

MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA *IN-TUBE* PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS ORGÁNICOS EN MATRICES ATMOSFÉRICAS

Autora: María Fernández Amado

Tesis doctoral, 2017

Directoras:

Dra. María del Carmen Prieto Blanco

Dra. Purificación López Mahía

Programa de doctorado “Química Ambiental y Fundamental” (RD 1393/2007)



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



Programa Oficial de Doctorado "Química Ambiental y Fundamental"
(RD 1393/2007). Área de Química Analítica

MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA *IN-TUBE* PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS ORGÁNICOS EN MATRICES ATMOSFÉRICAS

Memoria para optar al grado de Doctor
con Mención Internacional presentada por

María Fernández Amado

Directoras

Dra. María del Carmen Prieto Blanco

Dra. Purificación López Mahía

A Coruña, 2017



Dra. Dña. MARIA DEL CARMEN PRIETO BLANCO, Contratada Doctor y **Dra. Dña. PURIFICACIÓN LÓPEZ MAHÍA**, Catedrática del Área de Química Analítica de la Universidade da Coruña,

CERTIFICAN

Que la presente memoria titulada "Microextracción en fase sólida *in-tube* para el análisis de compuestos orgánicos en matrices atmosféricas" ha sido realizada por Dña. María Fernández Amado bajo su dirección en el Departamento de Química Analítica de la Universidade da Coruña, constituye su Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor con Mención Internacional.

Y para que así conste, firman la presente en A Coruña a 20 de abril de 2017.

Dra. Dña. María del Carmen Prieto Blanco

Dra. Dña. Purificación López Mahía

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por la concesión de una ayuda del programa de Formación de Profesorado Universitario para la realización del doctorado (AP2012-5486) y de una ayuda complementaria para estancia breve. A la Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria de la Xunta de Galicia por la concesión de una ayuda del Plan gallego de Investigación, Innovación y Crecimiento 2011-2015 (Plan I2C) de la Secretaría Xeral de Universidades para formación como doctora (Modalidad A).

Al Departamento de Química Analítica de la Universidad de A Coruña y al Instituto Universitario de Medio Ambiente por permitirme llevar a cabo este trabajo con ellos.

A mis directoras Dra. Dña. M^a Carmen Prieto Blanco y Dra. Dña. Purificación López Mahía por su paciencia, sus ideas y su ayuda.

Ao Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM), ao Departamento de Ambiente e Ordenamento e ao Departamento de Química da Universidade de Aveiro (Portugal), por aceitar-me para realizar lá uma estancia, e à doutora Célia dos Anjos Alves, responsável dessa estancia. A sua ajuda com o alojamento ou ir buscar-me à estação superam a cortesia, obrigada. Quero expressar também o meu agradecimento a todos os que ali conheci: professores, investigadores, doutorandos... e que me aceitaram como a uma mais no seu dia a dia e nas suas celebrações. À professora Teresa e ao professor Casimiro pelos seus conselhos e ajuda. A todas as pessoas do departamento de Química pela sua amabilidade fazendo-me sítio num laboratório muito ocupado. Aos meus companheiros de gabinete, a Maria João e o Vasco, pela sua boa disposição para comigo, e sobre tudo ao Danilo pela sua inestimável ajuda e apoio. Aprendi muito contigo, obrigada.

A los Servicios de Apoio á Investigación de la Universidade da Coruña, ya que sin los resultados proporcionados por ellos la parte de caracterización del particulado atmosférico y estudio de contribución de fuentes no habría sido posible.

A Fulvio Amato, por su instrucción primero, y por su valiosa ayuda después, con el PMF.

A Maricarmen, gracias por tu preocupación y por tu orientación con tus conocimientos y experiencia. Aunque no siempre estuviésemos de acuerdo, valoro enormemente tu inmensa dedicación a esta tesis. Sé que no muchos directores ofrecen

tanta ayuda y esfuerzos a sus doctorandos, y por eso te doy mis más sinceros agradecimientos por tu tiempo y por tu inestimable ayuda. No sé si esta tesis habría podido salir adelante sin ti, pero de haberlo hecho, habría sido peor de lo que es.

A Puri, gracias por tu confianza, por tu apoyo y por tus ánimos, especialmente en esta agobiada etapa final, cuando te has involucrado al máximo para que esto saliera adelante a tiempo.

A la gente del IUMA, Silvia que se encargó de parte de las extracciones, Iago que me ayudó con el resto, y especialmente a Pili, que siempre me ha ayudado en cuanto he necesitado y ha sido imprescindible en muestreos y análisis.

A la gente del Departamento y todos aquellos que pasasteis por aquí, algunos de muchos años con los que yo sólo coincidí "de refilón", y muchos alumnos con beca de colaboración, trabajos de fin de grado y máster, prácticas... durante el largo tiempo que me ha llevado esta tesis. En especial, gracias a Patricia y Laura por ayudarme durante unas semanas. ¡Menudo placer tener el equipo listo cuando llegaba cada mañana!

Quiero dar las gracias a los profes, todos muy atentos y con los que he tenido amenas conversaciones. A Elisa, la primera profe de Analítica que tuve y responsable con aquellas clases de que haya recalado en este departamento; a Alatzne, por su disposición para ayudar y solucionar cualquier problema; a Elia, por su compañía en el laboratorio y las agradables charlas que compartimos de cuando en cuando; a Andrade, por sus ánimos los días en que a ciertas horas no quedaba nadie más por el laboratorio; a Isa, por explicarme y ayudarme con los análisis de electroforesis; a Rosa y Jorge, encantadores explicándome las prácticas además de siempre interesándose por cómo me iba; a Mariajo, con la que comparto horario "enemiga del madrugón" y por tanto he coincidido bastante a horas casi intempestivas; y a Sol y Darío, siempre con una palabra amable y buenos ánimos.

A Carmen, Vero, Fany, Mari Paz y Gloria, por su continuo interés, sus sugerencias cuando algo no salía y sus ofrecimientos a ayudarme en lo que hiciera falta, además de alguna que otra tertulia de lo más entretenida. Y gracias Vero por hacer de fotógrafa, sin ti a saber qué habría salido en la Fig. 14b (venga, todos a mirarla jaja).

A Noelia Rodríguez por sus detalles conmigo, desde hacerme soplar las velas en un pastel en mi cumple hasta regalarme la taza en la que desayuné cada día en Aveiro. A Noelia Salgueiro por lo bien que lo pasamos por Portugal y por su importante apoyo en esta etapa final de la tesis. A Javi por su compañía en el laboratorio, compartiendo penas

y alegrías. A los tres, junto con Cris (y Iago en ocasiones) por lo bien que lo pasamos en comidas, paseos y ese escapismo, ayudándome (o casi obligándome jeje) a desconectar un poco de tanto trabajo.

A las muchas personas que me han llevado alguna vez en coche. Creo que prácticamente todo el departamento en algún momento, alguna de forma reiterada. La seguridad vial os agradece su contribución a que yo no haya sido un peligro público, en serio.

Lo que soy hoy ha sido forjado por mi pasado. Por ello no puedo dejar de mencionar a todas las personas importantes que me han acompañado en el camino de mi vida, hasta llegar aquí. Porque aunque no hayan contribuido directamente en esta tesis, yo no sería quien soy sin ellos. Y por muy loco que pueda parecer, eso incluye a todas las personas involucradas en mis series, películas, libros, canciones y videojuegos favoritos, los que me han acompañado e inspirado a lo largo de mi vida y han contribuido a construir la persona que soy hoy.

A (casi) todos mis profesores de la licenciatura, del IES Elviña y sobre todo del colegio Alborada. Gracias por enseñarme a aprender, habilidad básica que marca diferencias.

A todos mis compañeros (amigos) de la carrera. Ha sido un placer enorme conocerlos y compartir esos años con vosotros. Me siento muy afortunada de que hayamos coincidido en la vida.

A los cinco valientes que decidisteis que acabar la carrera bien merecía un viaje. Gracias Laura, Garde, Isa, Hugo y Sergio por unos días maravillosos, y por las (lamentablemente poco frecuentes) quedadas posteriores, con Pablo incluido en el grupo.

A mi compi, Isa, por ser una genial química, fantástica compañera, gran amiga y mejor persona. Ojalá pueda parecerme más a ti algún día.

A Sergio, Luis, Lucía y Almudena (y consortes jeje) por todas las cenas, las tardes de piscina y los juegos varios (y por las inolvidables fotos del Whatsapp en que salimos MUY mal).

A Mari (Nieves mejor, que sé que te gusta más). Porque ya sabes que contigo me lo paso pipa, este largo camino no habría sido lo mismo sin ti.

Iria, fuiste mi primera amiga en la facultad y siempre te he tenido a mi lado, incluso en la distancia. Gracias por hacer que nunca me sintiera sola.

A ambas os doy las gracias por ser dos de las mejores amigas que he tenido, tengo y tendré. Por absolutamente todo. Por hacerme completamente feliz. Por estar ahí y hacer que valga la pena. Por los ataques de risa, por las cenas, por el cine, por las series, por las risas (¿lo había dicho ya? Es que es lo mejor), por los culebrones, por el singstar... Ah, sí, y por las risas. Os he echado mucho de menos en los últimos tiempos, el laboratorio era mucho más divertido cuando estabais por aquí.

Y ya fuera de la facultad en la que he pasado casi 11 años, debo mencionar, aunque sea brevemente, a todas esas personas importantes que me acompañaron durante distintas etapas de mi vida. A todos mis amigos. A los que hice en el instituto, mi acogedora pandilla de 2º, mi grupito de 4º... A mis compañeros de piano y a Bárbara, una de las mejores profes que he tenido en mi vida. A esos vecinos con los que jugué tantas tardes. Al grupo de Alemania (y a los que no pudieron venir), porque ese viaje me cambió la vida y todos fuisteis un inconmensurable apoyo en momentos duros. A mis amigos de siempre, los del cole, porque crecimos juntos. Por muchos años que pasen no os olvido.

A toda mi familia, mis tíos/as, primos de todos los grados, mi tío Pepe, mis abuelos... y sobre todo a mis padres. Por su paciencia y aguante. Por su apoyo incondicional. Ellos sí que han estado ahí absolutamente siempre. Ellos sí son los más importantes responsables de que sea como soy (excepto por mis defectos, que son por no hacerles caso jeje). Simplemente porque lo bueno que hay en mí se lo debo a ellos... GRACIAS.

No soy fácil, lo sé. Así que gracias a todos por aguantarme con mis múltiples defectos y manías.

Y ya por último doy gracias a Dios por haberme acercado a ser lo que siempre había querido ser, y sobre todo por la buena gente que he conocido en el camino.

AYUDAS DISFRUTADAS

- Ayuda complementaria para estancia breve para beneficiarios del subprograma de formación de profesorado universitario (FPU). Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. Resolución de 9 de diciembre de 2014 de la Secretaría de Estado de Educación, Formación Profesional y Universidades (BOE del 22 de diciembre). Período: 1 mayo 2015 al 31 julio 2015.
- Ayuda de Posgrado para la Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España (Ref. AP2012-5486). Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. Resolución de 28 de febrero de 2013 de la Secretaría de Estado de Educación, Formación Profesional y Universidades (BOE del 18 de marzo). Período: 21 marzo 2013 al 3 diciembre 2016.
- Ayuda de apoyo a la etapa predoctoral del Plan gallego de Investigación, Innovación y Crecimiento 2011-2015 (Plan I2C) de la Secretaría Xeral de Universidades (Modalidad A). Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria de la Xunta de Galicia. Período: 5 diciembre 2012 al 21 marzo 2013.

ESTANCIAS DE INVESTIGACIÓN

- Caracterización de las fracciones carbonosas en matrices atmosféricas. CESAM-*Centre for Environmental and Marine Studies*, Universidad de Aveiro (Portugal). Duración: 3 meses (1/05/2015 al 31/07/2015). El objetivo fue la caracterización de distintas fracciones carbonosas en material particulado atmosférico de diferentes entornos de la Comunidad Autónoma de Galicia. La estancia fue financiada por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte con una ayuda complementaria para estancia breve para beneficiarios del subprograma de formación de profesorado universitario (FPU).

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN, CONTRATOS/CONVENIOS QUE FINANCIARON ESTA INVESTIGACIÓN

- Programa de Consolidación y estructuración de unidades de investigación competitivas del sistema universitario gallego. *Período*: 2013-2016. Xunta de Galicia. Consellería de Educación e ordenación universitaria. Dirección Xeral de Promoción Científica e Tecnolóxica do Sistema Universitario Gallego. *Investigador Responsable*: Darío Prada Rodríguez como responsable del grupo de investigación de Química Analítica Aplicada de la UDC (QANAP/G000343). *Grado de responsabilidad/participación*: Participante en las tareas de investigación que realiza en su Tesis Doctoral y otras colaboraciones puntuales dentro del grupo de investigación.
- Programa de Consolidación y estructuración de unidades de investigación competitivas del sistema universitario gallego. *Período*: 2010-2012. Xunta de Galicia. Consellería de Educación e ordenación universitaria. *Investigador Responsable*: Darío Prada Rodríguez como responsable del grupo de investigación de Química Analítica Aplicada de la UDC (QANAP/G000343). *Grado de responsabilidad/participación*: Participante en las tareas de investigación que realiza en su Tesis Doctoral y otras colaboraciones puntuales dentro del grupo de investigación.

- Creating and testing for controlling the air quality based on a new biotechnological tools. Use of a devitalized moss clone as passive contaminant sensor (MossClone). *Período:* Abril 2012 a marzo 2015. Proyecto Europeo EU FP7-ENV-2011-ECO-INNOVATION (No. 282952). *Investigador Principal:* Jose Angel Fernández (USC). *Responsable (UDC):* Purificación López Mahía. *Número de participantes UDC:* 5. *Grado de responsabilidad/participación:* Colaboración en las tareas de muestreo y análisis de HAP en muestras de agua de lluvia y deposición total.
- Caracterización de la deposición total y de la fracción acuosa del material particulado atmosférico: relación material particulado y precipitación *Período:* 2010-2013. Consellería de Economía e Industria (10MDS164019PR). *Investigador Principal:* Purificación López Mahía. *Número de investigadores participantes:* 10. *Grado de responsabilidad/participación:* Colaboración en la puesta a punto de un método basado en IT-SPME acoplado a HPLC-UV-FLD para la determinación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en la deposición atmosférica y en el extracto acuoso del particulado atmosférico.
- Análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en centrales térmicas de Endesa. ENDESA S.A., gestionado a través de Feuga (Nº proyecto 320/55-6500213346). *Período:* Enero 2014 a enero 2015. *Investigadores responsables:* Darío Prada Rodríguez, Soledad Muniategui Lorenzo y Purificación López Mahía. *Grado de responsabilidad/participación:* Colaboración en el tratamiento de las muestras (particulado y condensados) y posterior determinación por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección ultravioleta y fluorescencia.
- Determinaciones analíticas de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en muestras de emisiones a la atmósfera. ENDESA S.A., gestionado a través de Feuga (Nº proyecto 320-139). *Período:* Marzo 2013 a diciembre 2013. *Investigadores responsables:* Darío Prada Rodríguez, Soledad Muniategui Lorenzo y Purificación López Mahía. *Grado de responsabilidad/participación:* Colaboración en el tratamiento de las muestras (particulado y condensados) y posterior determinación por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección ultravioleta y fluorescencia.
- Determinaciones analíticas de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en muestras de emisiones a la atmósfera. ENDESA S.A., gestionado a través de Feuga (Nº proyecto 320-133). *Período:* Marzo 2012 a diciembre 2012. *Investigadores responsables:* Darío Prada Rodríguez, Soledad Muniategui Lorenzo y Purificación López Mahía. *Grado de responsabilidad/participación:* Colaboración en el tratamiento de las muestras (particulado y condensados) y posterior determinación por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección ultravioleta y fluorescencia.

ÍNDICE

Índice de figuras	i
Índice de tablas	vii
Abreviaturas y acrónimos	xi
Resumen/Resumo/Abstract	xix
Capítulo 1. Introducción	
1.1. Descripción de los analitos objeto de estudio	3
1.1.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)	3
1.1.2. Ésteres del ácido ftálico	7
1.1.3. Aminas alifáticas	10
1.2. Descripción de las matrices atmosféricas	12
1.2.1. Agua de lluvia	12
1.2.2. Material particulado atmosférico	15
1.2.3. Estudios de contribución de fuentes	17
1.3. Microextracción en fase sólida <i>in-tube</i> (IT-SPME)	18
1.4. Referencias	21
Capítulo 2. Objetivos	31
Capítulo 3. Discusión sobre las fortalezas y debilidades de la microextracción en fase sólida <i>in-tube</i> (IT-SPME) usando un estudio de alcance (<i>scoping review</i>)	
3.1. Estado del arte de IT-SPME (2009-2015)	35
3.2. Fortalezas y debilidades: configuraciones, parámetros y aplicaciones	38
3.2.1. Modalidades de extracción y configuraciones en IT-SPME	38
3.2.2. Parámetros a optimizar en IT-SPME	42
3.2.3. Aplicaciones a distintos tipos de analitos y matrices	50
3.3. Tendencias actuales que refuerzan la técnica	62
3.3.1. Nuevos acoplamientos	62
3.3.2. Nuevas modalidades de IT-SPME	64
3.3.3. Nuevos tipos de capilares y fases	65

3.4. Conclusiones y líneas futuras	67
3.5. Referencias	69
Capítulo 4. Desarrollo de un método de determinación de HAP en agua de lluvia mediante IT-SPME	
4.1. Antecedentes de la determinación de HAP en agua de lluvia y objetivos específicos	81
4.2. Metodología	87
4.3. Resultados y discusión	89
4.3.1. Optimización de IT-SPME	89
• Selección de la configuración de IT-SPME y del gradiente de separación cromatográfica	89
• Evaluación del efecto del modificador orgánico en la extracción	92
• Optimización del volumen de carga	99
4.3.2. Estudio de la estabilidad de las disoluciones acuosas de HAP	101
4.3.3. Optimización de la filtración de las muestras	104
4.3.4. Estudio de blancos de procedimiento	106
4.3.5. Validación del método	109
4.3.6. Aplicación a muestras	114
4.3.7. Optimización de la separación cromatográfica simultánea de HAP y ftalatos	117
4.4. Conclusiones	119
4.5. Referencias	120
Capítulo 5. Desarrollo de un método de determinación de ftalatos en agua de lluvia	
5.1. Antecedentes de la determinación de ftalatos en agua de lluvia y objetivos específicos	127
5.2. Metodología	130
5.3. Resultados y discusión	131
5.3.1. Optimización de la separación cromatográfica	131
5.3.2. Optimización de IT-SPME	135
• Elección del modificador orgánico	135

• Optimización del volumen de carga	139
• Optimización de la longitud del capilar, el acondicionamiento y la desorción	141
• Otros modos de extracción	143
• Comparativa entre los capilares de extracción	145
5.3.3. Estudio de blancos de procedimiento	146
5.3.4. Validación del método propuesto	150
5.3.5. Aplicación a muestras de agua de lluvia	155
5.4. Conclusiones	158
5.5. Referencias	159
Capítulo 6. Desarrollo de un método de determinación de ftalatos en material particulado atmosférico	
6.1. Antecedentes de la determinación de ftalatos en material particulado atmosférico y objetivos específicos	165
6.2. Metodología	171
6.3. Resultados y discusión	172
6.3.1. Optimización de la separación cromatográfica	174
6.3.2. Optimización de IT-SPME	176
6.3.3. Optimización de la extracción asistida mediante ultrasonidos (US)	177
6.3.4. Validación del método propuesto	180
6.3.5. Aplicación a muestras	183
6.4. Conclusiones	186
6.5. Referencias	187
Capítulo 7. Optimización de la separación y derivatización de aminas alifáticas	
7.1. Antecedentes de la determinación de aminas en matrices atmosféricas y objetivos específicos	193
7.2. Metodología	195
7.3. Resultados y discusión	195
7.3.1. Optimización de la separación de los derivados de aminas alifáticas	195
7.3.2. Optimización de la derivatización de las aminas	198

7.4. Conclusiones y líneas futuras	209
7.5. Referencias	210
Chapter 8. Atmospheric particulate matter characterization and source apportionment	
8.1. Introduction	215
8.2. Methodology	218
8.2.1. Sampling	218
8.2.2. Characterization of particulate matter	219
8.2.3. Number of particles, atmospheric gases and meteorological parameters	221
8.2.4. Calculations, statistical analyses and receptor modeling	221
8.3. Results and discussion	221
8.3.1. Characterization of the major components of PM ₁₀ and their interrelationships	221
• PM ₁₀ , carbonaceous fraction, N and S and their interrelationships	222
• Major ions and their interrelationships with meteorological parameters	229
• Trace metals and their correlations	230
• Carbon and nitrogen isotopes of PM ₁₀ and their inter-relations with WSOC, major ions and meteorological parameters	235
• Analysis of phthalates by IT-SPME in selected samples	237
• Sub-micron particles and their interrelationships with PM ₁₀ components and meteorological parameters	240
8.3.2. Source apportionment	246
• Identification of sources	246
• Source apportionment by Positive Matrix Factorization (PMF)	249
8.4. Conclusions	256
8.5. References	257
8.6. Supplementary material	263
Capítulo 9. Conclusiones/Conclusións/Conclusions	277

Anexos. Publicaciones.

- Anexo I. Strengths and weaknesses of in-tube solid-phase microextraction: A scoping review. *Analytica Chimica Acta* 906 (2016) 41–57. 289
- Anexo II. A novel and cost-effective method for the determination of fifteen polycyclic aromatic hydrocarbons in low volume rainwater samples. *Talanta* 155 (2016) 175–184. 313
- Anexo III. A comparative study of extractant and chromatographic phases for the rapid and sensitive determination of six phthalates in rainwater samples. *Chemosphere* 175 (2017) 52–65. 325
- Anexo IV. Ion-pair in-tube solid phase microextraction for the determination of phthalates and degradation products in atmospheric particulate matter (Manuscript). 341
- Anexo V. Interrelationships between major components of PM₁₀ and sub-micron particles: Influence of Atlantic air masses (Manuscript). 377

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

- Figura 1. Estructura de los 16 HAP prioritarios de la EPA. 5
- Figura 2. Estructura genérica de los ftalatos, que difieren en las cadenas sustituyentes en R₁ y R₂. 7
- Figura 3. Estructura genérica de las aminas, que se diferencian en los sustituyentes R₁, R₂ y R₃. 10

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN SOBRE LAS FORTALEZAS Y DEBILIDADES DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA IN-TUBE (IT-SPME) USANDO UN ESTUDIO DE ALCANCE (SCOPING REVIEW)

- Figura 4. Número de publicaciones relacionadas con IT-SPME, desde la introducción de la técnica hasta la actualidad, clasificadas por trienios. 36
- Figura 5. Porcentaje del número de publicaciones de IT-SPME en función del campo de aplicación. 36
- Figura 6. Porcentaje del número de publicaciones de IT-SPME en función de su combinación con técnicas instrumentales de determinación, por campo de aplicación. 37
- Figura 7. Porcentaje del número de publicaciones en función de los diferentes modos de extracción en IT-SPME. 39
- Figura 8. Configuraciones más importantes en IT-SPME, en posición de carga. a) Extracción única con 1 válvula; b) Modo de ciclos; c) Extracción única con 2 válvulas; d) Configuración de doble válvula para el acoplamiento con cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución (UHPLC). Los cuadrados discontinuos indican diferentes opciones de introducción de muestra en a y c y una segunda válvula opcional en b. 40
- Figura 9. Diagrama de Ishikawa con los principales parámetros que pueden afectar en la IT-SPME. Las líneas discontinuas representan pasos opcionales. 43
- Figura 10. Distintos tipos de capilares usados en IT-SPME: (A) Abiertos (B) Con relleno (C) Monolíticos. 45
- Figura 11. Porcentaje del número de publicaciones de IT-SPME en función del tipo de capilar empleado, por campo de aplicación. 46
- Figura 12. Porcentaje del número de publicaciones de IT-SPME en función de cómo se lleva a cabo la desorción. 49
- Figura 13. Acoplamientos y combinaciones de la IT-SPME con técnicas de determinación publicados durante el periodo de estudio. 1V: Extracción única con 1 válvula; 2V: Extracción única con 2 válvulas; Cic: Modo de ciclos; Jer: Capilar en la aguja de una jeringa; ACIT-SPME: *Array capillary* IT-SPME. 63

CAPÍTULO 4. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE HAP EN AGUA DE LLUVIA MEDIANTE IT-SPME

- Figura 14. a) Esquema de la configuración empleada (posición de carga). El circuito en rojo se corresponde con la válvula de 6 vías externa. La línea discontinua azul muestra la configuración sin IT-SPME; b) Fotografía de la configuración IT-SPME y detalle del capilar y sus conexiones. 90
- Figura 15. Cromatograma de una disolución patrón de 15 HAP prioritarios de la EPA (FLD) con el gradiente a flujo constante 0,5 mL/min. 91
- Figura 16. Cromatograma de una disolución patrón de 15 HAP prioritarios de la EPA + 2-metinaftaleno (FLD) con el gradiente final optimizado de flujo variable. 92
- Figura 17. Efecto del porcentaje de ACN, IPA y THF en la respuesta de los HAP para un volumen de carga de 3 mL. Concentración de cada HAP: 125 ng/L para IPA y THF y 10 ng/L para ACN. Barras de error = \pm SD (n=2). 94
- Figura 18. Cociente de las áreas obtenidas para los HAP con un 5% de modificador y las obtenidas con el porcentaje optimizado para cada modificador (30% ACN, 20% IPA y 15% THF). 96
- Figura 19. Sensibilidad obtenida para los HAP con el porcentaje optimizado de cada modificador. Barras de error = \pm 1SD (n=2). Condiciones: 3 mL de disolución patrón de 125 ng/L (con modificador ya incluido) + 60 μ L agua Milli-Q (*El BghiP presenta unas señales muy bajas en estas pruebas debido a que se estaba determinando en unas condiciones de fluorescencia que no son las más adecuadas para él (λ_{ex} =300 nm, λ_{em} =500 nm). Para la validación y aplicación del método se variaron las longitudes de onda (Tabla 6), obteniendo señales más elevadas para este compuesto). 98
- Figura 20. Efecto del volumen de carga en la respuesta de los HAP empleando un 15% THF como modificador. Barras de error = \pm SD (n=2-3). 99
- Figura 21. Efecto de la adición de tetrahidrofurano sobre la conservación de los HAP en agua de lluvia a 4°C. a) Muestra conservada sin THF; a') Detalle de los puntos inicial y tras 24 h de conservación sin THF, con barras de error = \pm SD (n=3); b) Muestra conservada con un 15% THF añadido; b') Detalle de los puntos inicial y tras 24 h de conservación con THF, con barras de error = \pm SD (n=3). 103
- Figura 22. Cromatograma correspondiente a un blanco del sistema, realizado inmediatamente después de una inyección de una muestra. 107
- Figura 23. Gráficos de control de los blancos de procedimiento en la determinación de HAP en agua de lluvia. 108
- Figura 24. Muestrador de vidrio Pyrex silanizado DEPOBULK®, con su soporte. 114
- Figura 25. Cromatograma a 223,8 nm de la inyección directa (20 μ L) de una disolución patrón de ftalatos (1 μ g/mL) y HAP (25 ng/mL) con el gradiente optimizado para la separación simultánea. 117
- Figura 26. Espectros de absorción UV-Visible de fluoranteno y butilbencilftalato. 118

CAPÍTULO 5. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN AGUA DE LLUVIA

- Figura 27. Cromatogramas obtenidos (223,8 nm) con los gradientes optimizados ACN/H₂O a flujo alto de una disolución de patrón de ftalatos (5 µg/mL) para: a) Columna monolítica; b) Columna cianopropilo. 132
- Figura 28. Cromatogramas obtenidos (223,8 nm) con los gradientes optimizados ACN/H₂O a flujo bajo de una disolución de patrón de ftalatos (5 µg/mL) para: a) Columna monolítica; b) Columna cianopropilo. 133
- Figura 29. Cromatogramas obtenidos (223,8 nm) con los gradientes optimizados MeOH/H₂O a flujo bajo de una disolución de patrón de ftalatos (5 µg/mL) para: a) Columna monolítica; b) Columna cianopropilo. 134
- Figura 30. Efecto de la concentración de modificador orgánico en la extracción de los 6 ftalatos con el capilar TRB-5. Condiciones: 2 mL patrón 100 ng/mL + 60 µL agua Milli-Q en un capilar de 70 cm para ACN y MeOH; 5 mL patrón 100 ng/mL + 60 µL agua Milli-Q en un capilar de 45 cm para THF. 136
- Figura 31. Efecto de la concentración de modificador orgánico en la extracción de los 6 ftalatos con el capilar DB-FFAP. Condiciones: 2 mL patrón 50 ng/mL + 60 µL agua Milli-Q en un capilar de 70 cm. 137
- Figura 32. Efecto de la concentración de modificador orgánico en la extracción de los 6 ftalatos con el capilar PLOT Rt[®]-S-BOND. Condiciones: 2 mL patrón 100 ng/mL + 60 µL agua Milli-Q en un capilar de 70 cm. 138
- Figura 33. Efecto del volumen sobre la extracción IT-SPME de 6 ftalatos para el capilar TRB-5: a) 45 cm, usando 25% MeOH como modificador; b) 70 cm, usando 25% MeOH como modificador; c) 70 cm, usando 15% THF como modificador. 140
- Figura 34. Efecto del volumen sobre la extracción IT-SPME de 6 ftalatos para el capilar PLOT Rt[®]-S-BOND de 70 cm, usando 40% MeOH como modificador. 141
- Figura 35. Efecto de la longitud del capilar sobre la extracción de 6 ftalatos. 142
- Figura 36. Efecto de la realización de ciclos en la introducción de muestra en la optimización IT-SPME para 6 ftalatos. a) 2 min entre ciclos; b) Desplazando con 60 µL de agua entre ciclos. 144
- Figura 37. Eficiencia en la extracción de 6 ftalatos con un capilar individual o con dos capilares en serie. 145
- Figura 38. Efecto del porcentaje de metanol en la extracción de 6 ftalatos en los capilares PLOT+TRB-5 en serie 145
- Figura 39. Cromatogramas de un blanco de sistema realizado tras lavar con ACN, un blanco de sistema realizado sin pasar ACN a través del capilar y un blanco de procedimiento (5 mL de agua Milli-Q con un 40% MeOH + 60 µL agua Milli-Q). Capilar PLOT Rt[®]-S-BOND. 148
- Figura 40. Ftalatos que aparecen en los blancos del proceso de filtración del agua Milli-Q en función del tipo de filtro. 149
- Figura 41. Cromatogramas obtenidos para la inyección directa de 10 µL de 2500 ng/mL y 5 mL de 120 ng/mL mediante IT-SPME. 154

Figura 42. Cromatograma de una muestra de agua de lluvia de evento y un blanco de procedimiento. Condiciones: capilar PLOT Rt®-S-BOND, 5 mL de muestra con 40% MeOH + 60 µL agua Milli-Q. 157

CAPÍTULO 6. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO

Figura 43. Efecto del flujo de la fase móvil sobre la separación de BBP, DiBP y DBP (etapa final de la optimización). 175

Figura 44. Cromatograma de una disolución patrón de ftalatos de 20 ng/mL con las condiciones de gradiente seleccionadas. 175

Figura 45. Efecto del acondicionamiento del capilar de extracción con TEA 0,1%, como paso previo a la introducción de la muestra. 176

Figura 46. Efecto de la adición de TEA como modificador y de su concentración sobre la determinación de ftalatos con IT-SPME. Barras de error = \pm SD (n=2). 177

Figura 47. Efecto del volumen de disolvente y tiempo de extracción sobre la extracción US de ftalatos en PM, seguido de IT-SPME en las condiciones previamente optimizadas. Concentración ftalatos = 20 ng/mL. Barras de error = \pm SD (n=2). 179

Figura 48. Efecto de la adición de TEA 0,25% sobre la extracción ultrasónicos de ftalatos en PM. Concentración ftalatos = 20 ng/mL. Barras de error = \pm SD (n=2). 179

Figura 49. Captador de alto volumen Digitel DHA-80. 183

Figura 50. Cromatogramas obtenidos para muestras de los diferentes puntos de muestreo. 184

CAPÍTULO 7. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN Y DERIVATIZACIÓN DE AMINAS ALIFÁTICAS

Figura 51. Cromatograma de una disolución patrón de las 5 aminas de interés derivatizadas *off-line* con el gradiente a flujo constante. a) Inyección directa de 20 µL; b) Inyección de 2 mL + 60 µL agua por IT-SPME. Condiciones derivatización: 1125 µL borato 0,05 M pH = 11,5 + 2250 µL FMOC 1 mM + 1125 µL Mix aminas (600 ng/mL en IT-SPME y 4 µg/mL en inyección directa). 197

Figura 52. Cromatograma de la inyección directa de 20 µL una disolución patrón de las 5 aminas de interés derivatizadas *off-line* con el gradiente final a flujo variable. Condiciones derivatización: 300 µL borato 0,16 M pH = 11,5 + 600 µL FMOC 1 mM + 300 µL Mix 600 ng/mL. 198

Figura 53. Efecto del orden de los reactivos en la derivatización de las aminas en el interior del capilar para (a) el capilar PLOT y (b) el capilar DB-FFAP. Concentración de aminas 600 ng/mL (1 ciclo de aminas, 1 ciclo de borato y 2 ciclos de FMOC 1 mM en cada caso, en el orden indicado). Barras de error = \pm SD (n=2). 200

Figura 54. Efecto del tiempo de reacción en el capilar en la optimización de la derivatización de las aminas en el interior del capilar Barras de error = \pm SD. (n=2). 201

Figura 55. Efecto del volumen de ACN de acondicionamiento en la optimización de la derivatización de las aminas en el interior del capilar. Barras de error = \pm SD (n=2).	201
Figura 56. Efecto de la concentración del tampón borato en la optimización de la derivatización de las aminas en el interior del capilar Barras de error = \pm SD. (n=2).	202
Figura 57. Efecto del pH del tampón borato en la optimización de la derivatización en el interior del capilar. Barras de error = \pm SD (n=2).	202
Figura 58. Efecto del disolvente empleado en el desplazamiento en la optimización de la derivatización de las aminas en el interior del capilar. Barras de error = \pm SD (n=2).	203
Figura 59. Efecto del medio del FMOC en la optimización de la derivatización de las aminas en el interior del capilar. Barras de error = \pm SD (n=2).	203
Figura 60. Efecto de la concentración del FMOC en la optimización de la derivatización de las aminas en el interior del capilar. Barras de error = \pm SD. (n=2).	204
Figura 61. Efecto del número de ciclos de FMOC en la optimización de la derivatización de las aminas en el interior del capilar Barras de error = \pm SD (n=2).	204
Figura 62. Efecto del volumen sobre la derivatización de las aminas, variando el volumen de cada ciclo. Barras de error = \pm SD (n=2).	205
Figura 63. Efecto del volumen sobre la derivatización de las aminas, variando el número de veces que se pasan los ciclos. Barras de error = \pm SD (n=2)	206
Figura 64. Efecto de la presencia de borato en la muestra. Barras de error = \pm SD (n=2).	206
Figura 65. Efecto del acondicionamiento en la extracción de derivados de las aminas formados off-line (capilar DB-FFAP). Barras de error = \pm SD (n=2).	207
Figura 66. Efecto del volumen inyectado en la optimización de la extracción de derivados formados off-line (capilar DB-FFAP). Barras de error = \pm SD (n=2).	208

