus, extraction is feasible in a manner analogous to SBSE. As stirring rate is increased the rotational forces surpass magnetic field and MNPs disperse into the bulk sample; therefore, extraction is accomplished by $\text{D}\mu\text{SPE}$. When stirring rate is reduced or halted, the MNPs return again on the surface of the magnets thus facilitating their collection and post-extraction treatment (i.e. elution of analytes), by following the steps associated with analyte elution in SBSE. Therefore, either SBSE or combined SBSE/ $\text{D}\mu\text{SPE}$ can be

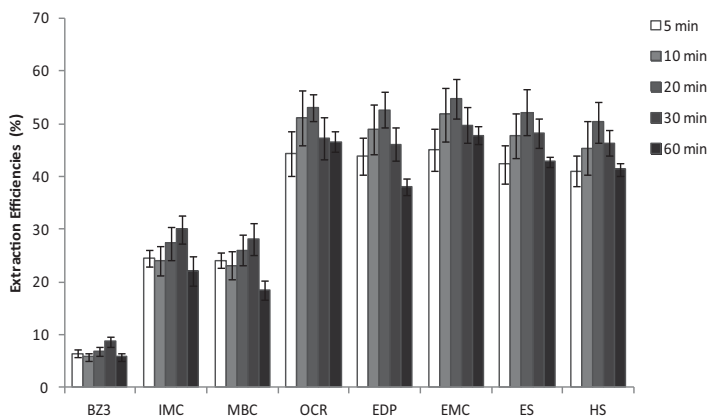


Fig. 3. Effect of the extraction time on the performance of the method. Extraction conditions: 25 mL sample volume adjusted to pH 4 and to 1% NaCl, 100 mg MNPs. Desorption conditions: 5 mL EtOH, 5 min desorption time.

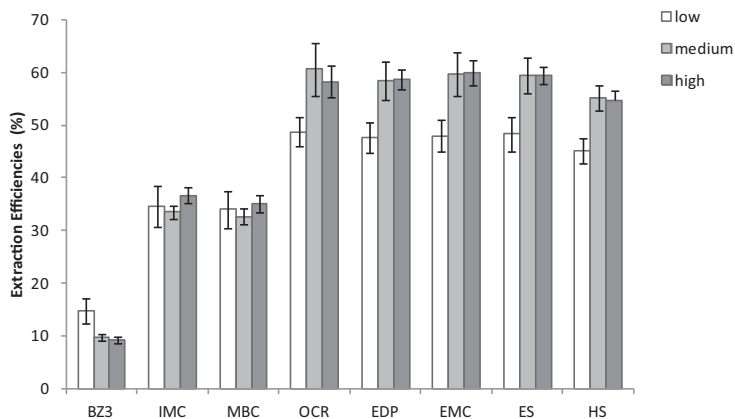


Fig. 4. Effect of the stirring rate on the SBSDD μ E method. Extraction conditions: 25 mL sample volume adjusted to pH 4 and to 1% NaCl, 100 mg MNPs, 20 min extraction time. Desorption conditions: 5 mL EtOH, 5 min desorption time.

selected only by regulating the stirring rate. The results at three stirring rates (low, medium and high) and for a given extraction time (20 min) suggest that extraction is feasible in both modes (Fig. 4). Less polar species are favorably extracted when MNPs are dispersed into the solution (i.e. at medium and high stirring rates), whereas for more polar compounds dispersion of MNPs offers no significant improvement. Therefore, extractions were carried out at medium/high stirring rates.

3.1.5. pH

Due to the non-polar nature of the oleic acid coating of the MNPs, non-ionized forms of the analytes should be preferably extracted. In this sense, the effect of pH on the extraction of the target UV filters was evaluated in the range of 2–8 using o-phosphoric acid and/or sodium hydroxide as pH regulators. In concurrence with our previous findings, acidic pH values favor the extraction of UV filters in hydrophobic extraction mediums, while at higher pH, increased hydrolysis of the compounds may have contributed to the

declining extraction yield [28,40,41]. Based on these results (Fig. 5), all experiments were conducted at a pH value of 4.

3.1.6. Ionic strength

Regulation of ionic strength is commonly used in many extraction methods in order to enhance the enrichment performance, by decreasing the solubility of the analytes in the aqueous phase and enhancing their partitioning onto the sorbent or organic phase (salting-out effect). The addition of various salts (NaCl, NaNO₃ and KCl) at a concentration of 1% provided clear evidence of improvement in the extraction efficiency of all compounds but no differences were observed among different salts. Therefore, NaCl was selected. As can be seen in Fig. 6, an increase in NaCl concentration to 5% improved the extraction for the more polar analytes. On the contrary, at 10% NaCl, the increase in the viscosity of the aqueous phase deterred the mass transfer process and as a result the extraction efficiencies of all compounds were reduced. Moreover, at 10% NaCl bubbles were observed on the magnets which

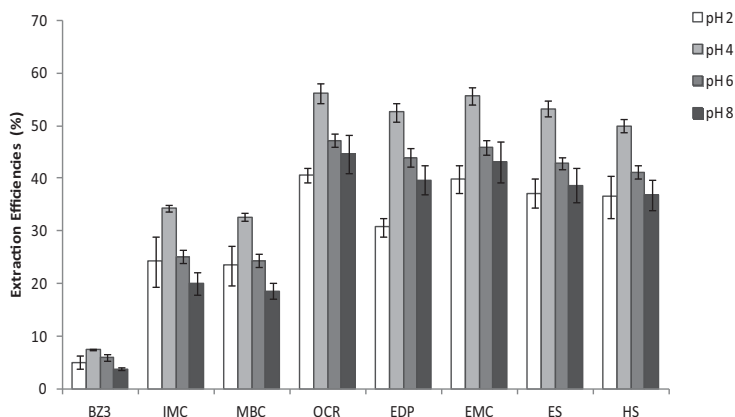


Fig. 5. Influence of the pH of the donor phase on the extraction of the target UV filters. Extraction conditions: 25 mL sample volume adjusted to different pH values and to 1% NaCl, 100 mg MNPs, 20 min extraction time. Desorption conditions: 5 mL EtOH, 5 min desorption time.

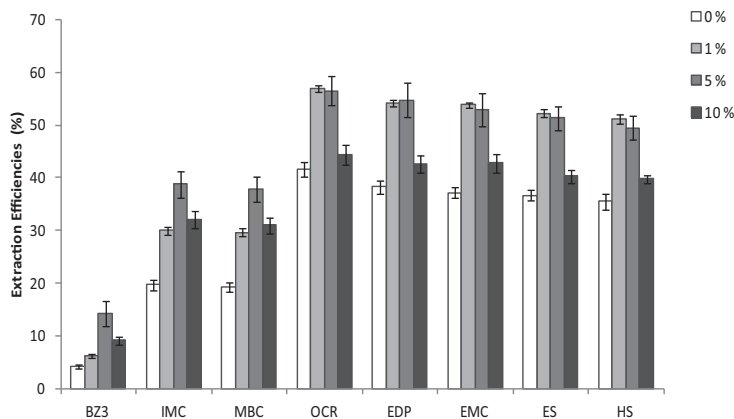


Fig. 6. Effect of the ionic strength of the donor phase on the extraction process. Extraction conditions: 25 mL sample volume adjusted to pH 4 and to different ionic strength values with NaCl, 100 mg MNPs, 20 min extraction time. Desorption conditions: 5 mL EtOH, 5 min desorption time.

may have reduced the effective contact area of MNPs. Based on these results, ionic strength was regulated at 5% NaCl (w/v).

3.1.7. Addition of an organic modifier

The adsorption of analytes on the vial glass walls (“wall-effect”) is a phenomenon known to contribute to the decreased sorption efficiency of the analytes on the sorbent surface, particularly for the most hydrophobic compounds [17]. To evaluate the importance of this phenomenon in our method, assays were performed with increasing ethanol concentrations (1–5%) as organic modifier. By comparing the extraction efficiency of all compounds in the presence and absence of an organic modifier, we observed that EEs decreased for all compounds, the most potent effect being observed for the most hydrophilic compounds (not shown). Therefore, we

inferred that the addition of an organic solvent increases the solubility of the target compounds in the aqueous medium. According to these results, the addition of an organic modifier was no longer considered.

3.1.8. Optimization of the desorption process

The desorption of the analytes from the surface of the nanoparticle sorbent is central to the performance of the method. The elution of analytes with solvents of different polarity such as ethanol, toluene and hexane revealed that the highest EEs values were obtained with ethanol while water immiscible solvents produced significantly lower results (Fig. 7a). These differences may be accredited to the fact that the nanoparticles were hydrated (water wet) therefore when the magnets were immersed into toluene or

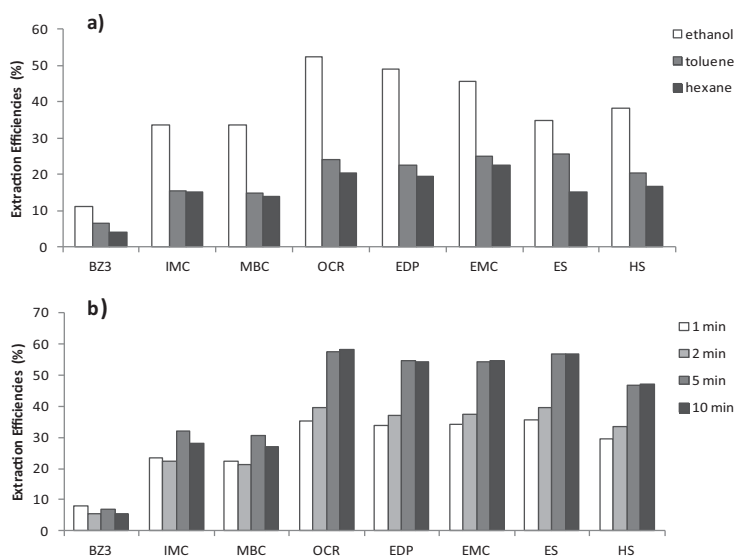


Fig. 7. Effect of the desorption conditions on the extraction efficiencies: (a) desorption solvent and (b) desorption time. Extraction conditions: 25 mL sample volume adjusted to pH 4 and to 1% NaCl, 100 mg MNPs, 20 min extraction time.

- the determination of clofentzine and chlorfenapyr in environmental water samples, *Analyst* 138 (2013) 6834–6843.
- [32] A.A. Asgharinezhad, N. Mollazadeh, H. Ebrahimzadeh, F.M.N. Shekari, Magnetic nanoparticles based dispersive micro-solid-phase extraction as a novel technique for coextraction of acidic and basic drugs from biological fluids and waste water, *J. Chromatogr. A* 1338 (2014) 1–8.
- [33] J.L. Benedé, A. Chisvert, A. Salvador, D. Sánchez-Quiles, A. Tovar-Sánchez, Determination of UV filters in both soluble and particulate fractions of seawaters by dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 812 (2014) 50–58.
- [34] K. Maaz, A. Mumtaz, S.K. Hasanain, A. Ceylan, Synthesis and magnetic properties of cobalt ferrite (CoFe₂O₄) nanoparticles prepared by wet chemical route, *J. Magn. Magn. Mater.* 308 (2007) 289–295.
- [35] J. Zhang, M. Li, M. Yang, B. Peng, Y. Li, W. Zhou, H. Gao, R. Lu, Magnetic retrieval of ionic liquids: fast dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of benzoyleurea insecticides in environmental water samples, *J. Chromatogr. A* 1254 (2012) 23–29.
- [36] Z. Xiong, L. Zhang, R. Zhang, Y. Zhang, J. Chen, W. Zhang, Solid-phase extraction based on magnetic core–shell silica nanoparticles coupled with gas chromatography–mass spectrometry for the determination of low concentration pesticides in aqueous samples, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 2430–2437.
- [37] H. Bagheri, A. Roostaie, M.Y. Baktash, A chitosan–polypyrrole magnetic nanocomposite as μ -sorbent for isolation of naproxen, *Anal. Chim. Acta* 816 (2014) 1–7.
- [38] S. Xu, C. Jiang, Y. Lin, L. Jia, Magnetic nanoparticles modified with polydimethylsiloxane and multi-walled carbon nanotubes for solid-phase extraction of fluoroquinolones, *Microchim. Acta* 179 (2012) 257–264.
- [39] K.M. Giannoulis, G.Z. Tsogas, D.L. Giokas, A.G. Vlessidis, Dispersive micro-solid phase extraction of ortho-phosphate ions onto magnetite nanoparticles and determination as its molybdenum blue complex, *Talanta* 99 (2012) 62–68.
- [40] D.L. Giokas, V.A. Sakkas, T.A. Albanis, Determination of residues of UV filters in natural waters by solid-phase extraction coupled to liquid chromatography–photodiode array detection and gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1026 (2004) 289–293.
- [41] D.L. Giokas, V.A. Sakkas, T.A. Albanis, D.A. Lampropoulou, Determination of UV-filter residues in bathing waters by liquid chromatography UV-diode array and gas chromatography–mass spectrometry after micelle mediated extraction–solvent back extraction, *J. Chromatogr. A* 1077 (2005) 19–27.
- [42] P. Yu, Q. Wang, X. Zhang, X. Zhang, S. Shen, Y. Wang, Development of superparamagnetic high-magnetization C18-functionalized magnetic silica nanoparticles as sorbents for enrichment and determination of methylprednisolone in rat plasma by high performance liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta* 678 (2010) 50–55.
- [43] I. Tarazona, A. Chisvert, Z. León, A. Salvador, Determination of hydroxylated benzophenone UV filters in sea water samples by dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4771–4778.
- [44] M. Pedrouzo, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull, Stir–bar-sorptive extraction and ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for simultaneous analysis of UV filters and antimicrobial agents in water samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 2833–2889.
- [45] K.T.N. Nguyen, C. Scapolla, M. Di Carro, E. Magi, Rapid and selective determination of UV filters in seawater by liquid chromatography–tandem mass spectrometry combined with stir bar sorptive extraction, *Talanta* 85 (2011) 2375–2384.
- [46] E. Magi, M. Di Carro, C. Scapolla, K.T.N. Nguyen, Stir bar sorptive extraction and LC–MS/MS for trace analysis of UV filters in different water matrices, *Chromatographia* 75 (2012) 973–982.
- [47] E. Magi, C. Scapolla, M. Di Carro, P. Rivoaro, K.T.N. Nguyen, Emerging pollutants in aquatic environments: monitoring of UV filters in urban wastewater treatment plants, *Anal. Methods* 5 (2013) 428–433.
- [48] M. Kawaguchi, R. Ito, H. Honda, N. Endo, N. Okanouchi, K. Saito, Y. Seto, H. Nakazawa, Simultaneous analysis of benzophenones sunscreen compounds in water sample by stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1200 (2008) 260–263.
- [49] R. Rodil, M. Moeder, Development of a method for the determination of UV filters in water samples using stir bar sorptive extraction and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1179 (2008) 81–88.
- [50] R. Rodil, J.B. Quintana, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, Multiclass determination of sunscreen chemicals in water samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 80 (2008) 1307–1315.