CAPÍTULO 8. ATMOSPHERIC PARTICULATE MATTER CHARACTERIZATION AND SOURCE APPORTIONMENT

Figure 67. (a) High volume sampler in the sampling site. (b) Map of the sampling site and the surrounding possible sources.	218
Figure 68. Thermal-optical system for the determination of OC and EC and detail of the quartz tube with the vertical punch of sample.	219
Figure 69. Temporal profiles (on a weekly basis) for total PM ₁₀ , carbonaceous fractions and total nitrogen and sulfur concentrations in PM ₁₀ . Error bars = \pm SD.	222
Figure 70. a) Temporal variation (on a weekly basis) for total sulfur in PM ₁₀ and gaseous SO ₂ (Riazor station); b) Relationship between backward trajectories and S and SO ₂ .	224
Figure 71. Correlation between: a) TC and OC; b) TC and EC.	226

Figure 72. Correlation and regression equations between: a) OC and EC; b) OC/ EC ratios and EC levels.	227
Figure 73. Correlation between S and PM ₁₀ .	229
Figure 74. Temporal variation (on a daily basis) for the number of particles of nucleation, Aitken and accumulation modes during the first sampling campaign (in spring).	241
Figure 75. Relationship between the number of particles (nucleation, Aitken and accumulation modes) and backward trajectories.	242
Figure 76. Temporal variation (on a daily basis) for the percentage of nucleation, Aitken and accumulation modes during the first sampling campaign (in spring).	242
Figure 77. Temporal variation (on a daily basis) for the number of particles of Aitken mode (left axis) and EC in PM ₁₀ (right axis) during the first sampling campaign (in spring).	243
Figure 78. Temporal variation (on a weekly basis) of the WSOC/OC percentages and OC/EC ratios.	247
Figure 79. Tracing of sources by stable carbon isotopes.	248
Figure 80. Tracing of sources by plotting $\delta^{13}\text{C}$ versus $\delta^{15}\text{N}$ with signed level of potential sources. <i>Data of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ adapted from Górká et al., 2008 (coal); Górká et al., 2012 (diesel); Martinelli et al., 2002 (natural forest); Turekian et al., 1998 (biomass burning); Widory et al., 2004 (gasoline) and Widory, 2007 (natural gas, coal, gasoline, diesel, fuel oil).</i>	249
Figure 81. Contribution of each factor to PM ₁₀ .	250
Figure 82. Factor profiles obtained for the PMF model.	251
Figure 83. Temporal variation according to the contribution of each factor.	252
Figure 84. Error estimation summary of PMF results in the concentration of every species in each factor.	255

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN SOBRE LAS FORTALEZAS Y DEBILIDADES DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA IN-TUBE (IT-SPME) USANDO UN ESTUDIO DE ALCANCE (SCOPING REVIEW)

Tabla 1. Resumen de las aplicaciones de IT-SPME en análisis medioambiental e industrial.	53
Tabla 2. Resumen de las aplicaciones de IT-SPME en análisis clínico.	57
Tabla 3. Resumen de las aplicaciones de IT-SPME en análisis alimentario.	60

CAPÍTULO 4. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE HAP EN AGUA DE LLUVIA MEDIANTE IT-SPME

Tabla 4. Características de los métodos publicados para determinación de HAP en agua de lluvia.	82
Tabla 5. Niveles publicados de HAP encontrados en agua de lluvia de diferentes lugares	84
Tabla 6. Gradiente de fase móvil optimizado y condiciones de fluorescencia empleados en el método de determinación de 15 HAP en agua de lluvia.	91
Tabla 7. Recuperaciones \pm SD (n=3) obtenidas para la filtración de 5 mL de una disolución patrón de HAP de 103 ng/L en agua Milli-Q a través de filtros de distinta naturaleza.	105
Tabla 8. Recuperaciones \pm SD (n=3) obtenidas para la filtración de distintos volúmenes de disoluciones patrón de HAP en agua Milli-Q a través de filtros de PTFE, pasando un 15% THF a través del filtro tras la muestra.	106
Tabla 9. Calibrados y límites de detección (LD) y cuantificación (LC) obtenidos para el método optimizado para la determinación de HAP en agua de lluvia.	110
Tabla 10. Normas de calidad ambiental para HAP recogidas en la Directiva 2013/39/UE.	111
Tabla 11. Reproducibilidad inter-día a dos niveles de concentración (250 y 1000 ng/L), expresada en % de coeficientes de variación, del método de determinación de HAP en agua de lluvia.	112
Tabla 12. Recuperaciones analíticas obtenidas para muestras de distintas aguas sobrecargadas con disoluciones patrón de HAP y recuperaciones absolutas de la IT-SPME.	114
Tabla 13. Concentraciones (ng/L) de HAP encontradas en las aguas ambientales analizadas.	116

CAPÍTULO 5. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN AGUA DE LLUVIA

Tabla 14. Gradiente optimizado para la separación simultánea de HAP y ftalatos.	117
Tabla 15. Características de los métodos de determinación de ftalatos en agua de lluvia y niveles encontrados publicados en la bibliografía.	129
Tabla 16. Recuperaciones absolutas del método IT-SPME de 6 ftalatos respecto a la inyección directa para los 3 capilares de extracción para una concentración 100 ng de cada analito.	146
Tabla 17. Pendientes y ordenadas en el origen de las rectas de calibrado obtenidas, límites de detección y cuantificación y reproducibilidad inter-día (n=12) del método optimizado para la determinación de 6 ftalatos el capilar TRB-5.	151
Tabla 18. Parámetros analíticos del método optimizado con el capilar PLOT para la determinación de 6 ftalatos: Pendientes, ordenadas en el origen, coeficientes de determinación, rangos lineales (ng/mL sin modificador añadido), reproducibilidad inter-día (nivel 20 ng/mL con modificador, n=17) y límites de detección instrumentales (LD), de detección del método (MDL), de cuantificación (LC) y para informar (RL) (todos en ng/mL sin modificador añadido).	153
Tabla 19. Recuperaciones analíticas (%) \pm SD (n=3) para agua de lluvia sobrecargada con 50 ng/mL, con pH ajustado y sin ajustar, y recuperaciones absolutas del método con el capilar PLOT Rt®-S-BOND.	154
Tabla 20. Concentraciones de ftalatos (ng/mL) \pm SD (n=3) en las muestras de agua de lluvia.	156
Tabla 21. Concentraciones de ftalatos (ng/mL) \pm SD (n=2) para las muestras diaria y mensuales analizadas con el método del capilar TRB-5. Condiciones: capilar TRB-5, 5 mL muestra con 15% THF + 60 μ L agua Milli-Q. No se han restado los blancos.	157

CAPÍTULO 6. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO

Tabla 22. Características de los métodos de determinación de ftalatos en PM y niveles encontrados publicados en la bibliografía.	167
Tabla 23. Recuperaciones obtenidas (%) para una disolución patrón acuosa de ftalatos de 20 ng/mL (antes de añadir el modificador orgánico) tras la filtración a través de distintos tipos de filtros, y evaluación del efecto del volumen.	172
Tabla 24. Recuperaciones analíticas obtenidas (%) \pm SD (n=3) para la extracción acuosa y orgánica de un filtro de PM10 sobrecargado con una cantidad de ftalatos equivalente a 20 ng/mL en el extracto con modificador.	173
Tabla 25. Parámetros analíticos del método optimizado para la determinación de 16 ftalatos: pendiente, ordenada en el origen y coeficiente de determinación de las rectas de calibrado, rango lineal, límite de detección del método (MDL), límite de cuantificación (LC) y límite para informar (RL) (todos en ng/m ³). La reproducibilidad inter-día (CV) se calcula para una disolución control de 20 ng/mL en 40%MeOH/60%TEA 0,05% (n=15).	181

Tabla 26. Recuperaciones analíticas (%R) \pm SD (n=6) para el método completo (filtro de PM sobrecargado con 0,5 μg de los analitos, correspondiente a 20 ng/mL en la etapa IT-SPME), y recuperaciones absolutas de la IT-SPME (%R abs.) \pm SD (n=3).	182
Tabla 27. Niveles (ng/m^3) de ftalatos en las muestras de PM_{10} analizadas.	185

CAPÍTULO 7. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN Y DERIVATIZACIÓN DE AMINAS ALIFÁTICAS

Tabla 28. Gradiente optimizado para la separación de 5 derivados de aminas. La temperatura de columna es $30 \pm 5^\circ\text{C}$.	196
---	-----

CAPÍTULO 8. ATMOSPHERIC PARTICULATE MATTER CHARACTERIZATION AND SOURCE APPORTIONMENT

Tabla 29. Average concentrations \pm Standard deviation (range in brackets) of different parameters of the carbonaceous and elemental analyses of PM_{10} samples of the studied suburban área, distributed by seasons.	223
Tabla 30. Average concentrations ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) \pm Standard deviation (range in brackets) of the major ions in PM_{10} samples of the studied suburban área, distributed by seasons.	231
Tabla 31. Average concentrations ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) \pm Standard deviation (range in brackets) of trace metals in PM_{10} samples of the studied suburban área, distributed by seasons.	232
Table 32. Average concentrations \pm Standard deviation (range in brackets) of the results of isotopic analyses of PM_{10} samples of the studied suburban area, distributed by seasons.	236
Table 33. Obtained concentration for carbonaceous fraction, Na^+ , K^+ , V and phthalates in the 14 selected samples.	239
Table 34. Correlations for nanoparticles with a) gases, metals and meteorological parameters, and b) PM_{10} , carbonaceous fractions, N, S and major ions.	244
Tabla S1. Correlation matrices for PM_{10} , carboaceous fraction, N, S and major ions by seasons.	265
Tabla S2. Correlation matrices for metals with other parameters, split by seasons.	270

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A

AA-EQS: *Annual Average-Environmental Quality Standards*, media anual en las normas de calidad ambiental

Acc: Moda acumulación

Ace: *Acenaphthene*, acenafteno

ACIT-SPME: *Array Capillary In-Tube Solid Phase Microextraction*, microextracción en fase sólida *in-tube* con haz de capilares

ACN: Acetonitrilo

Acy: *Acenaphthylene*, acenaftileno

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Ait: Moda Aiken

Ant: *Anthracene*, antraceno

ATSDR: *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (de Estados Unidos)

B

BaA: *Benz[a]anthracene*, benzo(a)antraceno

BAK: *Benzalkonium chloride*, cloruro de benzalconio

BaP: *Benzo[a]pyrene*, benzo(a)pireno

BbF: *Benzo[b]fluoranthene*, benzo(b)fluoranteno

BBP: *Benzyl butyl phthalate*, butilbencilftalato

BghiP: *Benzo[ghi]perylene*, benzo(ghi)perileno

BkF: *Benzo[k]fluoranthene*, benzo(k)fluoranteno

BS: *Bootstrap* (término estadístico)

BSA: *Bovine serum albumin*, albúmina de suero bovino

BUTAL: *Bursa Test and Analysis Laboratory*, Laboratorio de Análisis y Ensayos de Bursa (Turquía)

C

CapLC: *Capillary liquid chromatography*, cromatografía de líquidos capilar

CE: *Capillary electrophoresis*, electroforesis capilar

CE-ECD: *Capillary electrophoresis-Electrochemical detector*, electroforesis capilar con detector electroquímico

Chry: *Chrysene*, criseno

CMB: *Chemical Mass Balance*, balance químico de masa

CN: Ciano

COP: Compuestos orgánicos persistentes

COV: Compuestos orgánicos volátiles

D

DAD: *Diode array detector*, detector de matriz de diodos

DAP: *Diamylphthalate*, diamilftalato (di-n-pentilftalato)

DBahA: *Dibenz[a,h]anthracene*, dibenzo(a,h)antraceno

DBP: *Di-n-butylphthalate*, di-n-butilftalato

DCHP: *Dicyclohexyl phthalate*, dicitclohexilftalato

DCM: Diclorometano

DDP: *Didecylphthalate*, didecilftalato

DEA: Dietilamina

DEHP: *Bis(2-ethylhexyl)phthalate*, di-(2-etilhexil)ftalato

DEP: *Diethylphthalate*, dietilftalato

DHEA: Dehidroepiandrosterona

DHepP: *Di-n-heptylphthalate*, di-n-heptilftalato

DHP: *Di-n-hexylphthalate*, di-n-hexilftalato

DiBP: *Diisobutylphthalate*, diisobutilftalato

DiDP: *Diisodecylphthalate*, diisodecilftalato

DiNP: *Diisononylphthalate*, diisononilftalato

DiPP: *Diisopropylphthalate*, diisopropilftalato

Disp: *Displacement method*, método de desplazamiento

DLLME: *Dispersive liquid-liquid microextraction*, microextracción líquido-líquido dispersiva

DMA: Dimetilamina

DMP: *Dimethylphthalate*, dimetilftalato

DnOP: *Di-n-octylphthalate*, di-n-octilftalato

DNP: *Dinonylphthalate*, dinonilftalato

DNSCl: *Dansyl chloride*, cloruro de dansilo

DPhP: *Diphenyl phthalate*, difenilftalato

DPP: *Di-n-propylphthalate*, di-n-propilftalato

E

EA: Etilamina

EC: *Elemental carbon*, carbono elemental

EC-IT-SPME: *Electrochemically controlled in-tube solid phase microextraction*, microextracción en fase sólida *in-tube* controlada electroquímicamente

ECPI: *European Council for Plasticisers and Intermediates*, Consejo europeo de plastificantes y productos intermedios

EDCs: *Endocrine Disrupting Compounds*, disruptores endocrinos

EDA: Etilendiamina

EEUU: Estados Unidos

EFSA: *European Food Safety Authority*, Autoridad europea de seguridad alimentaria

EN: *European Norm*, norma europea

EPA: *Environmental Protection Agency*, Agencia de protección del medio ambiente (Estados Unidos)

ESI: *Electrospray ionization*, ionización por electrospray

EtA: Etanolamina

F

FID: *Flame ionization detector*, detector de ionización de llama

Fl: *Fluorene*, fluoreno

FLD: *Fluorescence detector*, detector de fluorescencia

FMOC: 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride, cloruro de 9-fluorenilmetoxicarbonilo

FSOT: *Fused silica open tubular*, columna capilar abierta de sílice fundida

FSS: *Fractionized Sampling and Stacking*, muestreo y apilamiento fraccionados

Ft: *Fluoranthene*, fluoranteno

G

GC: *Gas chromatography*, cromatografía de gases

GC-FID: Cromatografía de gases con detector de ionización de llama

GC-MS: Cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas

H

HAP: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

HFM: *Hollow fiber membrane*, fibra hueca de membrana

HFM-LPME: Microextracción en fase líquida con fibra hueca de membrana

HP: *Hydrophilic*, hidrofílico

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*, cromatografía de líquidos de alta resolución

HPLC-DAD: Cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de matriz de diodos

HPLC-FLD: Cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de fluorescencia

HPLC-MS/MS: Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de masas en tándem

HPLC-UV: Cromatografía de líquidos de alta resolución con detector ultravioleta

I

IARC: *International Agency for Research on Cancer*, Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer

ic-ELISA: *Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay*, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas indirecto competitivo

ICP: *Inductively coupled plasma*, plasma de acoplamiento inductivo

INSHT: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (España)

IP: *Indeno[1,2,3-cd]pyrene*, indeno(1,2,3-cd)pireno

IP-RP-HPLC: Ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatography, cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa con par iónico

IPA: *Isopropyl alcohol*, alcohol isopropílico (2-propanol)

ISO: *International Organization for Standardization*, Organización Internacional de Normalización

IT-SPME: *In-Tube Solid Phase MicroExtraction*, microextracción en fase sólida *in-tube*

IT-SPME-HPLC: Microextracción en fase sólida *in-tube* acoplada con cromatografía de líquidos de alta resolución

IT-SPME-HPLC-UV: Microextracción en fase sólida *in-tube* acoplada con cromatografía de líquidos de alta resolución con detector ultravioleta

IUMA: Instituto Universitario de Medio Ambiente

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*, Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

J

JECFA: *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*, Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios

L

L2MS: *Two-step laser mass spectrometry*, espectrometría de masas láser de dos pasos

LC: *Liquid chromatography*, cromatografía de líquidos

LC-MS: Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas

LLE: *Liquid-liquid extraction*, extracción líquido-líquido

LLME: *Liquid-liquid microextraction*, microextracción líquido-líquido

LOQ: *Limit of quantitation*, límite de cuantificación

LPME: *Liquid phase microextraction*, microextracción en fase líquida

M

MA: Metilamina

MAA-co-EGDMA: *Methacrylic acid-ethylene glycol dimethacrylate*, ácido metacrílico-dimetacrilato de etilenglicol

MAE: *Microwave assisted extraction*, extracción asistida con microondas

MALDI: *Matrix-assisted laser desorption/ionization*, ionización/desorción por láser asistida por matriz

MALDI-MS: *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*, espectrometría de masas con ionización/desorción por láser asistida por matriz

MBP: *Mono-n-butyl phthalate*, mono-n-butilftalato

MDL: *Method detection limit*, límite de detección del método

MDQ: *Minimum detectable quantity of the procedure*, cantidad mínima detectable del procedimiento

ME: Microextracción

MEGX: Monoetilglicinaxilidida

MEHP: *Mono(2-ethylhexyl)phthalate*, mono(2-etilhexil)ftalato

MEKC: *Micellar electrokinetic chromatography*, cromatografía electrocinética micelar

MeOH: Metanol

MINTOTA: Grupo de investigación de Miniaturización y métodos totales (Universitat de València)

MIP: *Molecular imprinted polymers*, polímeros de impresión molecular

mNaph: *2-methylnaphtalene*, 2-metilnaftaleno

MS/MS: *Mass spectrometry/mass spectrometry*, espectrometría de masas en tándem

MS: *Mass spectrometry*, espectrometría de masas

MSPD: *Matrix solid phase dispersión*, dispersión de la matriz en fase sólida

N

Naph: *Naphthalene*, naftaleno

NITC: 1-naphthylisothiocyanate, 1-naftil isotiocianato

NQS: 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate, 1,2-naftoquinona-4-sulfonato

NTP-CERHR: *National Toxicology Program Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction*, Programa Nacional de Toxicología del Centro para la Evaluación de Riesgos para la Reproducción Humana (Estados Unidos)

Nuc: Moda nucleación

O

OC: *Organic carbon*, carbono orgánico

ODS: Octadecilsílice

OPA: *o-phthalaldehyde*, o-ftalaldehído

OTT: *Open-Tubular Trapping*, atrapamiento en tubo abierto

P

PAEs: *Phthalate esters*, ftalatos

PAH: *Polycyclic aromatic hydrocarbons*, hidrocarburos aromáticos policíclicos

PCA: *Principal Components Analysis*, análisis de componentes principales

pCEC: *pressurized capillary electrochromatography*, electrocromatografía capilar asistida por presión

PDMS: Polidimetilsiloxano

PEEK: *Polyether ether ketone*, poliéter éter cetona

Phe: *Phenanthrene*, fenantreno

PI: Patrón interno

PLE: *Pressurized liquid extraction*, extracción con líquidos a presión

PLOT: *Porous layer open tubular*, columna capilar de capa porosa

PM: *Particulate Matter*, material particulado

PMF: *Positive Matrix Factorization*, factorización de matriz positiva

PPAR: *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*, receptor activado por proliferador de peroxisoma

PPY: *Polypyrrole*, polipirrol

PTFE: politetrafluoroetileno

PVDF: fluoruro de polivinilideno

Pyr: *Pyrene*, pireno

Q

QANAP: Grupo de Química Analítica Aplicada

R

RAM: *Restricted access material*, material de acceso restringido

REACH: *Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemical substances*;
Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de sustancias químicas

RD: Real Decreto

S

SBSE: *Stir-bar sorptive extraction*, extracción por sorción con barra agitadora

SCOT: *Support coated open tubular*, columna capilar de soporte recubierto

SD: *Standard deviation*, desviación estándar o típica

SDS-PAGE: *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*, electrophoresis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SIA: *Secondary Inorganic Aerosol*, aerosol inorgánico secundario

SML: *Specific Migration Limit*, límite máximo de migración específica

SMPS: Scanning Mobility Particle Sizer

SOA: *Secondary Organic Aerosol*, aerosol orgánico secundario

SPE: *Solid Phase Extraction*, extracción en fase sólida

SPME: *Solid Phase MicroExtraction*, microextracción en fase sólida

SPME-GC: Microextracción en fase sólida acoplada con cromatografía de gases

SPME-HPLC: Microextracción en fase sólida acoplada con cromatografía de líquidos de alta resolución

T

TC: *Total carbon*, carbono total

TEA: Trietilamina

THF: Tetrahidrofurano

TN: *Total nitrogen*, nitrógeno total

TOF-MS: *Time-of-flight mass spectrometry*, espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo

U

UDC: Universidade da Coruña

UE: Unión Europea

UNE-EN: Una Norma Española-Adaptación de una Norma Europea

UHPLC: *Ultra High Performance Liquid Chromatography*, cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución

US: Ultrasonidos

USEPA: *United States Environmental Protection Agency*, Agencia de protección del medio ambiente de Estados Unidos

UV: Ultravioleta

V

VLA-EC: Valor límite ambiental de exposición de corta duración

VLA-ED: Valor límite ambiental de exposición diaria

VOCs: *Volatile Organic Compounds*, compuestos orgánicos volátiles

VPDB: *Vienna Pee Dee Belemnite*

W

WCOT: *Wall coated open tubular*, columna capilar de pared recubierta

WSOC: *Water soluble organic carbon*, carbono orgánico soluble en agua

RESUMEN

En esta Tesis Doctoral se han desarrollado metodologías analíticas para la determinación de tres grupos de compuestos orgánicos de gran interés medioambiental (hidrocarburos aromáticos policíclicos, ésteres de ácido ftálico y aminas) en matrices atmosféricas (agua de lluvia y material particulado atmosférico).

Los métodos desarrollados emplean la microextracción en fase sólida *in-tube* acoplada *on-line* a cromatografía de líquidos (IT-SPME-HPLC). Se reducen considerablemente el número de etapas de tratamiento de muestra, los volúmenes requeridos (de muestra y disolventes orgánicos) y el tiempo de análisis, y se alcanzan límites de detección y cuantificación a nivel traza/ultratraza. Además se presenta un estudio de alcance de la técnica, con una discusión crítica sobre fortalezas y debilidades y su estado actual.

Los métodos se han aplicado a muestras de eventos cortos de precipitación, que no se pueden analizar por métodos clásicos, así como a un estudio de estabilidad de HAP en agua de lluvia.

Se ha abordado la caracterización de muestras de PM₁₀ analizando iones mayoritarios, metales traza, composición elemental, relaciones de isótopos estables y fracción carbonosa, que incluye el carbono orgánico soluble. Finalmente se ha realizado un estudio de identificación de fuentes con la aplicación de *Positive Matrix Factorization* (PMF).

RESUMO

Nesta Tese Doutoral desenvolvéronse metodoloxías analíticas para a determinación de tres grupos de compostos orgánicos de grande interese ambiental (hidrocarburos aromáticos policíclicos, ésteres de ácido ftálico e aminas) en matrices atmosféricas (auga de choiva e particulado atmosférico).

Os métodos desenvolvidos empregan a microextracción en fase sólida *in-tube* acoplada *on-line* a cromatografía de líquidos (IT-SPME-HPLC). Redúcese considerablemente o número de etapas de tratamento de mostra, os volumes requiridos (de mostra e disolventes orgánicos) e o tempo de análise, e alcánzanse límites de detección e cuantificación a nivel traza/ultratraza. Ademais preséntase un estudo de alcance da técnica, cunha discusión crítica sobre fortalezas e debilidades e o seu estado actual.

Os métodos aplicáronse a mostras de eventos curtos de precipitación, que non se poden analizar polos métodos clásicos, así como a un estudo de estabilidade de HAP en auga de choiva.

Abordouse a caracterización de mostras de PM₁₀ analizando ións maioritarios, metais traza, composición elemental, relacións de isótopos estables e fracción carbonosa, que inclúe o carbono orgánico soluble. Finalmente realizouse un estudo de identificación de fontes coa aplicación de *Positive Matrix Factorization* (PMF).

ABSTRACT

This PhD Thesis presents the development of analytical methodologies for the determination of three groups of organic compounds of a great interest (polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), phthalates and amines) in atmospheric matrices (rainwater and atmospheric particulate matter).

The developed methods use in-tube solid phase microextraction on-line coupled to liquid chromatography (IT-SPME-HPLC) to reduce significantly the steps of sample treatment, volume consumption of both sample and organic solvents and the time analysis, achieving detection and quantitation limits for trace/ultratrace analytes. In addition, a scoping review about IT-SPME, state of art and its strengths and weaknesses, has been performed.

The methods have been applied to short precipitation events, which cannot be analysed by classic methods, and to study the stability of PAHs in rainwater.

Characterization of PM₁₀ has been performed by analysing major ions, trace metals, elemental composition, stable isotopic ratios and carbonaceous fraction, including water soluble organic carbon. Finally, a source apportionment study has been performed by Positive Matrix Factorization (PMF).

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Esta Tesis Doctoral se centra en el desarrollo de varios métodos analíticos que hacen uso de la microextracción en fase sólida *in-tube* para la determinación de contaminantes orgánicos en matrices atmosféricas. Asimismo, siguiendo otra de las líneas de investigación del grupo de Química Analítica Aplicada de la Universidade da Coruña, se ha llevado a cabo la caracterización de material particulado atmosférico para posteriormente realizar un estudio de contribución de fuentes. En el presente capítulo se lleva a cabo una breve presentación de los grupos de analitos objeto de estudio y de las matrices que se analizan en esta Tesis Doctoral, así como del interés de los estudios de contribución de fuentes y de los fundamentos de la principal técnica empleada en el tratamiento de muestra, la microextracción en fase sólida *in-tube*. Tras exponer los principales objetivos del trabajo en el capítulo siguiente, en los capítulos posteriores se procederá a presentar y discutir: fortalezas y debilidades de la técnica de preparación seleccionada y su adecuación al tipo de aplicaciones de esta Tesis (capítulo 3), los métodos analíticos desarrollados (capítulos 4-7) y la caracterización y estudio de contribución de fuentes del material particulado atmosférico (capítulo 8). En el último capítulo se presentan las conclusiones generales extraídas del trabajo realizado durante esta Tesis Doctoral, para finalmente incluir como Anexos las publicaciones científicas derivadas del mismo.

1.1. DESCRIPCIÓN DE LOS ANALITOS OBJETO DE ESTUDIO

1.1.1. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAP)

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) o poliarenos son un amplio grupo de compuestos que contienen dos o más anillos aromáticos (formados por átomos de carbono e hidrógeno) fusionados entre sí. Existen más de 200 HAP diferentes, de los que más de 100 están presentes en el medio ambiente. Los más comunes contienen entre 2 y 7 anillos [Harvey, 1991; Danyi *et al.*, 2009]. Los HAP forman parte de los compuestos orgánicos persistentes (COP), un grupo de compuestos tóxicos muy estables y difíciles de degradar, lo que provoca que tengan un tiempo de vida largo y por ello que puedan bioacumularse en la cadena alimentaria o ser transportados a zonas muy alejadas de las fuentes. Todas estas razones los convierten en compuestos particularmente peligrosos para la salud humana y el medio ambiente. Como parte de los COP, la mayoría de los HAP son inertes químicamente (y por tanto muy estables), además de hidrófobos y solubles en disolventes orgánicos. Por su carácter lipofílico tienen tendencia a acumularse en las grasas [Basheer *et al.*, 2003; Harrad, 2010; Danyi *et al.*, 2009].

Los HAP se generan fundamentalmente mediante combustiones incompletas de hidrocarburos, mediante mecanismos como la pirólisis y la pirosíntesis. Proceden tanto de fuentes naturales como antropogénicas, existiendo una gran cantidad y variedad de ellas, que incluyen la combustión de carbón, petróleo, vegetación, aceites, madera, gases basados en carbono y otros combustibles fósiles. Las fuentes naturales incluyen incendios no intencionados, reacciones térmicas geológicas, erupciones volcánicas, biosíntesis directa por acción de microbios y plantas o pirólisis de material orgánico a altas

temperaturas, mientras que entre las fuentes antropogénicas, de mayor relevancia, se encuentran las emisiones de vehículos, incluyendo tráfico marítimo, calefacciones tanto industriales como domésticas, calderas industriales, incineradoras, producción de petróleo y sus derivados, incendios forestales intencionados o vertidos de petróleo. El humo del tabaco es también una fuente relevante para los fumadores tanto activos como pasivos [Ravindra *et al.*, 2008; Lee, 1995].

En la atmósfera, los HAP pueden encontrarse tanto en la fase gaseosa como en el material particulado, debido a su presión vapor, ya que son compuestos semivolátiles. En general, son los HAP más pesados los que presentan mayor afinidad por las partículas, especialmente por las más pequeñas ($<1 \mu\text{m}$). En la atmósfera, los HAP se dispersan, pudiendo transportarse a lugares muy alejados de las fuentes, y también pueden participar en diferentes reacciones secundarias como sulfonación, nitrosación o fotooxidación. Su eliminación de la atmósfera se produce principalmente por deposición, fundamentalmente seca para los HAP más ligeros, asociados a la fase gaseosa, y húmeda para los más pesados, asociados al material particulado. La deposición húmeda es particularmente relevante como mecanismo de eliminación de HAP en lugares con precipitaciones abundantes [Delhomme *et al.*, 2007; Olivella, 2006].

Los HAP están presentes en múltiples compartimentos ambientales: de la atmósfera pueden pasar mediante deposición a plantas, suelos y aguas, donde se pueden asociar a partículas en suspensión o pasar a los sedimentos. También están presentes en los alimentos, que son la principal fuente de exposición de los humanos no fumadores. Entran en la cadena alimentaria a través de animales y plantas, y además pueden formarse en la superficie de los alimentos al cocinarlos, así como durante algunos tratamientos como el secado y el ahumado [Ishizaki *et al.*, 2010; Olivella, 2006; Šimko, 2002].

El estudio de los HAP es de gran interés no solo por su extendida presencia en el medio ambiente, sino sobre todo porque algunos tienen propiedades genotóxicas, es decir, que pueden causar daño al material genético de los seres vivos, siendo altamente carcinógenos (producen cáncer), mutagénicos (provocan mutaciones) y/o teratógenos (producen malformaciones en los fetos o embriones). Su mecanismo de acción consiste en unirse al ADN [Danyi *et al.*, 2009]. Se considera que los HAP están implicados en diferentes tipos de cáncer en humanos (mama, pulmón, colon, piel, vejiga) y la IARC (*International Agency for Research on Cancer*, Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer) ha calificado varios HAP como probables carcinógenos en humanos, estando el benzo(a)pireno ya identificado como carcinógeno humano [Ishizaki *et al.*, 2010; Delhomme *et al.*, 2007; IARC, 2010]. Por otra parte, algunos HAP no carcinógenos de por sí pueden actuar como compuestos sinérgicos, potenciando los efectos tóxicos de otros compuestos que sí lo son [Šimko, 2002].

Debido a esta toxicidad y a su ubicuidad, es importante fijar unos valores máximos de estos compuestos para evitar exposiciones que supongan un problema de salud pública. La legislación referente a los HAP es sin embargo limitada, sobre todo por la dificultad de determinar los valores considerados seguros. Esta dificultad se debe a diversos factores,

incluyendo la complejidad de determinar los efectos de cada HAP individualmente y la cantidad y diversidad de fuentes de exposición [Ishizaki *et al.*, 2010].

Los HAP se consideran contaminantes prioritarios en diversos listados de diferentes organizaciones, como la Agencia Americana de Protección Medioambiental (EPA, *US Environmental Protection Agency*), que otorga esa clasificación a 16 HAP (Fig. 1): naftaleno (Naph), acenaftileno (Acy), acenafteno (Ace), fluoreno (Fl), fenantreno (Phe), antraceno (Ant), fluoranteno (Ft), pireno (Pyr), benz(a)antraceno (BaA), criseno (Chry), benzo(b)fluoranteno (BbF), benzo(k)fluoranteno (BkF), benzo(a)pireno (BaP), dibenz(a,h)antraceno (DBahA), benzo(ghi)perileno (BghiP) e indeno(1,2,3-cd)pireno (IP).

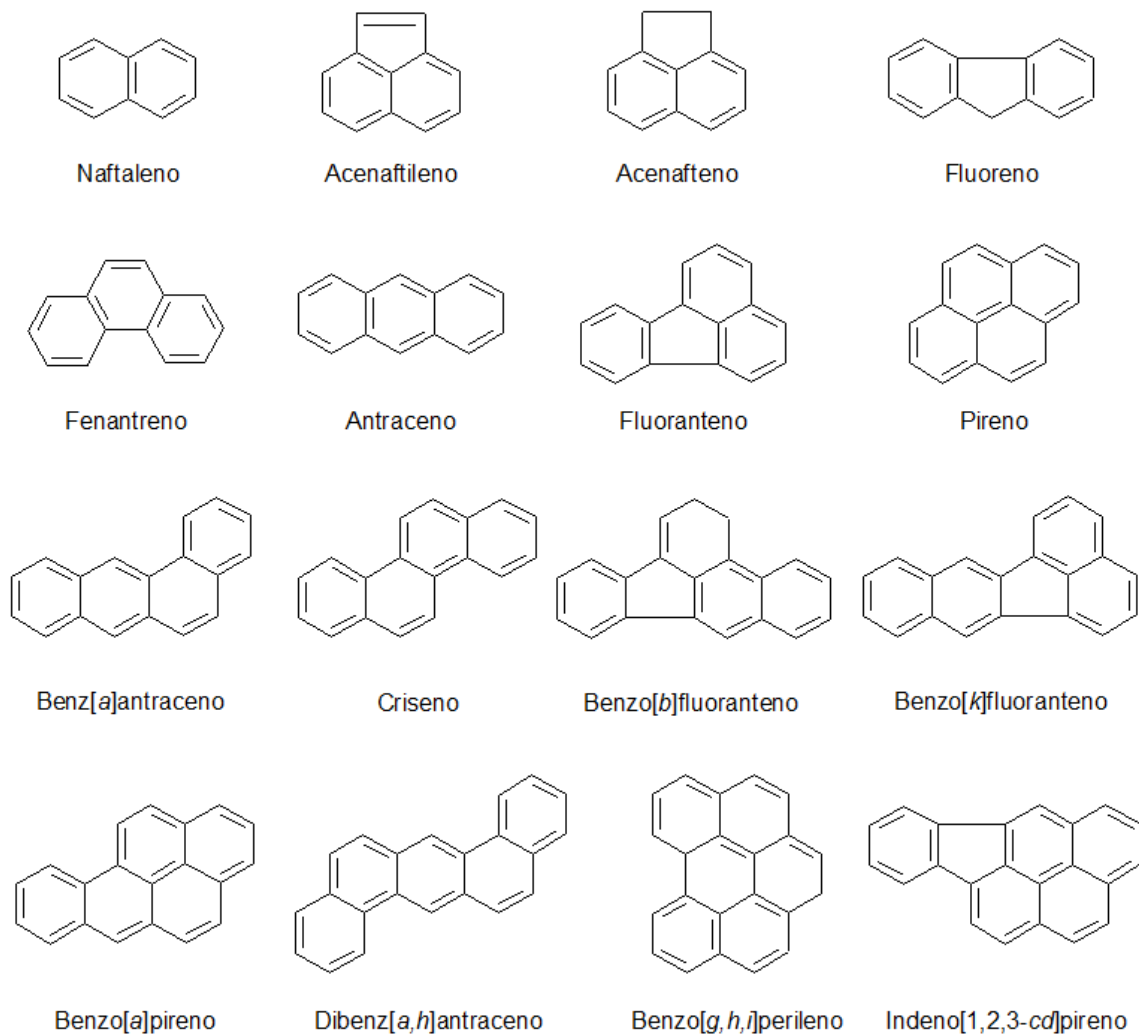


Figura 1. Estructura de los 16 HAP prioritarios de la EPA.