Determination of ultraviolet filters in bathing waters by stir bar sorptive-dispersive microextraction coupled to thermal desorption - gas chromatography - mass spectrometry

Publicado en **Talanta** 147 (2016) 246-252



Determination of ultraviolet filters in bathing waters by stir bar sorptive–dispersive microextraction coupled to thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry

Juan L. Benedé^a, Alberto Chisvert^{a,*}, Dimosthenis L. Giokas^b, Amparo Salvador^a

^a Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

^b Department of Chemistry, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 May 2015

Received in revised form

21 September 2015

Accepted 22 September 2015

Available online 26 September 2015

Keywords:

Environmental waters

Magnetic nanoparticles

Stir bar sorptive–dispersive microextraction

Thermal desorption

Trace analysis

Ultraviolet filters

ABSTRACT

In this work, a new approach that combines the advantages of stir bar sorptive extraction (SBSE) and dispersive solid phase extraction (DSPE), i.e. stir bar sorptive–dispersive microextraction (SBSD_μE), is employed as enrichment and clean-up technique for the sensitive determination of eight lipophilic UV filters in water samples. The extraction is accomplished using a neodymium stir bar magnetically coated with oleic acid-coated cobalt ferrite magnetic nanoparticles (MNPs) as sorbent material, which are detached and dispersed into the solution at high stirring rate. When stirring is stopped, MNPs are magnetically retrieved onto the stir bar, which is subjected to thermal desorption (TD) to release the analytes into the gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) system. The SBSDB_μE approach allows for lower extraction time than SBSE and easier post-extraction treatment than DSPE, while TD allows for an effective and solvent-free injection of the entire quantity of desorbed analytes into GC–MS, and thus achieving a high sensitivity. The main parameters involved in TD, as well as the extraction time, were evaluated. Under the optimized conditions, the method was successfully validated showing good linearity, limits of detection and quantification in the low ng L^{−1} range and good intra- and inter-day repeatability (RSD < 12%). This accurate and sensitive analytical method was applied to the determination of trace amounts of UV filters in three bathing water samples (river, sea and swimming pool) with satisfactory relative recovery values (80–116%).

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ultraviolet (UV) filters are organic compounds that absorb or reflect solar radiation in both UVA and UVB ranges, and are added to sunscreens and other cosmetics in order to prevent or minimize the harmful effects of this deleterious radiation [1]. Nevertheless, due to undesired dermatological and systemic side-effects, these compounds are regulated by legislation in order to ensure consumers' health [1–3].

The large use of cosmetics containing these compounds has led to their release into the aquatic environment either by direct (e.g. swimming) or indirect sources (e.g. wastewater), and thus accumulated in environmental waters and living organisms [4]. There are several studies showing that some of these UV filters may exert a negative impact in the flora and fauna of the aquatic ecosystem even at low concentration levels [5–8]. Hence, from an environmental point of view, it is interesting to develop sensitive and

selective analytical methods to monitor their concentration at trace levels.

In order to improve the method sensitivity and/or eliminate some potentially interfering compounds, extraction techniques are commonly applied. For this purpose, different liquid-phase microextraction techniques, such as single drop microextraction (SDME) [9,10], membrane-assisted liquid–liquid microextraction (MALLE) [11] and dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) or any of its modifications [12–16] have been employed for the determination of UV filters in environmental water samples. On the other hand, different sorbent-based extraction techniques such as solid-phase microextraction (SPME) [17,18], stir-bar sorptive extraction (SBSE) [19–23] and dispersive solid-phase extraction (DSPE) [24] have also been used for the extraction of UV filters from aquatic samples. These sorptive techniques minimize sample volume requirements and manipulation, as well as the volume of organic solvents compared to traditional solid-phase extraction [25–28]. Over the last years, novel approaches such as bar adsorptive microextraction (BA_μE) [29] have been introduced to determine UV filters. More recently the authors of the present work introduced for the first time a new microextraction

* Corresponding author.

E-mail address: alberto.chisvert@uv.es (A. Chisvert).

technique termed stir bar sorptive–dispersive microextraction (SBSD μ E) [30]. This last technique combines the principles of SBSE and DSPE into a single approach, which is mediated by the use of a stir bar coated with surface modified magnetic nanoparticles (MNPs) as sorbent material. At low stirring rate, it acts as SBSE, whereas at higher rates MNPs are detached and dispersed into the solution as in DSPE. Thus, SBSD μ E affords a series of advantages to both SBSE (lower extraction time and more versatile sorbents by using different coated MNPs) and DSPE (easier extraction and post-extraction treatment, reducing the manual intervention). The analytical utility of this approach was demonstrated for the determination of eight of the most commonly used UV filters, with excellent analytical features by using liquid desorption–liquid chromatography. However, due to the low level of UV filters in environmental waters (i.e. ng L⁻¹), higher sensitivity is needed. Mass spectrometry (MS) coupled either to liquid chromatography (LC) or to gas chromatography (GC) inherently offers the required

sensitivity, and is commonly applied for the environmental monitoring of UV filter residues in natural waters [4,31]. However, the required liquid desorption of the analytes from the sorbent material increases the dilution and thus decreases sensitivity (unless evaporation and reconstitution is performed, which also increases analysis time and analyte losses). Moreover, only a portion of the extracted analytes is injected what also diminishes the sensitivity. Thermal desorption (TD), coupled to GC–MS, can alleviate these shortcomings by enabling direct insertion of the entire quantity of the extracted analytes into the analytical instrument.

The aim of this work is to expand the analytical utility of SBSD μ E to the trace determination of UV filters residues in water samples by exploiting its advantages as extraction technique and combine it for the first time with TD, prior GC–MS, as an effective and solvent-free desorption step. The developed approach was applied to two environmental waters (river and sea) and swimming pool water with satisfactory analytical features, indicating its

Table 1
Chemical structure and some relevant data of the target compounds.

UV filter	Chemical structure	Molecular formula	CAS number	Selected ions ^a
2-ethylhexyl salicylate (ES)		C ₁₅ H ₂₂ O ₃	118-60-5	120,138,250
Homosalate (HS) ^b		C ₁₆ H ₂₂ O ₃	118-56-9	120,138,262
Isoamyl 4-methoxycinnamate (IMC) ^c		C ₁₅ H ₂₀ O ₃	71617-10-2	161, 178 ,248
3-(4-methylbenzylidene)camphor (4-MBC) ^c		C ₁₈ H ₂₂ O	36861-47-9	128,211, 254
Benzophenone-3 (BZ3)		C ₁₄ H ₁₂ O ₃	131-57-7	151, 227 ,228
2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate (EMC) ^c		C ₁₈ H ₂₆ O ₃	5466-77-3	161, 178 ,290
Ethylhexyl dimethyl PABA (EDP)		C ₁₇ H ₂₇ NO ₂	21245-02-3	148, 165 ,277
Octocrylene (OCR)		C ₂₄ H ₂₇ NO ₂	6197-30-4	204 ,232,360

^a The *m/z* values used as quantifiers are shown in bold.

^b There are two isomers (HS₁ and HS₂).

^c There are two geometrical isomers (Z and E) when it is exposed to light.

suitability to the monitoring survey of UV filter residues at (ultra) trace level in natural waters.

2. Experimental

2.1. Reagents and samples

All reagents were procured from major suppliers. 2-Ethylhexyl salicylate (ES) 99%, 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (benzophenone-3 (BZ3)) 98%, 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate (EMC) 99.8% and 2-ethylhexyl 4-(dimethylamino)benzoate (ethylhexyl dimethyl PABA (EDP)) 98% from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany); 3,3,5-trimethylcyclohexyl salicylate (homosalate (HS)) > 98% from Merck (Darmstadt, Germany); isoamyl 4-methoxycinnamate (IMC) 99.3% from Haarmann and Reimer (Parets del Vallés, Spain); 3-(4'-methylbenzylidene)camphor (MBC) 99.7% from Guinama S.L. (Valencia, Spain) and 2-ethylhexyl 2-cyano-3,3-diphenylacrylate (octocrylene (OCR)) > 98% from F.Hoffman-La Roche Ltd. (Basel, Switzerland) were used as standards. The chemical structure and some relevant information are given in Table 1. Deuterated benzophenone (benzophenones- d_{10} (BZ- d_{10})) from Sigma-Aldrich (Miamisburg, OH, USA) was used as surrogate in order to increase the repeatability, not only of the SBS D_{μ} E procedure but also of the TD-GC step. Cobalt (II) chloride hexahydrate (CoCl $_2$ · 6H $_2$ O) and iron (III) chloride hexahydrate (FeCl $_3$ · 6H $_2$ O) were purchased from Acros Organics (New Jersey, USA) while oleic acid (90%) was obtained from Sigma-Aldrich. HPLC-grade ethanol (EtOH), was procured from Scharlau (Barcelona, Spain). The deionized water used in this work was obtained from a Nanopure II water purification system provided by Barnstead (Boston, MA, USA). Sodium chloride (99.5%, analytical grade) and ortho-phosphoric acid (85%, analytical grade) that were used as ionic strength and pH regulators, respectively, were purchased from Scharlau. High purity helium (99.9999%) from Carburos Metálicos S.A. (Paterna, Spain) was used as carrier gas in the GC-MS system.

Water samples were collected from Patacona Beach (Valencia, Spain) and a public swimming pool from Almudaina (Alicante, Spain) in July 2014, and Turia River (Valencia, Spain) in February 2015. All samples were collected in 1 L topaz glass bottles and stored in the dark at 4 °C. Before analysis the samples were left to reach room temperature. Prior to sampling all glassware was thoroughly cleaned by soaking in HNO $_3$:H $_2$ O (50:50) and drying at 220 °C.

2.2. Apparatus and material

A Focus GC gas chromatograph coupled to a DSQ II mass spectrometry detector (operated in positive electron ionization mode at ionization energy of 70 eV) from Thermo Fisher Scientific (Austin, TX, USA) was employed. The thermal desorption step was performed with a UNITY 2™ thermodesorption system from Markes International Limited (Llantrisant, United Kingdom). A Basic20 pH meter from Crison (Alella, Spain) was used for the adjustment of solutions pH. Magnetic stirrer hotplates from Stuart Scientific (Staffordshire, United Kingdom) were used as stirrers in the extraction procedure. NdFeB (52 MGO) magnetic tumble stir cylinders (3.1 mm diameter × 6.4 mm long, nickel coated) from V&P Scientific (San Diego, USA) were used as stir bars for the extraction.

2.3. Synthesis of cobalt ferrite coated with oleic acid nanoparticles

The synthesis of the magnetic nanoparticles was performed in a two-step process that involved alkaline hydrolysis of ferrous and

cobalt salts followed by oleic acid functionalization at mild temperature conditions according to an adapted protocol [32]. In summary, 100 mL of a 0.4 M FeCl $_3$ aqueous solution and 100 mL of a 0.2 M CoCl $_2$ aqueous solution were mixed, and then 100 mL of a 3 M sodium hydroxide aqueous solution were added dropwise under continuous stirring. For the coating procedure, 2 mL of oleic acid were added and the reaction mixture was heated to 80 °C for 1 h. The mixture was slowly cooled to room temperature and the MNPs (appearing as a black precipitate product) were washed several times with magnetic decantation using ultrapure water followed by ethanol in order to remove the unreacted oleic acid. Finally, the precipitate was dried overnight at 100 °C and pulverized into a fine powder.

2.4. SBS D_{μ} E procedure

A stock solution containing 500 µg mL $^{-1}$ of all eight target UV filters was prepared in ethanol. A stock solution of BZ- d_{10} (as surrogate) was prepared in ethanol at 1000 mg L $^{-1}$, from which an aqueous solution of 1 mg L $^{-1}$ was prepared. Working solutions (500–2500 ng L $^{-1}$ for BZ3 and 100–500 ng L $^{-1}$ for the other analytes, containing BZ- d_{10} at 1 ng mL $^{-1}$) were prepared by appropriate dilution with deionized water.

To determine the total content of UV filters in the samples (i.e. soluble fraction plus particulate fraction), 25 mL of unfiltered water samples were sonicated for 15 min in order to lixiviate the UV filters from particles following the procedure developed previously [33]. The suspended particles were then removed by filtration through 0.45 µm nylon membrane filters. Surrogate (BZ- d_{10}) was also added to samples at 1 ng mL $^{-1}$.

For the physical modification process of the stir bar, 25 mg of MNPs were weighed in a glass vial to which 10 mL of deionized water were added. The stir bar was introduced into the vial and magnetically stirred for 10 min at high stirring rate to solvate the nanoparticles. Then, the MNPs-coated stir bar was removed from the solution with clean plastic tweezers and immersed in 25 mL aqueous standard or sample solutions adjusted to pH 4 and 5% NaCl (w/v), and stirred intensely for 30 min at room temperature. Upon termination of the stirring process, nanoparticles were magnetically retrieved onto the stir bar, and then the MNPs-coated stir bar was removed with clean plastic tweezers and placed into a glass sample tube (89 mm long × 6.4 mm o.d.) to accomplish TD directly coupled to GC-MS.

After each use, the coated stir bars were sequentially soaked and stirred for 5 min in deionized water, ethanol and acetone to prevent background contamination and left them to dry at room temperature. Before use, the sample tubes were soaked in HNO $_3$:H $_2$ O (50:50) overnight and dried at 220 °C.

2.5. TD-GC-MS analysis

The tube containing the MNPs-coated stir bar was heated at 50 °C for 2 min to remove any possible water residues from the MNPs. Then, the analytes were desorbed from the MNPs by heating at 250 °C for 10 min and the desorbed compounds were cryo-focused at -10 °C in the cold trap. Afterwards, trap temperature was rapidly increased from -10 °C to 250 °C (held for 3 min) at 16 °C s $^{-1}$ to transfer the trapped compounds to the GC column. The TD transfer line was maintained at a constant temperature of 200 °C.

Chromatographic separations were carried out in a HP-5MS Ultra Inert (95% dimethyl-5% diphenylpolysiloxane, 30 m length, 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness) column from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). The separations were run at a 1 mL min $^{-1}$ helium constant flow rate. The oven temperature program was: from 70 °C (1 min) to 170 °C at 10 °C min $^{-1}$, then to

200 °C at 2 °C min⁻¹ and finally to 280 °C (6 min) at 10 °C min⁻¹. The transfer line and ion source temperatures were set at 280 and 250 °C respectively. The chromatograms were recorded in selected ion monitoring (SIM) mode at the mass/charge (*m/z*) ratios given in Table 1. Calibration was performed by plotting A_i/A_{sur} (where A_i is the peak area of the target analyte and A_{sur} that of the surrogate) versus target analyte concentration.

3. Results and discussion

In a first attempt, the optimized extraction conditions from our previous work were initially considered [30] (i.e. 20 min extraction time and donor phase adjusted to pH 4 and 5% NaCl (*w/v*)), except the size of the stir bars (6.4 mm × 3.1 mm o.d.) and the amount of MNPs (25 mg) which were smaller than those used in our previous work (11 mm × 6 mm o.d., and 100 mg of MNPs) in order to not surpass the weight limitations of the sample tube.

The influence of experimental variables was then evaluated by extracting aqueous standard solutions containing 50 ng mL⁻¹ of each of the target UV filters. All experiments were performed in triplicate and the peak area of each analyte (A_i) was used as response function.

3.1. Study of the TD conditions

The effect of thermodesorption conditions (i.e. desorption temperature and hold time) was investigated in order to maximize the analytical signal response of the target analytes. Fig. 1 shows the TD temperature profiles for each analyte in the range from 225 to 275 °C at a hold time of 10 min. It can be seen that the peak area increases for all analytes as the desorption temperature reaches to 250 °C, especially for the less volatile analytes, indicating the complete desorption of the UV filters. Higher temperatures are not recommended since baseline perturbations become increasingly important due to oleic acid can be released above 250 °C [34], what also could deteriorate the GC column. Thus, 250 °C was selected for further experiments. Regarding the effect of desorption time (5–15 min), the peak areas increase considerably from 5 to 10 min of desorption, remaining practically constant thereafter (Fig. 2). On the basis of these results, 250 °C for 10 min were selected as the best conditions for performing the desorption step. These results are in good agreement with previous studies, where UV filters were also thermodesorbed after other extraction approaches like SBSE [19,20].

Finally, the influence of carryover effects was also evaluated by exposing the same stir bar inside the same sample tube to a second TD cycle. The relative amount of analytes measured in the

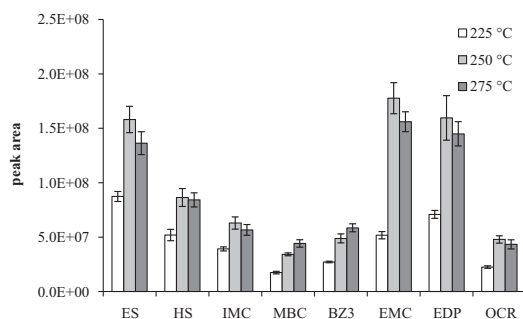


Fig. 1. Effect of the desorption temperature. Extraction conditions: 25 mL sample volume adjusted to pH 4 and to 1% NaCl, 20 min extraction time, 25 mg MNPs. Desorption conditions: 10 min desorption time.

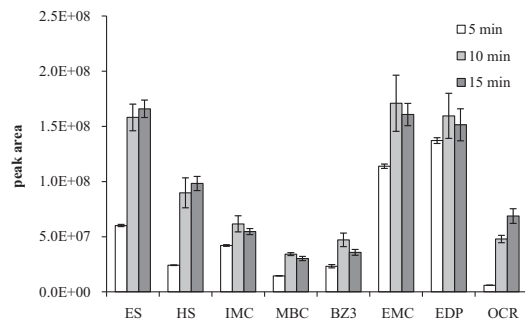


Fig. 2. Effect of the desorption time. Extraction conditions: 25 mL sample volume adjusted to pH 4 and to 1% NaCl, 20 min extraction time, 25 mg MNPs. Desorption conditions: 250 °C desorption temperature.

second desorption experiment was less than 1% thus showing the lack of carryover.

3.2. Study of the SBSD μ E extraction time

Since smaller stir bars (6.4 mm × 3.1 mm o.d.) and lower amounts of MNPs (25 mg) than in our previous work (11 mm × 6 mm o.d., and 100 mg of MNPs) [30] were used, the extraction time profiles of the analytes were re-assessed by extracting an aqueous standard solution containing 50 ng mL⁻¹ of UV filters in triplicate for different extraction time intervals (20–90 min). The results depicted in Fig. 3 show that the responses increased from 20 to 30 min, decreasing again at longer extraction times. Recent experimental evidence suggest that free protons play a crucial role in the stability of oleic acid coated MNPs and may compete oleic acid binding to the nanoparticle surface [35]. Thus, a part of oleic acid (and hence the analytes) may be desorbed during prolonged incubation at acidic (pH=4) conditions. On the grounds of these findings, an extraction time of 30 min was adopted.

3.3. Analytical performance of the developed method and application to real samples

Quality parameters such as linearity of the calibration curves, method limits of detection (MLOD) and quantification (MLOQ), enrichment factors (EF) and repeatability were evaluated to validate the developed procedure. All results are summarized in Table 2.

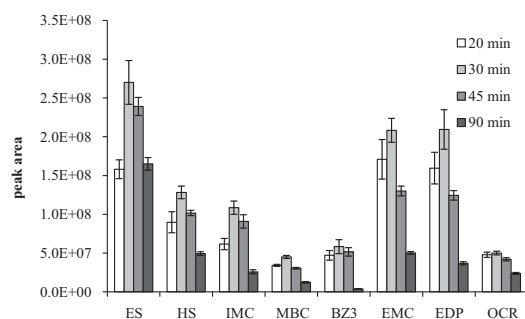


Fig. 3. Effect of the extraction time on the process. Extraction conditions: 25 mL sample volume adjusted to pH 4 and to 1% NaCl, 25 mg MNPs. Desorption conditions: 250 °C for 10 min.

Table 2Main analytical parameters of the developed SBSDD_μE-TD-GC-MS method.

UV filter	Slope $\pm s_b$ (ng L ⁻¹)/10 ^{-5a}	Regression coefficient R ^{2a}	EF ^b	MLOD ^c (ng L ⁻¹)	MLOQ ^c (ng L ⁻¹)	Repeatability ^d (%RSD)	
						Intra-day	Inter-day
ES	15.5 ± 0.4	0.997	314 ± 3	23	77	3.9	7.5
HS	138.4 ± 1.5	0.999	264 ± 30	13	43	1.5	5.4
IMC	21.9 ± 0.8	0.995	108 ± 10	28	95	5.4	11.3
MBC	16.3 ± 0.6	0.995	68 ± 5	23	78	8.6	8.9
BZ3	41.5 ± 1.3	0.997	68 ± 7	148	493	3.6	5.5
EMC	206 ± 7	0.996	538 ± 30	28	95	5.2	10.2
EDP	139 ± 5	0.997	164 ± 5	30	99	4.4	7.0
OCR	51.9 ± 1.6	0.996	690 ± 40	27	91	7.2	8.4

^a Working range: BZ3: 0.5–2.5 ng mL⁻¹; ES, HS, IMC, MBC, EMC, EDP and OCR: 100–500 ng L⁻¹; number of calibration points: 6; s_b : standard deviation of the slope.

^b EF: enrichment factor; as the mean of three replicates (\pm standard deviation) of an aqueous standard solution containing 200 ng L⁻¹ of the target analytes (500 ng L⁻¹ for BZ3).

^c MLOD: method limit of detection; MLOQ: method limit of quantification; calculated as $3S_{y/x}/b$ and $10S_{y/x}/b$ criteria, respectively, where $S_{y/x}$ is the residual standard deviation and b is the slope of the calibration curve.

^d Relative standard deviation (RSD), five replicate analysis of an aqueous standard solution containing 200 ng L⁻¹ of the target analytes (500 ng L⁻¹ for BZ3).

Due to SBSDD_μE is not an exhaustive extraction approach like other microextraction approaches [30], standard solutions were prepared in deionized water and subjected to the extraction procedure like samples. A high level of linearity (at least up to 50 ng mL⁻¹) was obtained for all compounds. However, due to the low levels of UV filters in natural waters, the employed working range was set between 100 and 500 ng L⁻¹, except for BZ3 whose working range was set from 0.5 to 2.5 ng mL⁻¹ because it is the most hydrophilic UV filter and it is only partially extracted due to its lower affinity for the sorbent surface. Good linearity was accomplished for all compounds with regression coefficients (R^2) higher than 0.995. The MLODs and MLOQs values, calculated as $3S_{y/x}/b$ and $10S_{y/x}/b$ criteria, ranged from 13 to 32 ng L⁻¹ (148 ng L⁻¹ for BZ3) and from 43 to 99 ng L⁻¹ (493 ng L⁻¹ for BZ3), respectively. Compared to our previous work [30], in which liquid desorption and liquid-chromatography with UV detection was employed, the sensitivity of the whole approach has increased considerably, reducing the MLODs by 85–250 times (depending on the analyte). Accordingly, the estimated EFs, calculated as the ratio of the concentration of the compound after extraction to the initial concentration of the same compound in the aqueous phase before the extraction, were ranged between 68 and 690. The lowest EFs were found for the most hydrophilic analytes as expected. However, in all the cases, TD offered a considerable improvement in the EFs compared to liquid desorption [30].

The precision of the method, expressed as relative standard deviation (RSD), was evaluated by analyzing five replicates of an

aqueous standard solution containing 200 ng mL⁻¹ of the target compounds (500 ng mL⁻¹ for BZ3). Repeatability (intra-day precision) ranged from 1.5% to 8.6%, whereas reproducibility (inter-day precision) was less than 12%, illustrating the good precision of the procedure.

3.4. Application to the analysis of genuine water samples

To examine the analytical utility of the developed method, it was applied to the determination of target UV filters in two natural water samples (river and seawater) and swimming pool water. The ionic strength of the samples was regulated to 5%, taking into account the initial salt content approximate in each sample (i.e. 0.05% in river water, 0.5% in swimming pool water and 4% in seawater). Then, samples were subjected to the SBSDD_μE-TD-GC-MS procedure in triplicate. As can be seen in Table 3, the UV filters levels in river water were quite low, obviously because sampling was performed during winter season. Nevertheless, the fact that some of them still appear is attributed to the presence of cosmetic enterprises on the top of the river area. On the contrary, the measured concentrations found in seawater and in swimming pool water during the summer season, when bathing activities and sunscreen use reach their maximum values, are noticeable higher. Interestingly, the concentrations found in swimming pool water (< LOQ = 732 ng L⁻¹) were generally lower than those in seawater (174–914 ng L⁻¹), probably due to the fact that the shower before the bath reduces the leaching of UV filters into the pool water.

Table 3UV filters contents in three water samples and their relative recovery values obtained by applying the developed SBSDD_μE-TD-GC-MS method at 200 ng L⁻¹ (500 ng L⁻¹ for BZ3).

UV filter	River water ^a			Sea water ^b			Swimming pool water ^c		
	Found amount (ng L ⁻¹)	Found amount after spiking (ng L ⁻¹)	Relative recovery (%)	Found amount (ng L ⁻¹)	Found amount after spiking (ng L ⁻¹)	Relative recovery (%)	Found amount (ng L ⁻¹)	Found amount after spiking (ng L ⁻¹)	Relative recovery (%)
ES	126 ± 15	355 ± 17	115 ± 6	914 ± 14	1126 ± 40	109 ± 14	732 ± 50	888 ± 20	80 ± 8
HS	219 ± 3	401 ± 30	96 ± 9	369 ± 40	576 ± 30	112 ± 12	366 ± 9	543 ± 30	96 ± 12
IMC	< LOQ	194 ± 17	86 ± 2	174 ± 11	372 ± 13	104 ± 5	283 ± 30	442 ± 14	84 ± 5
MBC	< LOQ	204 ± 30	97 ± 9	169 ± 30	353 ± 30	112 ± 13	178 ± 14	359 ± 12	110 ± 5
BZ3	< LOD	546 ± 40	110 ± 5	603 ± 50	1120 ± 90	103 ± 15	538 ± 50	997 ± 40	91 ± 6
EMC	220 ± 15	439 ± 50	115 ± 7	691 ± 40	855 ± 17	88 ± 6	338 ± 30	508 ± 10	91 ± 4
EDP	< LOQ	206 ± 20	88 ± 5	212 ± 20	435 ± 40	111 ± 13	< LOQ	289 ± 20	116 ± 13
OCR	164 ± 2	355 ± 30	98 ± 19	406 ± 20	576 ± 50	89 ± 9	624 ± 50	826 ± 12	105 ± 4

^a River water: Turia river (Valencia, Spain).