De ellos, el benzo(a)pireno, el benzo(a)antraceno y el dibenz(a,h)antraceno son los carcinógenos más potentes [USEPA, 1984]. En la Unión Europea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, *European Food Safety Authority*) también considera prioritarios 16 HAP, llamados 15+1 al haberse incluido el benzo(c)fluoreno con posterioridad: BaA, BaP, BbF, BghiP, BkF, Chry, DBahA, IP, benzo(j)fluoranteno, ciclopenta(cd)pireno, dibenzo(a,e)pireno, dibenzo(a,h)pireno, dibenzo(a,i)pireno, dibenzo(a,l)pireno, 5-metilcriseno y benzo(c)fluoreno [JECFA/64/SC, 2005]. Por su parte,

la Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades de Estados Unidos (ATSDR, *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*) considera 17 HAP como contaminantes prioritarios: todos los de la EPA excepto el naftaleno, además del benzo(j)fluoranteno y el benzo(e)pireno [ATSDR, 1995].

Históricamente, el benzo(a)pireno se ha utilizado con frecuencia como marcador de los riesgos de los HAP (es decir, como representante de su presencia y efectos tóxicos), y por ello es el HAP con mayor presencia en las regulaciones. Sin embargo, actualmente la EFSA considera que no es un marcador adecuado para todos los HAP, al menos en alimentos, y recomienda utilizar en su lugar la suma BaP+BaA+BbF+Chry [Reglamento 835/2011].

Tanto el benzo(a)pireno como otros HAP aparecen en diferentes legislaciones, que fijan valores límite en distintas matrices o al menos recomiendan monitorizar su concentración. Dado que la principal fuente de exposición a los HAP para las personas es a través de alimentos contaminados, existen valores límite de HAP para diversos alimentos, en especial los ahumados y productos destinados a niños y lactantes [Fernández González, 2009; Campíns-Falcó *et al.*, 2008; Reglamento 1881/2006 y posteriores modificaciones]. El naftaleno también tiene fijados valores límite ambientales por el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT) español, con un valor límite ambiental de exposición diaria (VLA-ED) de 10 ppm (53 mg/m³) y de exposición de corta duración (VLA-EC, referido a cualquier periodo de 15 minutos a lo largo de la jornada laboral) de 15 ppm (80 mg/m³) [INSHT, 2017].

En cuanto a matrices medioambientales, la Directiva 98/83/CE establece un límite de 0,010 µg/L para BaP y 0,10 µg/L para la suma de BbF+BkF+BghiP+IP en aguas de consumo. Además, la Decisión 2455/2001/CE, indica que BaP, BbF, BkF, IP y BghiP deben monitorizarse en aguas superficiales, subterráneas y costeras. En esa misma resolución también se mencionan el Naph, Ant y Ft, pero como contaminantes no prioritarios. En la Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, se dan unos valores límite en aguas superficiales para algunos HAP (Ant, Ft, Naph, BaP, BbF, BkF, BghiP e IP). Las cantidades máximas admisibles están entre 0,82 y 1,3×10⁵ ng/L, mientras que las medias anuales máximas van desde 0,17 hasta 2000 ng/L dependiendo del compuesto.

En aire, el Real Decreto RD 102/2011, relativo a la mejora de la calidad del aire, establece un valor objetivo de 1 ng/m³ para el benzo(a)pireno en material particulado (PM₁₀), dado como promedio durante un año natural. Además se indica que deben realizarse medidas en aire ambiente de otros HAP (como mínimo BaA, BbF, BjF, BkF, IP, Pyr y DBahA) con el objetivo de evaluar la contribución del BaP, la variación geográfica y las tendencias a largo plazo.

No existe ningún valor límite para ningún HAP en agua de lluvia. Los métodos normalizados para las medidas vienen dados en la Norma UNE-EN 15549:2008 (benzo(a)pireno en aire ambiente), y en la Norma UNE-EN 15980 (medición de la deposición de varios HAP de elevado peso molecular).

1.1.2. ÉSTERES DEL ÁCIDO FTÁLICO

Los ftalatos son ésteres del ácido *orto*-ftálico sintetizados mediante esterificación del citado ácido con diferentes alcoholes. En función del alcohol o alcoholes empleados en la esterificación, se obtienen distintos ftalatos (Fig. 2), que se pueden clasificar en dos grupos según su peso molecular. Los ftalatos de alto peso molecular son los más empleados, y entre ellos destacan el diisononil ftalato (DiNP) y el diisodecil ftalato (DiDP), que suponen el 70-80% de los ftalatos que se usan en Europa. Estos compuestos no se consideran tóxicos para los seres humanos. En cambio, muchos ftalatos de bajo peso molecular están clasificados como muy peligrosos en el Reglamento comunitario: Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de sustancias químicas (REACH, *Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemical substances*). Entre ellos se encuentran el di(2-etilhexil)ftalato (DEHP), el di-*n*-butilftalato (DBP), su isómero diisobutilftalato (DiBP) y el butilbencilftalato (BBP) [Ventrice *et al.*, 2013; ECPI, 2015].

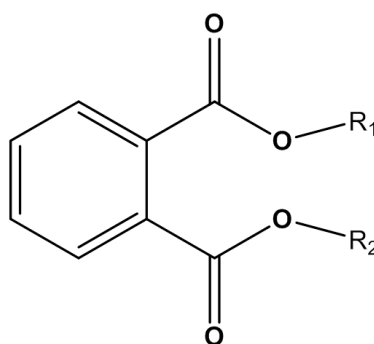


Figura 2. Estructura genérica de los ftalatos, que difieren en las cadenas sustituyentes en R_1 y R_2 .

El uso de los ftalatos está muy extendido en la industria. Se emplean fundamentalmente como plastificantes (sustancias que aumentan la flexibilidad y resistencia de los polímeros), de tal manera que están presentes en una gran variedad de productos fabricados con diferentes tipos de polímeros. Buena parte de los ftalatos (alrededor del 95%) se emplean en la laminación del PVC (cloruro de polivinilo), el plástico más usado del mundo. Los ftalatos están presentes en plásticos empleados en múltiples campos, incluyendo las industrias automovilística, alimentaria o textil, artículos médicos, objetos de la construcción o juguetes infantiles.

Asimismo, los ftalatos también se usan como agentes formadores de películas, disolventes para tintes o desnaturalizantes, además de encontrarse en cosméticos, perfumes y productos de aseo personal. En general, los ftalatos de alto peso molecular (y alguno de bajo peso molecular como el DBP) suelen usarse como plastificantes, mientras que los de bajo peso molecular: dimetilftalato (DMP), dietilftalato (DEP) o DBP, se utilizan en mayor proporción en adhesivos, tintas y cosméticos [Ventrice *et al.*, 2013; Heudorf *et al.*, 2007; ECPI, 2015].

Los ftalatos no están químicamente enlazados con los polímeros, por lo que se pueden filtrar, migrar o evaporar. De este modo, acaban en el medio ambiente, en los alimentos y en materiales que inicialmente no incluían ftalatos. Son considerados por ello

contaminantes ubicuos a los cuales están expuestos los seres humanos durante toda su vida, mediante ingestión, inhalación y contacto dérmico, incluyendo la contaminación ambiental. Como se ha comentado, su origen es antropogénico, debido a su utilización en la fabricación de multitud de productos. En el medio ambiente, los ftalatos se han encontrado en atmósfera, aguas, suelos y sedimentos y algunos se bioacumulan en la cadena alimentaria [Gao y Wen, 2016; Heudorf *et al.*, 2007].

Como sucedía con los HAP, en la atmósfera los ftalatos se reparten entre la fase gaseosa y el material particulado, estando en este caso mayoritariamente en fase vapor. Las concentraciones de los ftalatos en la atmósfera suelen presentar variaciones estacionales debido a que se ven afectadas por la temperatura, además de otros parámetros esenciales en la dispersión atmosférica de contaminantes como la presencia de capas de inversión térmica o los lavados mediante precipitación. Las actividades antropogénicas también afectan de forma significativa a los flujos de deposición de estos compuestos.

Los ftalatos pueden sufrir fotodegradación e hidrólisis, pero ambos procesos son muy lentos en la naturaleza. A pH neutro, los tiempos de vida media de los ftalatos se medirían en años, llegando a 2000 años para el DEHP. Por ello, la biodegradación por parte de bacterias y hongos es el principal mecanismo de eliminación de ftalatos. Aunque en condiciones de laboratorio este proceso es rápido, en la naturaleza es algo más lento, especialmente en condiciones anaerobias, en las que podría prolongarse varios meses.

El primer paso en la biodegradación de los ftalatos consiste en la hidrólisis a ácido ftálico, con monoésteres como productos intermedios. Posteriormente se producen más etapas, que difieren según el tipo de organismo responsable de la biodegradación, hasta mineralizar el ftalato transformándolo finalmente en CO₂ y H₂O [Gao y Wen, 2016].

Los seres humanos también tienen la capacidad de metabolizar los ftalatos, igualmente transformándolos en monoéster mediante hidrólisis, para continuar en este caso con una oxidación y una glucuronidación, sobre todo en el caso de los ftalatos de alto peso molecular, ya que los de bajo peso molecular se excretan también directamente como monoésteres en un alto porcentaje. Por este motivo, los monoésteres como el mono(2-etilhexil)ftalato (MEHP, metabolito del DEHP) o el mono-n-butilftalato (MBP, metabolito del DBP), junto con los productos secundarios oxidados (libres o conjugados como glucurónidos), se emplean como biomarcadores de la presencia de los ftalatos en humanos mediante su determinación en orina [Kumar y Sivaperumal, 2016; Jornet-Martínez *et al.*, 2015].

Respecto a los riesgos asociados a los ftalatos, y teniendo en cuenta su amplia presencia en el medio ambiente y todo tipo de productos, diversos comités de diferentes campos se han encargado de su evaluación. Los ftalatos presentan una baja toxicidad aguda. Además, todos los ftalatos han dado negativo en mutagenia y/o genotoxicidad. En cuanto a la carcinogenia, algunos ftalatos presentan actividad (o posible actividad) en roedores, aunque debido a varios motivos que incluyen diferencias relacionadas con el receptor activado por proliferador de peroxisoma α -PPAR (*Peroxisome Proliferator-*

Activated Receptor), cuya activación es la principal responsable de los efectos adversos, parece que no producen esos efectos en humanos. A pesar de ello, la IARC clasifica actualmente el DEHP como "posible carcinógeno humano", tras varios cambios de categoría [IARC, 2013; Heudorf *et al.*, 2007].

Por otra parte, muchos ftalatos están considerados disruptores endocrinos. El DEHP, el DBP, el DiBP, el BBP y el di-n-pentilftalato o diamilftalato (DAP) y sus isómeros están considerados tóxicos para la reproducción (categoría 1B) en el Reglamento 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo. El Programa Nacional de Toxicología del Centro para la Evaluación de Riesgos para la Reproducción Humana estadounidense (NTP-CERHR, *National Toxicology Program Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction*) ha evaluado los potenciales efectos adversos sobre la reproducción y desarrollo de los seres humanos de 7 ftalatos, estimando que la exposición a los mismos puede provocar una disminución en el número de espermatozoides, cambios histológicos en los testículos y reducción de la fertilidad [Heudorf *et al.*, 2007].

Los estudios llevados a cabo con roedores demuestran que una exposición constante a niveles bajos presenta toxicidad, afectando a los testículos en los machos (reduciendo su tamaño, la producción de espermatozoides y los niveles de zinc) y a los ovarios en las hembras (afectando a la producción de hormonas esteroideas). También se ha observado un aumento de la mortalidad y la aparición de malformaciones en las crías si la exposición se produce en días concretos de la gestación. En ratones, el compuesto más tóxico para el aparato reproductor es el DEHP, seguido de di-n-hexilftalato (DHP), DAP, DBP y di-n-propilftalato (DPP). Los ftalatos de cadenas muy cortas (como el DEP) o muy largas (como el di-n-octilftalato, DnOP) no parecen presentar toxicidad. Los efectos en seres humanos podrían ser similares a los encontrados en roedores y no manifestarse hasta pasados varios años [Ventrice *et al.*, 2013].

Por otra parte, se sospecha que los metabolitos de los ftalatos son más tóxicos que los productos de partida, de tal modo que los monoésteres y los productos secundarios oxidados presentarían actividad biológica. Por ejemplo, algunos estudios indican que el MEHP parece tener una toxicidad superior a la de su precursor DEHP en todos sus posibles efectos (disruptor endocrino, carcinógeno o su relación con trastornos del espectro autista). Además, el MEHP está relacionado con el asma mientras que el DEHP solo muestra relación con esta enfermedad respiratoria a concentraciones muy elevadas (no presentes en la naturaleza), al contrario que su monoéster derivado que provoca los mismos efectos a dosis más bajas [Bui *et al.*, 2016; Ventrice *et al.*, 2013; Nakamiya *et al.*, 2005; Jornet-Martínez *et al.*, 2014].

Debido a su toxicidad y a su extendida presencia en todo tipo de productos y en el medio ambiente, varios ftalatos están regulados en múltiples normativas. En Europa, los ftalatos catalogados como tóxicos para la reproducción en REACH (DEHP, BBP, DBP, DiBP, DAP) no se pueden emplear en juguetes, productos infantiles, cosméticos ni utensilios médicos y desde agosto de 2015 estos compuestos solo se pueden producir y vender con una autorización específica. A pesar de no estar catalogados como peligrosos para la salud, por su elevado volumen de producción y la mayor vulnerabilidad de los niños, algunos

ftalatos de alto peso molecular como DnOP, DiNP y DiDP también están sometidos a ciertas restricciones de uso en algunos productos infantiles [Reglamento 1907/2006; Ventrice *et al.*, 2013]. La Directiva 2007/19/CE, relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios, impone restricciones sobre DBP, BBP, DEHP, DiNP y DiDP, especificando un límite máximo de migración específica (SML, *Specific Migration Limit*) para cada uno de ellos. Además, el DEHP tiene algunas restricciones relacionadas con el contacto con alimentos [Ventrice *et al.*, 2013]. El INSHT tiene fijado un valor límite ambiental de exposición diaria de 5 mg/m³ para DMP, DEP, DBP y DEHP [INSHT, 2017].

En cuanto a legislación medioambiental, el DEHP está considerado un contaminante prioritario en la política de aguas europea y tiene fijado un límite como media anual en las normas de calidad ambiental (AA-EQS) de 1,3 µg/L en aguas superficiales [Directiva 2013/39/UE]. También la EPA estadounidense ha fijado una concentración máxima admisible en aguas de consumo para este compuesto (6 µg/L), al igual que la Organización Mundial de la Salud (8 µg/L). También hay límites en aguas de consumo en otros países como Australia, Japón o Nueva Zelanda [Gao y Wen, 2016]. Además del DEHP, la EPA considera contaminantes prioritarios a DMP, DEP, DBP, BBP y DnOP [40 CFR Parte 423, Apéndice A]. Hasta la fecha ningún ftalato está regulado en matrices atmosféricas.

1.1.3. AMINAS ALIFÁTICAS

Las aminas son derivados del amoníaco en los que uno o más de sus átomos de hidrógeno están sustituidos por grupos alquilo (aminas alifáticas) o arilo (aminas aromáticas). Dependiendo del número de hidrógenos sustituidos, se distingue entre aminas primarias, secundarias y terciarias (Fig. 3).

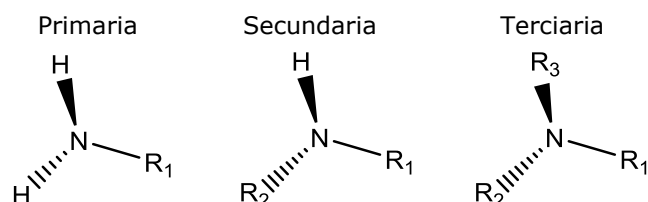


Figura 3. Estructura genérica de las aminas, que se diferencian en los sustituyentes R₁, R₂ y R₃.

Entre sus propiedades se encuentra el hecho de que poseen olores fuertes y característicos, siendo responsables del olor de muchos organismos y sustancias. Por otra parte, debido a la presencia de un par solitario de electrones en el átomo de nitrógeno central, las aminas tienen un fuerte carácter básico. Pueden actuar como bases incluso en presencia de amoníaco. Además, son compuestos muy polares, lo que dificulta su análisis [Ge *et al.*, 2011; Fekete *et al.*, 2010].

Las aminas son emitidas por una amplia variedad de fuentes, que pueden ser tanto antropogénicas (cría de animales, industrias, especialmente la alimentaria, combustiones, compostaje, automoción, tratamiento de aguas residuales, la cocina, inhibidores de la corrosión, humo del tabaco, textiles y pesticidas) como naturales (biodegradación de materia orgánica con proteínas o aminoácidos, quema de biomasa, océanos, vegetación o

fuentes geológicas). La mayoría de las fuentes emiten tanto aminas alifáticas como aromáticas, si bien en la ganadería, una de las fuentes de mayor importancia, se emiten fundamentalmente aminas alifáticas. En la industria, las aminas alifáticas (así como las poliaminas, con varios grupos amino) se emplean en grandes cantidades como materias primas y productos intermedios en la producción de tensioactivos, plásticos, tintes y medicamentos. También se utilizan como inhibidores de la corrosión en centrales de generación de energía. Respecto a las fuentes naturales, debe tenerse en cuenta que muchas aminas tienen funciones biológicas muy importantes, por lo que muchos organismos las producen [Poste *et al.*, 2014; Ge *et al.*, 2011; Prieto-Blanco *et al.*, 2009].

Debido al gran número de fuentes, las aminas son compuestos ubicuos en el medio ambiente. Participan en los ciclos del carbono y del nitrógeno y se encuentran en distintos compartimentos ambientales, incluyendo aire, aguas y suelos. En la atmósfera se han identificado alrededor de 150 aminas y 30 aminoácidos.

Las aminas más abundantes y frecuentes en la atmósfera son las alifáticas de bajo peso molecular, con entre 1 y 6 átomos de carbono: metilamina (MA), dimetilamina (DMA), trimetilamina (TMA), etilamina (EA), dietilamina (DEA), trietilamina (TEA), 1-propilamina y 1-butilamina. Estas aminas poseen presiones de vapor elevadas, por lo que el reparto gas/partícula no es tan interesante como para otros contaminantes, aunque también se han identificado en el material particulado atmosférico. Por otra parte, tienen una alta solubilidad en agua, que hace que estos compuestos se disuelvan en la fase líquida del aerosol o en el agua de lluvia. Además, aunque en menor concentración, también hay aminas de mayor peso molecular, cuya presencia en el material particulado atmosférico es de mayor relevancia [Poste *et al.*, 2014; Ge *et al.*, 2011].

El marcado carácter básico de las aminas las convierte en compuestos “especiales” entre las especies orgánicas que se hallan en la atmósfera, debido a su capacidad de neutralizar ácidos. Las aminas alifáticas gaseosas en particular son bases fuertes que pueden participar en reacciones ácido-base rápidas, reaccionando con ácidos como HCl, HNO₃ o H₂SO₄ que están presentes en la atmósfera. También pueden reaccionar con ácidos orgánicos, dando lugar a amidas, o con oxidantes (O₃, NO_x) para contribuir a la formación de aerosol orgánico secundario. Por otra parte, también es interesante el hecho de que las disoluciones acuosas de etanolamina (mono, di y tri) se usan como secuestradores de carbono por la elevada absorción de CO₂ que pueden alcanzar. Asimismo hay tensioactivos catiónicos como las alquilaminas que tienen la capacidad (reversible) de capturar CO₂. A pesar de su importante participación en las reacciones atmosféricas, existe poca información acerca de las propiedades termodinámicas y cinéticas de las aminas en la atmósfera [Ge *et al.*, 2011].

Aunque algunas aminas son tóxicas de por sí, especialmente las aromáticas (entre las cuales muchas son mutagénicas y carcinógenas), en general muchas aminas alifáticas tan solo provocan irritación en ojos, piel y sistema respiratorio. Sin embargo, las aminas alifáticas son en cualquier caso compuestos peligrosos debido a que sus productos de degradación, especialmente las N-nitrosaminas y las N-nitraminas (generados a partir de la oxidación de las aminas, particularmente las secundarias, en su reacción con nitratos y

nitritos), sí presentan una toxicidad elevada (mutagenia y carcinogenia). La única amina alifática considerada carcinógena en la IARC es la dietanolamina (clasificación 2B, posible carcinógeno en humanos) [Poste *et al.*, 2014; Lee y Wexler, 2013; IARC, 2013].

Sin embargo, varias N-nitrosaminas están catalogadas como posibles o probables carcinógenos en humanos, incluyendo N-nitrosodimetilamina, N-nitrosodietilamina, N-nitrosodi-n-propilamina, N-nitrosodi-n-butilamina, N-nitrosometiletilamina y N-nitrosodietanolamina, derivadas de aminas alifáticas [IARC, 1987; IARC, 2000].

A diferencia de otros contaminantes como los HAP y los ftalatos, las aminas alifáticas no están reguladas en la legislación. La EFSA evaluó 30 aminas empleadas como aromatizantes en alimentos, incluyendo varias aminas alifáticas, y determinó que no suponían peligro para la salud a los niveles de ingestión estimados para estos aditivos. Todas las aminas alifáticas evaluadas dieron negativo en las pruebas de genotoxicidad realizadas [EFSA, 2015].

Sin embargo, debido a su ya comentado uso como materias primas en la industria, el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo sí que regula múltiples aminas, incluyendo bastantes alifáticas (MA, DMA, TMA, N,N-dimetiletilamina, EA, DEA, TEA, isopropil- y diisopropilamina, butilamina, ciclohexilamina, mono-, di- y tri- etanolamina, 2-dietilaminoetanol y 2-N-dibutilaminoetanol) y algunas aromáticas y poliaminas. En la manipulación directa como productos químicos, varias aminas alifáticas están consideradas, además de irritantes, nocivas por ingestión, inhalación y/o contacto dérmico, además de poder provocar quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. Los valores límite ambientales de exposición diaria para las aminas alifáticas están en el rango 2-5 ppm (3,8-21 mg/m³) para las de cadenas cortas de carbonos, siendo inferiores para las que contienen el etanol como sustituyente (0,46-1 ppm, 2-9,7 mg/m³). Los VLA-EC, que solo están establecidos para parte de esas aminas, se encuentran entre 3 y 15 ppm (7,5-37 mg/m³) [INSHT, 2017].

1.2. DESCRIPCIÓN DE LAS MATRICES ATMOSFÉRICAS

1.2.1. AGUA DE LLUVIA

El agua es un componente minoritario, aunque de gran importancia, de la atmósfera. En este compartimento ambiental el agua se encuentra como vapor (~95%) y como pequeñas gotas en suspensión, que forman nubes y finalmente precipitan en forma de lluvia o nieve. El agua de lluvia no es agua pura, sino una disolución muy diluida de múltiples sustancias, recogidas por el agua durante su estancia y recorrido en la atmósfera. Los componentes químicos disueltos en el agua de lluvia proceden de una gran variedad de fuentes, aunque en general se pueden dividir en dos grupos, si derivan mayoritariamente de partículas en el aire (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ y Cl⁻) o de gases atmosféricos (SO₄²⁻, NH₄⁺ y NO₃⁻). Tanto partículas como gases, a su vez, pueden proceder de varias fuentes tanto naturales (aerosol marino, polvo de los suelos, etc.) como antropogénicas (industria, quema de biomasa, etc.). La composición del agua de lluvia, por tanto, viene determinada por la de los aerosoles que actúan como núcleos de

condensación de las gotas y la de los gases solubles que reaccionan con el agua. El agua de lluvia tiene un amplio rango de composiciones, que varían según el lugar de recogida, al igual que la cantidad de agua presente en un determinado volumen de aire. El pH del agua también es variable, si bien en general es débilmente ácido [Berner *et al.*, 2012].

La determinación de los diversos componentes del agua de lluvia conlleva una gran complejidad debido a la variabilidad en la composición. Ésta depende del lugar de muestreo y de las fuentes que le influyen, pero también se ve afectada por las variaciones estacionales, por las condiciones atmosféricas e incluso por la altura a la que se recoja la muestra [Van Noort y Wondergem, 1985]. La presencia de tantos componentes de muy diferente naturaleza y en distintas proporciones, incluyendo muchos a nivel ultratraza, complica aún más su caracterización. A estas dificultades todavía habría que añadir la posibilidad de que el muestreo y el almacenamiento de la muestra afecten a la composición, debido a la posibilidad de cesiones del material del envase, pérdida de los analitos por adsorción, degradación de algunos compuestos o modificación del reparto entre la fase disuelta y las partículas en suspensión.

Aunque la precipitación es estrictamente solo la deposición húmeda, en muchas ocasiones se utilizan muestreadores abiertos, que recogen también las partículas que se depositan cuando no llueve (deposición seca), de tal modo que la muestra recogida es deposición total (*bulk deposition*). Incluso aunque solo se recolecte la deposición húmeda, ésta incluye también partículas arrastradas por el agua (generalmente de menor tamaño que las que depositan en seco). La mayoría de las técnicas de tratamiento de agua de lluvia requieren una filtración previa para eliminar esas partículas, aunque en ocasiones la fracción particulada también se analiza. Como se ha comentado, el reparto de algunos analitos entre ambas fases puede variar durante el almacenamiento, por lo que es importante realizar la filtración siempre en el mismo punto del tratamiento para obtener resultados reproducibles. Desgraciadamente no existe un consenso sobre los protocolos de muestreo, filtrado y almacenamiento de agua de lluvia, y en muchas ocasiones ni siquiera se ofrece información sobre el material y lavado del recipiente empleado para recoger y conservar la muestra, o el tiempo y las condiciones de conservación, que pueden afectar a la composición de la muestra [Krupa, 2002].

El interés en la caracterización del agua de lluvia se debe, por un lado, a su participación en la relación entre distintos compartimentos ambientales, ya que la deposición húmeda es una importante vía de eliminación de ciertos contaminantes de la atmósfera y a la vez de entrada de éstos en aguas, suelos y vegetación. Por otra parte, está documentado en la bibliografía el uso del agua de lluvia en agricultura y también como agua de bebida en distintas partes del mundo, como por ejemplo en Chipre [Charalambides *et al.*, 2003], en la India [Chakraborty *et al.*, 2016] o en Australia [Huston *et al.*, 2009]. Por ello es particularmente importante realizar un seguimiento de su calidad. Por ejemplo, Lu *et al.* (2015) desaconsejaron el consumo de agua de lluvia recogida en Guangzhou y Foshan (China) sin purificación previa en base a sus estimaciones de la composición de la misma.

Una variable importante a la hora de muestrear agua de lluvia es el tiempo de muestreo, que a su vez está muy relacionado con el volumen recogido. Se puede llevar a cabo el muestreo de un evento de precipitación concreto, recogiendo la muestra cuando éste acaba, se pueden realizar muestreos separados dentro de un mismo evento (dividiendo las fracciones recogidas por tiempo o por volumen, según la intensidad de la precipitación) e incluso se pueden muestrear gotas individuales (si bien el volumen tan reducido de la muestra dificulta su posterior análisis, limitando sus aplicaciones). Es muy frecuente tomar muestras combinadas de varios eventos, recogéndolas periódicamente (normalmente cada 1, 2 o 4 semanas) [Krupa, 2002].

El tipo de muestra recogida depende del objetivo del análisis. A pesar de que el uso de muestras combinadas (generalmente semanales o mensuales) está muy extendido, el análisis de eventos individuales o muestras combinadas de periodos más cortos (diarias) proporciona también información muy interesante. Debido al efecto lavado del agua de lluvia sobre muchos contaminantes, el volumen inicial de la precipitación es el que contiene las concentraciones más elevadas de los compuestos (incluso una interrupción corta entre dos eventos produce un aumento en los niveles de los contaminantes al inicio del segundo evento), y el resto de la lluvia, con concentraciones más bajas, diluye la muestra final [Taguchi *et al.*, 2012]. Varios autores han encontrado correlación negativa entre el volumen de muestra y las concentraciones encontradas en el agua de lluvia para varios contaminantes como HAP y aldehídos [Taguchi *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2010]. En general, las muestras recogidas durante periodos largos tienen un volumen mayor que las de periodos más cortos (aunque por supuesto también depende de la intensidad de la precipitación), por lo que en las últimas se suelen encontrar concentraciones más elevadas.

Cierta información puede perderse con la dilución en el muestreo en periodos largos, siendo únicamente accesible a través del análisis de muestras de periodos cortos. Los eventos permiten estudiar los procesos de lavado desde el aerosol atmosférico, las variaciones temporales de los niveles de los analitos y también cuantificar las concentraciones más elevadas, que a pesar de ser puntuales (ya que únicamente se dan al inicio del evento), quizás podrían llegar a ser lo suficientemente elevadas en algunos lugares puntuales como para provocar efectos negativos sobre el medio ambiente si los compuestos poseen toxicidad aguda. Como ejemplo de esta pérdida de información, Taguchi *et al.* (2012) solo han podido observar las diferencias regionales en los niveles de aldehídos en agua de lluvia teniendo en cuenta los primeros momentos de los eventos. Dichas diferencias no se pueden observar si se tiene en consideración el volumen total recogido de las muestras.

Por este motivo, en ocasiones se lleva a cabo el muestreo secuencial dentro de un evento, recogiendo fracciones de 1 mm. A partir de este tipo de muestreo, se han propuesto diferentes modelos (hiperbólico, potencial, exponencial) de la relación entre los analitos y la cantidad de precipitación, que varían en función del tipo de contaminante (compuestos carbonílicos, HAP, metales) [Balla *et al.*, 2014; Taguchi *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2009; Shimamura *et al.*, 2006].

Teniendo todo esto en cuenta, para la determinación de compuestos orgánicos a bajos niveles de concentración en agua de lluvia parece imprescindible considerar estos tipos de muestreo (por eventos, secuenciales...) frente a los muestreos en largos períodos de tiempo. Sin embargo, esto requiere la adaptación de las metodologías tradicionales de análisis a técnicas miniaturizadas que permitan analizar bajos volúmenes de muestra.

Además del tiempo de muestreo y el volumen de muestra, en ocasiones se aportan datos de otros parámetros como las condiciones meteorológicas (viento, temperatura) o el pH y conductividad de la muestra. Algunos autores proporcionan información sobre el tiempo que llevaba sin llover antes del muestreo, que (junto con la precipitación previa acumulada) suele tener mucha importancia ya que debido al efecto lavado del agua de lluvia en general los niveles son más elevados cuanto más tiempo haya pasado sin precipitaciones [Van Noort y Wondergem, 1985; Bucheli *et al.*, 2000].

1.2.2. MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO

El término material particulado atmosférico (PM, *Particulate Matter*) se refiere a la mezcla de partículas sólidas y pequeñas gotas (aerosoles) en suspensión en la atmósfera. El PM está formado por una mezcla heterogénea de partículas de diferentes tamaños, morfologías y composiciones, que varían según el lugar y la época. Las partículas que constituyen el PM tienen diámetros entre 0,02 y 100 μm (las de mayor diámetro sedimentan con facilidad y no se incluyen en el PM). Teniendo en cuenta que las partículas generalmente no son esféricas y tienen formas irregulares, es complicado trabajar con sus diámetros reales, por lo que se utiliza el diámetro aerodinámico (D_a). El D_a se define como el diámetro que tendría una partícula esférica de densidad 1 g/cm^3 para tener la misma velocidad de deposición que la partícula considerada. Una vez definido el diámetro aerodinámico se define el término PM_x , que se refiere a las partículas que pasan a través de un cabezal de tamaño selectivo para un diámetro aerodinámico de "x" μm con una eficiencia de corte del 50% [Guevara, 2016; Blanco Heras, 2009; Directiva 2008/50/CE].

Las características físicas y la composición del PM están directamente relacionadas con el origen de las partículas, que puede ser muy diverso. Se distingue entre partículas primarias, emitidas directamente por fuentes tanto naturales como antropogénicas, y partículas secundarias, formadas en la atmósfera como resultado de reacciones físico-químicas. El aerosol secundario se forma a partir de conversión gas-partícula y/o por condensación de compuestos gaseosos sobre partículas ya formadas. Estas partículas secundarias se forman fundamentalmente a partir de gases precursores generados como subproductos de las combustiones, como los compuestos orgánicos volátiles (COV), amoníaco u óxidos de azufre y de nitrógeno [Guevara, 2016].

Respecto a las fuentes de partículas primarias, ya se ha comentado que pueden ser naturales o antropogénicas. Entre las fuentes naturales se encuentran el aerosol marino, el polvo de los suelos, la actividad volcánica, los incendios forestales no intencionados y las emisiones biogénicas. En cuanto a las fuentes antropogénicas, las combustiones constituyen la fuente de mayor importancia. Las emisiones domésticas por quema de biomasa son la fuente mayoritaria de PM_{10} y $\text{PM}_{2,5}$ en Europa, y tanto el tráfico rodado

como el marítimo contribuyen también al material particulado de forma significativa, especialmente en áreas urbanas. Otro tipo muy relevante de fuentes antropogénicas son las industrias (segunda fuente en Europa tras las combustiones domésticas), tanto las relacionadas con la energía (centrales y refinerías) como otro tipo de actividades industriales, como la construcción y demolición, así como las actividades agrícolas. Mientras que las combustiones y procesos industriales generan mayoritariamente las partículas más finas ($PM_{2,5}$ y partículas ultrafinas), los procesos mecánicos, el aerosol marino y la suspensión de polvo contribuyen en mayor medida a la fracción gruesa ($PM_{2,5-10}$) [Guevara, 2016].