^b Sea water: Patacona beach (Valencia, Spain).

^c Swimming pool water: Almudaina's swimming pool (Alicante, Spain).

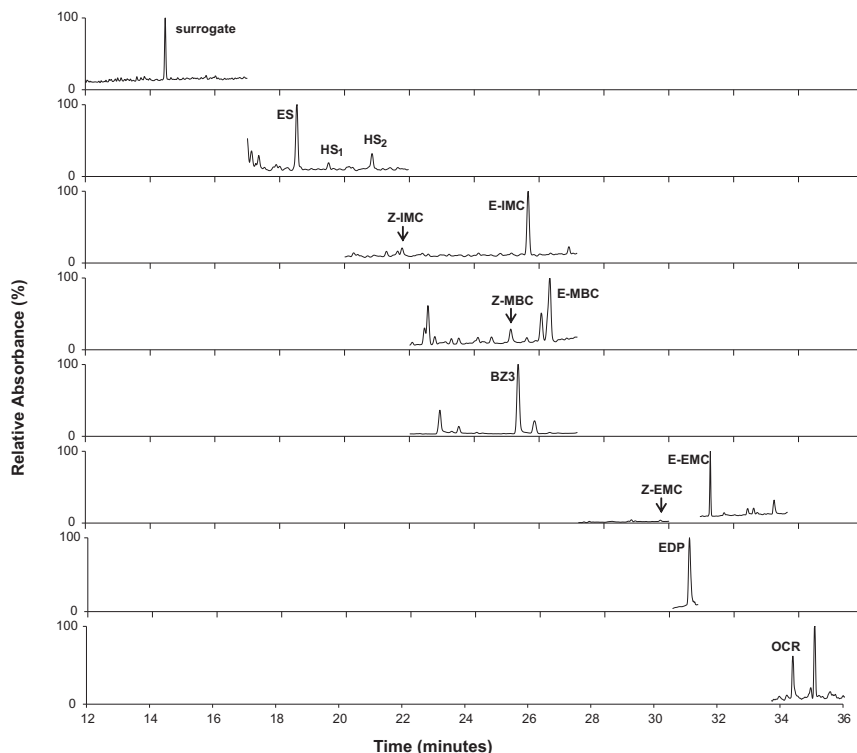


Fig. 4. Chromatogram of a seawater sample (Patacona beach, Valencia, Spain) obtained by the developed SBSD μ E-TD-GC-MS method.

Moreover, it should be noted that the concentration of UV filters in that kind of aquatic samples depends on several factors, such as number of swimmers and water recirculation rates along the day [8].

Finally, the reliability of the method and matrix effects, were assessed by recovery studies. To this end, the three above-mentioned samples were spiked with the target analytes at a concentration of 200 ng L⁻¹ and subjected to the SBSD μ E-TD-GC-MS procedure. As can be seen in Table 3, the obtained relative recoveries, i.e., with regard to aqueous standard solutions subjected to the same extraction procedure than samples, ranged from 86% to 115% in river water, from 88% to 112% in seawater and 80% to 116% in swimming pool water, which are satisfactory for applications related to the routine screening of UV filters release in the aquatic environment. A typical chromatogram of a real sample is shown in Fig. 4.

4. Conclusions

In the present work, a fully optimized SBSD μ E-TD-GC-MS method for the determination of eight UV filters in water samples is presented. The main advantage of the developed method is the combined use of SBSD μ E as microextraction technique (allowing lower extraction times and simplicity of the procedure) with TD as desorption technique (avoiding sample manipulation and dilution of the extract) coupled to GC-MS detection. Compared to previous methods, this new methodology requires little sample manipulation and reduced analysis time, it does not require solvent evaporation and reconstitution steps, and alleviates the need for using

commercial sorbents like generally occurs in SPE, SPME and SBSE. Not the least, the MLOD values suggest that this method exhibits high sensitivity for the determination of the target UV filters in water samples at the ng L⁻¹ level. By and large, this methodology contributes to the development of expedient and sensitive methods for the determination of organic UV filters in aqueous media at (ultra)trace level.

Acknowledgments

Authors acknowledge the financial support of the University of Valencia (Project UV-INV-AE13-137567). J.L. Benedé thanks the Generalitat Valenciana for his fellowship (ACIF/2012/73).

References

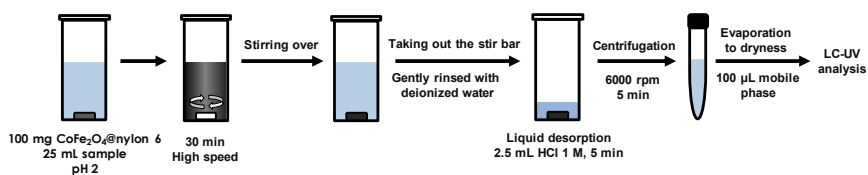
- [1] A. Chisvert, A. Salvador, UV Filters in sunscreens and other cosmetics. Regulatory aspects and analytical methods, in: A. Chisvert, A. Salvador (Eds.), *Analysis of Cosmetic Products*, Elsevier, Amsterdam, 2007, p. 83.
- [2] A. Salvador, A. Chisvert, Sunscreen analysis: a critical survey on UV filters determination, *Anal. Chim. Acta* 537 (2005) 1–14.
- [3] Regulation (EC) No. 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products, 2009.
- [4] D.L. Giokas, A. Salvador, A. Chisvert, UV filters: from sunscreens to human body and the environment, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 360–374.
- [5] M. Schlumpf, P. Schmid, S. Durrer, M. Conscience, K. Maerkel, M. Henseler, M. Gruetter, I. Herzog, S. Reolon, R. Ceccatelli, O. Faass, E. Stutz, H. Jarry, W. Wuttke, W. Lichtensteiger, Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters – an update, *Toxicology* 205 (2004) 113–122.
- [6] P. Kunz, H. Galicia, K. Fent, Comparison of in vitro and in vivo estrogenic activity of UV filters in fish, *Toxicol. Sci.* 90 (2006) 349–361.

- [7] M. Coronado, H. de Haro, X. Deng, M.A. Rempel, R. Lavado, D. Schlenk, Estrogenic activity and reproductive effects of the UV-filter oxybenzone (2-hydroxy-4-methoxyphenyl-methanone) in fish, *Aquat. Toxicol.* 90 (2008) 182–187.
- [8] A. Tovar-Sánchez, D. Sánchez-Quiles, G. Basterretxea, J.L. Benedé, A. Chisvert, A. Salvador, I. Moreno-Garrido, J. Blasco, Sunscreen products as emerging pollutants to coastal waters, *PLoS One* 8 (2013) e65451.
- [9] N. Okanouchi, H. Honda, R. Ito, M. Kawaguchi, K. Saito, H. Nakazawa, Determination of benzophenones in river-water samples using drop-based liquid phase microextraction coupled with gas chromatography/mass spectrometry, *Anal. Sci.* 24 (2008) 627–630.
- [10] L. Vidal, A. Chisvert, A. Canals, A. Salvador, Ionic liquid-based single-drop microextraction followed by liquid chromatography–ultraviolet spectrophotometry detection to determine typical UV filters in surface water samples, *Talanta* 81 (2010) 549–555.
- [11] R. Rodil, S. Schrader, M. Moeder, Non-porous membrane-assisted liquid-liquid extraction of UV filters compounds from water samples, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4887–4894.
- [12] I. Tarazona, A. Chisvert, Z. León, A. Salvador, Determination of hydroxylated benzophenone UV filters in sea water samples by dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4771–4778.
- [13] N. Negreira, I. Rodríguez, E. Rubi, R. Cela, Dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for the rapid and sensitive determination of UV filters in environmental water samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 995–1004.
- [14] P. Zhang, Z. Shi, Q. Yu, Y. Feng, A new device for magnetic stirring-assisted dispersive liquid-liquid microextraction of UV filters in environmental water samples, *Talanta* 83 (2011) 1711–1715.
- [15] Y. Zhang, H.K. Lee, Determination of ultraviolet filters in water samples by vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1249 (2012) 25–31.
- [16] J.-W. Wu, H.-C. Chen, W.-H. Ding, Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction plus simultaneous silylation for rapid determination of salicylate and benzophenone-type ultraviolet filters in aqueous samples, *J. Chromatogr. A* 1302 (2013) 20–27.
- [17] N. Negreira, I. Rodríguez, M. Ramil, E. Rubi, R. Cela, Sensitive determination of salicylate and benzophenones type UV filters in water samples using solid-phase microextraction, derivatization and gas chromatography tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 638 (2009) 36–44.
- [18] H. Liu, L. Liu, Y. Xiong, X. Yang, T. Luan, Simultaneous determination of UV filters and polycyclic musks in aqueous samples by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6747–6753.
- [19] R. Rodil, M. Moeder, Development of a method for the determination of UV filters in water samples using stir bar sorptive extraction and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1179 (2008) 81–88.
- [20] M. Kawaguchi, R. Ito, N. Endo, N. Sakui, N. Okanouchi, K. Saito, N. Sato, T. Shiozaki, H. Nakazawa, Stir bar sorptive extraction and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry for trace analysis of benzophenones and its derivatives in water sample, *Anal. Chim. Acta* 557 (2006) 272–277.
- [21] K.T.N. Nguyen, C. Scapolla, M. Di Carro, E. Magi, Rapid and selective determination of UV filters in seawater by liquid chromatography – tandem mass spectrometry combined with stir bar sorptive extraction, *Talanta* 85 (2011) 2375–2384.
- [22] E. Magi, M. Di Carro, C. Scapolla, K.T.N. Nguyen, Stir bar sorptive extraction and LC–MS/MS for trace analysis of UV filters in different water matrices, *Chromatographia* 75 (2012) 973–982.
- [23] N. Gilart, N. Miralles, R.M. Marcé, F. Borrull, N. Fontanals, Novel coatings for stir bar sorptive extraction to determine pharmaceuticals and personal care products in environmental waters by liquid chromatography and tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 774 (2013) 51–60.
- [24] I.P. Román, A. Chisvert, A. Canals, Dispersive solid-phase extraction based on oleic acid-coated magnetic nanoparticles followed by gas chromatography–mass spectrometry for UV-filter determination in water samples, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2467–2475.
- [25] R.M. Smith, Before the injection – modern methods of sample preparation for separation techniques, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 3–27.
- [26] M.C. Alcludia-León, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, Stir membrane extraction: a useful approach for liquid sample pretreatment, *Anal. Chem.* 81 (2009) 8957–8961.
- [27] C. Nerín, J. Salafranca, M. Aznar, R. Batlle, Critical review on recent developments in solventless techniques for extraction of analytes, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 809–833.
- [28] L. Ramos, Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques, *J. Chromatogr. A* 1221 (2012) 84–98.
- [29] C. Almeida, A. Stepkowska, A. Alegre, J.M.F. Nogueira, Determination of trace levels of benzophenone-type ultra-violet filters in real matrices by bar adsorptive micro-extraction using selective sorbent phases, *J. Chromatogr. A* 1311 (2013) 1–10.
- [30] J.L. Benedé, A. Chisvert, D.L. Giokas, A. Salvador, Development of stir bar sorptive–dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles and its analytical application to the determination of hydrophobic organic compounds in aqueous media, *J. Chromatogr. A* 1362 (2014) 25–33.
- [31] S.D. Richardson, Water analysis: emerging contaminants and current issues, *Anal. Chem.* 83 (2011) 4614–4648.
- [32] K. Maaz, A. Mumtaz, S.K. Hasanain, A. Ceylan, Synthesis and magnetic properties of cobalt ferrite (CoFe₂O₄) nanoparticles prepared by wet chemical route, *J. Magn. Magn. Mater.* 308 (2007) 289–295.
- [33] J.L. Benedé, A. Chisvert, A. Salvador, D. Sánchez-Quiles, A. Tovar-Sánchez, Determination of UV filters in both soluble and particulate fractions of seawaters by dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 812 (2014) 50–58.
- [34] L. Zhang, R. He, H.-C. Gu, Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles, *Appl. Surf. Sci.* 253 (2006) 2611–2617.
- [35] R.A. Harris, P.M. Shumbula, H. van der Walt, Analysis of the interaction of surfactants oleic acid and oleylamine with iron oxide nanoparticles through molecular mechanics modeling, *Langmuir* 31 (2015) 3934–3943.

Stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles-nylon 6 composite for the extraction of hydrophilic organic compounds in aqueous media

Aceptado en Abril 2016 en **Analytica Chimica Acta**, *en prensa*

Graphical abstract



Highlights

- ▶ SBSDME approach is extended for the extraction of hydrophilic compounds
- ▶ SBSDME combines the advantages of SBSE and DSPE into a single approach
- ▶ Magnetic nanoparticles-nylon 6 composite is used as sorbent material
- ▶ The determination of hydrophilic UV filters in water is chosen as model application
- ▶ The method has been developed and validated obtaining good analytical features

Stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles-nylon 6 composite for the extraction of hydrophilic organic compounds in aqueous media

Juan L. Benedé^a, Alberto Chisvert^{a,*}, Dimosthenis L. Giokas^b, Amparo Salvador^a

^a Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

^b Department of Chemistry, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece

Abstract

A new and sensitive analytical method based on the recently developed approach termed stir bar-sorptive dispersive microextraction (SBSDME) using a magnetic $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -nylon 6 composite as sorbent material is presented for the extraction of hydrophilic organic compounds. The simultaneous determination of four hydrophilic UV filters in environmental water samples has been chosen as a model analytical application due to the increasing awareness regarding the occurrence of sunscreen residuals in natural waters. The developed SBSDME approach combines the principles and benefits of stir bar sorptive extraction (SBSE) and dispersive solid phase extraction (DSPE) but allows for lower extraction time and easier post-extraction treatment. Moreover, most importantly, it enables the use of new magnetic materials that affords higher versatility and can be tailored to the needs of the analysis. The main experimental parameters involved in the SBSDME process (i.e. composite amount, extraction time, pH, ionic strength, desorption solvent and desorption time) were evaluated to provide the best enrichment factors. Under the optimized conditions, the method was successfully validated showing good linearity, enrichment factors between 105 and 145 depending on the analyte, limits of detection and quantification in the low ng mL^{-1} range ($1.6 - 2.9 \text{ ng mL}^{-1}$ and $5.4 - 9.6 \text{ ng mL}^{-1}$, respectively) and good intra- and inter-day repeatability ($\text{RSD} < 13 \%$). The developed method was applied to the analysis of water samples of different origin (sea, river and swimming pool). Relative recovery values ranged between 90 – 115 %, thus showing that the matrices under consideration do not affect the extraction process.