El PM está formado por multitud de componentes, que pueden ser tanto orgánicos como inorgánicos. Los componentes inorgánicos son fundamentalmente iones (sulfato de amonio, nitrato, sal marina) y partículas de suelos transportadas por el viento, aunque el PM también incluye metales en su composición. Los iones mayoritarios (SO_4^{2-} , NO_3^- , NH_4^+) forman parte del aerosol inorgánico secundario (SIA, *Secondary Inorganic Aerosol*). Otra fracción importante en el material particulado atmosférico es la carbonosa, que se divide en carbono elemental y carbono orgánico. Los compuestos orgánicos que forman o pueden formar parte del PM abarcan una gran variedad de número de carbonos, grupos funcionales y solubilidades, aunque tan solo una pequeña parte de ellos han sido cuantificados. Los compuestos orgánicos presentes en el PM pueden ser tanto primarios como secundarios, formando estos últimos parte del aerosol orgánico secundario (SOA, *Secondary Organic Aerosol*) [Blanco Heras, 2009; Ge *et al.*, 2011; Saxena *et al.*, 1996].

El estudio del PM resulta de gran interés debido a sus efectos negativos sobre el clima, los ecosistemas, la visibilidad y la salud humana. Además, el PM proporciona una superficie para reacciones químicas (en fase condensada o de superficie), participando por tanto en la química de la atmósfera. Mientras que sus efectos sobre el clima se deben fundamentalmente a sus propiedades ópticas (dispersión y absorción de la luz solar y la radiación térmica), en los ecosistemas puede afectar a procesos como la fotosíntesis y alterar los ciclos de nutrientes (acidificación, eutrofización) [Putaud *et al.*, 2010; Blanco Heras, 2009].

Respecto a sus efectos sobre la salud, el PM afecta fundamentalmente a los sistemas respiratorio y cardiovascular. El pequeño tamaño de las partículas les otorga capacidad para penetrar en el sistema respiratorio, de tal modo que cuanto menor sea el tamaño, más podrán adentrarse las partículas en el cuerpo humano y más nocivos serán sus efectos. El PM_{10} puede alcanzar los pulmones (región traqueobronquial), mientras que el $PM_{2,5}$ llega a la región alveolar. La Organización Mundial de la Salud (OMS) propone en su guía de calidad del aire un valor límite de $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ como media diaria y $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ como media anual para PM_{10} , mientras que para $PM_{2,5}$ propone los valores de 25 y $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (media diaria y anual respectivamente) [ISO-7708:1995; OMS, 2005]. Además, el material particulado está identificado por la IARC como carcinógeno para los seres humanos [IARC, 2016].

El Real Decreto RD 102/2011, relativo a la mejora de la calidad del aire, incluye el PM_{10} y el $PM_{2,5}$ entre los contaminantes regulados. Para el PM_{10} se fija un valor límite diario

de $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$, que no podrá superarse en más de 35 ocasiones por año, y un valor límite como promedio anual de $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Por su parte, el $\text{PM}_{2,5}$ tiene un valor límite anual de $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$, que se reducirá a $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ a partir del 1 de enero de 2020. Los efectos del PM sobre la salud también se ven afectados por la composición de las partículas, ya que éstas pueden contener contaminantes tóxicos. Por este motivo están regulados también los niveles máximos para algunos contaminantes (arsénico, cadmio, níquel y benzo(a)pireno) en PM_{10} .

1.2.3. ESTUDIOS DE CONTRIBUCIÓN DE FUENTES

Este tipo de estudios se llevan a cabo con el objetivo principal de poder identificar las posibles fuentes de material particulado atmosférico, realizar una estimación sobre sus contribuciones a la masa total de PM y obtener un perfil químico de las diferentes fuentes identificadas. De esta forma se pueden evaluar mejor los riesgos de salud asociados al PM, dando lugar al desarrollo e implementación de políticas para proteger tanto la salud humana como el medio ambiente y facilitando el diseño de estrategias de mitigación efectiva de esos riesgos.

Existen numerosos modelos para identificar las fuentes y estimar su contribución, que se han desarrollado basándose en datos ambientales registrados en los lugares donde se realiza la monitorización ambiental. La modelización es una tarea muy compleja debido al gran número de variables que influyen en las concentraciones de PM.

Se emplean dos tipos de métodos para llevar a cabo la modelización. Por un lado, existen métodos basados en inventarios de emisiones y modelos de dispersión para simular la formación, transporte, deposición y emisión de aerosoles. Este tipo de métodos requieren de inventarios de emisiones detallados (no siempre disponibles) y además no son exactos, particularmente en los casos en que la contribución de emisiones naturales es muy significativa. El otro tipo de métodos empleado para esta función, los modelos receptores, se basan en la evaluación estadística de datos químicos de composición del PM recogido en los "lugares receptores". El principio fundamental de este enfoque es suponer la conservación de la masa y de las especies químicas desde el origen hasta el receptor. Entre los modelos receptores se incluyen métodos como el análisis de componentes principales (PCA, *Principal Components Analysis*), el balance químico de masa (CMB, *Chemical Mass Balance*) y la factorización de matriz positiva (PMF, *Positive Matrix Factorization*).

El CMB requiere un conocimiento detallado de las fuentes y los perfiles de emisión y su principal limitación es que los aerosoles secundarios deben incluirse de forma separada, como compuestos químicos específicos, en lugar de como componentes de los perfiles de emisión de la fuente. Esto puede conducir a una interpretación no del todo correcta. Cuando no se posee un conocimiento previo detallado de las fuentes ni de sus perfiles de contaminación, los modelos más utilizados son PCA y PMF. En estos modelos las fuentes y sus contribuciones se atribuyen basándose únicamente en observaciones en el sitio receptor, estableciendo correlaciones internas mediante criterios matemáticos que dan lugar a la aparición de factores. Una limitación de estos modelos es que el resultado de

los componentes o factores puede representar mezclas de fuentes en lugar de perfiles independientes [Amato *et al.*, 2014].

A escala regional y local, debido a que las fuentes están muy localizadas, las emisiones antropogénicas juegan un papel muy importante, dominante en algunos casos [Kuo *et al.*, 2014]. Algunos modelos reproducen bastante bien algunos contaminantes atmosféricos que son estables en la atmósfera y cuyas fuentes de emisión están bien establecidas; sin embargo, otros componentes del PM suelen ser infravalorados por los modelos actuales. En la mayoría de los estudios llevados a cabo en diferentes lugares del mundo se han observado diferencias significativas entre las distintas tipologías de las zonas (rural, tráfico, urbana, industrial, de fondo, etc.).

1.3. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA *IN-TUBE* (IT-SPME)

En la actualidad las técnicas analíticas instrumentales proporcionan una muy buena sensibilidad y selectividad, pero todavía no permiten analizar directamente muestras complejas (biológicas, ambientales, alimentarias...). Por tanto, es necesario llevar a cabo un tratamiento previo de la muestra, que puede incluir la extracción, concentración, fraccionamiento y/o aislamiento del analito o analitos. Esta etapa o etapas de tratamiento de muestra tienen un gran impacto tanto en la calidad (en cuanto a exactitud y precisión) del análisis como en su tiempo, ya que más del 80% del tiempo de análisis se dedica a las etapas de muestreo y tratamiento. Por este motivo es importante que la preparación de muestra sea eficiente, lo que idealmente implica una mínima pérdida de muestra (y por tanto una buena recuperación de los analitos), una eliminación lo más completa posible de los interferentes, un coste bajo y que el tratamiento sea rápido, cómodo y fácil de combinar con los sistemas que se usarán posteriormente en la determinación. Frente a las técnicas de tratamiento de muestra clásicas, que generalmente conllevan múltiples (y tediosas) etapas, mucho tiempo y un gran consumo de disolventes, las tendencias en los últimos tiempos se dirigen a la miniaturización, la reducción del uso de disolventes y la automatización. De esas tendencias surgen las llamadas técnicas de microextracción, frente a la extracción líquido-líquido y la extracción en fase sólida (SPE, *Solid Phase Extraction*) "clásica" [Kataoka *et al.*, 2009].

En concreto, la microextracción en fase sólida (SPME, *Solid Phase MicroExtraction*) es una técnica de tratamiento de muestra miniaturizada en la que se utiliza un dispositivo de microextracción con una fase adsorbente (o absorbente). Cuando se pone en contacto con la muestra, quedan retenidos en esa fase los analitos, que posteriormente se desorberán para analizarlos [Bagheri *et al.*, 2004]. Existen dos mecanismos de extracción, con distinto fundamento, en función del coeficiente de difusión de los analitos en la fase: la absorción (los analitos con difusión rápida en la fase migran al interior de la misma en la extracción en un proceso no competitivo) y la adsorción (los analitos, de difusión lenta, se quedan en la superficie de la fase en un proceso competitivo, dado que los sitios disponibles son limitados) [Cháfer Pericás, 2006].

La SPME consta de 2 etapas fundamentales: la extracción, en la que los analitos se adsorben sobre la fase sólida (o se absorben, según el caso), y la desorción, en la que se

liberan. Hay dos tipos de desorción, la desorción térmica, empleada sobre todo cuando se acopla la SPME a cromatografía de gases (GC, *Gas Chromatography*) y la desorción con disolventes, que es la más utilizada en el acoplamiento con cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*). La desorción puede llevarse a cabo tanto *on-line* como *off-line*, teniendo muchas más ventajas la desorción *on-line*, en la que se transfiere la totalidad de los analitos extraídos al sistema cromatográfico, obteniendo mejor sensibilidad, reproducibilidad y exactitud, reduciendo el número de etapas y acortando el tiempo de análisis. Además de estas dos etapas principales, existen hasta tres etapas opcionales más. En primer lugar, en función del tipo de fase puede ser necesario acondicionarla antes de la extracción para activar los grupos que van a interaccionar con los analitos. El acondicionamiento va seguido muchas veces de un lavado, para eliminar impurezas en la fase que puedan desorberse posteriormente junto a los analitos, y así evitar efectos memoria. Entre las etapas de extracción y desorción puede hacerse una etapa de limpieza, que elimine impurezas que también se hayan extraído o restos de algún reactivo empleado. La última etapa opcional, que también se ubicaría antes de la desorción, sería un secado, en el que se pasa una corriente de gas inerte (generalmente N₂) por la fase para secarla. Esta etapa se suele usar en SPME-GC, para eliminar restos de las matrices acuosas que no pueden entrar en el sistema cromatográfico [Bagheri *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2013].

La SPME es una técnica de extracción no exhaustiva, en la que se produce un equilibrio entre la fase sólida y la muestra, y el analito se reparte entre ambas fases. La cantidad de analito retenida es proporcional a su concentración en la muestra, aunque no se extrae en su totalidad, sino que queda parte en la muestra tras la extracción. Los rendimientos o recuperaciones absolutas de la extracción suelen ser bajos, pero dado que ésta es reproducible y que se usan volúmenes muy pequeños de disolvente, se concentran mucho los analitos, dando lugar finalmente a buenos límites de detección y cuantificación [Kataoka *et al.*, 2009]. Respecto a las ventajas que presenta la microextracción en fase sólida, la cantidad de disolventes orgánicos usada es mínima (o incluso inexistente), lo que reduce los costes del análisis y la cantidad de residuos generados, así como el contacto del analista con disolventes que muchas veces son tóxicos. Además, los analitos se concentran al trabajar con volúmenes tan pequeños, permitiendo alcanzar buenos límites de detección y cuantificación incluso con pequeñas cantidades de muestra. La técnica también presenta buena selectividad (la afinidad de la fase utilizada marcará qué analitos se extraen), es sencilla, fácil de automatizar y relativamente rápida. En general también permite reducir el número de etapas del análisis, pudiéndose acoplar *on-line* en muchos casos con los equipos usados en la determinación. Reducir el número de etapas tiene múltiples ventajas, reduciendo las posibilidades de error, el tiempo de análisis y su coste [Kataoka *et al.*, 2009].

Dentro de la SPME, existen varias modalidades según el dispositivo, y se dividen en dos grandes grupos. En uno de ellos, la fase sólida recubre la superficie externa del dispositivo de extracción, como sucede en la SPME en fibra, en la extracción por sorción sobre barra agitadora (SBSE, *Stir-Bar Sorptive Extraction*), en la que la fase sólida recubre una barra agitadora, o en la microextracción en capa fina (TFME, *Thin-Film*

MicroExtraction), donde el dispositivo es una película o membrana de fase sólida. En estos casos, considerados técnicas estáticas, la difusión de los analitos a la fase se facilita mediante agitación. En el otro grupo (considerado de técnicas dinámicas), la fase sólida recubre el interior del dispositivo, y la difusión de los analitos se produce al pasar la muestra a través del mismo. Esto es lo que sucede en la microextracción en fase sólida *in-tube* (IT-SPME, donde el dispositivo es un capilar), SPME *in-tip* (una punta de pipeta) o SPME en jeringa (la aguja de una microjeringa) [Kabir *et al.*, 2013; Kataoka, 2011; Torres-Padrón *et al.*, 2014]. En la trampa tubular abierta (OTT, *Open-Tubular Trapping*), otra técnica de microextracción capilar, la ejecución es similar a IT-SPME (los analitos también quedan retenidos al pasar la muestra a través de un capilar recubierto internamente con la fase sólida). Sin embargo, en OTT, que se acopla con GC, se produce la extracción completa del analito o analitos, a diferencia de la IT-SPME que es una técnica de extracción no exhaustiva [Kataoka *et al.*, 2009].

La modalidad más común de SPME es la SPME en fibra, en la que la fase sólida recubre una fibra que puede sustituir a la aguja de una jeringa de inyección de cromatografía de gases, permitiendo utilizar los inyectores convencionales para el acoplamiento SPME-GC [Saito *et al.*, 2003, Lord, 2007]. Por el contrario, el acoplamiento SPME-HPLC es más complejo, con unos tiempos de desorción largos que se unen a otros problemas como la escasa variedad de fibras de SPME válidas para aplicaciones en cromatografía de líquidos o la dificultad de automatización. La desorción *off-line* o el uso de una interfase con cámara de desorción son posibilidades poco utilizadas debido a la lentitud y baja eficiencia de la desorción de los analitos desde la fibra hasta un disolvente [Lord, 2007]. Por este motivo, el acoplamiento de SPME con HPLC (de gran interés para el análisis de compuestos no aptos para GC), se suele llevar a cabo en la modalidad *in-tube* (IT-SPME). Cuando la muestra (generalmente líquida, aunque podría ser gaseosa) pasa a través del capilar, los analitos quedan retenidos, y la desorción se lleva a cabo pasando un disolvente a través de capilar, obteniéndose una desorción mucho más rápida y eficiente que con la fibra. Además, la IT-SPME presenta algunas ventajas más sobre la SPME en fibra en el acoplamiento con HPLC. Así, en el capilar se puede incluir una cantidad de fase sólida mayor que en la fibra, permitiendo alcanzar límites más bajos. Tampoco están presentes en la modalidad *in-tube* los problemas de fragilidad y sangrado de la fibra que ocurren en la desorción con disolventes.

El acoplamiento *on-line* es mucho más sencillo y permite la automatización. La principal limitación de la IT-SPME es la necesidad de introducir muestras que no contengan partículas, para evitar la obturación del capilar, lo que en ocasiones implica una operación previa de filtración o centrifugación [Lord, 2007; Kataoka *et al.*, 2009], aunque esta etapa es habitual en cualquier muestra y/o extracto antes de su introducción en el cromatógrafo. Existen varias modalidades y configuraciones en IT-SPME, así como diferentes tipos de capilares. En el capítulo 3 se discutirán de forma exhaustiva todas esas posibilidades, así como su estado actual y sus fortalezas y debilidades, junto con otras cuestiones relacionadas con la técnica como los parámetros más importantes en la optimización y las aplicaciones en que se ha utilizado en los últimos años.

1.4. REFERENCIAS

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), *Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons* (1995).
- Amato F., Alastuey A., de la Rosa J., Gonzalez Castanedo Y., Sánchez de la Campa A. M., Pandolfi M., Lozano A., Contreras González J., Querol X. Trends of road dust emissions contributions on ambient air particulate levels at rural, urban and industrial sites in southern Spain. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 14 (2014) 3533–3544.
- Bagheri H., Salemi A. Coupling of a Modified In-Tube Solid Phase Microextraction Technique with High Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detection for the Ultra-Trace Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Samples. *Chromatographia*, 59 (2004) 501–505.
- Balla D., Papageorgiou A., Voutsas D. Carbonyl compounds and dissolved organic carbon in rainwater of an urban atmosphere. *Environmental Science and Pollution Research*, 21 (2014) 12062–12073.
- Basheer C., Balasubramanian R., Lee. H. K. Determination of organic micropollutants in rainwater using hollow fiber membrane/liquid-phase microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1016 (2003) 11–20.
- Berner E. K., Berner R. A. *Global Environment: Water, Air, and Geochemical Cycles*. Princeton University Press, New Jersey, 2012.
- Blanco Heras G. A. *Determinación de aniones, cationes y ácidos orgánicos en material particulado atmosférico mediante electroforesis capilar*. Tesis Doctoral, Departamento de Química Analítica, Universidade da Coruña (2009).
- Bucheli T. D., Haefliger O. P., Dietiker Jr. R., Zenobi R. Analysis of Water Contaminants and Natural Water Samples Using Two-Step Laser Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 72 (2000) 3671–3677.
- Bui T. T., Giovanoulis G., Palm Cousins A., Magnér J., Cousins I. T., de Wit C. A. Human exposure, hazard and risk of alternative plasticizers to phthalate esters. *Science of the Total Environment*, 541 (2016) 451–467.
- Campíns-Falcó P., Verdú-Andrés J., Sevillano-Cabeza A., Molins-Legua C., Herráez-Hernández. R. New micromethod combining miniaturized matrix solid-phase dispersion and in-tube in-valve solid-phase microextraction for estimating polycyclic aromatic hydrocarbons in bivalves. *Journal of Chromatography A*, 1211 (2008) 13–21.
- Cháfer Pericás C. *Acoplamiento Microextracción en Fase Sólida-Cromatografía*. Tesis Doctoral, Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universitat de Valencia (2006).

Capítulo 1. Introducción

Chakraborty A., Gupta T., Tripathi S. N. Chemical composition and characteristics of ambient aerosols and rainwater residues during Indian summer monsoon: Insight from aerosol mass spectrometry. *Atmospheric Environment*, 136 (2016) 144–155.

Charalambides A., Petrides G., Pashalidis I. Rainwater characteristics over an old sulphide mine refuse in Sha, Cyprus. *Atmospheric Environment*, 37 (2003) 1921–1926.

Danyi S., Brose F., Brasseur C., Schneider Y.-J., Larondelle Y., Pussemier L., Robbens J., De Saeger S., Maghuin-Rogister G., Scippo M.-L. Analysis of EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons in food supplements using high performance liquid chromatography coupled to an ultraviolet, diode array or fluorescence detector. *Analytica Chimica Acta*, 633 (2009) 293–299.

Decisión nº 2455/2001/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de noviembre de 2001, por la que se aprueba la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE.

Delhomme O., Rieb E., Millet M. Solid-Phase Extraction and LC with Fluorescence Detection for Analysis of PAHs in Rainwater. *Chromatographia*, 65 (2007) 163–171.

Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de agosto de 2013 por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas.

Directiva 2008/50/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 21 de mayo de 2008 relativa a la calidad del aire ambiente y a una atmósfera más limpia en Europa.

Directiva 2007/19/CE de la Comisión, de 30 de marzo de 2007, por la que se modifican la Directiva 2002/72/CE relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios y la Directiva 85/572/CEE del Consejo por la que se determina la lista de los simulantes que se deben utilizar para controlar la migración de los componentes de los materiales y objetos de material plástico destinados a entrar en contacto con los productos alimenticios.

Directiva 98/83/CE del Consejo de 3 de noviembre de 1998 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano.

ECPI (2015). European Council for Plasticisers and Intermediates (ECPI) estimations based on IHS published data about the use of phthalate plasticizers in Europe in 2005-2014, http://www.plasticisers.org/en_GB/plasticisers/Orthophtalates.

EFSA CEF Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids. Scientific Opinion on Flavouring Group Evaluation 86, Revision 2: Consideration of aliphatic and arylalkyl amines and amides evaluated by JECFA (65th meeting). *EFSA Journal*, 13(1) (2015) 3998, 49 págs.

Environmental Protection Agency (EPA). Appendix A to Part 423 – 126 Priority Pollutants. *40 CFR Chapter I*.

- Fekete A., Malik A. K., Kumar A., Schmitt-Kopplin P. Amines in the Environment. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 40(2) (2010) 102–121.
- Fernández González V. *Metodologías analíticas para la determinación de trazas de hidrocarburos aromáticos policíclicos en matrices del medio marino*. Tesis Doctoral, Departamento de Química Analítica, Universidade da Coruña (2009).
- Gao D.-W., Wen Z.-D. Phthalate esters in the environment: A critical review of their occurrence, biodegradation, and removal during wastewater treatment processes. *Science of the Total Environment*, 541 (2016) 986–1001.
- Ge X., Wexler A. S., Clegg S. L. Atmospheric amines – Part I. A review. *Atmospheric Environment*, 45 (2011) 524–546.
- Guevara M. Emissions of Primary Particulate Matter. *Issues in Environmental Science and Technology No. 42. Airborne particulate matter: Sources, Atmospheric Processes and Health*, Eds. R.E. Hester, R.M. Harrison, X. Querol. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2016.
- Gupta M., Pillai A. K. K. V., Jain A., Verma K. K. Coupled in-tube and on-fibre solid-phase microextractions for cleanup and preconcentration of organic micropollutants from aqueous samples and analysis by gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 618 (2008) 61–69.
- Harrad S. *Persistent Organic Pollutants*. Wiley, Hoboken, 2010.
- Harvey R. G. *Polycyclic aromatic hydrocarbons: Chemistry and Carcinogenicity*. Cambridge University Press, Cambridge, 1991.
- Heudorf U., Mersch-Sundermann V., Angerer J. Phthalates: Toxicology and exposure. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210 (2007) 623–634.
- Huang D., Peng P., Xu Y., Deng Y., Deng H. Distribution and deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons in precipitation in Guangzhou, South China. *Journal of Environmental Sciences*, 21 (2009) 654–660.
- Huston R., Chan Y. C., Gardner T., Shaw G., Chapman H. Characterisation of atmospheric deposition as a source of contaminants in urban rainwater tanks. *Water Research*, 43 (2009) 1630–1640.
- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Outdoor Air Pollution*. IARC Scientific Publications, Lyon, Volume 109, 2016.
- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Chemicals Present in Industrial and Consumer Products, Food and Drinking-water*. IARC Scientific Publications, Lyon, Volume 101, 2013.
- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures*. IARC Scientific Publications, Lyon, Volume 92, 2010.

IARC *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Industrial Chemicals*. IARC Scientific Publications, Lyon, Volume 77, 2000.

IARC *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42*. IARC Scientific Publications, Lyon, Supplement 7, 1987.

Ishizaki A., Saito K., Hanioka N., Narimatsu S., Kataoka H. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 5555–5563.

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT). *Límites de exposición profesional para agentes químicos en España 2017*. INSHT, Madrid, 2017.

JECFA/64/SC, 2005. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). *Summary and Conclusions of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Sixty-Fourth meeting*, Roma (2005).

Jornet-Martínez N., Antón-Soriano C., Campíns-Falcó P. Estimation of the presence of unmetabolized dialkyl phthalates in untreated human urine by an on-line miniaturized reliable method. *Science of the Total Environment*, 532 (2015) 239–244.

Jornet-Martínez N., Muñoz-Ortuño M., Moliner-Martínez Y., Herráez-Hernández R., Campíns-Falcó P. On-line in-tube solid phase microextraction-capillary liquid chromatography method for monitoring degradation products of di-(2-ethylhexyl) phthalate in waters. *Journal of Chromatography A*, 1347 (2014) 157–160.

Kabir A., Furton K. G., Malik A. Innovations in sol-gel microextraction phases for solvent-free sample preparation in analytical chemistry. *TrAC - Trends in analytical chemistry*, 45 (2013) 197–218.

Kataoka H. Current developments and future trends in solid-phase microextraction techniques for pharmaceutical and biomedical analyses. *Analytical Sciences*, 27 (2011) 893–905.

Kataoka H., Ishizaki A., Nonaka Y., Saito K. Developments and applications of capillary microextraction techniques: A review. *Analytica Chimica Acta*, 655 (2009) 8–29.

Krupa S. V. Sampling and physico-chemical analysis of precipitation: a review. *Environmental Pollution*, 120(3) (2002) 565–594.

Kumar A. R., Sivaperumal P. Analytical methods for the determination of biomarkers of exposure to phthalates in human urine samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 75 (2016) 151–161.

Kuo C.-P., Liao H.-T., Chou C.C.-K., Wu C.-F.. Source apportionment of particulate matter and selected volatile organic compounds with multiple time resolution data. *Science of The Total Environment*, 472(15) (2014) 880–887.

- Lee D., Wexler, A. S. Atmospheric amines – Part III: Photochemistry and toxicity. *Atmospheric Environment*, 71 (2013) 95–103.
- Lee H. K. Recent applications of gas and high-performance liquid chromatographic techniques to the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulates. *Journal of Chromatography A*, 710(1) (1995) 79–92.
- Lord H. L. Strategies for interfacing solid-phase microextraction with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1152 (2007) 2–13.
- Lu X., Fung J. C. H., Wu D. Modeling wet deposition of acid substances over the PRD region in China. *Atmospheric Environment*, 122 (2015) 819–828.
- Nakamiya K., Takagi H., Nakayama T., Ito H., Tsuruga H., Edmonds J. S., Morita M. Microbial production and vaporization of mono-(2-ethylhexyl) phthalate from di-(2-ethylhexyl) phthalate by microorganisms inside houses. *Archives of Environmental and Occupational Health*, 60(6) (2005) 321–325.
- Norma ISO-7708:1995. Air quality - Particle size fraction definitions for health-related sampling. (equivalente a UNE 77213:1997. Calidad del aire. Definiciones de las fracciones de los tamaños de partículas para el muestreo asociado a problemas de salud).
- Norma UNE-EN 15549:2008. Calidad del aire. Método normalizado para la medición de la concentración de benzo(a)pireno en el aire ambiente.
- Norma UNE-EN 15980:2011. Calidad del aire. Determinación de la deposición de benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[j]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno e indeno[1,2,3-cd]pireno.
- Olivella M. À. Polycyclic aromatic hydrocarbons in rainwater and surface waters of Lake Maggiore, a subalpine lake in Northern Italy. *Chemosphere*, 63 (2006) 116–131.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). *Guías de calidad del aire de la OMS relativas al material particulado, el ozono, el dióxido de nitrógeno y el dióxido de azufre. Actualización mundial 2005.*
- Pan J., Huang Y., Liu L., Hu Y., Li G. A novel fractionized sampling and stacking strategy for online hyphenation of solid-phase-based extraction to ultra-high performance liquid chromatography for ultrasensitive analysis. *Journal of Chromatography A*, 1316 (2013) 29–36.
- Poste A. E., Grung M., Wright R. F. Amines and amine-related compounds in surface waters: A review of sources, concentrations and aquatic toxicity. *Science of the Total Environment*, 481 (2014) 274–279.
- Prieto-Blanco M. C., López-Mahía P., Campíns-Falcó P. In-Tube Solid-Phase Microextraction and Liquid Chromatography Using a Monolithic Column for the Selective Determination of Residual Ethylenediamine in Industrial Cationic Polymers. *Analytical Chemistry*, 81(14) (2009) 5827–5832.

Putaud J.-P., Van Dingenen R., Alastuey A., Bauer H., Birmili W., Cyrus J., Flentje H., Fuzzi S., Gehrig R., Hansson H. C., Harrison R. M., Herrmann H., Hitztenberger R., Hüglin C., Jones A.M., Kasper-Giebl A., Kiss G., Kousa A., Kuhlbusch T. A. J., Löschau G., Maenhaut W., Molnar A., Moreno T., Pekkanen J., Perrino C., Pitz M., Puxbaum H., Querol X., Rodriguez S., Salma I., Schwarz J., Smolik J., Schneider J., Spindler G., ten Brink H., Tursic J., Viana M., Wiedensohler A., Raes F. A European aerosol phenomenology – 3: Physical and chemical characteristics of particulate matter from 60 rural, urban, and kerbside sites across Europe. *Atmospheric Environment*, 44 (2010) 1308–1320.

Ravindra K., Sokhi R., Van Grieken R. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment*, 42 (2008) 2895–2921.

Real Decreto 102/2011, de 28 de enero, relativo a la mejora de la calidad del aire.

Reglamento (CE) nº 1881/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.

Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) nº 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) nº 1488/94 de la Comisión así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión.

Reglamento (UE) nº 835/2011 de la Comisión de 19 de agosto de 2011 que modifica el Reglamento (CE) no 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de hidrocarburos aromáticos policíclicos en los productos alimenticios.

Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 Concerning the Registration, Evaluation, authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC.

Saito Y., Jinno K. Miniaturized sample preparation combined with liquid phase separations. *Journal of Chromatography A*, 1000(1-2) (2003) 53–67.

Saxena P.; Hildemann L. M. Water-soluble organics in atmospheric particles: A critical review of the literature and application of thermodynamics to identify candidate compounds. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 24(1) (1996) 57–109.

Shimamura T., Wada T., Iwashita M., Takaku Y., Ohashi H. Scavenging properties of major and trace species in rainfall collected in urban and suburban Tokyo. *Atmospheric Environment*, 40 (2006) 4220–4227.

- Šimko P. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 770 (2002) 3–18.
- Taguchi S., Murai K., Takamatsu M., Hayakawa Y., Tamizu S., Kuwata M., Katayama Y., Kuramitz H., Hata N. Interpretation of the concentrations of aldehydes in rainwater over a wide area and local areas of Japan by some dominant factors. *Atmospheric Environment*, 61 (2012) 588–596.
- Torres-Padrón M. E., Afonso-Olivares C., Sosa-Ferrera Z., Santana-Rodríguez J. J. Microextraction techniques coupled to liquid chromatography with mass spectrometry for the determination of organic micropollutants in environmental water samples. *Molecules*, 19 (2014) 10320–10349.
- United States Environmental Protection Agency (EPA), *Polynuclear Hydrocarbons*, vol. 10, US-EPA, Washington, DC, 1984.
- Van Noort P. C. M., Wondergem E. Scavenging of Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Rain. *Environmental Science and Technology*, 19 (1985) 1044–1048.
- Ventrice P., Ventrice D., Russo E., De Sarro G. Phthalates: European regulation, chemistry, pharmacokinetic and related toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(1) (2013) 88–96.
- Wang Y., Li P.-h., Li H.-l., Liu X.-h., Wang W.-x. PAHs distribution in precipitation at Mount Taishan China. Identification of sources and meteorological influences. *Atmospheric Research*, 95 (2010) 1–7.

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

En el capítulo anterior se ha indicado el interés en la determinación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, ftalatos y aminas alifáticas, así como la importancia del análisis de las matrices atmosféricas por su relación con el resto de matrices ambientales y su contribución al transporte y degradación de los contaminantes. Estas temáticas se engloban en las líneas de investigación del grupo QANAP, basadas en el desarrollo de metodologías analíticas y en la caracterización y monitorización de contaminantes en muestras medioambientales.

La microextracción en fase sólida *in-tube* es una técnica miniaturizada de preparación de muestra que presenta numerosas ventajas (que se comentarán con mayor detalle en el capítulo 3). Entre ellas se encuentra su versatilidad (pudiéndose aplicar a una gran variedad de analitos de diferentes polaridades y a muestras líquidas o extractos de muestras sólidas), su rapidez, la buena sensibilidad y selectividad que permite alcanzar, el bajo consumo de disolventes y muestra necesarios, y su sencillez, siendo fácilmente acoplable con un cromatógrafo de líquidos, lo que evita o minimiza las múltiples etapas en la preparación de muestra. Estos motivos la convierten en la técnica seleccionada para su aplicación en esta Tesis Doctoral.

Los principales objetivos de este trabajo son:

- Llevar a cabo una discusión crítica sobre las fortalezas y debilidades de la microextracción en fase sólida *in-tube*, analizando cualitativamente y también con datos cuantitativos, mediante un estudio de alcance, cuáles son las configuraciones, acoplamientos y modalidades más consolidadas, los parámetros con mayor peso en la optimización y los campos de aplicación más explotados durante los últimos años.
- Desarrollo y validación de métodos analíticos para el análisis de compuestos orgánicos (HAP, ftalatos y aminas alifáticas) a nivel traza y ultratrazas en matrices atmosféricas (agua de lluvia y material particulado atmosférico) mediante la aplicación de la microextracción en fase sólida *in-tube* acoplada *on-line* con el sistema cromatográfico (HPLC).
- Aplicación de los métodos desarrollados al análisis de muestras de agua de lluvia de diferentes tipologías (mensuales, diarias, eventos) y a las fracciones acuosa y orgánica del material particulado atmosférico de diferentes entornos (urbano, rural, tráfico).
- Caracterización exhaustiva de material particulado atmosférico mediante el análisis de sus componentes mayoritarios (fracción carbonosa, iones, metales...) para realizar un estudio de contribución de fuentes mediante la aplicación de métodos estadísticos.

**CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN SOBRE LAS FORTALEZAS Y DEBILIDADES DE
LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA *IN-TUBE* (IT-SPME) USANDO
UN ESTUDIO DE ALCANCE (*SCOPING REVIEW*)**

Publicación:

M. Fernández-Amado, M.C. Prieto-Blanco, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez. Strengths and weaknesses of in-tube solid-phase microextraction: A scoping review. *Analytica Chimica Acta* 906, Febrero 2016, 41-57.

3.1. ESTADO DEL ARTE DE IT-SPME (2009-2015)

La microextracción en fase sólida *in-tube* (IT-SPME) es una de las técnicas miniaturizadas que han surgido en las últimas décadas para reducir tanto el consumo de muestra y disolventes, como el tiempo y número de etapas de los métodos que hacen uso de técnicas de preparación de muestra clásicas. A diferencia de otras propuestas que no han tenido demasiada continuidad en el tiempo, la IT-SPME se mantiene en constante desarrollo con un número creciente de publicaciones relacionadas, que se traduce en la aparición de nuevas modalidades, acoplamientos y capilares de extracción en los últimos años.