Keywords: Composite; Dispersive solid phase extraction; Hydrophilic compounds; Magnetic nanoparticles; Stir bar sorptive extraction; UV filters

* Corresponding author:

e-mail address: alberto.chisvert@uv.es (A. Chisvert)

1. Introduction

Sample preparation is one of the most important and critical steps of the analytical process. The importance of sample preparation is further emphasized in the determination of compounds at trace levels, since, on one hand, it is usually necessary to perform a preconcentration of the analytes, while on the other hand the samples often require a cleaning step to eliminate potentially interfering compounds. In this sense, extraction techniques, such as liquid-liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE), have played a fundamental role because they allow for both enrichment and separation in a single step. However, during the last years these traditional techniques are being progressively shelved in favor of the so-called 'microextraction techniques', which allow to obtain higher enrichment factors, to reduce the amounts of solvents and to generate significantly less wastes [1,2].

The introduction of solid-phase microextraction (SPME) in 1990 [3] as miniaturization of the traditional SPE constituted a major breakthrough in this field. This solventless technique, which is based on the sorption of the analytes in a coated fused silica fiber, became very popular due to its wide applicability. However, due to the low sorbent amount typically used ($\sim 0.5 \mu\text{L}$), the mass of analyte extracted is limited, and thus sensitivity could be negatively affected [4]. The stir-bar sorptive extraction (SBSE) technique [5], introduced a few years later and based on similar principles than SPME but using a coated magnetic stir bar, constituted another relevant example derived from the efforts to miniaturize SPE. In contrast to SPME, the sorbent amount used in SBSE ($24\text{-}126 \mu\text{L}$) is much larger than in SPME, which leads to higher amounts of analytes being extracted and thus achieving higher sensitivity [6-8]. However, the main drawback associated to SBSE is the low availability of commercial sorbents, mainly limited to polydimethylsiloxane (PDMS) and poly(ethyleneglycol) (PEG)-modified silicone. Thus, its applicability is mainly focused on the extraction of non-polar compounds [7,8]. To this respect, one of the most active trend is the development of new coatings in order to increase the versatility of this technique [7,8] or the development of alternative extraction approaches [8].

Dispersive solid phase extraction (DSPE) [9] is another promising miniaturized-SPE sample pretreatment technique. In DSPE, a SPE sorbent is dispersed in a sample solution containing the target analytes, thus maximizing the contact area between both donor and acceptor phases. After extraction, the sorbent containing the retained analytes is retrieved by centrifugation. This

approach overcomes the versatility problem associated with SBSE, since a vast gamut of commercial sorbents is available [10]. In the last decade, magnetic nanoparticles (MNPs) coated with different sorbents have gained popularity as acceptor phases in DSPE [11], due to their higher specific surface area that speed up the extraction process, and their magnetic properties that allow their facile and fast retrieval by means of a strong magnet. The use of hybrid materials (i.e., composites) made of MNPs attached to polymers or carbon nanotubes is currently attracting great attention since the magnetic behavior of the MNPs and the high capability of sorption of the polymers (or of the carbon nanotubes) are jointly exploited [12,13].

Very recently, our research group introduced a new microextraction technique termed stir bar sorptive-dispersive microextraction (SBSDME) [14,15], where a magnetic stir bar coated with MNPs is placed into the sample. This novel technique aims to combine the principles of SBSE and DSPE, by acting as SBSE at low stirring rate, whereas at higher rate MNPs are detached and dispersed into the donor solution as in DSPE, returning to the magnetic bar when the stirring is stopped. In this manner, SBSMDME presents advantages over both SBSE (lower extraction time and more versatile sorbents by using different coated MNPs) and DSPE (easier extraction and post-extraction treatment and minimum manual intervention). The analytical utility of this approach was demonstrated for the determination of lipophilic UV filters in water samples by using oleophilic CoFe_2O_4 @oleic acid MNPs [14,15].

With the aim of contributing to the development of new extraction approaches, the objective of this work is to show the versatility of SBSMDME for the extraction of highly polar compounds, such as hydrophilic UV filters (see Table 1), from environmental water samples. It should be pointed out that UV filters are considered as emerging pollutants due to the easy pathways to reach the aquatic environment and their potential harmful effects in the flora and fauna [16-18], and thus their determination presents a noticeable interest. However, the hydrophilic UV filters have a sulfonic moiety (see Table 1) that confers them a high solubility in water, which hinders their extraction. Nevertheless, the high affinity that sulfonated compounds exhibit to polyamides is well-known and it supposes the basis of dyeing of nylon with acid dyes [19,20]. In this sense, a CoFe_2O_4 @ SiO_2 -nylon 6 composite is proposed here as sorbent material in SBSMDME for the extraction of the target compounds. This composite is based on that previously presented by

Valcárcel's research group for the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons [21] and bisphenol A [22] on the basis of π - π interactions and/or hydrogen-bonds.

Different published papers have been focused on the extraction, and subsequent determination, of different lipophilic UV filters from environmental water samples by using microextraction techniques [18,23,24]. However, as has been recently reviewed [24], some hydrophilic UV filters have been extracted from surface waters by SPE [25-28], but no publications dealing with their extraction using the high potential that microextraction techniques offer have been reported.

2. Experimental

2.1. Reagents and samples

Phenyldibenzimidazole tetrasulphonic acid (PDT) (disodium salt) >99 % from Haarmann and Reimer (Parets del Vallés, Spain), phenylbenzimidazole sulphonic acid (PBS) 99 % from Guinama S.L. (Valencia, Spain), terephthalidene dicamphor sulphonic acid (TDS) (triethanolamine salt) 32 % from L'Oreal (Paris, France) and benzophenone-4 (BZ4) 99.9 % from Roig Farma S.A. (Terrassa, Spain) were used as standards. 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid (NQS) 95 % from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) was used as surrogate. The chemical structure and some relevant information are given in Table 1.

Cobalt(II) chloride hexahydrate ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) and iron(III) chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) from Acros Organics (New Jersey, USA), tetraethylorthosilicate (TEOS) reagent grade 98 % and nylon 6 pellets from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), and formic acid from Fluka Chemika (Steinheim, Germany), were used for the synthesis of the $\text{CoFe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ -nylon 6 composite.

LC-grade ethanol (EtOH), hydrochloric acid 37 % (reagent grade) and glacial acetic acid (extra pure) were obtained from Scharlau (Barcelona, Spain). The deionized water used in this work was produced from a Nanopure II water purification system provided by Barnstead (Boston, MA, USA). Analytical reagent grade sodium chloride 99.5% and ortho-phosphoric acid 85% from Scharlau were used as ionic strength and pH regulators, respectively.

Water samples were collected from Santa Ponsa beach (Majorca Island, Spain) in August 2011, Pinedo beach (Valencia, Spain) and Patacona beach (Valencia, Spain) in May 2013, a public

swimming pool from Almudaina (Alicante, Spain) in July 2014 and Turia River (Valencia, Spain) in February 2015. All samples were collected in 1 L topaz glass bottles and stored in the dark at 4 °C. Before analysis the samples were left to reach room temperature.

Prior to sampling, all glassware was thoroughly cleaned by soaking in HNO₃:H₂O (50:50) and drying at 220 °C to prevent background contamination.

2.2. Apparatus

An Agilent 1220 Infinity LC system comprised of a degasser, a quaternary pump, an autosampler, a thermostated column oven and a UV/Vis detector was employed throughout the study. Separations were carried out in a Purospher[®] 100 RP-18 (12.5 cm length, 4 mm I.D., 5 µm particle size) column (Merck). A Basic 20 pHmeter from Crison (Alella, Spain) was used for the adjustment of pH. Magnetic stirrer hotplates (Stuart Scientific, Staffordshire, United Kingdom) were used as stirrers in the extraction procedure. A miVac DUO concentrator with miVac SpeedTrap from GeneVac (Ipswich, United Kingdom) was used for evaporation to dryness.

2.3. Synthesis of the CoFe₂O₄@SiO₂-nylon 6 composite

The synthesis of the CoFe₂O₄@SiO₂-nylon 6 composite consisted of three steps: the synthesis of the cobalt ferrite nanoparticles by wet chemical coprecipitation according to Maaz et al. [29], the subsequent coating with silica according to Andrade et al. [30], and finally the synthesis of the nylon 6 polymeric network with embedded CoFe₂O₄@SiO₂ MNPs according to Reyes-Gallardo et al. [21]. Nevertheless, these authors employed Fe₃O₄ MNPs, while CoFe₂O₄ was preferred in this work due to its higher chemical stability [31].

First, the cobalt ferrite nanoparticles were synthesized by mixing 100 mL of a 0.4 M FeCl₃ aqueous solution and 100 mL of a 0.2 M CoCl₂ aqueous solution. Then, 100 mL of a 3 M sodium hydroxide aqueous solution were added dropwise under continuous stirring. The black precipitate product was slowly cooled to room temperature and the MNPs were washed several times with ultrapure water and ethanol. Finally, the precipitate was dried overnight at 100 °C and pulverized into a black fine powder.

In order to increase the chemical stability of the nanoparticles, they were coated with silica by a simple hydrothermal reaction. For this purpose, the above-obtained CoFe_2O_4 nanoparticles were homogeneously dispersed in a mixture of 500 mL of ethanol and 120 mL of water for 15 min. Then, 15 mL of ammonia aqueous solution and 25 mL of TEOS were added to solution and magnetically stirred for 24 h at room temperature. The resultant $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ core-shell nanoparticles were washed with ultrapure water and ethanol and finally dried at 100 °C.

Finally, for the preparation of the polymer network with the MNPs embedded, 750 mg of nylon 6 were dissolved in 25 mL of formic acid and then 1 g of $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ was dispersed into this solution by means of ultrasounds for 5 min. Then, the dispersion was moderately added with the aid of a syringe to a beaker containing 250 mL of deionized water. In this step, the gelation of the nylon 6 around the MNPs is produced by solvent changeover. Finally, the solid was washed with water and ethanol and then dried at 100 °C.

2.4. Characterization of the MNPs and the composite

Different instruments for MNPs and composite characterization were used. Particle size distribution curve of the composite was obtained using a Malvern Mastersizer 2000 instrument. Particle size distribution curve of the MNPs and zeta potential measurements for $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -nylon 6 composite were performed using a Malvern Zetasizer ZS instrument.

A JEOL JEM-1010 transmission electron microscopy (TEM) operating at 100 kV equipped with an AMT RX80 (8.0 Mpx) digital camera was used to observe the morphology of the MNPs and the composite.

For detailed information about the properties of the composite see the Supplementary material.

2.5. Proposed method

2.5.1. Standards and samples preparation

A stock solution containing $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ of the four UV filters was prepared in water, by adding ca. 2 drops of 10 % NaOH needed to solubilize some of them. A stock solution of NQS (as surrogate) was prepared in water at $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Working solutions ($10 - 50 \text{ ng mL}^{-1}$) containing NQS at 250 ng mL^{-1} were prepared by appropriate dilution with deionized water.

To determine the total content of each UV filter in the samples (i.e. soluble fraction plus particulate fraction), 25 mL of unfiltered water samples were sonicated for 15 min to lixiviate the UV filters from particles according to our previous study [32]. The suspended particles were then removed by filtration through the polypropylene frit of an empty SPE cartridge. The nylon membrane filters of 0.45 μm commonly used in the laboratory are discharged in this work since they could adsorb traces of the sulfonated target analytes [33].

2.5.2. SBSDME procedure

For preconditioning and physical coating of the stir bars, 100 mg of dried composite were dispersed in 10 mL of deionized water in a 30 mL-glass vial. A neodymium stir bar (11 mm long x 6 mm o.d.) was introduced and stirred for 10 min at high stirring rate to solvate the nanoparticles. By stopping the stirrer, the nanoparticles were strongly attracted by the stir bar and then the coated stir bar was removed from the solution with the aid of plastic thumb forceps. For the extraction procedure, the coated stir bar was immersed in 25 mL aqueous standard or sample solutions contained in a 30 mL-glass vial, and it was stirred for 30 min at room temperature. High stirring speed was used to detach the composite from the stir bar and to enable their dispersion into the solution facilitating the adsorption of the analytes. Upon termination of the stirring process, the composite was rapidly retrieved onto the stir bar by magnetic attraction. After that, the coated stir bar was taken out with plastic thumb forceps, gently rinsed with deionized water and placed into a 30 mL-glass vial containing 2.5 mL of HCl 1 M for 5 min to accomplish the liquid desorption of the analytes. The whole extracts were transferred to 7.5 mL glass centrifuge tubes and centrifuged for 5 min at 6000 rpm to settle possible composite residues. Then, the extracts were transferred to glass tubes and evaporated to dryness at 50 °C. Finally, they were reconstituted with 100 μL of mobile phase (a mixture of EtOH:1 % acetate buffer (pH 4.75) 30:70 (v/v)) and transferred into inserts placed inside 1.5 mL injection vials for LC-UV analysis. Fig. 1 shows a schematic diagram of the experimental procedure.