Todos estos aspectos se tratan en este capítulo, en el que se lleva a cabo un estudio de alcance para evaluar la dimensión de la técnica de una forma transversal [Arksey H. y O'Malley, 2005]. Las preguntas a las que se pretende responder con este estudio son ¿cuáles son las configuraciones, acoplamientos y modalidades más consolidadas en IT-SPME?, ¿cuáles son los parámetros con mayor peso en la optimización? y ¿cómo están diversificadas las aplicaciones en los diferentes campos durante los últimos años?

Para intentar dar respuesta a estas cuestiones, en el presente capítulo se lleva a cabo un análisis exhaustivo y crítico acerca de la técnica, identificando los resultados más relevantes entre 2009 y 2015. No se trata de una simple recopilación de los resultados, sino que éstos se analizan de forma cualitativa y cuantitativa, con un estudio pormenorizado de las fortalezas y debilidades de la técnica. En el futuro, si las debilidades están localizadas, se podrá enfocar la investigación en reforzar esos puntos débiles para lograr mayores avances en la técnica.

Desde la introducción de la IT-SPME hace 20 años [Eisert y Pawliszyn, 1997] y hasta marzo de 2017, se han publicado 315 referencias sobre IT-SPME (búsqueda de "*in-tube solid phase microextraction*" en las bases de datos Scopus, Caplus y Medline). A pesar de que en este capítulo tan solo se analizan en profundidad las publicaciones del periodo enero 2009 a enero 2015, se incluyen en la Figura 4 los resultados más recientes. Se observa la evolución del número de publicaciones con el tiempo, pudiéndose observar el interés creciente hacia la IT-SPME y se corrobora el crecimiento de la técnica también durante el último trienio 2015-2017, que es el de mayor producción científica desde sus inicios, a pesar de que los datos referentes al 2017 solamente incluyen el primer trimestre del año.

Se ha llevado a cabo un estudio exhaustivo de la bibliografía publicada entre enero de 2009 y enero de 2015, que representa 38% del total. Durante este periodo se encuentran 119 referencias, divididas en artículos de investigación (96), revisiones (19) y patentes (4). La gran mayoría de las revisiones no son específicas de IT-SPME, sino que se centran en aplicaciones concretas en algunos campos y en técnicas de microextracción, extracción con absorbentes/adsorbentes y técnicas de química verde. La presencia de la IT-SPME entre las técnicas destacadas en múltiples revisiones de distintos campos es indicativa de la relevancia que la técnica ha adquirido en los últimos años.

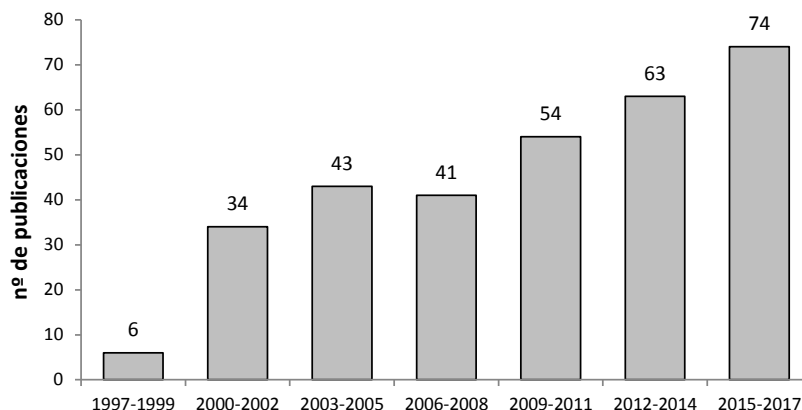


Figura 4. Número de publicaciones relacionadas con IT-SPME, desde la introducción de la técnica hasta la actualidad, clasificadas por trienios.

La microextracción en fase sólida *in-tube* puede aplicarse a matrices de diferentes campos. Las aplicaciones medioambientales son las más abundantes, seguidas de cerca por las aplicaciones clínicas (Fig. 5). El tercer gran campo de aplicación es el alimentario, mientras que las aplicaciones a muestras industriales son muy escasas (solo 2 trabajos, 2,4%) [Prieto-Blanco *et al.*, 2009; Prieto-Blanco *et al.*, 2013a]. En los últimos años la relevancia de las aplicaciones medioambientales ha experimentado un importante crecimiento en IT-SPME, ya que en una revisión de Kataoka *et al.* del año 2009 [Kataoka *et al.*, 2009a] sobre técnicas de microextracción las aplicaciones en el campo clínico suponían más de la mitad (54,5%) de las publicaciones de la técnica y las publicaciones relacionadas con el campo medioambiental se quedaban en un 32,2%. También las aplicaciones en el campo alimentario han aumentado de forma significativa (21,7% frente al 13,2% del 2009).

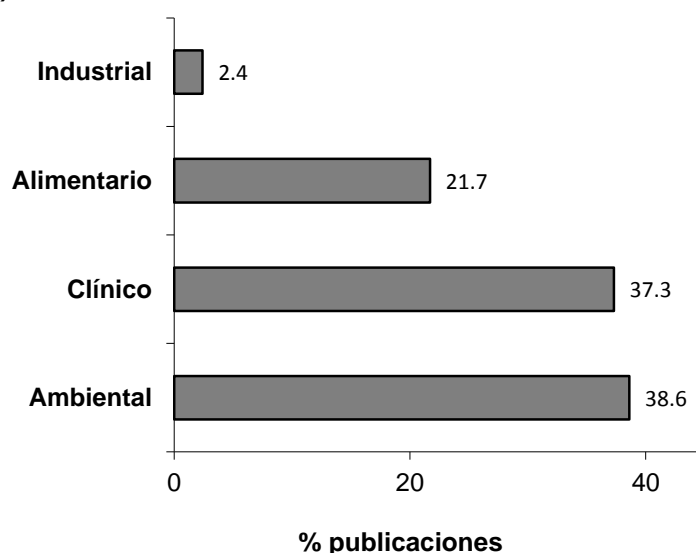


Figura 5. Porcentaje del número de publicaciones de IT-SPME en función del campo de aplicación.

La IT-SPME se puede acoplar con distintas técnicas, y se encuentran diferencias en las combinaciones según el campo de aplicación. En aplicaciones a muestras alimentarias, el peso específico de la combinación con técnicas electroforéticas y espectrometría de

masas (39%) es bastante mayor que en las otras aplicaciones (15-22%). La cromatografía de líquidos capilar (CapLC, *Capillary Liquid Chromatography*) es muy utilizada en las aplicaciones medioambientales (44%), mientras que su presencia es muy escasa en los campos clínico y alimentario. La combinación de IT-SPME con HPLC es común a todos los campos de aplicación, suponiendo entre un 28 y un 45% de las referencias (Fig. 6).

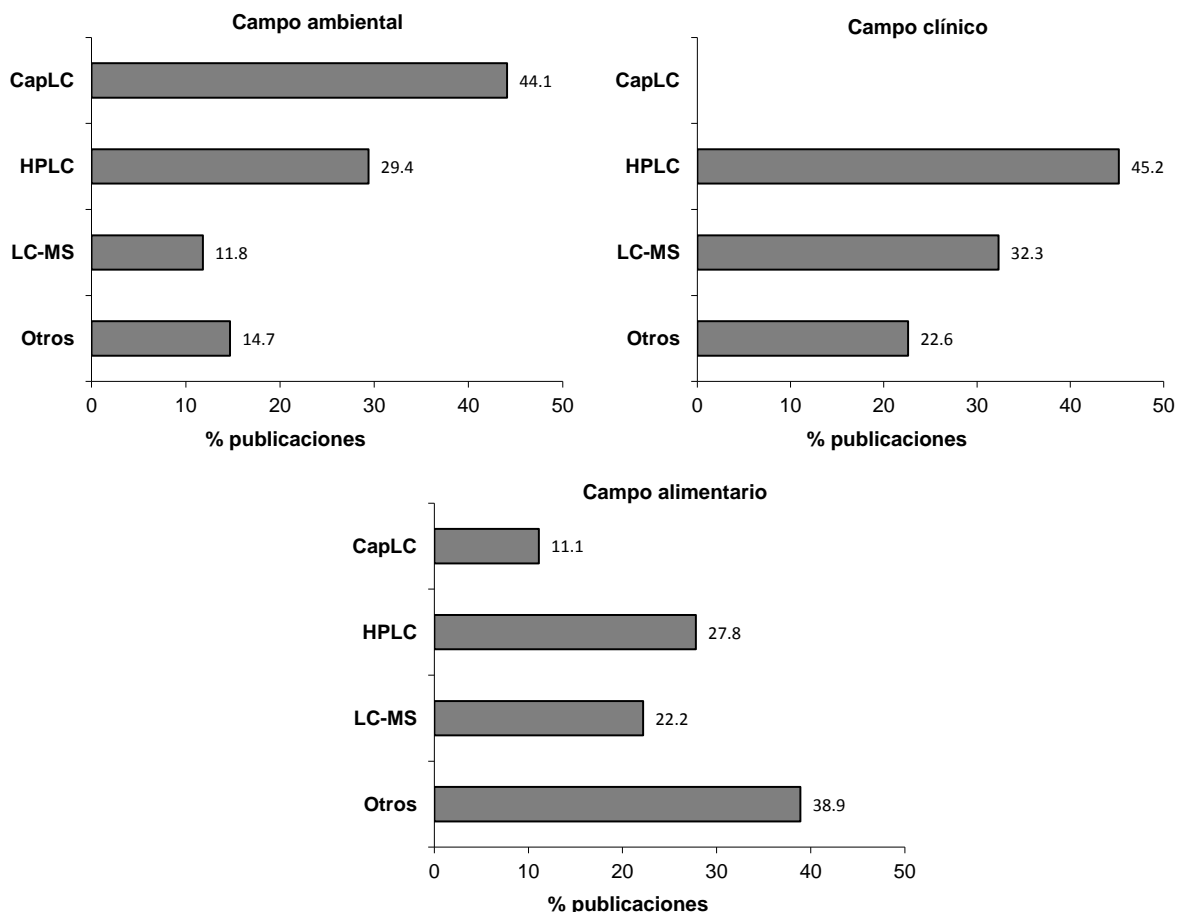


Figura 6. Porcentaje del número de publicaciones de IT-SPME en función de su combinación con técnicas instrumentales de determinación, por campo de aplicación.

Muchos autores han contribuido a lo largo de estos años al desarrollo de la microextracción en fase sólida *in-tube*, y algunos grupos y centros de investigación son responsables de una parte importante de la producción relacionada con IT-SPME. Las Universidades de Wuhan (China) y de Shujitsu (Japón) representan un elevado porcentaje de las referencias en el periodo de estudio: la primera con un 27,8%, 29% y 15,6% en el campo alimentario, clínico y ambiental respectivamente, y la segunda con un 27,8%, 22,6% y 6,2% en los mismos campos. Otros grupos están más especializados en un campo concreto. Así, la Universidad de Valencia aporta más de la mitad (56,2%) de las referencias en el campo medioambiental (15,6% en colaboración con la Universidade da Coruña), mientras que la Universidad de São Paulo (Brasil) produce el 19,4% de las publicaciones en el campo clínico.

3.2. FORTALEZAS Y DEBILIDADES: CONFIGURACIONES, PARÁMETROS Y APLICACIONES

En IT-SPME se pueden utilizar distintas modalidades de extracción, que implican distintas configuraciones. Esta fortaleza que implica versatilidad tiene como contrapartida una cierta confusión respecto a la instrumentación necesaria para llevar a cabo cada modalidad para aquellos que se acerquen por primera vez a la técnica.

En este apartado se describirán las distintas configuraciones, así como los parámetros más importantes que se pueden optimizar en IT-SPME. La existencia de múltiples variables a optimizar es por una parte una ventaja de la técnica, ya que permite afrontar diferentes problemas que puedan surgir con diversas alternativas, pero también puede convertir la optimización en un proceso complejo.

3.2.1. MODALIDADES DE EXTRACCIÓN Y CONFIGURACIONES EN IT-SPME

En IT-SPME hay dos modalidades de extracción fundamentales:

- Extracción única (*flow-through mode*, también llamada microextracción con capilar recubierto, *coated capillary microextraction*). En esta modalidad la muestra pasa a través del capilar una sola vez y en un solo sentido. La extracción única puede utilizarse tanto en modo manual (más sencillo y barato) como automatizado (más exacto, preciso y cómodo).
- Extracción con ciclos de aspiración/expulsión (*draw/eject cycles mode*). En este caso un determinado volumen de muestra es aspirado dentro del capilar y luego es eyectado de retorno al recipiente de la muestra. Esto se realiza repetidamente, mediante cambios en el sentido de paso de la bomba de introducción de muestra, logrando que la muestra pase varias veces por el capilar y obteniendo una mayor sensibilidad, ya que se retiene una mayor cantidad de analito/s que con la extracción única. Debido a la necesidad de una bomba que introduzca y expulse la muestra en el capilar, el modo de ciclos solo puede llevarse a cabo con automatización. Además, el tipo de bomba dosificadora que se usa en este modo no está disponible en todas las casas comerciales de cromatógrafos de líquidos, por lo que esta modalidad tiene mayores limitaciones instrumentales [Kataoka *et al.*, 2009a].

El *modo de extracción única* es mayoritario entre las referencias publicadas, siendo la modalidad elegida en un 62,7% de los casos (34,7% en modo automatizado y el otro 28% con introducción de muestra manual), mientras que el *modo de ciclos* se emplea en un 29,3% de las referencias (Fig. 7). Además de las anteriormente mencionadas limitaciones relativas a la instrumentación para aplicar el modo de ciclos, otro motivo probable del predominio del modo de extracción única es su capacidad de proporcionar una buena eficiencia en un periodo de tiempo corto. En general, el modo de ciclos implica tiempos de extracción más largos, si bien la automatización limita el impacto de esta desventaja al poder llevarse a cabo la extracción sin necesidad de la atención del analista, incluso durante la noche. Existen también otras modalidades mucho menos extendidas de

Llevar a cabo la extracción en IT-SPME. Aupartová *et al.* (2014) proponen un modo de "ciclos" manual en el que la muestra pasa una sola vez por el capilar, como en el modo de extracción única, pero en lugar de hacerlo de forma continua, se introduce un volumen pequeño que se deja varios minutos dentro del capilar antes de sustituirlo por un nuevo "ciclo" de muestra.

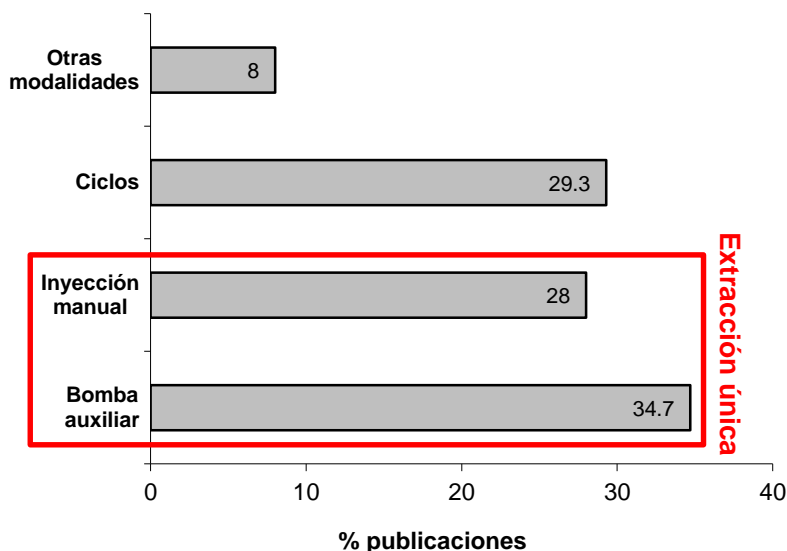


Figura 7. Porcentaje del número de publicaciones en función de los diferentes modos de extracción en IT-SPME.

En el capítulo de Introducción ya se ha mencionado que la SPME es una técnica de extracción no exhaustiva, en la que no se produce la extracción completa de los analitos, sino que se da un equilibrio entre la fase extractante y la muestra. Si se espera hasta que se alcance el equilibrio se extraerá mayor cantidad de analito que si todavía no se ha alcanzado, pero a cambio de un mayor tiempo de extracción. Por este motivo en muchas ocasiones no se espera a que se alcance el equilibrio, ya que siempre que la fase y la muestra estén en contacto un tiempo fijado la extracción será reproducible entre análisis sin necesidad de esperar a que se llegue al equilibrio [Ishizaki *et al.*, 2010; Lord, 2007; Kataoka *et al.*, 2009a]. En el modo de "ciclos" manuales, se espera para que se acerque al equilibrio completo, lo que incrementa la sensibilidad pero a costa de aumentar el tiempo de la extracción.

Otra modalidad de extracción poco empleada consiste en colocar el capilar en una jeringa, generalmente sustituyendo la aguja [Wang *et al.*, 2014a; Wu *et al.*, 2010], aunque también se puede conectar a ésta mediante una funda de Teflón® [Zarejousheghani *et al.*, 2013]. Los límites entre esta modalidad de IT-SPME y la SPME en jeringa de la que se habló en el capítulo de Introducción son bastante difusos.

En la IT-SPME existen distintas configuraciones según cómo se lleven a cabo las operaciones de extracción y desorción y dónde se sitúe el capilar. La configuración más habitual en el modo de extracción única consiste en la sustitución del bucle de muestra por el capilar de extracción en una válvula de inyección de 6 vías (Fig. 8a). En esta configuración, conocida como "modo en válvula" (*in-valve mode*), se pasa un volumen del

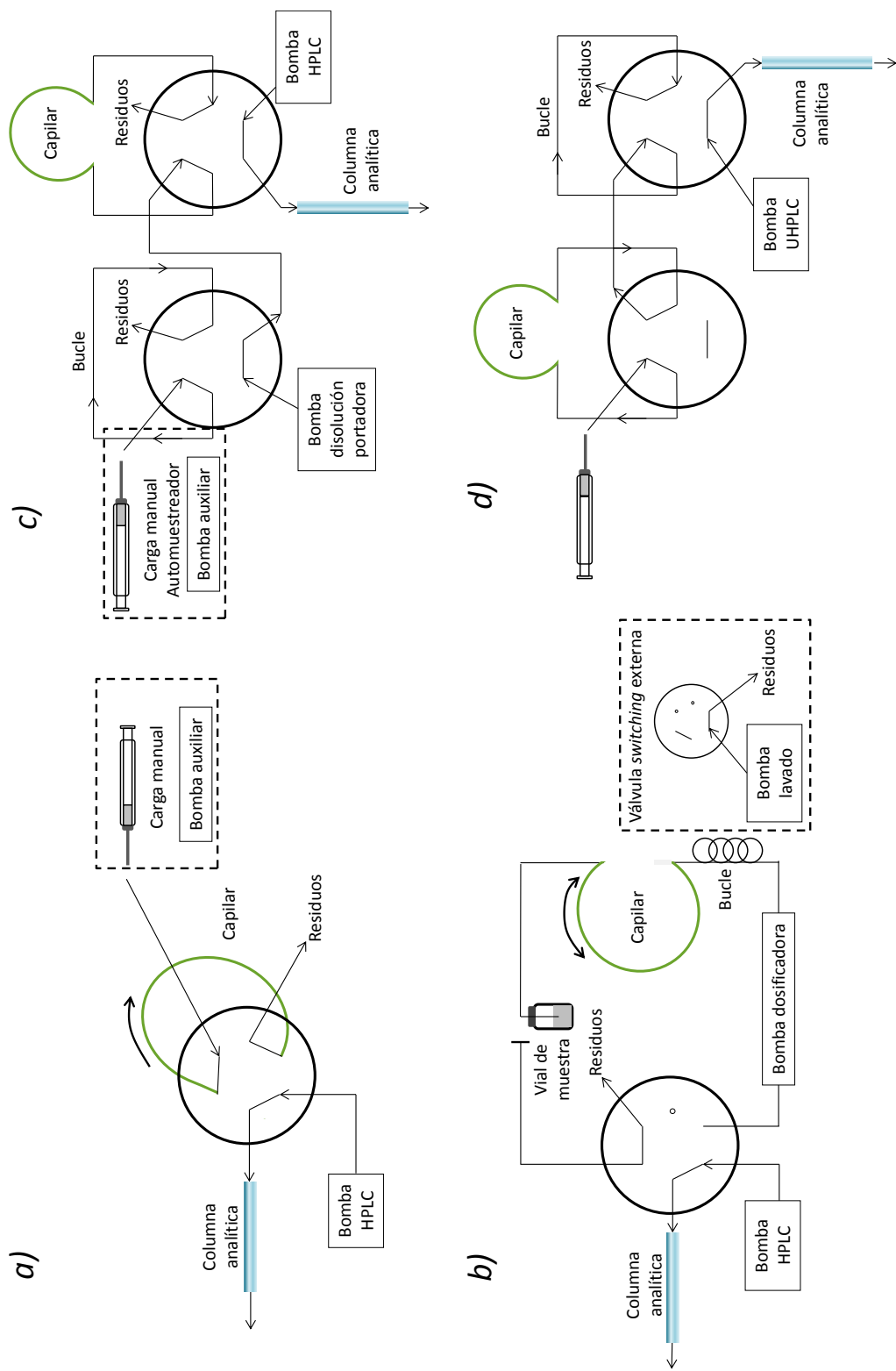


Figura 8. Configuraciones más importantes en IT-SPME, en posición de carga. a) Extracción única con 1 válvula; b) Modo de ciclos; c) Extracción única con 2 válvulas; d) Configuración de doble válvula para el acoplamiento con cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución (UHPLC). Los cuadros discontinuos indican diferentes opciones de introducción de muestra en a y c y una segunda válvula opcional en b.

orden de mL a través del capilar en posición de carga. De este modo, aunque el volumen de muestra sea mayor que el del capilar, el exceso no entra en la columna cromatográfica. Como se ha comentado, la introducción de la muestra puede ser manual, con una jeringa, o bien estar automatizada y realizarse con una bomba auxiliar. Para la modalidad de extracción con ciclos, el capilar se sitúa entre la aguja del inyector automático y la bomba dosificadora. Normalmente se mantiene el bucle para proteger la bomba (Fig. 8b). En la modalidad de ciclos se trabaja con volúmenes del orden de μL .

Por otra parte, existen también algunas configuraciones que hacen uso de dos válvulas de seis vías en lugar de una en la modalidad de extracción única (Fig. 8c). En general, el capilar de extracción se sitúa en la segunda válvula, mientras que en la primera se mantiene el bucle [Wang *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010a]. La muestra se introduce (de forma manual o automatizada) primero en el bucle de la primera válvula, para después desplazarla a la segunda válvula (y por tanto al capilar de extracción) mediante una disolución portadora que se desplaza con una bomba auxiliar. Esta disolución portadora en ocasiones es un tampón [Wang *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2009] o una mezcla de agua y un disolvente orgánico, mejorando la extracción. El tiempo y flujo de paso de esta disolución debe optimizarse, así como su composición. En esta configuración, el volumen de muestra está limitado por el bucle de la primera válvula, por lo que se trabaja con volúmenes mucho menores que en la configuración de una sola válvula. Una configuración con 2 válvulas permite trabajar con volúmenes muy bajos (3 μL) [Zhang *et al.*, 2010a].

La configuración con seis válvulas también se ha aplicado a la extracción *off-line* previa al análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF-MS) [Wang *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2010]. Por otra parte, también existe la opción de que una de las válvulas no sea de seis vías. Así, por ejemplo, Poorahong *et al.* (2013) han usado una válvula de diez vías como segunda válvula, colocando en ella, además del capilar, un bucle en el que introducen la disolución eluyente antes de la desorción. Dentro de la configuración con doble válvula también puede situarse el capilar en la primera válvula, dejando un bucle en la segunda. Esta configuración evita que el capilar tenga que soportar las elevadas presiones del sistema cromatográfico con el que se acopla (Fig. 8d) [Masiá *et al.*, 2013; Pan *et al.*, 2013]. También se ha propuesto una configuración con una válvula de ocho vías con dos capilares (fibras huecas, en este caso) como primera válvula. Esta configuración permite llevar a cabo la extracción en paralelo con las dos fibras huecas, reduciendo el tiempo de análisis prácticamente a la mitad [Chen *et al.*, 2012]. En resumen, la configuración de doble válvula suele emplearse cuando existen necesidades particulares como limitaciones en el volumen de muestra, necesidad de utilizar disoluciones tampón o disolventes en la extracción o acoplamientos con sistemas con presión muy elevada. Con inyección manual, un bucle situado en la primera válvula permite mayor exactitud en el volumen que se pasa por el capilar colocado en la segunda válvula [Fan *et al.*, 2005].

También existe la posibilidad de utilizar dos válvulas en el modo de ciclos. En este caso, su uso permite solucionar un problema habitual en este modo: la dilución de la muestra cuando se mezcla con la fase móvil presente en las conexiones y tubos. En el modo de extracción única se suele trabajar con desorción dinámica con la fase móvil. Para ello se cambia la válvula a la posición de inyección justo después de pasar la muestra, para que la fase móvil circule por el capilar y desorba los analitos. Pero para evitar el paso a la columna de parte de la muestra líquida, que aún queda en el capilar, es necesario desplazarla introduciendo un cierto volumen de un disolvente antes de pasar a posición de inyección. La entrada de estos restos de muestra en el capilar podría provocar problemas de reproducibilidad, además de que se estarían introduciendo interferentes en la columna. Por el contrario, en el modo de ciclos no se produce este desplazamiento de la muestra antes de la desorción, ni tampoco de la fase móvil del análisis anterior antes de la siguiente extracción. Para evitar esta mezcla entre la muestra y la fase móvil, Yang *et al.* (2013; 2014) proponen colocar una segunda válvula (*switching valve*) con una bomba auxiliar entre el capilar y la bomba dosificadora. Esta válvula adicional permite llevar a cabo una etapa de lavado entre los pasos de extracción y desorción, evitando el problema de la mezcla entre la muestra y la fase móvil. Por último, mencionar que en la configuración "en jeringa" es frecuente que la muestra pase una sola vez y en un único sentido a través del capilar (extracción única), pero también puede usarse el modo de ciclos [Bagheri y Salemi, 2004]. En este caso, en el que se usa un doble capilar (2 capilares concéntricos en sustitución de la aguja de la jeringa), se llena y vacía la jeringa repetidamente, de tal modo que la muestra pasa varias veces a través del capilar. Posteriormente se llena el capilar con acetonitrilo para desorber los analitos y se inyecta directamente en el HPLC.

3.2.2. PARÁMETROS A OPTIMIZAR EN IT-SPME

La eficacia de la IT-SPME viene determinada por el coeficiente de distribución de los analitos entre la muestra líquida y la fase extractante y por la velocidad lineal del fluido a través del capilar [Eisert y Pawliszyn, 1997]. Es necesario alcanzar un compromiso entre el tiempo y la eficiencia de la extracción: si la retención de los analitos en el capilar es muy fuerte, la desorción será lenta y difícil, pero si quedan muy poco retenidos, la sensibilidad no será buena. Múltiples parámetros afectan a la eficiencia y selectividad de la IT-SPME, y deben tenerse en consideración durante la optimización de la técnica para cada aplicación concreta. En este apartado se enumeran los parámetros más significativos, representados en un diagrama de Ishikawa [Orlandini *et al.*, 2013] en la Figura 9, explicando su importancia y los rangos habituales.

- **Capilar.** Es el dispositivo en el que se realiza la extracción y posterior desorción de los analitos en IT-SPME, por lo que afecta notablemente a la eficacia y selectividad. Hay varios parámetros relacionados con el capilar que es necesario tener en cuenta:
 - Dimensiones del capilar (longitud, diámetro interno y espesor de la fase). Las dimensiones afectan a la carga de muestra máxima que el capilar puede soportar y

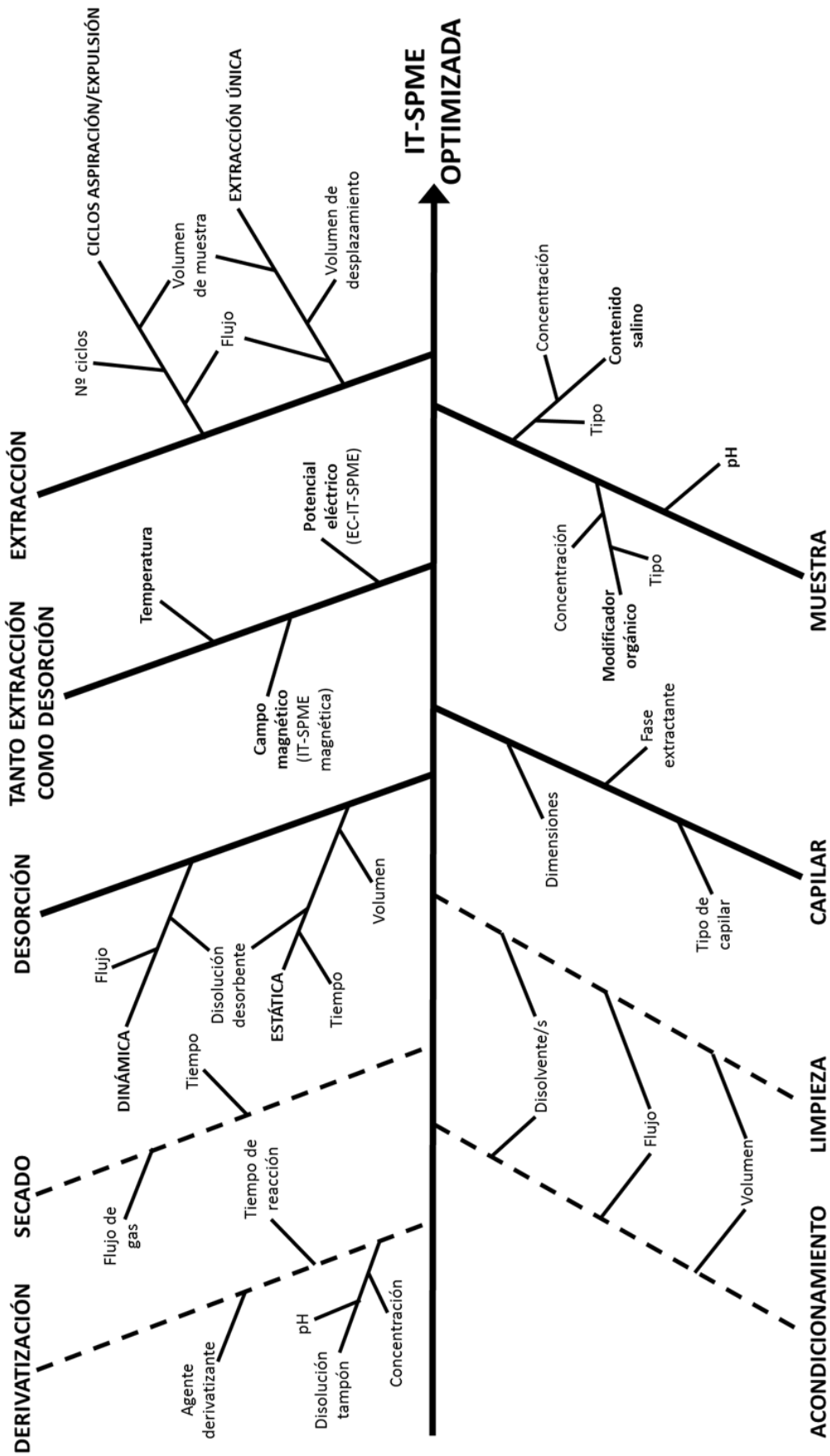


Figura 9. Diagrama de Ishikawa con los principales parámetros que pueden afectar en la IT-SPME. Las líneas discontinuas representan pasos opcionales

a la cantidad de analito que se puede extraer, así como a la velocidad de la extracción y la desorción. Aumentar las dimensiones del capilar permitirá extraer cantidades mayores de los analitos, pero también provoca mayor lentitud a la hora de alcanzar el equilibrio, favoreciendo el ensanchamiento de picos y la aparición de colas [Kataoka *et al.*, 2009a]. Este efecto es más acusado cuando la técnica se acopla con sistemas cromatográficos miniaturizados, en los que las dimensiones de la columna cromatográfica son del mismo orden que las del capilar. En general la longitud del capilar suele estar entre 20 y 100 cm (50-60 cm cuando se usan ciclos de aspiración/expulsión) y el diámetro interno suele ser 0,25 o 0,32 mm cuando se acopla con HPLC y 0,53 mm cuando se acopla con electroforesis capilar.

- Fase extractante. Es uno de los parámetros críticos, ya que la fase elegida va a determinar la selectividad. La fase se selecciona en función de las interacciones que puede formar con los analitos, de acuerdo a su polaridad o con la presencia de grupos específicos que den lugar a interacciones adicionales (π - π , enlace de hidrógeno, etc.) con los analitos, siendo de este modo más selectiva [Kataoka *et al.*, 2009a].
- Tipo de capilar. Hay diferentes tipos de capilares, que se diferencian en su superficie (dependiente de su estructura), en la relación fase extractante/muestra o en la resistencia al paso de muestra así como en las presiones que se generan. El método usado para enlazar la fase al capilar también es importante, ya que afecta a la porosidad y la estabilidad del mismo. Hay que tener siempre en cuenta la estabilidad tanto de la fase como de la unión de ésta con el capilar, ya que si la unión se degrada provocará problemas de estabilidad [Zhang *et al.*, 2014]. Por ejemplo, aunque las fases unidas mediante enlace químico son muy estables frente al agua y disolventes orgánicos, se deterioran con ácidos o bases fuertes. Por ello, la estabilidad puede limitar las condiciones de trabajo, aunque en general las columnas capilares son estables frente a las fases móviles comunes de HPLC [Kataoka *et al.*, 2009a; Li *et al.*, 2009]. Se pueden emplear tanto capilares comerciales como capilares de síntesis propia. En general, para análisis de rutina y para obtener una buena reproducibilidad, se eligen capilares comerciales. Los capilares preparados en el laboratorio (no comerciales) se utilizan especialmente cuando la aplicación requiere una fase específica (por ejemplo, para la extracción de biomoléculas). Los principales tipos de capilares y sus características se examinan a continuación (Fig. 10).

En los *capilares abiertos* la fase recubre la pared interna del capilar formando una película. Son capilares con buena reproducibilidad y cuya estabilidad mecánica y permeabilidad permiten el uso de flujos relativamente elevados. Su principal desventaja es que la cantidad de fase no es muy grande [Li *et al.*, 2009]. Este tipo de capilares se puede preparar en el laboratorio mediante diferentes métodos, como polimerización, sol-gel, electrodeposición o deposición en fase líquida. Sin embargo, lo más habitual es el uso de capilares comerciales, que generalmente suelen ser un tramo de una columna de cromatografía de gases. Así, existen varios tipos de columnas capilares: WCOT (*Wall Coated Open Tubular*, columna capilar de pared recubierta) y FSOT (*Fused Silica Open Tubular*, columna capilar abierta de sílice

fundida), en las que la fase estacionaria recubre directamente la pared interna; SCOT (*Support Coated Open Tubular*, columna capilar de soporte recubierto), en las que la fase recubre un soporte sólido unido a la pared interna; y PLOT (*Porous Layer Open Tubular*, columna capilar de capa porosa), en las que la pared interna, recubierta por la fase sólida, es porosa. Las columnas PLOT y SCOT tienen mayor área superficial que las WCOT y FSOT, permitiendo mayor cantidad de carga de muestra [Harris, 2007].