After each use, the stir bars were sequentially soaked and stirred for 5 min in deionized water, ethanol and acetone to prevent possible background contamination and then finally dried.

2.5.3. LC-UV analysis

Twenty microliters of each extract were injected into the LC system. Separation of the UV filters and surrogate was carried out at 0.5 mL min^{-1} by isocratic elution using EtOH and 1% acetate buffer pH 4.75 at a mixing ratio of 30:70 (v/v). The column temperature was maintained constant at $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Monitoring of peak area was performed at 320 nm for all the target compounds. Calibration curves were constructed by plotting A_i/A_{sur} (where A_i is the peak area of the target analyte and A_{sur} that of the surrogate (i.e. NQS)) versus target analyte concentration.

3. Results and discussion

3.1. Sorbent material

The selection of MNPs-nylon 6 composite as sorbent material was made due to the ability of nylon to retain negatively charged compounds by electrostatic forces with the amino-terminal groups. The point of zero charge (pH_{pzc}), i.e., the pH at which the surface charge was zero, is an important parameter to be determined, since at $\text{pH} < \text{pH}_{\text{pzc}}$, the composite surface has a net positive charge, while at $\text{pH} > \text{pH}_{\text{pzc}}$ the surface is negatively charged. In this sense, the pH_{pzc} was characterized and it was 3.1 (see Supplementary material), thus showing that the nylon polymer exhibits positive charge (and consequently capacity to retain negatively charged compounds by electrostatic forces) at pH values below 3.1. This is very important in order to study the influence of the pH of the donor solution as it is discussed further below in more detail. Other characterization techniques were applied to confirm the size and morphology of both $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ nanoparticles and the $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -nylon 6 composite (see Supplementary material). The results demonstrated that $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ nanoparticles were spherical with an average diameter of 40 nm, whereas $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -nylon 6 composite had an average size of 35 μm .

3.2. Study of the experimental variables involved in the SBS DME procedure

SBS DME is not an exhaustive extraction technique [14,15], so that an equilibrium between the donor phase and the sorbent phase is achieved, which depends on the affinity of each compound with the sorbent. The main parameters involved in the extraction were optimized in

order to obtain the highest extraction efficiency (EE) of the hydrophilic target compounds, Thus, the amount of composite, the extraction time, the pH and finally the ionic strength of the donor phase were studied. The variables that could affect the desorption process such as the nature of the desorption solvent and desorption time were also investigated. In all experiments the EEs were evaluated by extracting 25 mL aqueous standard solutions containing 100 ng mL^{-1} of each analyte. All studies were carried out in triplicate.

3.2.1. Composite amount

The mass transfer of the analytes from the donor to the acceptor phase strongly depends on the ratio between the sorbent area and the volume of the aqueous solution. To obtain the maximum EEs of all analytes, the $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -nylon 6 composite amount was varied in the range of 25 to 150 mg, whereas the volume of the donor phase solution was maintained at 25 mL. As can be seen in Fig. 2, the EEs increased with increasing amount of the composite material up to 100 mg, but no significant improvement was observed at higher amounts. This finding shows that no significant increase in the contact area between both donor and acceptor phases occurs when the sorbent amount is excessively increased but the volume of the donor phase is maintained constant. Based on this observation, 100 mg of sorbent were selected for further experiments.

3.2.2. Extraction time

The importance of extraction time on the EEs of the target compounds was investigated in the range of 5 - 60 min. The optimum extraction was accomplished within 30 min, while longer contact times did not contribute to the improvement of the EEs (Fig. 3), but slightly diminished the EE. This could be related with the fact that nylon decomposes under strong acidic conditions. Although it does not apparently decompose at pH 2, this phenomenon becomes gradually important after 60 min of stirring, thus releasing not only the polymer but also the entrapped analytes. Similar observations have been reported before [14,15] when hydrophobic compounds were extracted with oleic acid-coated magnetic nanoparticles for prolonged times. Based on these results, an extraction time of 30 min was adopted.

3.2.3. pH

The effect of the pH of the donor solution on the extraction process was studied in the range 2 – 8 using ortho-phosphoric acid and/or sodium hydroxide as pH regulators. The adsorption capacity for all the analytes on CoFe₂O₄@SiO₂-nylon 6 composite increased at low pH values, and decreased as pH was increased, as can be seen in Fig. 4. This is consistent with the p*H*_{pzc} of the composite (i.e., 3.1, see Section 3.1). Thus, at pH 2 the surface of the composite is positively charged due to the nylon amino-terminal groups, whereas the sulphonate groups of the analytes are deprotonated (p*K*_a < 1), and thus electrostatic attraction forces are favored. In concurrence with this explanation, EEs deteriorate at higher pH values since the carboxy-terminal groups of nylon become negatively charged thus repelling the deprotonated UV filters molecules. However, partial extraction was still observed, which demonstrates that nylon can also interact with the compounds via other mechanisms, such as hydrogen bonding and/or π-π interactions [21, 22]. As a confirmation, an aqueous standard solution of BZ3 (a compound belonging to the same family than BZ4 but without the sulfonic group in its structure) was extracted under the same experimental conditions. The EE was significantly lower (EE_{BZ3} = 33 % versus EE_{BZ4} = 53 %) which verifies the facts that a) electrostatic attraction plays the most important role in the adsorption of the analytes while other mechanisms contribute to a lesser extent and b) the method exhibits good selectivity for the target analytes as compared to other hydrophilic species thus enabling sample clean-up. Based on these results, all experiments were conducted at a pH value of 2. Lower pH values were avoided since the nylon decomposes, what negatively affects the extraction capability.

3.2.4. Ionic strength

The effect of the ionic strength on analyte adsorption was studied at the selected pH value (i.e., pH=2), at which the analytes and the composite are oppositely charged and thus attractive forces are expected. As can be seen in Fig. 5, the higher ionic strength of the donor solution, the lesser the EEs. This could be attributed to the competition of ions for the active sites of the sorbent. These results are in accordance with previous published articles stating that an increase in the ionic strength of the donor phase could have a negative effect on the adsorption

capacity when the electrostatic forces between the adsorbent surface and the analyte are attractive [34,35]. According to these results, no salt was added in further experiments.

However, the salt content in environmental waters may vary from 0.05 % in river water to 5 % (w/v) in seawater; therefore, the EEs will vary significantly. To mitigate this problem, 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid (NQS) (which also possess a sulfonic group) was used as surrogate. It was observed that ionic strength had the same influence in the EE of NQS as the analytes (i.e., its response decreased in a similar manner to the analytes when the ionic strength increased). Therefore, for further experiments, NQS was added in order to correct for any possible deviations due to the difference in the salt content.

3.2.5. Study of the desorption process

The desorption of the analytes from the surface of the composite is an important step to the performance of the method and is affected by both the solvent type and its volume. In this sense, the following solvents and solvent mixtures were tested: ethanol, in order to wash off the target compounds from the sorbent surface; 1 M HCl, in order to partially protonate the negatively-charged analytes and thus minimize the electrostatic attraction with the positively-charged nylon; a mixture of ethanol:1 M HCl 60:40 (v/v), in order to exploit the advantages of both ethanol and 1 M HCl; and finally, 1 M NaOH, in order to deprotonate the positively-charged nylon and thus minimize the electrostatic attraction with the negatively-charged compounds. The results revealed that the highest desorption efficiency was obtained with 1 M HCl. When desorption was performed with ethanol, ethanol:1 M HCl 60:40 (v/v) and 1 M NaOH, a poor desorption efficiency (i.e., 71 - 74 %, 78 - 82 % and 50 - 80 % compared to 1 M HCl, respectively) was observed for all the target analytes. These results show that the analytes are strongly retained in the nylon 6 network and can only be released under strongly acidic conditions by decomposition of the nylon material.

The desorption time was studied between 1 and 10 min. Complete desorption for all the analytes was accomplished after 5 min by using 2.5 mL of 1 M HCl, which was enough to completely cover the coated stir bar. Longer desorption times did not improve the EEs. Importantly, no carryover between repeated elutions was observed suggesting that desorption is quantitative and no additional desorption steps were necessary to recover the analytes.

3.3. Reusability of the composite

The reusability of the sorbent was also examined by sequentially extracting different aqueous standard solutions ($n = 3$) with the same composite under the optimum experimental conditions. Comparison of the EEs with t-test at the 95 % probability level showed significant changes for all analytes. The results showed a mean loss of 57 % after the second use and a mean loss of 85 % after the third use. That is because the $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -nylon 6 composite was partially decomposed due to its low stability at strong acidic conditions (see Section 3.2.5). However, the easy synthesis procedure, the commercial availability and the low-cost of the materials used for the preparation of the nylon composite mitigate this disadvantage. Alternatively, the use of ethanol as desorption solvent could be employed to increase the reusability of the composite, but at the expense of achieving lower desorption efficiency (see Section 3.2.5), which negatively affects the sensitivity.

3.4. Analytical figures of merit of the SBSDME

Method validation was performed by determining a series of important quality parameters such as the extraction efficiency (EE), the enrichment factor (EF), the linearity of the response curves, the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), and the repeatability of the method under the optimized conditions defined above. The results are summarized in Table 2.

The EE ranged between 45 and 58 %, showing that this is a non-exhaustive technique, like other solid phase-based microextraction techniques such as SPME or SBSE. The EF, calculated as the ratio of the concentration of the analyte in the final extract to the initial concentration in the aqueous phase, ranged between 105 and 145, which are consistent with the obtained EE and the volumes ratio. Unfortunately, no comparison can be performed with previously published papers dealing with the extraction of hydrophilic UV filters [25-28], because SPE was used in all the cases and no data for the EF were reported.

A high degree of linearity, that reached at least 500 ng mL^{-1} , was obtained in all cases, and the employed working range for the analysis of real samples was set from 10 to 50 ng mL^{-1} with regression coefficients (r^2) > 0.997 .

As can be also seen in Table 2, the LODs and LOQs, calculated as $3.S_{y/x}/b$ and $10.S_{y/x}/b$ criteria (where $S_{y/x}$ and b are the residual standard deviation and the slope, respectively, of the calibration curve), were found to be in the low ng mL^{-1} level ranging from 1.6 to 2.9 ng mL^{-1} and from 5.4 to 9.6 ng mL^{-1} , respectively. These levels are higher than those reported in previous published papers dealing with the extraction of hydrophilic UV filters by SPE and subsequent determination by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (i.e., in the ng L^{-1} range) [25-28]. Nevertheless, we should take into account that the sensitivity obtained by using a MS/MS detector is much higher than that obtained by using a UV spectrometry detector. Therefore, a considerable further improvement should be expected by using a MS/MS detector after SBS/DME.

The repeatability, expressed as relative standard deviation (RSD %), was evaluated applying the proposed method to five replicate aqueous standard solutions containing the target analytes at two different concentration levels (10 and 30 ng mL^{-1}) in the same day (intra-day) and five consecutive days (inter-day). Values were between 2.2 and 12.3 %, showing the good precision of the method.

3.5. Application to the analysis of genuine water samples

The reliability of the method and potential matrix effects were evaluated by means of recovery experiments in five real water samples of different matrix composition. In this sense, river, swimming pool and three seawater samples were spiked with 30 ng mL^{-1} of the target analytes, and analyzed according to the developed method. The relative recoveries, defined as the ratio of the concentration found in spiked water samples to that determined from the extraction of an aqueous standard solution of the same concentration, are summarized in Table 3. The obtained relative recoveries ranged from 91 to 115 % in seawater samples, 92 to 99 % in river water and 90 to 101 % in swimming pool water. Despite the original salt content in each sample (i.e., 0.05 % in river water, 0.5 % in swimming pool water and 4 % in seawater), the use of a surrogate enabled to obtain satisfactory results with the use of external calibration. A typical chromatogram of a real sample is shown in Fig. 6.

4. Conclusions

In the present work, a fully optimized SBS-DME-LC-UV method for the determination of four highly hydrophilic UV filters in water samples is presented. This methodology contributes to the development of expedient and sensitive methods for the determination of hydrophilic organic compounds in aqueous media at trace level. The extraction process is mediated by the use of magnetic nanoparticles-nylon 6 composite as sorbent, taking advantage of the high affinity that sulfonated compounds exhibit to polyamides. Compared to previous methods for the determination of polar compounds, this new methodology requires little sample manipulation and reduced analysis time. The preparation of the sorbent is a facile procedure and uses low-cost commercially available materials. Moreover, the developed method is simple and accurate, and consumes low amounts of solvents, thus it is both user and environmentally friendly according with the principles and practice of the Green Analytical Chemistry. Not at least, it should be emphasized that the SBS-DME approach allows for high enrichment of the target compounds and consequently increases the sensitivity. The use of more sensitive techniques like LC-MS/MS would greatly increase the sensitivity of the overall method.

Acknowledgements

Authors acknowledge the financial support of the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Project CTQ2015-70301). J.L. Benedé also thanks the University of Valencia for his fellowship (CPI-15-284).