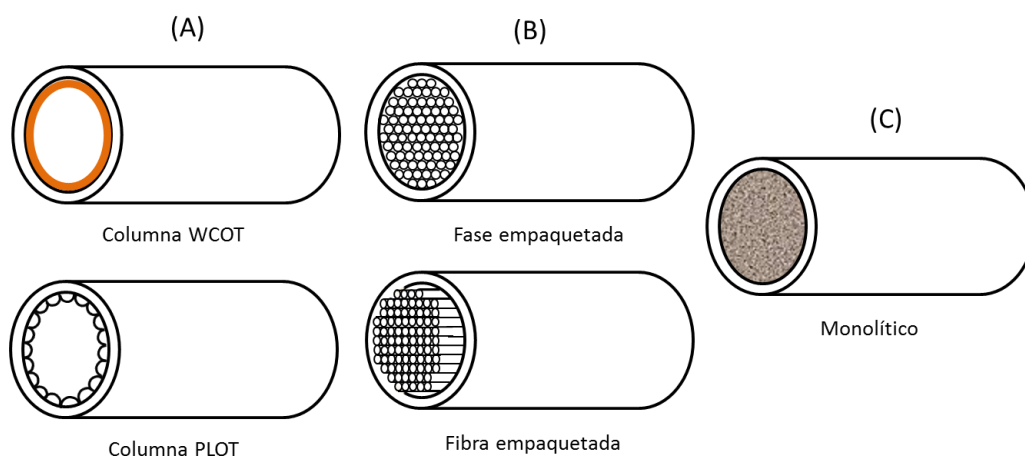


Figura 10. Distintos tipos de capilares usados en IT-SPME: (A) Abiertos (B) Con relleno (C) Monolíticos.

Los *capilares con relleno (packed in-tube)* cuentan con un relleno en su interior, que puede ser de diferentes tipos: alambre empaquetado (*wire-in-tube*), donde un alambre reduce el volumen útil del capilar, para aumentar la relación fase/muestra; fase empaquetada (*sorbent-packed capillary in-tube*), en la que el relleno está formado por pequeñas partículas más o menos esféricas de la fase sólida o recubiertas con ella, de tal modo que la eficacia es muy alta, pero se obturan con mucha facilidad y se pueden romper con las presiones altas; y fibra empaquetada (*fiber-in-tube*), donde el relleno son unos filamentos recubiertos de la fase sólida. De este modo aumenta la eficacia de la extracción al incrementar la superficie extractante y reducir el volumen.

Los *capilares monolíticos* están formados por una pieza de un material con estructura porosa y continua herméticamente unida a las paredes del capilar, de forma que la muestra tiene que atravesar obligatoriamente los poros. Éstos son de dos tamaños diferentes: macroporos o *throughpores*, conectados entre sí formando canales, y mesoporos, más pequeños y situados en las partes sólidas que rodean esos canales. Debido a su elevada porosidad, los capilares monolíticos poseen una elevada superficie, lo que conlleva mayor eficacia de extracción que los otros tipos de capilares, y también presiones más bajas. A esto hay que añadir su buena estabilidad frente al pH y que son biocompatibles, lo que permite emplearlos para el análisis directo de muestras biológicas (previamente centrifugadas y/o diluidas). Existen distintos tipos de capilares monolíticos, que pueden ser de sílice o de un

polímero orgánico. Aunque hay algunos capilares monolíticos comerciales, en general suelen prepararse *in situ*, a partir del monómero, un agente entrecruzante y un disolvente porogénico apropiado, pudiendo controlar el tamaño de los poros [Guiochon, 2007].

Los capilares comerciales (fundamentalmente de tipo FSOT y PLOT) son los más empleados, en un 44% de las referencias, mientras que los monolíticos suponen un 24,7% del total, y son mayoritarios (50% de las referencias) en las aplicaciones alimentarias (Fig. 11).

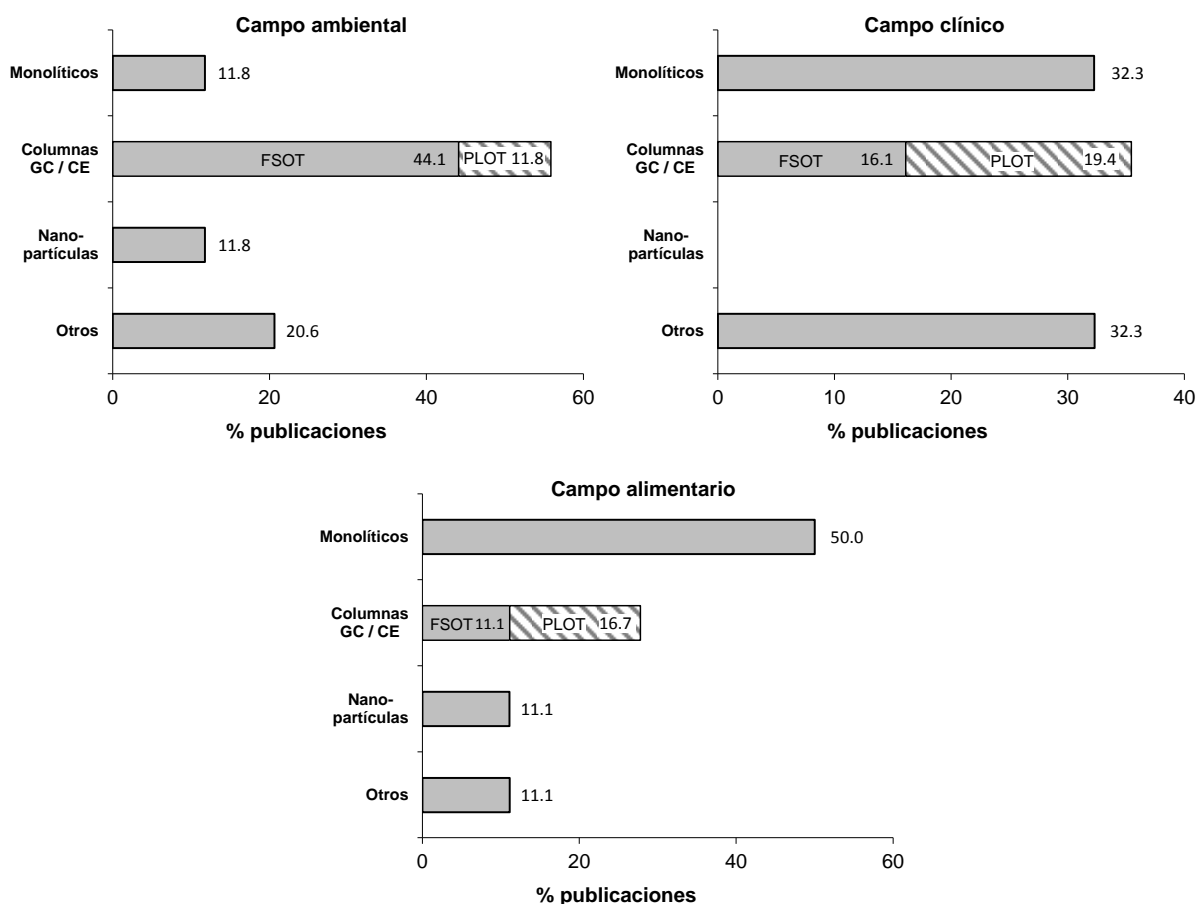


Figura 11. Porcentaje del número de publicaciones de IT-SPME en función del tipo de capilar empleado, por campo de aplicación.

- **Características de la muestra.** Hay varios parámetros de la muestra que pueden afectar a la eficacia de la extracción. Si lo hacen, es necesario controlarlos para asegurar la reproducibilidad, ya que pueden ser específicos de cada muestra (concentración de sales o pH, por ejemplo). Pero también se pueden optimizar para mejorar la eficiencia de la SPME *in-tube*. Los principales parámetros relacionados con la muestra son:

- Disolvente orgánico. La adición de una cierta cantidad de un disolvente orgánico (modificador orgánico) a una muestra acuosa (o de una fase acuosa a un extracto orgánico) va a afectar a la eficiencia de la extracción. El efecto va a depender del tipo de modificador utilizado (es decir, del disolvente añadido) y de su concentración en la muestra, y dicho efecto también puede variar para los distintos analitos. El

modificador puede aumentar la eficacia de la extracción (promoviendo las interacciones entre la muestra y la fase y minimizando las pérdidas de analito por adsorción en la superficie del recipiente), pero también puede reducir la eficiencia de la extracción si aumenta la solubilidad de los analitos en la muestra. Por tanto, debe determinarse si se usa algún modificador, cuál y en qué proporción. En ocasiones, la adición de un modificador es necesaria; por ejemplo, cuando la fase es C₁₈ se necesita adicionarlo para mantener activadas las cadenas octadecilo [Delhomme *et al.*, 2007; Kataoka *et al.*, 2009a; Ishizaki *et al.*, 2010; Campíns-Falcó *et al.*, 2008].

- Contenido salino. En general las sales aumentan la eficiencia de la extracción, pero una concentración demasiado alta puede obturar el capilar, por lo que su concentración debe fijarse y controlarse con sumo cuidado. El efecto no solo depende de la fuerza iónica, sino del tipo de sal, ya que algunos iones en concentraciones elevadas pueden competir con los analitos por los sitios activos de la fase extractante [Kataoka *et al.*, 2009a; Zheng *et al.*, 2007; Ahmadi *et al.*, 2015a]. La técnica del par iónico también se puede aplicar a IT-SPME [Prieto-Blanco *et al.*, 2012].
 - pH. Puede afectar a la extracción cuando los compuestos tienen carácter ácido o básico, o cuando son ionizables. En general, los compuestos de carácter ácido se extraen bien si la muestra es ácida y los básicos se extraen mejor cuando la muestra es alcalina. Se debe comprobar si el pH afecta a la extracción y, si es así, fijarlo, siempre teniendo presente la estabilidad de los analitos y del capilar al pH elegido [Kataoka *et al.*, 2009a].
- **Parámetros asociados a las distintas etapas**. Hay múltiples variables que se pueden optimizar asociadas a las distintas etapas de la IT-SPME, especialmente a las principales de extracción y desorción.

En la etapa de *extracción* hay muchos parámetros que optimizar. Inicialmente, hay que escoger entre la modalidad de extracción única y la de ciclos en función de las necesidades y de la instrumentación disponible. En ambos casos habrá que optimizar el volumen de muestra y el flujo de introducción de muestra (o de aspiración/expulsión en ciclos). Para seleccionar el flujo hay que encontrar un compromiso entre la eficiencia y el tiempo. En cuanto al volumen, cuanto mayor sea, más analito quedará retenido (siempre que no se haya saturado la fase) y por tanto aumentará la sensibilidad, pero se consumirá mayor cantidad de muestra (que es un factor limitante en algunas aplicaciones), se introducirán más interferencias en el sistema (con matrices "sucias") y se alargará el tiempo de análisis (para un mismo flujo). En el modo de ciclos, una de las variables que se debe optimizar es el número de los mismos. A mayor número de ciclos, mayor eficiencia, pero también mayor ensanchamiento de banda y, sobre todo, más tiempo consumido en la extracción. Utilizando un capilar de GC de 60 cm de longitud y 0,32 mm de diámetro interno, generalmente los rangos de los parámetros a optimizar están en 20-30 ciclos de 40 µL de muestra a un flujo de 150-200 µL/min. En el modo de extracción única se puede optimizar el volumen de disolvente de desplazamiento (que generalmente es agua) empleado para eliminar los restos de

muestra líquida. En ocasiones, este volumen de desplazamiento ayuda en la desorción, por lo que en esos casos también habría que optimizar la composición del disolvente [Kataoka *et al.*, 2009a; Ishizaki *et al.*, 2010; Campíns-Falcó *et al.*, 2008].

En la *desorción*, se puede elegir entre una desorción *estática* (en la que se deja un cierto tiempo en el interior del capilar la disolución desorbente, antes de traspasar los analitos a la columna cromatográfica) o una *dinámica* (en la que la desorción se produce mientras la disolución desorbente, que generalmente suele ser la propia fase móvil de la cromatografía, está circulando). En general, se opta por la desorción dinámica a no ser que ésta no sea efectiva porque los analitos estén fuertemente retenidos en la fase sólida y la desorción dinámica sea demasiado lenta, incompleta o discriminativa (los analitos se desorben en distintas proporciones). Tanto en desorción dinámica como estática se debe optimizar la disolución desorbente empleada, que por comodidad será la fase móvil cuando con ella la desorción sea efectiva. En caso contrario, habría que determinar qué disolvente/s se utilizan y en qué proporción. En la desorción dinámica, además, puede optimizarse el flujo de la fase móvil o disolución desorbente, mientras que en una desorción estática habría que fijar el volumen de disolución usado y el tiempo que se deja en el capilar para que se produzca la desorción [Kataoka *et al.*, 2009a]. La desorción estática, con un disolvente o incluso con un medio micelar [Aufartová *et al.*, 2014], es poco utilizada (6,7% de los estudios), mientras que la desorción dinámica con la fase móvil es la más común (68,0%) (Fig. 12). Cuando la IT-SPME se acopla a CG se puede usar desorción térmica, pero es muy poco utilizada [Yan *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2014]. La desorción puede llevarse a cabo también *off-line* (14,6%), pero implica perder algunas de las ventajas de la técnica, ya que no toda la cantidad extraída de analitos entra en el equipo de determinación y además se introduce un paso adicional y se pierde la posibilidad de automatización (Fig. 12).

En las nuevas variantes de IT-SPME, que se describirán y discutirán con mayor detalle a continuación, en el apartado 3.3, surgen nuevos parámetros que controlar y optimizar. En la IT-SPME magnética el principal parámetro es la *intensidad del campo magnético (B)* aplicado en la extracción (en la desorción se aplica la misma intensidad con polaridad inversa). La longitud del generador de campo utilizado también influye en la eficiencia [Moliner-Martínez *et al.*, 2012]. En la IT-SPME controlada electroquímicamente debe evaluarse el efecto de los *potenciales eléctricos* aplicados durante la extracción y la desorción. Por otra parte, la *temperatura* afecta al coeficiente de reparto de los analitos entre la muestra y la fase y a la desorción de los analitos. Generalmente se trabaja sin controlar la temperatura, siempre que no haya variaciones muy significativas que puedan influir en la extracción. Sin embargo, Yang *et al.* (2014) han propuesto un dispositivo que controla y modifica la temperatura del capilar, aprovechando su efecto tanto en la extracción como en la desorción. Han probado temperaturas de entre 0 y 100°C.

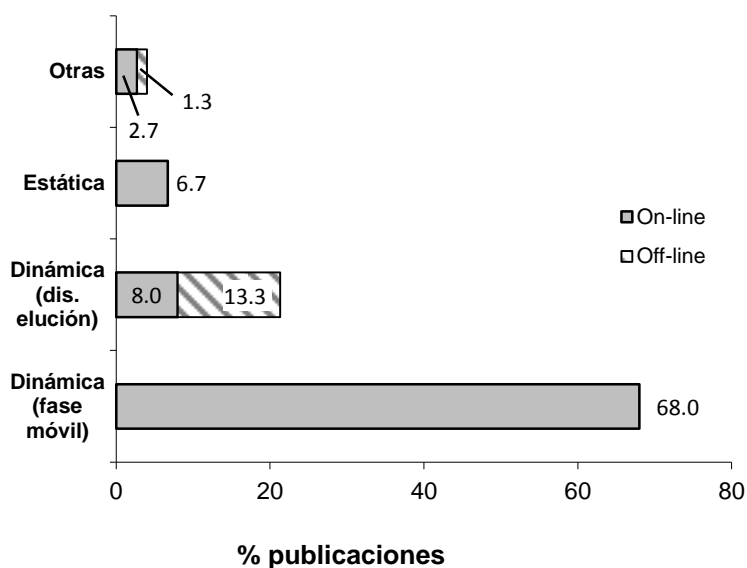


Figura 12. Porcentaje del número de publicaciones de IT-SPME en función de cómo se lleva a cabo la desorción.

Entre las etapas opcionales de la IT-SPME también hay algunos parámetros que se pueden optimizar. El *acondicionamiento* del capilar puede ser necesario, de modo que hay que determinar si lo es, y en ese caso qué disolvente o disolventes son necesarios y cuánto volumen (el mínimo necesario para activar la fase). Respecto a la etapa de *limpieza* también hay que decidir si compensa llevarla a cabo (por el gasto de tiempo y disolventes que supone) y, en caso de que se incluya, cuál es el disolvente o disolventes más adecuado y qué volumen se empleará. También se puede variar el flujo del disolvente. En algunos casos, en función de la naturaleza y concentración de los interferentes o de la utilización de ciertos reactivos (por ejemplo, agentes derivatizantes), la etapa de limpieza puede ser necesaria [Bagheri *et al.* , 2004]. Otra etapa opcional es el *secado* del capilar antes de la desorción, para eliminar la muestra líquida. Esta etapa se lleva a cabo pasando un flujo de gas a través del capilar [Pan *et al.* , 2013; Zhang *et al.* , 2009].

En ocasiones, puede ser necesario derivatizar los analitos para aumentar la sensibilidad o selectividad o para mejorar la extracción o la separación cromatográfica. La *derivatización* puede llevarse a cabo *off-line* [Prieto-Blanco *et al.* , 2009; Prieto-Blanco *et al.* , 2011; Prieto-Blanco *et al.* , 2013b], pero también *on-line* , dentro del capilar. Aunque antes de 2009 se habían realizado varios estudios con derivatización combinada con IT-SPME, en el periodo estudiado solo un 6% de los artículos publicados la utilizan. En la derivatización en el capilar hay dos posibilidades: extraer primero el/los analito/s para derivatizarlo/s después (pasando a través del capilar primero la muestra y después el agente derivatizante [Pan *et al.* , 2013]) o extraer y derivatizar simultáneamente los compuestos de interés (extrayendo primero el agente derivatizante y pasando posteriormente la muestra a través del capilar para que reaccione con él, dejando la mezcla un cierto tiempo en el interior del capilar [Campíns-Falcó *et al.* , 2009]). También se ha probado una reacción de derivatización con varios ciclos derivatizante/muestra

[Prieto-Blanco *et al.*, 2011]. Cuando se incluye esta etapa de derivatización, los parámetros que se pueden optimizar son el agente derivatizante y su exceso, el pH del medio, la concentración de la disolución tampón empleada y el tiempo de reacción. Además, debe evaluarse la eficiencia de las diferentes posibilidades (*on-line/off-line*, extracción + derivatización o extracción y derivatización simultánea).

En definitiva, los parámetros más importantes en la microextracción en fase sólida *in-tube* son el tipo de capilar y la fase sólida escogida, pero en algunos análisis también pueden ser críticos algunos parámetros relacionados con la muestra. Así, para la determinación de analitos polares, tensioactivos o mezclas de compuestos con distinta hidrofobicidad, podría ser necesaria la adición de modificadores, agentes de par iónico o ajuste de pH. En la modalidad de ciclos, la optimización es relativamente sencilla debido a que algunas variables (número de ciclos, flujo y volumen de muestra) se mueven en un rango estrecho de valores.

3.2.3. APLICACIONES A DISTINTOS TIPOS DE ANALITOS Y MATRICES

En las Tablas 1-3 se presentan los parámetros más importantes de cada método publicado en la bibliografía: matriz, analito/s, técnica de determinación, capilar empleado e información sobre la automatización, la desorción, si el acoplamiento con la técnica de determinación es *on-line* o no y algunos parámetros analíticos (rango lineal y límites de detección). Las dos referencias para muestras industriales se han incluido al final de la tabla de aplicaciones en el campo medioambiental, ya que las matrices analizadas se emplean en el tratamiento de aguas.

A diferencia de otras técnicas, incluso miniaturizadas como la SPME en fibra, en IT-SPME solo se pueden analizar muestras líquidas filtradas (si inicialmente contienen partículas). Sin embargo, la filtración es generalmente la única etapa previa necesaria para muestras líquidas, sobre todo en el campo medioambiental, por lo que la IT-SPME da lugar a procedimientos muy sencillos (muchas veces con una única etapa) y con bajo consumo de muestra, frente a muchos procedimientos habituales con varias etapas y elevados volúmenes. La IT-SPME también puede aplicarse a muestras sólidas, pero en ese caso debe combinarse con otra/s técnica/s, que pueden ser tanto clásicas como miniaturizadas, para obtener un extracto líquido que pueda procesarse en el capilar.

En las aplicaciones en el campo medioambiental predominan las matrices líquidas, especialmente aguas de distinta naturaleza (Tabla 1): agua de mar, aguas costeras, aguas de transición, agua de río, agua de lago, agua de grifo, agua de pozo y aguas residuales. Sin embargo, en el campo ambiental también se ha aplicado la IT-SPME a extractos orgánicos y acuosos de muestras sólidas como suelos, polvo, material particulado atmosférico, sedimentos, bivalvos, plantas, flores, semillas y polen. En los análisis de muestras sólidas, la IT-SPME se combina con técnicas como la extracción asistida por ultrasonidos (UAE, *Ultrasound-Assisted Extraction*) [Prieto-Blanco *et al.*, 2011; Prieto-Blanco *et al.*, 2013b], la extracción asistida por microondas (MAE, *Microwave Assisted Extraction*) [Pan *et al.*, 2013] y la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD, *Matrix Solid Phase Dispersion*) [Muñoz-Ortuño *et al.*, 2012; Muñoz-Ortuño *et al.*, 2014]. Cuando

el extracto obtenido es acuoso, la combinación con IT-SPME es muy sencilla (procesando el extracto como una muestra líquida acuosa), mientras que los extractos orgánicos (como los que se obtienen en el análisis de sedimentos y bivalvos) también se procesan sin problemas tras mezclarlos con agua como modificador. En el análisis de plantas y suelos [Wang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014] son necesarios procedimientos con múltiples etapas incluyendo SPE y evaporación.

El rango de analitos de interés en el campo medioambiental va desde compuestos hidrófobos hasta compuestos polares y tensioactivos, incluyendo HAP, pesticidas (organofosforados, triazinas y productos de degradación, fenilureas, trifluralina), disruptores endocrinos (ftalatos, fenoles), compuestos carbonílicos, aminas alifáticas, halobenzenos, fármacos y metabolitos, algunas biomoléculas (hormonas, esteroides, clorofila) y tensioactivos de amonio cuaternario (QAC, *Quaternary Ammonium Compounds*). El análisis de algunos de ellos, como los QAC, es un reto complejo para cualquier técnica de tratamiento de muestra [Boyacı *et al.*, 2015], por lo que durante su análisis no solo hay que tener en cuenta la limpieza del material sino también su química en disolución (formación de micelas, comportamiento en presencia de iones y disolventes orgánicos, etc.).

En las aplicaciones clínicas (Tabla 2) las matrices predominantes son el plasma y la orina. Sin embargo, la técnica de IT-SPME también se ha aplicado a otras matrices biológicas como la saliva, el suero sanguíneo o el pelo. Los compuestos más analizados en este tipo de matrices son fármacos, metabolitos y biomoléculas (hormonas, glucoproteínas, fosfopéptidos y enzimas), aunque también se han analizado HAP, aminas heterocíclicas o drogas. Aunque en IT-SPME predominan los analitos orgánicos, la técnica también se puede aplicar a compuestos inorgánicos u organometálicos. En 2012 se publicó un método (con fibra hueca en lugar de capilar) para analizar 6 especies de arsénico (As(III), As(V), ácido monometilarsónico, ácido dimetilarsónico, arsenobetaína y arsenocolina) [Chen *et al.*, 2012]. La determinación es con HPLC (con par iónico) acoplado a ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*, Plasma de acoplamiento inductivo con espectrometría de masas).

En aplicaciones alimentarias (Tabla 3) hay una mayor variedad de matrices analizadas, tanto bebidas (refrescos, agua, zumo, té y leche) como alimentos sólidos (nueces, cereales, frutos secos, huevo y tejidos animales). En este campo los compuestos de interés son productos tóxicos residuales que se originan en la producción de alimentos vegetales o animales (50%), productos directamente relacionados con la seguridad alimentaria como las micotoxinas (16,7%) y componentes de los alimentos (vitaminas, carotenoides y proteínas, 22,2%). Los analitos incluyen fármacos, aditivos alimentarios, pigmentos, proteínas, fosfopéptidos, enzimas, micotoxinas, vitaminas y contaminantes cuya presencia está muy extendida como HAP, triazinas y bisfenol A. Las biomoléculas son los analitos más frecuentes.

Las muestras sólidas requieren un tratamiento previo a la IT-SPME, que para matrices alimentarias se suele realizar con técnicas clásicas como extracción asistida con US [Zhang *et al.*, 2010a], tratamiento enzimático [Wang *et al.*, 2012] o saponificación

[Zhang *et al.*, 2010a]. Debido a la complejidad de este tipo de matrices, en la mayoría de los casos los procedimientos requieren de varias etapas que incluyen centrifugación, lavado, filtración, secado y/o redisolución, y que son necesarias para eliminar grasas o proteínas que puedan interferir en el análisis posterior [Kataoka *et al.*, 2009c; Bagheri *et al.*, 2013; González-Fuenzalida *et al.*, 2014].

Cabe destacar la utilización de la IT-SPME para el enriquecimiento de fosfolípidos, con objeto de estudiar la fosforilación de las proteínas. En este tipo de estudios, los fosfopéptidos obtenidos en la digestión enzimática se caracterizan con espectrometría de masas, pero es preciso concentrarlos y purificarlos antes de la determinación espectrométrica. La IT-SPME es una de las técnicas usadas para este fin, compitiendo con métodos como la inmunoprecipitación o la modificación química. En estos casos, la fase extractante en el capilar está formada por materiales de cromatografía de afinidad con óxidos metálicos (MOAC, *Metal Oxide Affinity Chromatography*) [Wang *et al.*, 2012] o de cromatografía de afinidad ion-metal (IMAC, *Metal-Ion Affinity Chromatography*) [Wu *et al.*, 2010], que permiten obtener una elevada selectividad en la extracción en un corto periodo de tiempo. De forma análoga la IT-SPME se puede emplear en glucoproteómica para el enriquecimiento de glucoproteínas de mezclas proteicas utilizando materiales de cromatografía de afinidad boronato (BAC, *Boronate Affinity Chromatography*) en el capilar [Lin *et al.*, 2011].

Tabla 1. Resumen de las aplicaciones de IT-SPME en análisis medioambiental e industrial (continúa).

Matriz	Análito/s	Técnica	Capilar	On-line	Auto.	Desorción	Validación (ng/mL)		Ref.
							Rango	LD	
Agua	Ácido acetilsalicílico Acetaminofena Atenolol Diclofenac Ibuprofeno	CapLC	Nanopartículas magnéticas (no comercial)	Sí	No	D (f. móv.)	n.p.	5	Moliner-Martínez et al., 2012
								2,5	
								5	
								1,7	
Agua	Aminas alifáticas	HPLC	TRB-5	Sí	No	D (f. móv.)	< 2500 (UV)	Campíns-Falcó et al., 2009	
							6-500 (FLD)		
Agua	C ₁₂ -BAK	CapLC (columna TiO ₂)	TRB-35	Sí	No	D (f. móv.)	1,5-300	Prieto-Blanco et al., 2012	
Agua	EDCs HAP	HPLC-UV	Nanopartículas (no comercial)	Sí	Sí	D (f. móv.)	n.p.	Li et al., 2009	
Agua	Ketoprofeno Fenbufeno Ibuprofeno	LC-MS	Monolítico (no comercial)	Sí	Sí	D (f. móv.)	2-200	Yu et al., 2012 ^a	
							1-200		
Agua	Oseltamivir y oseltamivir carboxilato	LC-MS/MS	CP-Pora PLOT amina	Sí	Cic.	D (f. móv.)	0,001-0,500	Kataoka et al., 2012	
							(0,078-0,16) ×10 ⁻³		
Agua	HAP	GC	Liner de cuarzo relleno de varios capilares (no comercial)	No	No	T	0,01-100	Yan et al., 2012	
Agua	Pesticidas, hidrocarburos, ftalatos y fenoles	CapLC-DAD	Columna GC comercial	Sí	No	D (f. móv.)	1-100	Campíns-Falcó et al., 2010	
Muestras acuosas ambientales	Estrógenos	HPLC-DAD y HPLC-FLD	Supel-Q PLOT y Carboxen 1006 PLOT	Sí	Cic.	n.p.	0,04-0,63 (UV)	Aufartová et al., 2012	
							0,005-0,03 (FLD)		
Agua de lago	Triazinas	DART-MS	Monolítico con nanotubos de carbono (no comercial)	Sí	No	D (dis. el.)	0,02-0,14	Wang et al., 2014 ^{a,b}	
Agua de río	Triazinas	CapLC-DAD	Nanopartículas magnéticas (no comercial)	Sí	No	D (f. móv.)	3-40	González-Fuenzalida et al., 2014	

^aTambién está en la Tabla 2. ^bTambién está en la Tabla 3. Auto.: Automatizado; Cic.: Ciclos; Desor.: Desorción; D: Dinámica; f. móv.: Fase móvil; dis. el.: Disolución eluyente; T: Térmica; n.p.: No proporcionado; LD: Límite de detección.

Tabla 1. Resumen de las aplicaciones de IT-SPME en análisis medioambiental e industrial (continúa).

Matriz	Análito/s	Técnica	Capilar	On-line	Auto.	Desorción	Validación (ng/mL)		Ref.
							Rango lineal	LD	
Agua de río, costera y residual	DEHP	UHPLC-MS/MS	TRB-5	Sí	No	D (dis. el.)	0,25-25	0,025	Masiá et al., 2013
	Clorfenvinfos						0,25-25	0,025	
	Clorpirifós						0,025-2,5	0,025	
	Trifluralina						0,25-25	0,025	
	Diurón						0,25-25	0,1	
	Terbutilazina						0,25-25	0,025	
	Atrazina						0,25-25	0,1	
Isoproturón	0,25-25	0,1							
Simazina	0,25-25	2,5							
Agua de río, mar y de bebida	Diclofenac	HPLC-UV	PPY (no comercial)	Sí	Sí	E	0,5-1000	0,1	Ahmadi et al., 2015a ^a
Agua de mar y de transición	Ftalatos	CapLC-DAD	TRB-5	Sí	No	D (f. móv.)	< 50,0 (< 25,0 para DEP)	0,005-1,5	Jornet-Martínez et al., 2014
Agua de mar y de transición	Triazinas y productos de degradación	CapLC-DAD	TRB-5	Sí	No	D (f. móv.)	< 50,0	0,02-0,10	Moliner-Martínez et al., 2015a
Agua de mar y residual	Clorofila <i>a</i>	CapLC-DAD	TRB-5	Sí	No	D (f. móv.)	0,1-1	0,05	Vitta et al., 2010
Agua de mar y residual	EDCs	HPLC-DAD/FLD	Supel-Q PLOT	Sí	No	E (micelar)	0,1-1000	0,03-1,95 (UV) 0,02-0,14 (FLD)	Aufartová et al., 2014
Aguas superficiales y residuales	Ácido perfluorooctanoico Sulfonato de perfluorooctano	LC-MS	CP-Pora PLOT amina	Sí	Cic.	D (f. móv.)	0,05-5	0,0015 0,0032	Saito et al., 2010a
Agua de río y de grifo	Triazinas	HPLC-UV	Sorbente basado en sol-gel con 3TMSPA (no comercial)	Sí	Sí	D (f. móv.)	30-1000	10	Bagheri et al., 2013
Agua de grifo y de lago y suelos	HAP	HPLC-FLD	Microtubo de multicapas de grafeno (no comercial)	Sí	Sí	D (f. móv.)	(0,3-200) × 10 ⁻³	(0,05-0,1) × 10 ⁻³	Zhang et al., 2013a

^aTambién está en la Tabla 2. Auto.: Automatizado; Cic.: Ciclos; Desor.: Desorción; D: Dinámica; f. móv.: Fase móvil; dis. el.: Disolución eluyente; E: Estática; LD: Límite de detección.

Tabla 1. Resumen de las aplicaciones de IT-SPME en análisis medioambiental e industrial (continúa).

Matriz	Análito/s	Técnica	Capilar	On-line	Auto. Desorción	Validación (ng/mL)	LD	Ref.
Agua de grifo, río, mar y residual	Clorobencenos Nitroclorobencenos	GC-ECD	Liner de cuarzo relleno de varios capilares (no comercial)	No	No	0,003-19,2	0,00041-0,047	Yan <i>et al.</i> , 2014
Agua de grifo, de pozo y residual	4-nitrofenol	HPLC-UV	MIP (no comercial)	No	Semi.	1-10000	0,33	Zarejousheghani <i>et al.</i> , 2013
Aguas residuales	Compuestos organofosforados	CapLC-DAD	Nanopartículas magnéticas (no comercial)	Sí	No	n.p.	0,010-0,050	Moliner-Martínez <i>et al.</i> , 2014
Aguas residuales	Colesterol Coprostanol	CapLC-DAD	TRB-5	Sí	No	5-125 (f. móv.) 40-5000	1,2 10	Moliner-Martínez <i>et al.</i> , 2010
Aguas residuales	Triazinas Organofosforados Fenilureas Trifluralina DEHP	CapLC	TRB-5	Sí	No	< 10.0 (f. móv.)	0,005-0,050	Moliner-Martínez <i>et al.</i> , 2011
Sedimentos costeros	DEHP	CapLC-DAD	TRB-5	Sí	No	n.p.	8 (90 µg/kg)	Muñoz-Ortuño <i>et al.</i> , 2014
Suelo y polvo	HAP	HPLC-UV/FLD	Bucle de acero inoxidable	Sí	Sí	0,0005-0,500 (f. móv.) 0,002-1,000	0,0002-0,002	Zhang <i>et al.</i> , 2014
Extracto acuoso de PM ₁₀	Compuestos carbonílicos	CapLC	TRB-5	Sí	No	0,09-40 (f. móv.)	0,030-0,198	Prieto-Blanco <i>et al.</i> , 2011
PM _{2.5} y PM ₁₀	Compuestos carbonílicos	CapLC-MS	TRB-35	Sí	No	0,0031-2,322 (f. móv.)	0,0009-0,0082	Prieto-Blanco <i>et al.</i> , 2013b
Polen, flores y semillas	24-epibrasinolida	UHPLC-UV/FLD	Monolítico MIP (no comercial)	Sí	D (dis. der.)	0,003-5,000	0,0007	Pan <i>et al.</i> , 2013
<i>Arabidopsis thaliana</i>	28-epihomobrasinolida	LC-MS	Monolítico de poli(MAA-co-EDMA) (no comercial)	Sí	Sí	0,005-0,500 (f. móv.)	0,0020	Wang <i>et al.</i> , 2013

Auto.: Automatizado; Semi.: Semiautomático; Desor.: Desorción; D: Dinámica; f. móv.: Fase móvil; dis. der.: Disolución derivatizante; T: Térmica; n.p.: No proporcionado; LD: Límite de detección.