References

- [1] T. Hyötyläinen, M.L. Riekkola, Sorbent- and liquid-phase microextraction techniques and membrane-assisted extraction in combination with gas chromatographic analysis: A review, *Anal. Chim. Acta* 614 (2008) 27-37
- [2] R. Costa, Newly introduced sample preparation techniques: Towards miniaturization, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 44 (2014) 299-310
- [3] C. Arthur, J. Pawliszyn, Solid-phase microextraction with thermal-desorption using fused-silica optical fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145-2148
- [4] F.J. Camino-Sánchez, R. Rodríguez-Gómez, A. Zafra-Gómez, A. Santos-Fandila, J.L. Vilchez, Stir bar sorptive extraction: Recent applications, limitations and future trends, *Talanta*, 130 (2014) 388-399
- [5] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C.A. Cramers, Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles, *J. Microcol. Sep.* 11 (1999) 737-747
- [6] F. Sánchez-Rojas, C. Bosch-Ojeda, J.M. Cano-Pavon, A Review of Stir Bar Sorptive Extraction, *Chromatographia* 69 (2009) 79-94
- [7] N. Gilart, R.M. Marcé, F. Borrull, N. Fontanals, New coatings for stir-bar sorptive extraction of polar emerging organic contaminants, *Trends Anal. Chem.* 54 (2014) 11-23
- [8] J.M.F. Nogueira, Stir-bar sorptive extraction: 15 years making sample preparation more environment-friendly, *Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 214-223
- [9] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412-431
- [10] J. Plotka-Wasyłka, N. Szczepanska, M. de la Guardia, J. Namiesnik, Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media, *Trends Anal. Chem.* 77 (2016) 23-43
- [11] M. Wierucka, M. Biziuk, Application of magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction in preparing biological, environmental and food samples, *Trends Anal. Chem.* 59 (2014) 50-58

- [12] E.M. Reyes-Gallardo, G. Lasarte-Aragonés, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, Hybridization of commercial polymeric microparticles and magnetic nanoparticles for the dispersive micro-solid phase extraction of nitroaromatic hydrocarbons from water, *J. Chromatogr. A* 1271 (2013) 50-55
- [13] C. Herrero-Latorre, J. Barciela-García, S. García-Martín, R.M. Peña-Crecente, J. Otárola-Jiménez, Magnetic solid-phase extraction using carbon nanotubes as sorbents: A review, *Anal. Chim. Acta* 892 (2015) 10-26
- [14] J.L. Benedé, A. Chisvert, D.L. Giokas, A. Salvador, Development of stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles and its analytical application to the determination of hydrophobic organic compounds in aqueous media. *J. Chromatogr. A* 1362 (2014) 25-33
- [15] J.L. Benedé, A. Chisvert, D.L. Giokas, A. Salvador, Determination of ultraviolet filters in bathing waters by stir bar sorptive-dispersive microextraction coupled to thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry, *Talanta* 147 (2016) 246-252
- [16] M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, Chemical analysis and ecotoxicological effects of organic UV-absorbing compounds in aquatic ecosystems, *Trends Anal. Chem.* 28 (2009) 708-717
- [17] P. Gago-Ferrero, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, An overview of UV-absorbing compounds (organic UV-filters) in aquatic biota, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 2597-2610
- [18] S. Ramos, V. Homem, A. Alves, L. Santos, Advances in analytical methods and occurrence of organic UV-filters in the environment – A review, *Sci. Total Environm.* 526 (2015) 278-311
- [19] R.H. Peters, Nylon Fibre: A Study of the Mechanism of the Dyeing Process with Acid Dyes, *J. Soc. Dyers Colourists* 61 (1945) 95-100
- [20] F.C. McGrew, A.K. Schneider, The sorption of acid dyes on nylon *J. American Chem. Soc.* 72 (1950) 2547-2552
- [21] E.M. Reyes-Gallardo, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, Magnetic nanoparticles-nylon 6 composite for the dispersive micro solid phase extraction of selected polycyclic aromatic hydrocarbons from water samples, *J. Chromatogr. A* 1345 (2014) 43-49

- [22] E.M. Reyes-Gallardo, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, Dispersive micro-solid phase extraction of bisphenol A from milk using magnetic nylon 6 composite and its final determination by HPLC-UV, *Microchem. J.* 124 (2016) 751-756
- [23] S.D. Richardson SD, S.Y. Kimura, Water analysis: Emerging contaminants and current issues, *Anal. Chem.* 88 (2016) 546-582
- [24] A. Chisvert, A. Salvador A, Analytical methodologies for the determination of personal care products in water samples, in: M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló (Eds.), *Personal care products in the aquatic environment*, Springer, Berlin, 2014, pp. 191-229
- [25] R. Rodil, J.B. Quintana, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, Multiclass determination of sunscreen chemicals in water samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 80 (2008) 1307-1315
- [26] N. Negreira, I. Rodríguez, M. Ramil, E. Rubí, R. Cela, Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of hydroxylated benzophenone UV absorbers in environmental water samples, *Anal. Chim. Acta* 654 (2009) 162-170
- [27] S. Bratkovics, Y. Sapozhnikova, Determination of seven commonly used organic UV filters in fresh and saline waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Methods* 2 (2011) 2943-2950
- [28] P. Gago-Ferrero, N. Mastroianni, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, Fully automated determination of nine ultraviolet filters and transformation products in natural waters and wastewaters by on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1294 (2013) 106-116
- [29] K. Maaz, A. Mumtaz, S.K. Hasanain, A. Ceylan, Synthesis and magnetic properties of cobalt ferrite nanoparticles prepared by wet chemical route, *J. Magn. Mater.* 308 (2007) 289-295
- [30] A.L. Andrade, D.M. Souza, M.C. Pereira, J.D. Fabris, R.Z. Domingues, Synthesis and characterization of magnetic nanoparticles coated with silica through a sol-gel approach, *Cerâmica* 55 (2009) 420-424

- [31] I.P. Román, A. Chisvert, A. Canals, Dispersive solid-phase extraction based on oleic acid-coated magnetic nanoparticles followed by gas chromatography–mass spectrometry for UV-filter determination in water samples, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2467-2475
- [32] A. Tovar-Sánchez, D. Sánchez-Quiles, G. Basterretxea, J.L. Benedé, A. Chisvert, A. Salvador, I. Moreno-Garrido, J. Blasco, Sunscreen products as emerging pollutants to coastal waters, *Plos One* 8 (2013), e65451
- [33] A. Balaguer, A. Chisvert, A. Salvador, Sequential-injection determination of traces of disodium phenyl dibenzimidazole tetrasulphonate in urine from users of sunscreens by on-line solid-phase extraction coupled with a fluorimetric detector, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 922-927
- [34] G. Newcombe, M. Drikas, Adsorption of NOM activated carbon: electrostatic and non-electrostatic effects, *Carbon* 35 (1997) 1239-1250
- [35] Y.S. Al-Degs, M.I. El-Barghouthi, A.H. El-Sheikh, G.M. Walker, Effect of solution pH, ionic strength, and temperatura on adsorption behavior of reactive dyes on activated carbón, *Dyes and pigments* 77 (2008) 16-23

Figure captions

Fig. 1. Schematic diagram of the proposed method.

Fig. 2. Effect of the composite amount on the extraction process. Extraction conditions: 25 mL sample volume, 20 min extraction time. Desorption conditions: 2.5 mL EtOH:HCl 1 M (60:40), 5 min desorption time.

Fig. 3. Effect of the extraction time on the extraction process. Extraction conditions: 25 mL sample volume, 100 mg composite. Desorption conditions: 2.5 mL EtOH:HCl 1 M (60:40), 5 min desorption time.

Fig. 4. Effect of the pH of the donor phase on the extraction process. Extraction conditions: 25 mL sample volume, 100 mg composite, 30 min extraction time. Desorption conditions: 2.5 mL EtOH:HCl 1 M (60:40), 5 min desorption time.

Fig. 5. Effect of the ionic strength of the donor phase on the extraction process. Extraction conditions: 25 mL sample volume adjusted to pH 2, 100 mg composite, 30 min extraction time. Desorption conditions: 2.5 mL EtOH:HCl 1 M (60:40), 5 min desorption time.

Fig. 6. Chromatogram of a seawater sample spiked with 30 ng mL⁻¹ of the target UV filters.

Fig. 1.

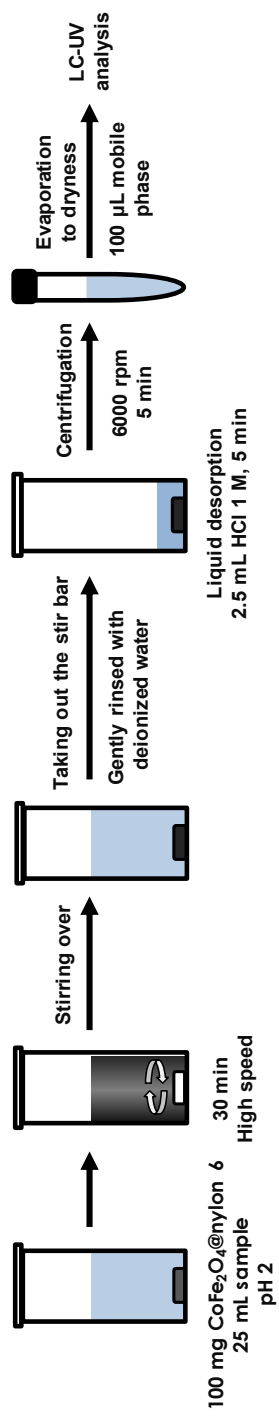


Fig. 2.

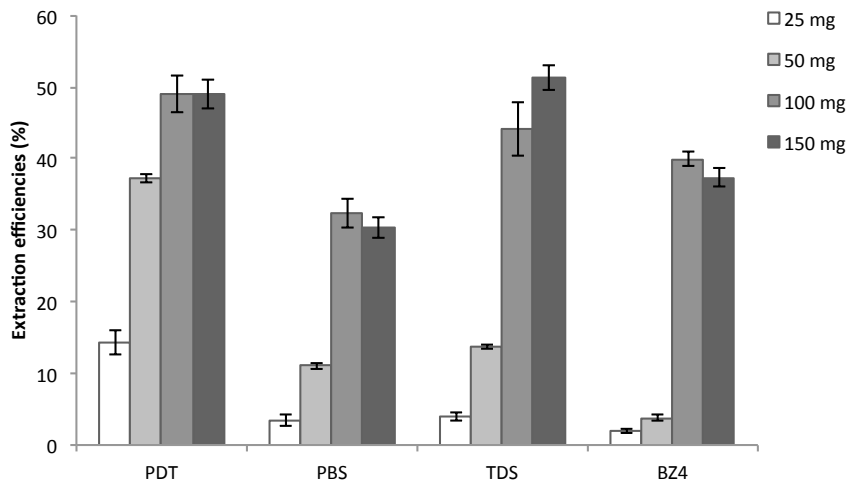


Fig. 3.

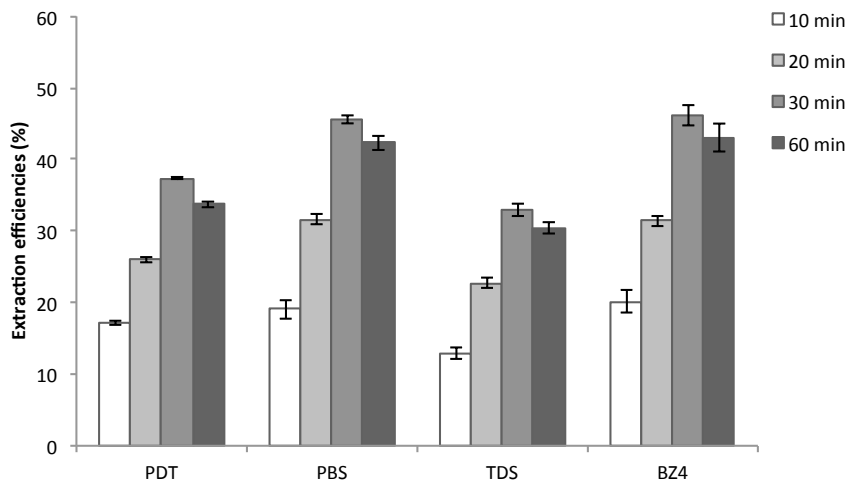


Fig. 4.

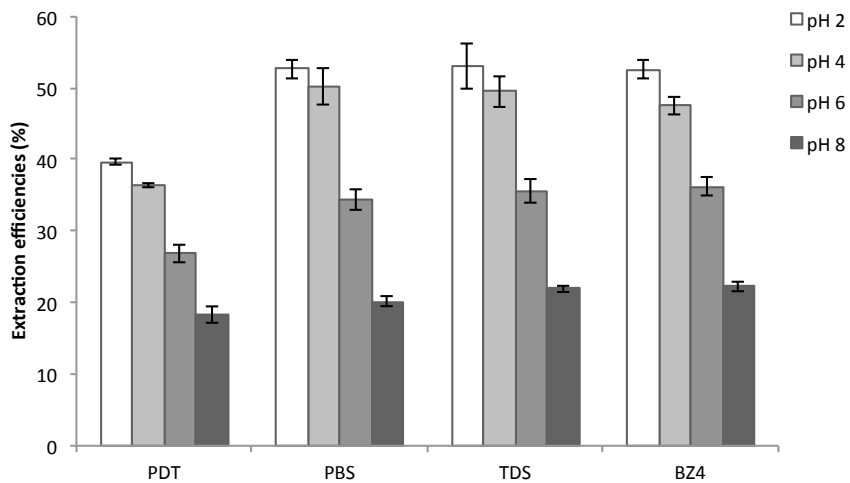


Fig. 5.

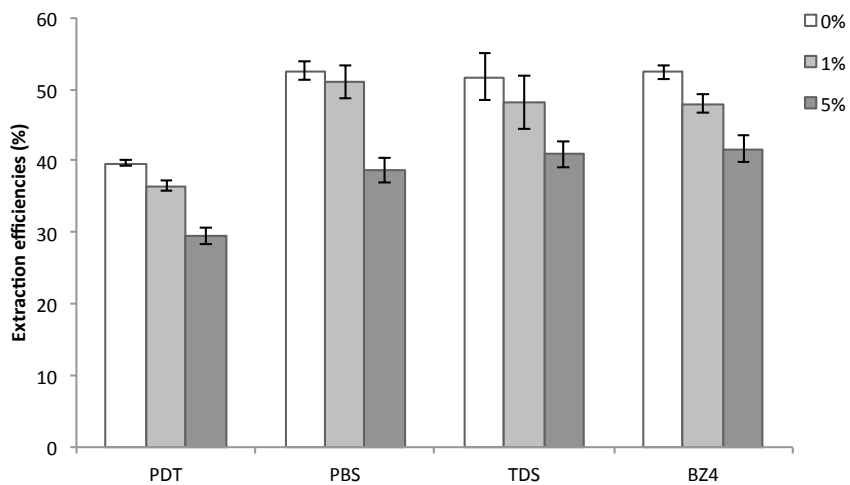


Fig. 6.