Tabla 1. Resumen de las aplicaciones de IT-SPME en análisis medioambiental e industrial.

Matriz	Analito/s	Técnica	Capilar	On-line	Auto.	Desorción	Validación (ng/mL)		Ref.
							Rango lineal	LD	
Bivalvos	DEHP	CapLC	TRB-5	Sí	No	D (f. móv.)	< 200	10 (170 µg/kg)	Muñoz-Ortuño et al., 2012
Muestras industriales y aguas de lavado ^c	BAK (4 homólogos)	CapLC-DAD-MS (Columna CN)	TRB-35	Sí	No	D (f. móv.)	0,2-5,4	0,1	Prieto-Blanco et al., 2013a
Polímeros catiónicos industriales ^c	Etilendiamina	HPLC-FLD	TRB-5	Sí	No	D (f. móv.)	70-2000	20	Prieto-Blanco et al., 2009

^cMuestras industriales. Auto.: Automatizado; Desor.: Desorción; D: Dinámica; f. móv.: Fase móvil; LD: Límite de detección.

Tabla 2. Resumen de las aplicaciones de IT-SPME en análisis clínico (continúa).

Matriz	Análito/s	Técnica	Capilar	On-line	Auto.	Desorción	Validación (ng/mL)		Ref.
							Rango lineal	LD	
Saliva	Cortisol DHEA	LC-MS/MS	Supel-Q PLOT	Sí	Cic.	D (f. móv.)	0,005-1,0 0,05-1,0	0,0009 0,013	Yasuhara et al., 2012
Saliva	Testosterona Cortisol DHEA	LC-MS/MS	Supel-Q PLOT	Sí	Cic.	D (f. móv.)	0,002-0,50 0,02-5,0 0,10-25,0	0,0003 0,0011 0,0089	Kataoka et al., 2013a
Orina y saliva	Nicotina, cotinina y alcaloides relacionados	LC-MS	CP-Pora PLOT amina	Sí	Cic.	D (f. móv.)	0,5-20	0,015-0,040	Kataoka et al., 2009b
Orina	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina	CE-ECD	Monolítico MIP (no comercial)	No	Sí	D (dis. el.)	2,83-425	0,74	Zhang et al., 2010b
Orina	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina	HPLC-UV	Monolítico MIP (no comercial)	No	Sí	D (dis. el.)	2,83-1500	0,91	Zhang et al., 2009
Orina	Esteroides anabolizantes	LC-MS	Supel-Q PLOT	Sí	Cic.	D (f. móv.)	0,5-20	0,009-0,182	Saito et al., 2010b
Orina	Diclofenac	HPLC-UV	PPY (no comercial)	Sí	Sí	E	0,5-1000	0,1	Ahmadi et al., 2015a ^a
Orina	Dopamina	LC-ESI-MS/MS	Capilar de afinidad borato (no comercial)	Sí	Sí	D (f. móv.)	5-10000	1,2	He et al., 2010
Orina	Doxepin, clozapin e imipramina	HPLC	Monolítico (no comercial)	Sí	Sí	D (f. móv.)	< 5000	12,5-71,5	Ma et al., 2009
Orina	Aminas heterocíclicas	LC-MS/MS	Supel-Q PLOT	Sí	Cic.	D (f. móv.)	0,010-2,000	0,0017-0,0041	Kataoka et al., 2014
Orina	Naproxeno	HPLC-UV	PPY (no comercial)	Sí	Sí	E	0,5-1000	0,07	Ahmadi et al., 2015b
Orina	Varias especies de arsénico	IP-RP-HPLC-ICP-MS	Fibra hueca de MPTS-AAPTS/PSP inmovilizado (no comercial)	Sí	Sí	D (dis. el.)	< 1000	0,017-0,053	Chen et al., 2012
Plasma Orina	Antidepresivos	LC-MS	Monolítico (no comercial)	Sí	Sí	D (f. móv.)	1-500	0,07-2,95 0,06-2,84	Zheng et al., 2010
Plasma	Drogas	UHPLC-MS/MS	DB 1701	No	No	D (dis. el.)	n.p.	< 25	Wang y Liu, 2014c

^aTambién está en la Tabla 1. Auto.: Automatizado; Cic.: Ciclos; Desor.: Desorción; D: Dinámica; f. móv.: Fase móvil; dis. el.: Disolución eluyente; E: Estática; LD: Límite de detección.

Tabla 2. Resumen de las aplicaciones de IT-SPME en análisis clínico (continúa).

Matriz	Analito/s	Técnica	Capilar	On-line	Auto.	Desorción	Validación (ng/mL)		Ref.
							Rango lineal	LD	
Plasma	Derivados de butirofenona	LC-MS/MS	DB-17	Sí	Cic.	D (f. móv.)	< 500	0,03-0,2	Kumazawa et al., 2009
Plasma	Fluoroquinolonas	HPLC-UV	Monolítico de poli(MAA-co-EGDMA)	Sí	Sí	D (f. móv.)	n.p.	1,1-2,6	Huang et al., 2009
Plasma	Fluoxetina y norfluoxetina	HPLC-FLD	PPY (no comercial) RAM (sílice recubierta con BSA) (no comercial)	Sí	Cic.	E	< 700	5,0	Gonçalves Silva et al., 2009
Plasma	Interferon α_{2a}	HPLC-FLD	Capilar de inmunofijación (no comercial)	Sí	Cic.	D (f. móv.)	0,06-3,0 MIU/mL	0,06 (LC)	Chaves et al., 2011
Plasma	Interferon α_{2a}	HPLC-FLD	Capilar de inmunofijación (no comercial)	Sí	Cic.	D (f. móv.)	0,006-3,0 MIU/mL	0,006 (LC)	Chaves y Queiroz, 2013b
Plasma	Interferon α_{2a}	HPLC-FLD	MIP (no comercial)	Sí	Cic.	D (f. móv.)	8-300	8,0 (LC)	Chaves y Queiroz, 2013a
Plasma	Ketoprofeno Fenbufeno Ibuprofeno	LC-MS	Monolítico (no comercial)	Sí	Sí	D (f. móv.)	10-1000 10-1000 20-1000	2,63 2,01 4,77	Yu et al., 2012 ^a
Plasma	Lidocaína y MEGX	HPLC	FSOT recubierto con OV-1701 (no comercial) Tubo (0,7 mm i.d.) de PPY saturado con <i>n</i> -octanol (no comercial)	Sí	Cic.	D (f. móv.)	50-5000	15-20	Caris et al., 2012
Plasma	Naproxeno	HPLC-UV	Capilar comercial	No	Cic.	Cic.	0,9-450	0,54	Ahmadi y Bapirzadeh, 2013
Plasma	Rifampicina	HPLC-UV	Polietilenglicol	Sí	Cic.	D (f. móv.)	100-100000	100 (LC)	Melo et al., 2011
Plasma de conejo	Fármacos	CE (sweeping)	Capilar comercial	Sí	Sí	D (dis. el.)	10-500	1,62-24,0	Xia et al., 2010
Plasma de rata	Alcaloides protoberberina	HPLC-UV	Monolítico (no comercial)	Sí	Sí	D (f. móv.)	0,05-50	0,01	Zhang et al., 2013b

^aTambién está en la Tabla 1. Auto.: Automatizado; Cic.: Ciclos; Desor.: Desorción; D: Dinámica; f. móv.: Fase móvil; dis. el.: Disolución eluyente; E: Estática; n.p.: No proporcionado; LD: Límite de detección.

Tabla 2. Resumen de las aplicaciones de IT-SPME en análisis clínico.

Matriz	Análito/s	Técnica	Capilar	On-line	Auto.	Desorción	Validación (ng/mL)		Ref.
							Rango lineal	LD	
Suero	Glucoproteínas	SDS-PAGE	Monolítico MIP (no comercial)	No	Sí	D (dis. el.)	n.p.	n.p.	Lin et al., 2013a
Suero	Lisozima	SDS-PAGE	Monolítico MIP (no comercial)	No	Sí	D (dis. el.)	n.p.	n.p.	Lin et al., 2013b ^b
Suero y mezcla de digestión de fosfoproteínas+BSA	Fosfopéptidos	MALDI-MS	Monolítico (no comercial)	No	Semi.	D (dis. el.)	n.p.	10-50 fmol	Wang et al., 2012 ^b
Pelo	Aminas heterocíclicas	LC-MS/MS	Supel-Q PLOT	Sí	Cic.	D (f. móv.)	0,010-2,000	0,00010-0,00079	Kataoka et al., 2013b
Fármacos sin purificar	HAP	HPLC-FLD	CP-Sil 19CB	Sí	Cic.	D (f. móv.)	0,05-2,0	0,00032-0,00463	Ishizaki et al., 2011 ^b

^bTambién está en la Tabla 3. Auto.: Automatizado; Semi.: Semiautomático; Cic.: Ciclos; Desor.: Desorción; D: Dinámica; f. móv.: Fase móvil; dis. el.: Disolución eluyente; n.p.: No proporcionado; LD: Límite de detección.

Tabla 3. Resumen de las aplicaciones de IT-SPME en análisis alimentario (continúa).

Matriz	Análito/s	Técnica	Capilar	On-line	Auto.	Desorción	Validación (ng/mL)		Ref.
							Rango lineal	LD	
Coca-Cola y Sprite	Aditivos alimentarios ácidos	HPLC-UV	Monolítico polimérico modificado con líquido iónico (no comercial)	No	Semi.	D (dis. el.)	< 625	1,2-13,5	Wang et al., 2014b
Cola	Bisfenol A	CE (stacking y sweeping)	Monolítico (no comercial)	No	Sí	D (dis. el.)	5-200	1,8	Jiwei et al., 2009
Agua (contenida en biberón)	Bisfenol A	Espectro-fotometría UV-Vis	CPANI en un tubo de acero-sílice (no comercial)	Sí	Sí	D (dis. el.)	(0,023-22,8)×10 ³	4,6	Poorahong et al., 2013
Zumo de naranja	Triazinas	DART-MS	Monolítico con nanotubos de carbono (no comercial)	No	No	D (dis. el.)	n.p.	0,02-0,14	Wang et al., 2014a ^a
Leche	Estrógenos sintéticos	HPLC	Nanopartículas depositadas (no comercial)	Sí	Sí	D (f. móv.)	< 200 ng/g	1,2-2,2 ng/g	Yu et al., 2011
Leche desnatada	Fosfopéptidos	MALDI-TOF	Nanopartículas-IMAC-Zr ⁴⁺ (no comercial)	No	No	D (dis. el.)	n.p.	50 fmol	Wu et al., 2010
Leche desnatada y clara de huevo	Fosfopéptidos	MALDI-MS	Monolítico (no comercial)	No	Semi.	D (dis. el.)	n.p.	10-50 fmol	Wang et al., 2012 ^b
Leche	Antibacterianos	LC-MS	Monolítico (no comercial)	Sí	No	D (f. móv.)	< 200 ng/g	0,3-1,2 ng/g 0,2-3,0 ng/g 0,2-0,7 ng/g 0,2-1,0 ng/g	Zheng et al., 2009
Clara de huevo	Lisozima	SDS-PAGE	Monolítico MIP (no comercial)	No	Sí	D (dis. el.)	n.p.	n.p.	Lin et al., 2013b ^b
Clara de huevo	Ovalbúmina	pCEC (como CapLC)	Monolítico (no comercial)	No	Sí	D (dis. el.)	n.p.	n.p.	Lin et al., 2011

^aTambién está en la Tabla 1. ^bTambién está en la Tabla 2. Auto.: Automatizado; Semi.: Semiautomático; Desor.: Desorción; D: Dinámica; f. móv.: Fase móvil; dis. el.: Disolución eluyente; n.p.: No proporcionado; LD: Límite de detección.

Tabla 3. Resumen de las aplicaciones de IT-SPME en análisis alimentario.

Matriz	Análito/s	Técnica	Capilar	On-line	Auto.	Desorción	Validación (ng/mL)		Ref.
							Rango lineal	LD	
Zumo de frutas y frutos seco	Patulina	LC-MS	Carboxen 1006 PLOT	Sí	Cic.	D (f. móv.)	0,5-20	0,0235	Kataoka et al., 2009c
Nueces, cereales, frutos secos y especias	Aflatoxinas	LC-MS	Supel-Q PLOT	Sí	Cic.	D (f. móv.)	0,05-2,0	0,0021-0,0028	Nonaka et al., 2009
Nueces y cereales	Ocratoxinas	LC-MS	Carboxen 1006 PLOT	Sí	Cic.	D (f. móv.)	0,5-20	0,089-0,092	Saito et al., 2012
Maíz	β -caroteno	micro-LC	Monolítico sílice-ODS	Sí	Sí	D (f. móv.)	n.p.	7-20	Zhang et al., 2010a
Maíz	Vitaminas liposolubles y β -caroteno	CapLC	Monolítico sílice-ODS	Sí	Sí	D (f. móv.)	n.p.	1,9-173	Xu y Jia, 2009
Té y alimentos desecados	HAP	HPLC-FLD	CP-Sil 19CB	Sí	Cic.	D (f. móv.)	0,05-2,0	0,00032-0,00463	Ishizaki et al., 2010
Té	HAP	HPLC-FLD	CP-Sil 19CB	Sí	Cic.	D (f. móv.)	0,05-2,0	0,00032-0,00463	Ishizaki et al., 2011 ^b
Tejidos animales	Antibióticos	HPLC	MIP (<i>fiber-in-tube</i>) (no comercial)	Sí	Sí	E	0,2-20	0,016-0,11	Hu et al., 2012

^bTambién está en la Tabla 2. Auto.: Automatizado; Cic.: Ciclos; Desor.: Desorción; D: Dinámica; f. móv.: Fase móvil; dis. el.: Disolución eluyente; E: Estática; n.p.: No proporcionado; LD: Límite de detección.

3.3. TENDENCIAS ACTUALES QUE REFUERZAN LA TÉCNICA

Algunas de las fortalezas de la IT-SPME, como la automatización, se han visto ampliadas en los últimos años con la aparición de nuevos acoplamientos (con cromatografía de líquidos de ultra alta resolución, UHPLC) y la consolidación de otros ya existentes (con CapLC). Por otra parte, la eficiencia de la extracción, al no tratarse de una técnica exhaustiva, es uno de los aspectos susceptibles de mejora en la técnica. En los últimos años se han realizado diferentes propuestas para mejorar la eficiencia, tanto en términos de sensibilidad como de tiempo de extracción. Estas propuestas se dividen en dos grandes grupos: la introducción de nuevas variantes de IT-SPME y el desarrollo de nuevos capilares de extracción. Algunos problemas que han surgido en la aplicación a matrices biológicas se pueden solucionar con nuevas fases extractantes [Queiroz y Melo, 2014], que en general buscan mejorar la selectividad y reducir el efecto matriz, una mayor estabilidad mecánica, presiones más bajas o resistencia frente a distintos tipos de matrices.

3.3.1. NUEVOS ACOPLAMIENTOS

Uno de los puntos fuertes de la IT-SPME siempre ha sido la sencillez para acoplarla con la cromatografía de líquidos, aunque también se puede combinar, *on-line* u *off-line*, con otras muchas técnicas de separación y determinación: electroforesis capilar (CE, *Capillary Electrophoresis*) [Zhang *et al.*, 2010b; Jiwei *et al.*, 2009], electroforesis convencional [Lin *et al.*, 2013a; Lin *et al.*, 2013b], cromatografía de gases [Yan *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2014], espectrometría de masas [Wang *et al.*, 2014a; Wang *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2010] o espectroscopia UV-Visible [Poorahong *et al.*, 2013]. La combinación IT-SPME-CE incluso se ha llevado a cabo utilizando un mismo capilar para ambas técnicas [Xia *et al.*, 2010]. Los acoplamientos con espectrometrías (UV y/o MS) son un ejemplo de la versatilidad de la IT-SPME a la hora de combinarse con otras técnicas instrumentales (Fig. 13).

Los acoplamientos con HPLC (35,1% de las referencias) y LC-MS (23,4%) siguen siendo mayoritarios, pero el número de publicaciones en las que la IT-SPME se acopla con sistemas cromatográficos miniaturizados (cromatografía micro-líquida y cromatografía de líquidos capilar) ha aumentado significativamente en los últimos años, suponiendo un 22,1% de las referencias. El acoplamiento de IT-SPME a un sistema también miniaturizado permite una drástica disminución del consumo de disolventes y un aumento de la sensibilidad. La columna cromatográfica tiene dimensiones similares (en longitud y diámetro interno) al capilar de extracción, por lo que el acoplamiento es muy sencillo.

Por el contrario, acoplar la IT-SPME con UHPLC es mucho más complejo, debido a que los capilares de extracción no pueden soportar las elevadas presiones a las que se trabaja con esos cromatógrafos. Por este motivo, el acoplamiento no puede hacerse directamente. Se han presentado dos estrategias para solucionar esta incompatibilidad con las presiones de trabajo: una configuración con doble válvula [Masiá *et al.*, 2013] y otra con una interfase basada en una estrategia de muestreo y apilamiento fraccionados (FSS, *Fractionized Sampling and Stacking*) [Pan *et al.*, 2013]. La primera propuesta

emplea dos válvulas, con el capilar en la primera (Fig. 8d). Tras la extracción, los analitos se desorben con una disolución eluyente para pasarlos al bucle situado en la segunda válvula, que es la que permitirá el paso de la fase móvil cromatográfica para trasladar los analitos a la columna. De esta forma, el capilar no tiene que soportar las presiones del sistema UHPLC, ya que es la segunda válvula la que está en contacto con este sistema. La otra estrategia también incluye dos válvulas de 6 vías (y una válvula de 3 vías adicional previa a la columna cromatográfica para evitar que ésta se contamine durante los lavados del resto del sistema). La extracción y la desorción se llevan a cabo como en la otra opción, con el capilar situado en la primera válvula y un bucle en la segunda. La diferencia más importante está en que en lugar de introducir los analitos (en el caso publicado, derivados de los analitos, ya que se desorben y trasladan al bucle con un agente derivatizante) directamente en la columna analítica, llevan a cabo un proceso de FSS. Este proceso consiste en cambiar de posición repetidamente la segunda válvula (con el bucle lleno de los derivados), alternando entre carga e inyección. Los derivados están en un disolvente fuerte, que provoca ensanchamiento de los picos por efecto eluotrópico. Con el proceso FSS se intercalan pequeñas bandas de la fase móvil inicial (con una elevada concentración de agua y por tanto mucho más débiles que el disolvente de los derivados) en medio del disolvente fuerte, logrando disminuir el ensanchamiento de los picos.

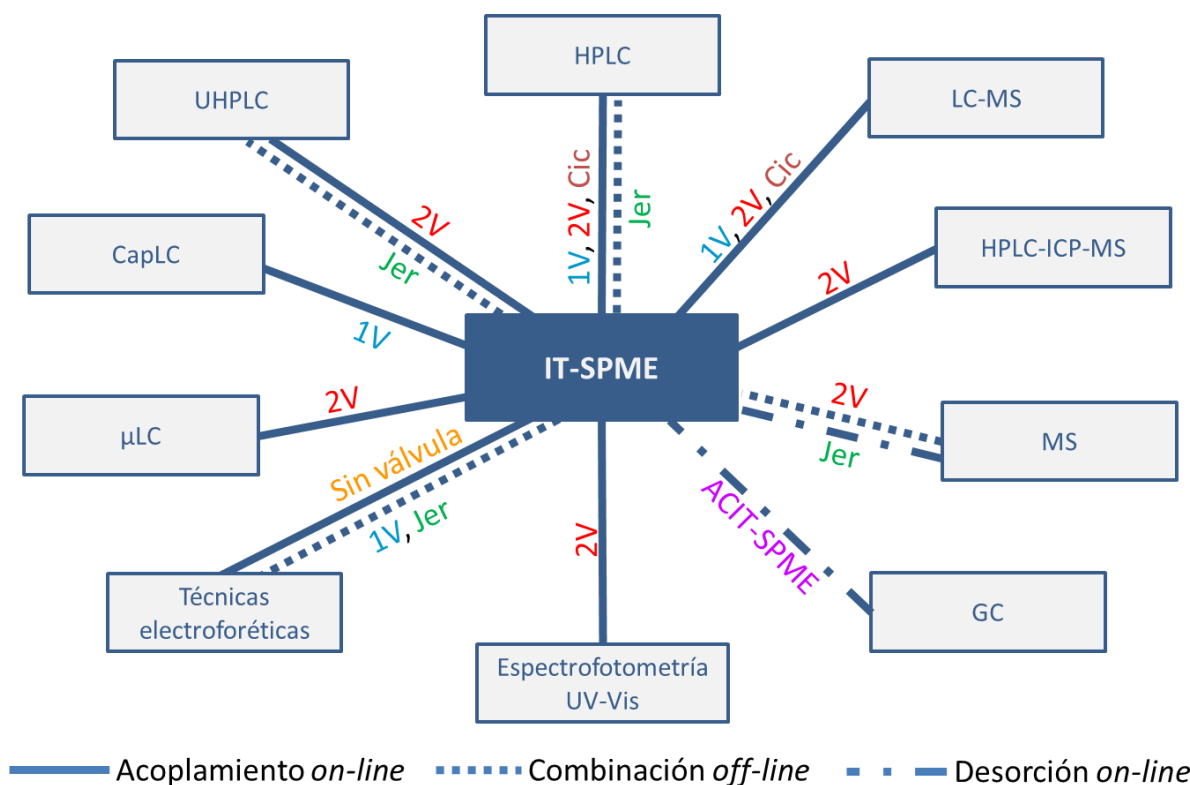


Figura 13. Acoplamientos y combinaciones de la IT-SPME con técnicas de determinación publicados durante el periodo de estudio. 1V: Extracción única con 1 válvula; 2V: Extracción única con 2 válvulas; Cic: Modo de ciclos; Jer: Capilar en la aguja de una jeringa; ACIT-SPME: *Array capillary IT-SPME*.

3.3.2. NUEVAS MODALIDADES DE IT-SPME

Las eficiencias habituales en IT-SPME rondan entre un 10 y un 30%. Aunque no implican una baja sensibilidad, ya que en muchos casos se detectan concentraciones de ppb o ppt, la eficiencia es uno de los aspectos más débiles de la IT-SPME y por tanto claramente susceptible de mejora. En los últimos años han surgido diferentes variantes o modalidades que intentan mejorar la eficacia de la extracción. Entre ellas destacan la IT-SPME magnética, la controlada electroquímicamente y la de temperatura controlada.

La microextracción en fase sólida *in-tube* magnética (*Magnetic-IT-SPME*) se basa en la utilización del magnetismo para mejorar la eficiencia de la extracción. En esta modalidad, el capilar de extracción contiene una fase de nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4 en un soporte de SiO_2) que interacciona con un campo magnético externo, independiente de variables químicas. Las nanopartículas superparamagnéticas se magnetizan al aplicar el campo magnético, afectando al reparto de los analitos entre la muestra líquida y la fase sólida. Así, los analitos diamagnéticos quedan retenidos en la zona en la que las fuerzas magnéticas sean mínimas, al ser repelidos por ellas. Con esta nueva técnica logran aumentar significativamente la eficiencia de la extracción alcanzando eficiencias de entre un 60 y un 100% [Moliner-Martínez *et al.*, 2012; Campis Falco *et al.*, 2013; Moliner-Martínez *et al.*, 2014; González-Fuenzalida *et al.*, 2014].

La microextracción en fase sólida *in-tube* controlada electroquímicamente (EC-IT-SPME), por su parte, emplea polímeros conductores y un campo eléctrico, combinando la SPME con la electroquímica para aumentar la sensibilidad y reducir el tiempo de análisis al utilizar el capilar como un electrodo. El capilar tiene una fase de polipirrol cuya carga se puede controlar electroquímicamente: al aplicar un potencial positivo, la fase se oxida adquiriendo carga positiva y reteniendo los analitos aniónicos con una elevada afinidad. Al aplicar un potencial negativo, la carga se neutraliza y los analitos se liberan. Aplicando los potenciales eléctricos la sensibilidad obtenida es 14 veces mejor que en IT-SPME convencional [Ahmadi *et al.*, 2015a].

Ya se ha comentado en el apartado 3.2.2 que la temperatura afecta a la extracción y la desorción de los analitos. Yang *et al.* (2014) proponen un dispositivo de control de temperatura termoeléctrico con el que modifican la temperatura del capilar en ambas etapas. La eficiencia de la extracción aumenta si se lleva a cabo a una temperatura baja (10°C), mientras que una temperatura relativamente elevada (70°C) en la desorción reduce el ensanchamiento de picos. Los límites de detección y cuantificación alcanzados son 3 veces menores que los que se obtienen a temperatura ambiente.

Otra variante presentada recientemente es la microextracción en fase sólida *in-tube* con matriz de capilares (ACIT-SPME, *Array Capillary In-Tube Solid Phase MicroExtraction* [Yan *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2014]. En esta modalidad el dispositivo de extracción es un *liner* relleno de capilares de extracción, recubiertos con fase sólida tanto por dentro como por fuera. De esta forma, la superficie de fase sólida en contacto con la muestra es muy elevada, mejorando la transferencia de masa (lo que proporciona una extracción y desorción rápidas) y permitiendo el paso de grandes volúmenes de muestra, que se hace

pasar a gravedad a través del *liner*. Acoplan el dispositivo con GC-FID (mediante desorción térmica), alcanzando límites de detección bajos, aunque para ello se necesitan grandes volúmenes de muestra (250-350 mL).

3.3.3. NUEVOS TIPOS DE CAPILARES Y FASES

Una de las vías más prometedoras dentro del desarrollo de la IT-SPME es la constante aparición de nuevos recubrimientos o fases. El auge de esta estrategia podría deberse a que el formato de la técnica (el capilar) hace sencillo experimentar con nuevos recubrimientos. El interés en este tema es muy elevado, y varias de las revisiones sobre IT-SPME publicadas en los últimos años se centran en las nuevas fases, como la de Moliner-Martínez *et al.* (2015b), enfocada a muestras ambientales, o la de Queiroz y Melo (2014), para muestras biológicas.

Los capilares más utilizados, como se ha comentado en el apartado 3.2.2 (Fig. 11), son los abiertos, con la fase recubriendo la pared interna del capilar. Especialmente extendido está el uso de capilares comerciales (fundamentalmente secciones de columnas de GC), siendo los más usados los capilares de tipo FSOT/WCOT (61,8% de las referencias) con fases polisiloxano modificadas. También los capilares PLOT, con una superficie mayor y que por tanto pueden extraer mayor cantidad de analitos, son bastante utilizados, suponiendo el 38,2% restante de las referencias con capilares comerciales. También se pueden preparar capilares abiertos en el laboratorio [Caris *et al.*, 2012] mediante diversos métodos. Los capilares con relleno (descritos en el apartado 3.2.2) son poco frecuentes y tan solo unas pocas aplicaciones han usado las modalidades *fiber-in-tube* [Hu *et al.*, 2012] y con capilar empaquetado [Chaves *et al.*, 2011; Chaves y Queiroz, 2013a] en los últimos años.

Respecto a la presencia e importancia de los distintos tipos novedosos de capilares durante los últimos años (monolíticos, polímeros de impresión molecular tanto monolíticos como no monolíticos, materiales de acceso restringido y capilares con nanopartículas depositadas), se puede observar que los capilares monolíticos se han consolidado como una opción muy utilizada (Fig. 11). Esto es especialmente visible en los campos clínico y alimentario (donde un 32 y un 50% de las referencias, respectivamente, emplean capilares monolíticos), mientras que en el campo medioambiental su incidencia es más limitada (12%). Este tipo de capilares proporcionan una mayor eficiencia y menores presiones, que permiten trabajar con flujos más elevados. Se pueden usar capilares monolíticos comerciales [Zhang *et al.*, 2010a; Xu y Jia, 2009], pero lo más frecuente es prepararlos en el laboratorio, en ocasiones combinándolos con el uso de polímeros de impresión molecular (MIP, *Molecular Imprinted Polymers*) o nanotubos.

Los MIP son materiales con sitios de unión altamente selectivos (en función del tamaño y forma del hueco y de las posibles interacciones), creados mediante la utilización de un molde molecular. Este tipo de capilares se emplea especialmente para el análisis de biomoléculas en aplicaciones clínicas, habiéndose publicado métodos con capilares MIP monolíticos para analizar hormonas [Pan *et al.*, 2013], glucoproteínas [Lin *et al.*, 2013a], enzimas [Lin *et al.*, 2013b] o metabolitos [Zhang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010b].

También se han usado capilares MIP no monolíticos [Zarejousheghani *et al.*, 2013], incluyendo capilares con relleno tanto con fibras MIP [Hu *et al.*, 2012] como con partículas MIP [Chaves y Queiroz, 2013a].

Para la concentración de biomoléculas también se emplean otros tipo de capilares, como los RAM (*Restricted Access Material*, materiales de acceso restringido), que permiten la inyección de muestras biológicas sin ningún tratamiento previo, debido a que excluyen las moléculas más grandes evitando que interfieran en el análisis [Chaves *et al.*, 2011]. Asimismo, se emplean los capilares de inmunoafinidad [Chaves y Queiroz, 2013b], basados en un mecanismo de reconocimiento molecular y que proporcionan una elevadísima selectividad (al utilizar anticuerpos específicos como fase), y los de afinidad boronato [He *et al.*, 2010], usados para extraer y aislar moléculas con grupos *cis*-diol de forma específica.

Otra fase relativamente utilizada en IT-SPME es el polipirrol (PPY), una fase sólida común en SPE y SPME, que se puede emplear directamente como recubrimiento interno de los capilares [Ahmadi *et al.*, 2015a; Gonçalves Silva *et al.*, 2009; Ahmadi *et al.*, 2015b] o también en capilares modificados, como el saturado con octanol propuesto por Ahmadi y Bapirzadeh (2013), en el que la extracción puede producirse tanto por adsorción (en la fase sólida) como por absorción (en el disolvente orgánico).

Otra de las grandes tendencias actuales es el uso de nanopartículas, que en IT-SPME se traduce en la preparación de capilares con nanopartículas depositadas. Debido a su elevada área superficial, estos capilares proporcionan una mayor capacidad de extracción que los capilares tradicionales con una fase de la misma composición [Li *et al.*, 2009]. En la IT-SPME magnética se usan asimismo capilares de nanopartículas, en este caso de Fe_3O_4 [Moliner-Martínez *et al.*, 2012; Moliner-Martínez *et al.*, 2014; González-Fuenzalida *et al.*, 2014]. También se han publicado aplicaciones con otros capilares con nanopartículas no magnéticas [Wu *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2009], incluyendo uno que responde a los cambios de temperatura [Yu *et al.*, 2011]. Este capilar, de nanopartículas de SiO_2 modificadas con un polímero inteligente, varía su afinidad y propiedades entre hidrofílicas e hidrófobas según la temperatura a la que se encuentre.

Más allá de todas las propuestas comentadas, en los últimos años también se han publicado otras fases para capilares preparados en el laboratorio, con multicapas de grafeno [Zhang *et al.*, 2013a], un composite de polianilina, polietilenglicol y polidimetilsiloxano [Poorahong *et al.*, 2013] o una fase basada en sol-gel con 3-(trimetoxisilil)propilamina preparada usando sales de diazonio [Bagheri *et al.*, 2013]. También se han usado fibras huecas en lugar de capilares [Chen *et al.*, 2012].

Otra propuesta novedosa y muy sencilla consiste en utilizar un bucle de acero inoxidable, sin ningún tipo de modificación, para llevar a cabo la extracción [Zhang *et al.*, 2014]. Entre las ventajas del uso del bucle está un importante aumento en la estabilidad, especialmente respecto a las presiones elevadas, y una mayor sencillez en la configuración del sistema. Zhang *et al.* obtienen una buena concentración de 6 HAP en muestras medioambientales con esta propuesta.

Realizando una comparativa entre los distintos tipos de capilar, cabe destacar que los capilares comerciales tienen como ventajas su fácil disponibilidad (con un amplio rango de polaridades, espesores y porosidad), una muy buena reproducibilidad, estabilidad probada frente a mezclas agua/disolvente orgánico y la capacidad de llevar a cabo un elevado número de análisis sin necesidad de sustituir el capilar. Por el contrario, tienen una baja capacidad de carga, lo que implica que para obtener factores de concentración elevados suele ser necesario trabajar con volúmenes relativamente grandes o un número de ciclos alto. Además, su selectividad es limitada y no son biocompatibles. Por el contrario, los capilares RAM y monolíticos sí son biocompatibles y minimizan los tratamientos previos de muestras biológicas. Sin embargo, los capilares RAM tienen limitaciones en cuanto a la velocidad de paso de la muestra. En cambio, los capilares monolíticos permiten el uso de flujos elevados por su alta porosidad y también poseen buena estabilidad frente a pH extremos y disolventes orgánicos, aunque se necesita controlar la estructura de los poros. La reproducibilidad entre capilares es buena tanto para capilares monolíticos como monolíticos MIP (< 10%) y la mayoría se pueden reutilizar para entre 50 y 100 extracciones [Yu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2009].

El polipirrol es un material selectivo que proporciona mejores eficiencias que otros capilares convencionales debido a que puede establecer un mayor número de interacciones con los analitos, aunque como los capilares convencionales, los de polipirrol también tienen baja capacidad de carga. Los capilares de nanopartículas también dan lugar a mejores eficiencias por su elevada área, y si las nanopartículas presentan propiedades magnéticas se pueden aumentar considerablemente las recuperaciones absolutas de la técnica. La principal desventaja de los capilares de nanopartículas es que la reproducibilidad entre capilares es más limitada, si bien unas pocas publicaciones han informado de reproducibilidad intercapilar inferior al 15% [Moliner-Martínez *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2009] y de la posibilidad de usar cada capilar en más de 200 análisis [Moliner-Martínez *et al.*, 2012; González-Fuenzalida *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2011].

3.4. CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS

A partir de los resultados publicados analizados en este capítulo, se puede concluir que la configuración más consolidada en IT-SPME es la de la modalidad de extracción única con una sola válvula, si bien en aplicaciones clínicas es más frecuente la modalidad de ciclos. Las configuraciones con dos válvulas proporcionan mayor versatilidad en casos en los que hay limitaciones relacionadas con el volumen de muestra, la complejidad de la extracción o las presiones elevadas del sistema con el que se acopla la técnica. Aún hay cabida para nuevas propuestas de configuraciones o modalidades de extracción en los próximos años.