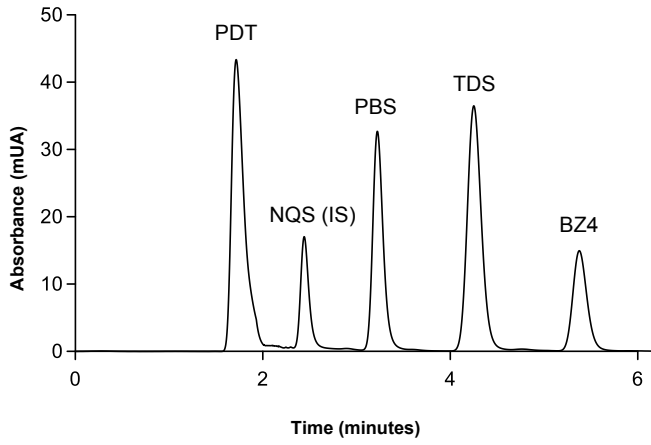


Table 1. Chemical structure and some relevant data of the target compounds and the surrogate.

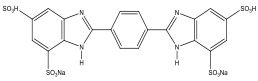
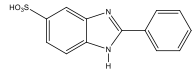
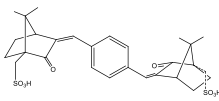
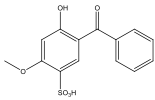
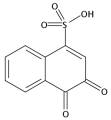
Compound	Chemical structure	Molecular formula	CAS number	log P _{ow}
Disodium phenyldibenzimidazole tetrasulfonate (PDT)		C ₂₀ H ₁₄ N ₄ O ₁₂ S ₄ .2Na	180898-37-7	- 0.26
2-Phenylbenzimidazole-5-sulfonic acid (PBS)		C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₃ S	27503-81-7	- 0.234
Terephthalylidene-3,3'-dicamphor-10,10'-disulfonic acid (TDS)		C ₂₈ H ₃₄ O ₈ S ₂	92761-26-7	- 1.820
Benzophenone-4 (BZ4)		C ₁₄ H ₁₂ O ₆ S	4065-45-6	0.993
1,2-Naphthoquinone-4-sulfonic acid (NQS)		C ₁₀ H ₆ O ₅ S	2066-93-5	- 0.445

Table 2. Main analytical parameters of the proposed method.

UV filter	Slope \pm s_b (ng mL ⁻¹)/10 ⁻⁴ ^a	Regression coefficient R^2 ^a	EE ^b	EF ^b	LOD ^c (ng mL ⁻¹)	LOQ ^c (ng mL ⁻¹)	Repeatability ^d (% RSD)			
							Intra-day		Inter-day	
							10 ng mL ⁻¹	30 ng mL ⁻¹	10 ng mL ⁻¹	30 ng mL ⁻¹
PDT	350 \pm 7	0.998	45 \pm 4	105 \pm 8	1.9	6.3	2.6	5.6	12.3	11.5
PBS	253 \pm 7	0.997	58 \pm 2	145 \pm 5	2.8	9.2	4.0	4.7	8.6	8.8
TDS	384 \pm 10	0.997	57 \pm 5	143 \pm 9	2.9	9.6	2.2	5.3	7.7	9.3
BZ4	155 \pm 2	0.999	55 \pm 5	137 \pm 8	1.6	5.4	3.3	5.8	6.5	8.6

^a Working range: 10 – 50 ng mL⁻¹; number of calibration points: 6; s_b : standard deviation of the slope.

^b EE: extraction efficiency; EF: enrichment factor; as the mean of three replicates (\pm standard deviation) of an aqueous standard solution containing 100 ng mL⁻¹ of the target analytes.

^c LOD: limit of detection; LOQ: limit of quantification; calculated as $3S_{y/x}/b$ and $10S_{y/x}/b$ criteria, respectively, where $S_{y/x}$ is the residual standard deviation and b is the slope of the calibration curve.

^d Relative standard deviation (RSD), five replicate analysis of an aqueous standard solution containing 10 and 30 ng mL⁻¹ of the target analytes.

Table 3. Relative recovery values obtained applying the proposed method to five spiked water samples at 30 ng mL⁻¹.

UV filter	Relative recoveries (%)				
	Sea water 1 ^a	Sea water 2 ^b	Sea water 3 ^c	Swimming pool water ^d	River water ^e
PDT	91 ± 8	94 ± 9	97 ± 8	90 ± 7	96 ± 5
PBS	104 ± 5	109 ± 5	115 ± 2	101 ± 8	93 ± 8
TDS	97 ± 5	99 ± 4	105 ± 5	100 ± 8	92 ± 5
BZ4	95 ± 6	97 ± 5	103 ± 6	92 ± 5	99 ± 5

^a Seawater 1: Santa Ponsa beach (Majorca Island, Spain)

^b Seawater 2: Pinedo beach (Valencia, Spain)

^c Seawater 3: Patacona beach (Valencia, Spain)

^d Swimming pool water: Almudaina's swimming pool (Alicante, Spain)

^e River water: Turia river (Valencia, Spain)

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles-nylon 6 composite for the extraction of hydrophilic organic compounds in aqueous media

Juan L. Benedé^a, Alberto Chisvert^{a,*}, Dimosthenis L. Giokas^b, Amparo Salvador^a

^a Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

^b Department of Chemistry, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece

* Corresponding author:

e-mail addresses: alberto.chisvert@uv.es (A. Chisvert)

Instruments for nanoparticles and composite characterization

Different characterization techniques were applied to the $\text{CoFe}_2\text{O}_4@SiO_2$ nanoparticles and the $\text{CoFe}_2\text{O}_4@SiO_2$ -nylon 6 composite.

Particle size distribution curves of the MNPs and the composite were obtained using a Malvern Zetasizer ZS instrument and a Malvern Mastersizer 2000 instrument, respectively.

Zeta potential measurements in order to determine the point of zero charge of the composite were performed also using a Malvern Zetasizer ZS instrument.

A JEOL JEM-1010 transmission electron microscopy (TEM) operating at 100 kV equipped with an AMT RX80 (8.0 Mpx) digital camera was used to observe the morphology of the MNPs and composites.

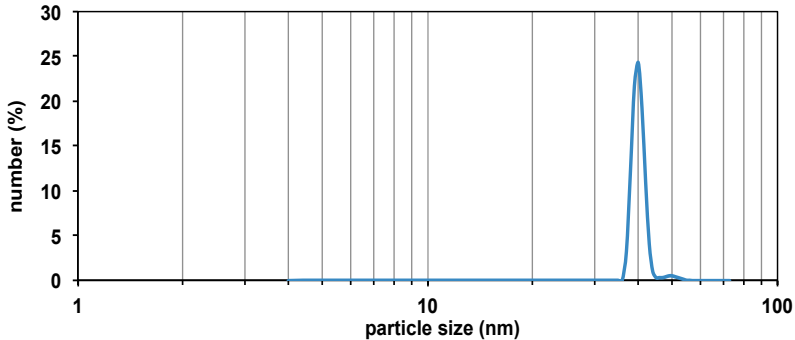
Characterization of the $\text{CoFe}_2\text{O}_4@SiO_2$ MNPs and $\text{CoFe}_2\text{O}_4@SiO_2$ -nylon 6 composite

Particle size

Particle size was determined by the number distribution method measured by the dynamic light scattering (DLS) technique. Figure S1 shows the particle size distribution by number of (a) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@SiO_2$ nanoparticles and (b) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@SiO_2$ -nylon 6 composite after measuring a

dispersion (10 mg/mL) of these materials. The mean size obtained from these representations was 40 nm and 35 μm , respectively.

a)



b)

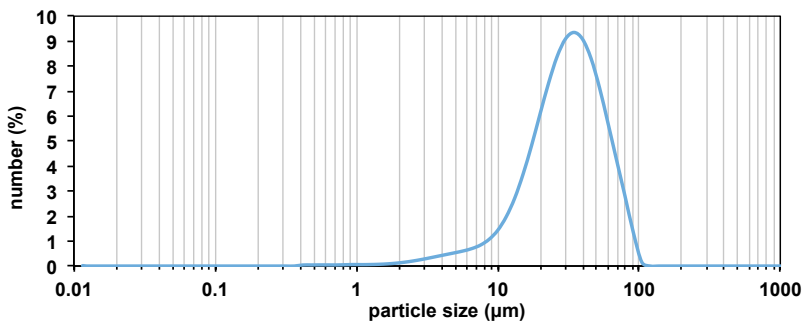


Figure S1. Size distribution curves by number for $\text{CoFe}_2\text{O}_4@SiO_2$ nanoparticles and (b) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@SiO_2$ -nylon 6 composite

Zeta potential – point of zero charge

Zeta potential measurements were performed in order to determine the point of zero charge (pzc) of the $\text{CoFe}_2\text{O}_4@SiO_2$ -nylon 6 composite. Zeta potential is an indicator of dispersion stability and it is influenced by the surface chemistry. The pH of the sample is one of the most important factors that affect the zeta potential of the dispersion. Therefore, a zeta potential versus pH curve is used to determine at which pH the zeta potential equals zero (pH_{pzc}), i.e., the

pH at which the surface has a net neutral charge. When pH of the sample is lower than pH_{pzc} , the composite surface will have a net positive charge, while the surface will have a net negative charge if the pH of the sample is above its pH_{pzc} .

Figure S2 shows the zeta potential versus pH plot for a suspension of composite (10 mg/mL) in different 1 mM ortho-phosphoric acid solutions adjusted to different pH values (i.e. 3.0, 3.5, 4.0, 5.0 and 6.0) with 1 M sodium hydroxide. The responses at $\text{pH} < 3$ were not satisfactory due to the high conductivity of the sample at this pH value, that needed 10 mM buffer solution. As can be seen, pH_{pzc} of the $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -nylon 6 composite was 3.1.

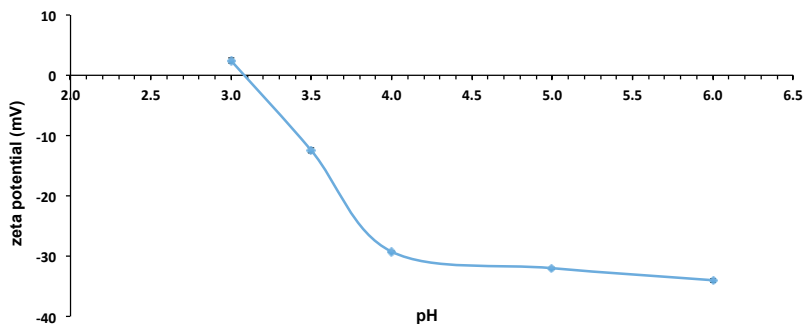


Figure S2. Zeta potential vs pH

Morphology

Morphology of the MNPs and the composite was determined by TEM microscopy operating at 100 kV. Representative TEM micrographs of $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ nanoparticles and $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -nylon 6 composite are shown in Figure S3 and Figure S4, respectively. According to these images, the MNPs are spherical and the obtained mean size matches with that previously obtained by DLS (40 nm). Regarding to the composite, it can be observed as the MNPs are clearly embedded in the polymeric network, maintaining their original size.

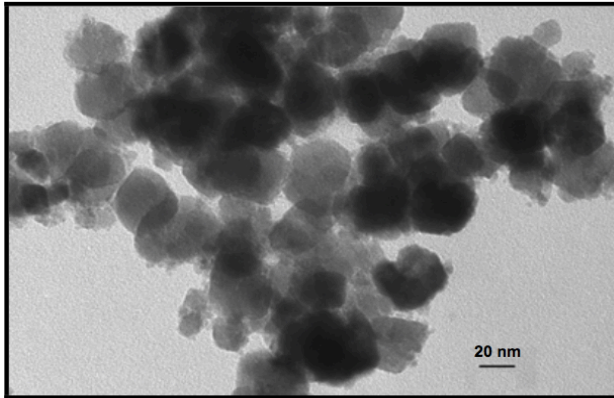


Figure S3. TEM micrographs of $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ MNPs

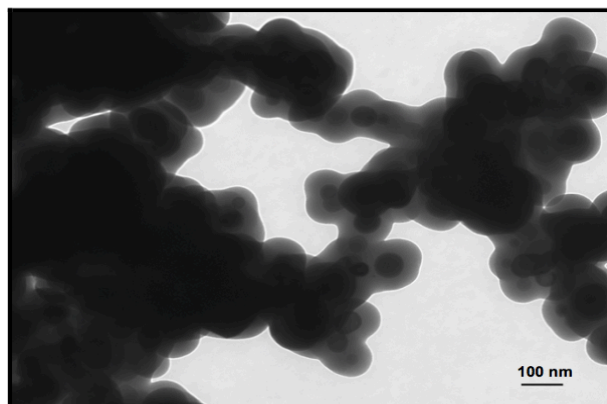
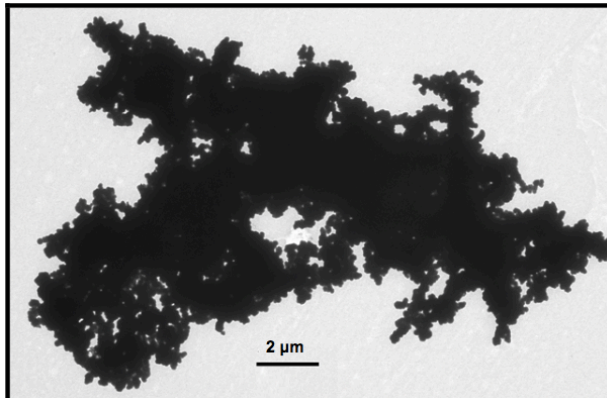


Figure S4. TEM micrographs of $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ -nylon 6 composite