En la optimización de IT-SPME, existen multitud de parámetros que se pueden optimizar, pero los que más influyen sobre la técnica son el tipo de capilar y la fase extractante. Tanto las columnas capilares comerciales de GC como los capilares monolíticos se han usado con éxito en un gran número de estudios. Los capilares

comerciales de GC, con muy buena reproducibilidad, son muy adecuados para la implementación de la IT-SPME en métodos de rutina. En cuanto a la desorción, en la mayoría de casos se emplea desorción dinámica con la fase móvil cuando la IT-SPME se acopla a cromatografía de líquidos.

La IT-SPME ha demostrado su aplicabilidad a los campos clínico, ambiental y alimentario, con un importante crecimiento en estos dos últimos. En cambio, a pesar de su potencial, muy pocas publicaciones aplican la técnica al análisis de muestras industriales. Por el contrario, la IT-SPME se emplea en proteómica, para la caracterización mediante MALDI-TOF-MS. Uno de los puntos débiles de la técnica es que necesita combinarse con otras para poder aplicarse a muestras sólidas. A pesar de haber demostrado ser compatible con extractos tanto acuosos como orgánicos y combinarse fácilmente con técnicas como MSPD, MAE o UAE, es necesario un estudio más profundo sobre su aplicación a matrices sólidas complejas, especialmente en el campo alimentario.

Una de las ventajas de la IT-SPME es la automatización, que se ha ampliado con un aumento de los acoplamientos con sistemas miniaturizados (CapLC), que representan un porcentaje similar al del acoplamiento con LC-MS (en torno a un 20%), y la aparición de nuevas estrategias que permiten el acoplamiento con UHPLC. Además, la IT-SPME no solo puede acoplarse a múltiples sistemas cromatográficos, sino también a otras técnicas instrumentales como espectrometrías (MS, UV). Por otra parte, la aparición de nuevas variantes, como la IT-SPME controlada electroquímicamente o la de temperatura controlada, han mejorado la eficiencia de la extracción, que alcanza valores de entre 60 y 100% en la IT-SPME magnética. En los próximos años será interesante seguir la expansión de estas novedosas propuestas.

Uno de los campos con mayor desarrollo dentro de la IT-SPME durante los últimos años es la preparación de nuevos capilares y fases en el laboratorio. En este desarrollo deben tenerse en cuenta sus características referentes a selectividad, biocompatibilidad, eficiencia de extracción y estabilidad. En general, los nuevos capilares han supuesto una mejora en la selectividad, sensibilidad y estabilidad mecánica. Los capilares monolíticos, junto con los MIP, RAM o de nanopartículas, han logrado reducir el efecto matriz de muestras biológicas [Queiroz y Melo, 2014]. Estos nuevos capilares se han empleado sobre todo en aplicaciones clínicas y alimentarias.

En vista del balance entre ventajas e inconvenientes de la IT-SPME que se han discutido en este capítulo, parece plausible un desarrollo constante de la técnica en los próximos años. Numerosos grupos de investigación ha contribuido a una mayor difusión de la técnica. La investigación futura en IT-SPME podría estar relacionada con el desarrollo de nuevas fases extractantes, la ampliación de su incidencia en proteómica y otros campos de aplicación (especialmente el industrial) y novedades respecto a la combinación con otras técnicas.

3.5. REFERENCIAS

- Ahmadi S. H., Manbohi A., Heydar K. T. Electrochemically controlled in-tube solid phase microextraction. *Analytica Chimica Acta*, 853 (2015a) 335–341.
- Ahmadi S. H., Manbohi A., Heydar K. T. Electrochemically controlled in-tube solid phase microextraction of naproxen from urine samples using an experimental design. *Analyst*, 140 (2015b) 497–505.
- Ahmadi F., Bapirzadeh T. High-performance liquid chromatographic determination of naproxen in plasma after extraction by a novel in-tube solid phase-liquid liquid liquid extraction method. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 36 (2013) 1280–1295.
- Arksey H., O'Malley L. Scoping studies: Towards a methodological framework. *International Journal of Social Research Methodology: Theory and Practice*, 8 (2005) 19–32.
- Aufartová J., Torres-Padrón M. E., Sosa-Ferrera Z., Nováková L., Solich P., Santana-Rodríguez J.J. Development of a novel in-tube solid phase microextraction based on micellar desorption followed by LC-DAD-FD for the determination of some endocrine disruptor compounds in environmental liquid samples. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 37 (2014) 1654–1672.
- Aufartová J., Torres-Padron M. E., Sosa-Ferrera Z., Solich P., Santana-Rodríguez J. J. Optimization of an in-tube solid phase microextraction method coupled with HPLC for determination of some oestrogens in environmental liquid samples using different capillary columns. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 92(4) (2012) 382–396.
- Bagheri H., Bayat P., Piri-Moghadam H. Grafting the sol-gel based sorbents by diazonium salts: A novel approach toward unbreakable capillary microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1318 (2013) 58–64.
- Bagheri H., Salemi A. Coupling of a Modified In-Tube Solid Phase Microextraction Technique with High Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detection for the Ultra-Trace Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Samples. *Chromatographia*, 59 (2004) 501–505.
- Boyacı E., Rodríguez-Lafuente A., Gorynski K., Mirnaghi F., Souza-Silva E. A., Hein D., Pawliszyn J. Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: Comparison for challenging cases. *Analytica Chimica Acta*, 873 (2015) 14–30.
- Campíns-Falcó P., Verdú-Andrés J., Sevillano-Cabeza A., Herráez-Hernández R., Molins-Legua C., Moliner-Martínez Y. In-tube solid-phase microextraction coupled by in valve mode to capillary LC-DAD: Improving detectability to multiresidue organic pollutants analysis in several whole waters. *Journal of Chromatography A*, 1217(16) (2010) 2695–2702.
- Campíns-Falcó P., Herráez-Hernández R., Verdú-Andrés J., Cháfer-Pericás C. On-line determination of aliphatic amines in water using in-tube solid-phase microextraction-assisted derivatisation in

- in-valve mode for processing large sample volumes in LC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394(2) (2009) 557–565.
- Campíns-Falcó P., Verdú-Andrés J., Sevillano-Cabeza A., Molins-Legua C., Herráez-Hernández. R. New micromethod combining miniaturized matrix solid-phase dispersion and in-tube in-valve solid-phase microextraction for estimating polycyclic aromatic hydrocarbons in bivalves. *Journal of Chromatography A*, 1211 (2008) 13–21.
- Campíns Falcó P., Coronado Miralles E., Moliner Martínez Y., Prima García H., Ribera Hermano A. Device and method for magnetic in-tube solid-phase microextraction. Patent WO2013011171. 0124; Patent Application Date: 20120716; Priority Application Date: 20110718, 2013.
- Caris J. A., Gonçalves Silva B. J., Dantas Moisés E. C., Lanchote V. L., Costa Queiroz M. E. Automated analysis of lidocaine and its metabolite in plasma by in-tube solid-phase microextraction coupled with LC-UV for pharmacokinetic study. *Journal of Separation Science*, 35(5-6) (2012) 734–741.
- Chaves A. R., Costa Queiroz M.E. In-tube solid-phase microextraction with molecularly imprinted polymer to determine interferon alpha 2a in plasma sample by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1318 (2013a) 43–48.
- Chaves A. R., Queiroz M. E. C. Immunoaffinity in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography with fluorescence detection for determination of interferon α in plasma samples. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 928 (2013b) 37–43.
- Chaves A. R., Silva B. J. G., Lanças F. M., Queiroz M. E. C. Biocompatible in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography-fluorescence detection for determination of interferon α in plasma samples. *Journal of Chromatography A*, 1218(21) (2011) 3376–3381.
- Chen B., Hu B., He M., Mao X., Zu W. Synthesis of mixed coating with multi-functional groups for in-tube hollow fiber solid phase microextraction–high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry speciation of arsenic in human urine. *Journal of Chromatography A*, 1227 (2012) 19–28.
- Delhomme O., Rieb E., Millet M. Solid-Phase Extraction and LC with Fluorescence Detection for Analysis of PAHs in Rainwater. *Chromatographia*, 65 (2007) 163–171.
- Fan Y., Feng Y.-Q., Da S.-L., Wang Z.-H. In-tube solid phase microextraction using a β -cyclodextrin coated capillary coupled to high performance liquid chromatography for determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine samples. *Talanta*, 65(1) (2005) 111–117.
- Eisert R., Pawliszyn J. Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, 69 (1997) 3140–3147.
- Gonçalves Silva B. J., Lanças F. M., Costa Queiroz M. E. Determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma by polypyrrole-coated capillary in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1216(49) (2009) 8590–8597.

- González-Fuenzalida R. A., Moliner-Martínez Y., Prima-García H., Ribera A., Campins-Falcó P., Zaragoza R. J. Evaluation of Superparamagnetic Silica Nanoparticles for Extraction of Triazines in Magnetic in-Tube Solid Phase Microextraction Coupled to Capillary Liquid Chromatography. *Nanomaterials*, 4 (2014) 242–255.
- Guiochon G. Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1168(1-2) (2007) 101–168.
- Harris D. C. *Análisis Químico Cuantitativo*. Reverté, Barcelona, 2007.
- He J., Liu Z., Ren L., Liu Y., Dou P., Qian K., Chen H.-Y. On-line coupling of in-tube boronate affinity solid phase microextraction with high performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry for the determination of cis-diol biomolecules. *Talanta*, 82 (2010) 270–276.
- Hu Y., Song C., Li G. Fiber-in-tube solid-phase microextraction with molecularly imprinted coating for sensitive analysis of antibiotic drugs by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1263 (2012) 21–27.
- Huang J.-F., Feng Y.-Q., Lin X.-H. Determination of five fluoroquinolones in human plasma using polymer monolith microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 44 (2009) 941–945.
- Ishizaki A., Saito K., Kataoka H. Analysis of contaminant polycyclic aromatic hydrocarbons in tea products and crude drugs. *Analytical Methods*, 3 (2011) 299–305.
- Ishizaki A., Saito K., Hanioka N., Narimatsu S., Kataoka H. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography–fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 5555–5563.
- Jiwei H., Xuegang L., Yawen C., Heyou H. Hybrid silica polymeric monolith-based in-tube microextraction and CE for determination of bisphenol A in beverages. *Journal of Separation Science*, 32 (2009) 2759–2766.
- Jornet-Martínez N., Muñoz-Ortuño M., Moliner-Martínez Y., Herráez-Hernández R., Campins-Falcó P. On-line in-tube solid phase microextraction-capillary liquid chromatography method for monitoring degradation products of di-(2-ethylhexyl) phthalate in waters. *Journal of Chromatography A*, 1347 (2014) 157–160.
- Kataoka H., Inoue T., Ikekita N., Saito K. Development of exposure assessment method based on the analysis of urinary heterocyclic amines as biomarkers by on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406 (2014) 2171–2178.
- Kataoka H., Ehara K., Yasuhara R., Saito K. Simultaneous determination of testosterone, cortisol, and dehydroepiandrosterone in saliva by stable isotope dilution on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(1) (2013a) 331–340.

- Kataoka H., Inoue T., Saito K., Kato H., Masuda K. Analysis of heterocyclic amines in hair by on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 786 (2013b) 54–60.
- Kataoka H., Shiba H., Saito K. Automated analysis of oseltamivir and oseltamivir carboxylate in environmental waters by online in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, 4(6) (2012) 1513–1518.
- Kataoka H., Ishizaki A., Nonaka Y., Saito K. Developments and applications of capillary microextraction techniques: A review. *Analytica Chimica Acta*, 655 (2009a) 8–29.
- Kataoka H., Inoue R., Yagi K., Saito K. Determination of nicotine, cotinine, and related alkaloids in human urine and saliva by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49(1) (2009b) 108–114.
- Kataoka H., Itano M., Ishizaki A., Saito K. Determination of patulin in fruit juice and dried fruit samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(18) (2009c) 3746–3750.
- Kumazawa T., Saeki K., Yanagisawa I., Uchigasaki S., Hasegawa C., Seno H., Suzuki O., Sato K. Automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with HPLC/MS/MS for the determination of butyrophenone derivatives in human plasma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394(4) (2009) 1161–1170.
- Li T., Xu J., Wu J.-H., Feng Y.-Q. Liquid-phase deposition of silica nanoparticles into a capillary for in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 2989–2995.
- Lin Z., Wang J., Tan X., Sun L., Yu R., Yang H., Chen G. Preparation of boronate-functionalized molecularly imprinted monolithic column with polydopamine coating for glycoprotein recognition and enrichment. *Journal of Chromatography A*, 1319 (2013a) 141–147.
- Lin Z., Lin Y., Sun X., Yang H., Zhang L., Chen G. One-pot preparation of a molecularly imprinted hybrid monolithic capillary column for selective recognition and capture of lysozyme. *Journal of Chromatography A*, 1284 (2013b) 8–16.
- Lin Z. A., Pang J. L., Lin Y., Huang H., Cai Z. W., Zhang L., Chen G. N. Preparation and evaluation of a phenylboronate affinity monolith for selective capture of glycoproteins by capillary liquid chromatography *Analyst*, 136(16) (2011) 3281–3288.
- Lord H. L. Strategies for interfacing solid-phase microextraction with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1152 (2007) 2–13.
- Ma Q., Chen M., Shi Z.-G., Feng Y.-Q. Preparation of a poly(N-isopropylacrylamide-coethylene dimethacrylate) monolithic capillary and its application for in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, 32(15-16) (2009) 2592–2600.

- Masiá A., Moliner-Martinez Y., Muñoz-Ortuño M., Pico Y., Campíns-Falcó P. Multiresidue analysis of organic pollutants by in-tube solid phase microextraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1306 (2013) 1–11.
- Melo L. P., Queiroz R. H. C., Queiroz M. E. C. Automated determination of rifampicin in plasma samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879(24) (2011) 2454–2458.
- Moliner-Martínez Y., Serra-Mora P., Verdú-Andrés J., Herráez-Hernández R., Campíns-Falcó P. Analysis of polar triazines and degradation products in waters by in-tube solid-phase microextraction and capillary chromatography: an environmentally friendly method. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407 (2015a) 1485–1497.
- Moliner-Martínez Y., Herráez-Hernández R., Verdú-Andrés J., Molins-Legua C., Campíns-Falcó P. Recent advances of in-tube solid-phase microextraction. *TrAC - Trends in analytical chemistry*, 71 (2015b) 205–213.
- Moliner-Martinez Y., Vitta Y., Prima-Garcia H., González-Fuenzalida R. A., Ribera A., Campíns-Falcó P., Coronado E. Silica supported Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction and magnetic in-tube solid-phase microextraction: application to organophosphorous compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406 (2014) 2211–2215.
- Moliner-Martínez Y., Prima-Garcia H., Ribera A., Coronado E., Campíns-Falcó P. Magnetic In-Tube Solid Phase Microextraction. *Analytical Chemistry*, 84(16) (2012) 7233–7240.
- Moliner-Martínez Y., Molins-Legua C., Verdú-Andrés J., Herráez-Hernández R., Campíns-Falcó P. Advantages of monolithic over particulate columns for multiresidue analysis of organic pollutants by in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(37) (2011) 6256–6262.
- Moliner-Martínez Y., Herráez-Hernández R., Molins-Legua C., Campíns-Falcó P. Improving analysis of apolar organic compounds by the use of a capillary titania-based column: Application to the direct determination of faecal sterols cholesterol and coprostanol in wastewater samples. *Journal of Chromatography A*, 1217(28) (2010) 4682–4687.
- Muñoz-Ortuño M., Argente-García A., Moliner-Martínez Y., Verdú-Andrés J., Herráez-Hernández R., Picher M. T., Campíns-Falcó P. A cost-effective method for estimating di(2-ethylhexyl)phthalate in coastal sediments. *Journal of Chromatography A*, 1324 (2014) 57–62.
- Muñoz-Ortuño M., Moliner-Martínez Y., Cogollos-Costa S., Herráez-Hernández R., Campíns-Falcó P. A miniaturized method for estimating di(2-ethylhexyl) phthalate in bivalves as bioindicators. *Journal of Chromatography A*, 1260 (2012) 169–173.

- Nonaka Y., Saito K., Hanioka N., Narimatsu S., Kataoka H. Determination of aflatoxins in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(20) (2009) 4416–4422.
- Orlandini S., Pinzauti S., Furlanetto S. Application of quality by design to the development of analytical separation methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405 (2013) 443–450.
- Pan J., Huang Y., Liu L., Hu Y., Li G. A novel fractionized sampling and stacking strategy for online hyphenation of solid-phase-based extraction to ultra-high performance liquid chromatography for ultrasensitive analysis. *Journal of Chromatography A*, 1316 (2013) 29–36.
- Poorahong S., Thammakhet C., Thavarungkul P., Kanatharana P. Online in-tube microextractor coupled with UV-Vis spectrophotometer for bisphenol A detection. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 48 (2013) 242–250.
- Prieto-Blanco M. C., Moliner-Martinez Y., Campíns-Falcó P. Combining poly(dimethyldiphenylsiloxane) and nitrile phases for improving the separation and quantitation of benzalkonium chloride homologues: In-tube solid phase microextraction–capillary liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry for analyzing industrial samples. *Journal of Chromatography A*, 1297 (2013a) 226–230.
- Prieto-Blanco M. C., Y. Moliner-Martínez, P. López-Mahía, P. Campíns-Falcó, Determination of carbonyl compounds in particulate matter PM_{2.5} by in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography/mass spectrometry. *Talanta*, 115 (2013b) 876–880.
- Prieto-Blanco M. C., Moliner-Martínez Y., López-Mahía P., Campíns-Falcó P. Ion-pair in-tube solid-phase microextraction and capillary liquid chromatography using a titania-based column: Application to the specific lauralkonium chloride determination in water. *Journal of Chromatography A*, 1248 (2012) 55–59.
- Prieto-Blanco M. C., López-Mahía P., Campíns-Falcó P. On-line analysis of carbonyl compounds with derivatization in aqueous extracts of atmospheric particulate PM₁₀ by in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(30) (2011) 4834–4839.
- Prieto-Blanco M. C., López-Mahía P., Campíns-Falcó P. In-Tube Solid-Phase Microextraction and Liquid Chromatography Using a Monolithic Column for the Selective Determination of Residual Ethylenediamine in Industrial Cationic Polymers. *Analytical Chemistry*, 81(14) (2009) 5827–5832.
- Queiroz M. E. C., Melo L. P. Selective capillary coating materials for in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography to determine drugs and biomarkers in biological samples: A review. *Analytica Chimica Acta*, 826 (2014) 1–11.
- Saito K, Ikeuchi R, Kataoka H. Determination of ochratoxins in nuts and grain samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1220 (2012) 1–6.

- Saito K., Uemura E., Ishizaki A., Kataoka H. Determination of perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 658(2) (2010a) 141–146.
- Saito K., Yagi K., Ishizaki A., Kataoka H. Determination of anabolic steroids in human urine by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52(5) (2010b) 727–733.
- Vitta Y., Moliner-Martínez Y., Campíns-Falcó P., Cuervo A. F. An in-tube SPME device for the selective determination of chlorophyll a in aquatic systems. *Talanta*, 82 (2010) 952–956.
- Wang X., Li X., Li Z., Zhang Y., Bai Y., Liu H. Online Coupling of In-Tube Solid-Phase Microextraction with Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry for Rapid Determination of Triazine Herbicides in Water Using Carbon-Nanotubes-Incorporated Polymer Monolith. *Analytical Chemistry*, 86 (2014a) 4739–4747.
- Wang T.-T., Chen Y.-H., Ma J.-F., Hu M.-J., Li Y., Fang J.-H., Gao H.-Q. A novel ionic liquid-modified organic-polymer monolith as the sorbent for in-tube solid-phase microextraction of acidic food additives. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406 (2014b) 4955–4963.
- Wang Y., Liu Z. Determination of 5 new abused drugs in plasma by in tube solid phase microextraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Yiyao Daobao*, 33 (2014c) 575–578.
- Wang X., Ma Q., Li M., Chang C., Bai Y., Feng Y., Liu H. Automated and sensitive analysis of 28-epihomobrassinolide in *Arabidopsis thaliana* by on-line polymer monolith microextraction coupled to liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1317 (2013) 121–128.
- Wang S.-T., Wang M.-Y., Su X., Yuan B.-F., Feng Y.-Q. Facile Preparation of SiO₂/TiO₂ Composite Monolithic Capillary Column and Its Application in Enrichment of Phosphopeptides. *Analytical Chemistry*, 84(18) (2012) 7763–7770.
- Wu J.-H., Zhao Y., Li T., Xu C., Xiao K., Feng Y.-Q., Guo L. The use of liquid phase deposition prepared phosphonate grafted silica nanoparticle-deposited capillaries in the enrichment of phosphopeptides. *Journal of Separation Science*, (2010) 1806–1815.
- Xia Z., Gan T., Chen H., Lv R., Wei W., Yang F. A new open tubular capillary microextraction and sweeping for the analysis of super low concentration of hydrophobic compounds. *Journal of Separation Science*, 33(20) (2010) 3221–3230.
- Xu H., Jia L. Capillary liquid chromatographic analysis of fat-soluble vitamins and β -carotene in combination with in-tube solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877(1+2) (2009) 13–16.
- Yan X., Wu D., Meng H., Hao L., Ding K., Guan Y. Further investigation of array capillary in-tube solid-phase microextraction of trace organic pollutants in water samples. *Analytical Methods*, 6 (2014) 750–757.

- Yan X., Wu D., Peng H., Ding K., Duan C., Guan Y. Array capillary in-tube solid-phase microextraction: A rapid preparation technique for water samples. *Journal of Chromatography A*, 1244 (2012) 69–76.
- Yang Y., Rodriguez-Lafuente A., Pawliszyn J. Thermoelectric-based temperature controlling system for in-tube solid-phase microextraction. *Journal of Separation Science*, 37 (2014) 1617–1621.
- Yang Y., Lord H., Pawliszyn J. A new strategy to eliminate sample mixing during in-tube solid phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1318 (2013) 12–21.
- Yasuhara R., Ehara K., Saito K., Kataoka H. Automated analysis of salivary stress-related steroid hormones by online in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, 4(11) (2012) 3625–3630.
- Yu Q., Wang X., Ma Q., Yuan B., He H., Feng Y. Automated analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in human plasma and water samples by in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry based on a poly(4-vinylpyridine-coethylene dimethacrylate) monolith. *Analytical Methods*, 4(6) (2012) 1538–1545.
- Yu Q., Ma Q., Feng Y. Temperature-response polymer coating for in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. *Talanta*, 84(4) (2011) 1019–1025.
- Zarejousheghani M., Möder M., Borsdorf H. A new strategy for synthesis of an in-tube molecularly imprinted polymer-solid phase microextraction device: Selective off-line extraction of 4-nitrophenol as an example of priority pollutants from environmental water samples. *Analytica Chimica Acta*, 798 (2013) 48–55.
- Zhang W., Zhang Z., Meng J., Zhou W., Chen Z. Adsorptive behavior and solid-phase microextraction of bare stainless steel sample loop in high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1365 (2014) 19–28.
- Zhang W., Zhang J., Bao T., Zhou W., Meng J., Chen Z. Universal Multilayer Assemblies of Graphene in Chemically Resistant Microtubes for Microextraction. *Analytical Chemistry*, 85 (2013a) 6846–6854.
- Zhang W., Chen Z. Mussel inspired polydopamine functionalized poly(ether ether ketone) tube for online solid-phase microextraction-high performance liquid chromatography and its application in analysis of protoberberine alkaloids in rat plasma. *Journal of Chromatography A*, 1278 (2013b) 29–36.
- Zhang S., Jia L., Wang S. Determination of β -Carotene in Corn by In-Tube SPME Coupled to Micro-LC. *Chromatographia*, 72 (2010a) 1231–1233.
- Zhang S. W., Zou C. J., Luo N., Weng Q. F., Cai L. S., Wu C. Y., Xing J. Determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by capillary electrophoresis with molecularly imprinted monolith in-tube solid phase microextraction. *Chinese Chemical Letters*, 21(1) (2010b) 85–88.

Zhang S.-W., Xing J., Cai L.-S., Wu C.-Y. Molecularly imprinted monolith in-tube solid-phase microextraction coupled with HPLC/UV detection for determination of 8-hydroxy-2' deoxyguanosine in urine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(2) (2009) 479–487.

Zheng M.-M., Wang S.-T., Hu W.-K., Feng Y.-Q. In-tube solid-phase microextraction based on hybrid silica monolith coupled to liquid chromatography–mass spectrometry for automated analysis of ten antidepressants in human urine and plasma. *Journal of Chromatography A*, 1217(48) (2010) 7493–7501.

Zheng M.-M., Ruan G.-D., Feng Y.-Q. Evaluating polymer monolith in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry for reliable quantification and confirmation of quinolone antibacterials in edible animal food. *Journal of Chromatography A*, 1216(44) (2009) 7510–7519.

Zheng M.-M., Lina B., Feng Y.-Q. Hybrid organic–inorganic octyl monolithic column for in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1164 (2007) 48–55.

**CAPÍTULO 4. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE
HAP EN AGUA DE LLUVIA MEDIANTE IT-SPME**

Publicación:

M. Fernández-Amado, M.C. Prieto-Blanco, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez. A novel and cost-effective method for determination of fifteen polycyclic aromatic hydrocarbons in low volume rainwater samples. *Talanta* 155, Agosto 2016, 175–184.

Congresos:

M. Fernández Amado, M.C. Prieto-Blanco P. López-Mahía, S. Muniategui Lorenzo, D. Prada Rodríguez. Development of a selective method based on in-tube solid phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography for ultratrace analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in rainwater. Comunicación póster. *XIII Reunión Científica de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines (SECyTA 2013)*. Tenerife (España) 8-11 Octubre, 2013.

D. Prada-Rodríguez, S. Iglesias Samitier, G. Grueiro Noche, M. Fernández-Amado, M. Piñeiro-Iglesias, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía. Total flux deposition of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in several stations in Galicia (NW Spain). Comunicación póster. *25th International Symposium on Polycyclic Aromatic Compounds (ISPAC 2015)*. Burdeos (Francia) 13-17 Septiembre, 2015.

4.1. ANTECEDENTES DE LA DETERMINACIÓN DE HAP EN AGUA DE LLUVIA Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En este capítulo se presenta el desarrollo y validación de un método que combina *on-line* la IT-SPME con HPLC con detección de fluorescencia (FLD) para el análisis de 15 hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras acuosas a nivel ultratrazo.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) se encuentran en diversas matrices medioambientales (aguas, aire y suelos) en concentraciones muy bajas, a nivel traza o ultratrazo. En la atmósfera, en concreto, los HAP se encuentran tanto en la fase gaseosa como adsorbidos al material particulado atmosférico, así como en el agua de lluvia, aunque debido a su baja solubilidad en agua en esta última matriz las concentraciones son particularmente bajas. Por este motivo es necesario utilizar métodos muy sensibles para la determinación de HAP en este tipo de muestras. En general estos métodos incluyen varias etapas (extracción, hidrólisis, limpieza, concentración), necesarias para alcanzar los requisitos de sensibilidad y selectividad de este análisis. Para muestras líquidas los métodos más comunes suelen incluir una extracción (extracción líquido-líquido [LLE] o extracción en fase sólida [SPE]), una etapa de limpieza y otra de concentración del extracto, además de la determinación cromatográfica. Estos métodos con varias etapas suelen implicar un consumo elevado de disolventes y tratamientos largos que favorecen las posibles pérdidas de analitos, multiplicando las opciones de error [Šimko, 2002; Wolska *et al.*, 2005].

La SPE suele llevarse a cabo con cartuchos C₁₈ para extraer los HAP y una posterior elución con tetrahidrofurano o diclorometano. Este último disolvente también es el más utilizado en las extracciones líquido-líquido, aunque algunos autores usan hexano [Sahu *et al.*, 2004]. Takagai *et al.* (2002) llevan a cabo una LLE homogénea, añadiendo un tensioactivo perfluorado (perfluorooctanoato) para extraer los HAP. En los últimos años hay un aumento de las versiones miniaturizadas de ambas extracciones, la SPME y la microextracción líquido-líquido (LLME, *Liquid-Liquid MicroExtraction*). En la SPME predomina la modalidad de fibra acoplada a GC-MS, aunque Bourdat-Deschamps *et al.* (2007) emplean la SBSE (*Stir-Bar Sorptive Extraction*, extracción por sorción con barra agitadora), con desorción usando acetonitrilo para determinación por HPLC-FLD. En cuanto a la LLME, se encuentran diferentes modalidades en la bibliografía, incluyendo la de fibra hueca con membrana (HFM, *Hollow Fiber Membrane*) [Basheer *et al.*, 2003], usando líquidos iónicos [Xiao *et al.*, 2012; Pena *et al.*, 2009] o dispersiva [Pena *et al.*, 2009; Guo y Lee, 2011a].

En algunos métodos, los HAP se recogen reteniéndolos en una resina de Amberlita® XAD-2, por lo que posteriormente la muestra debe tratarse como un sólido, empleando extracción Soxhlet [Poster *et al.*, 1996a; Poster *et al.*, 1996b; Park *et al.*, 2001], asistida por ultrasonidos [Birgül *et al.*, 2011] o acelerada con disolventes (ASE, *Accelerated Solvent Extraction*) [Olivella, 2006].

En cuanto a la determinación, predomina la cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC-MS), seguida por HPLC con detección de fluorescencia.

Muy pocos autores proponen técnicas alternativas como la electroforesis capilar [Takagai *et al.*, 2002] o la espectrometría de masas láser de dos pasos (L2MS), que consiste en desorber los analitos de la superficie de la muestra congelada y posteriormente ionizarlos para proceder a su análisis en un espectrómetro de masas con tiempo de vuelo (*Time-Of-Flight Mass Spectrometry*, TOF-MS) [Bucheli *et al.*, 2000].

En la Tabla 4 se muestran datos relevantes sobre diversos métodos de determinación de HAP en agua de lluvia publicados en la bibliografía, indicando el número de HAP que se analizan, los límites de detección alcanzados, el volumen consumido tanto de muestra como de disolventes orgánicos, y las técnicas de preparación y determinación empleadas, así como las etapas que incluye el tratamiento de muestra. Como ya se ha comentado, las técnicas de preparación de muestra, además de SPE y LLE, incluyen sus versiones miniaturizadas SPME y LLME, mientras que en la determinación destacan la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y la cromatografía de líquidos de alta resolución con detección de fluorescencia. Los límites de detección se encuentran en el rango 0,01-1300 ng/L, siendo inferiores a 220 ng/L para la mayoría de los métodos, que usan GC-MS o HPLC-FLD en la determinación. De todos modos, es necesario señalar que a pesar de ofrecer límites a nivel ultratrazo, los métodos recogidos en la tabla no proporcionan ningún tipo de información acerca del control de blancos, que resulta fundamental al trabajar a esas concentraciones a nivel ultratrazo.

Tabla 4. Características de los métodos publicados para determinación de HAP en agua de lluvia (continúa).

HAP ^a	V (mL) muestra	Etapas y tiempo	Dis. org. (mL) ^b	Técnica		LD (ng/L)	Ref.
				prepar.	determ.		
18 (15)	10	1. Extracción con modificador, disolvente extractante y dispersante 2. Refrigeración en baño de hielo (2 min) 3. Centrifugación (5 min) 4. Recogida del extracto orgánico	2,5	DLLME con líquido iónico	HPLC-FLD	0,1-7*	Pena <i>et al.</i> , 2009
17 (15)	50	1. SPE (46 min) 2. Evaporación en rotavapor 3. Redisolución	25	SPE	HPLC-FLD	0,2-16,9	Delhomm e <i>et al.</i> , 2007
16 (16)	3000-8000	1. SPE (100-260 min) 2. Concentración en rotavapor y corriente de N ₂ 3. Purificación por cromatografía líquido-sólido 4. Concentración en corriente de N ₂ 5. Redisolución	85 mín.	SPE (fase disuelta), Soxhlet (partículas)	GC-MS	0,01-1,0	Huang <i>et al.</i> , 2009
16 (16)	50	1. SPE (15 min para el secado) 2. Concentración en corriente de N ₂ 3. Redisolución	16	SPE	HPLC-UV y FLD	0,03-36	Kiss <i>et al.</i> , 1996
16 (16)	10	1. Extracción con sales disueltas y ajuste de pH (75 min)	-	SPME	GC-MS	1-41	Rianawati <i>et al.</i> , 2009

^aEntre paréntesis, nº HAP EPA; ^bConsumo de disolventes orgánicos por muestra; prepar.: preparación; determ.: Determinación; LD: Límite de detección; *Límite de cuantificación; DLLME: Microextracción líquido-líquido dispersiva.

Tabla 4. Características de los métodos publicados para determinación de HAP en agua de lluvia.

HAP ^a	V (mL) muestra	Etapas y tiempo	Dis. org. (mL) ^b	Técnica		LD (ng/L)	Ref.
				prepar.	determ.		
16 (16)	200	1. LLE (× 3) 2. Filtración para eliminar el agua 3. Concentración en corriente de N ₂ 4. Redisolución	60	LLE	GC-MS	1,42-31,4	Istenic <i>et al.</i> , 2011
16 (16)	10	1. Extracción con sales disueltas y ajuste de pH (60 min)	-	SPME	GC-MS	2,67-18,02	Anil <i>et al.</i> , 2013
16 (16)	5	1. Extracción con dispersante y disolvente de extracción (2 min) 2. Demulsificación con adición de disolvente 3. Recogida del extracto orgánico	1,05	DLLME	GC-MS	3,7-39,1	Guo y Lee, 2011a
16 (16)	100	1. Extracción con sales y disolvente orgánico (30 min) 2. Recogida del extracto orgánico	1	LLME	GC-MS	4-18*	Guidotti <i>et al.</i> , 2000
16 (16)	1000	1. Extracción líquido-líquido 2. Concentración con rotavapor y corriente de N ₂ 3. Purificación por SPE	n.e.	LLE	HPLC-FLD	10*	Sablayrolles <i>et al.</i> , 2011
16 (16)	1000	1. Extracción líquido-líquido (30 min) 2. Evaporación del extracto 3. Redisolución	1,5	LLME	HPLC-FLD y UV	30-220 (22500 para Acy)	Vinci <i>et al.</i> , 2013
16 (15)	5	1. Extracción con sales disueltas (30 min)	0,005	HFM-LPME	GC-MS	2-47	Basheer <i>et al.</i> , 2003
9 (6)	0,2	-	-	Se congela la muestra	L2MS	200-1300	Bucheli <i>et al.</i> , 2000
5 (2)	40	1. Extracción líquido-líquido 2. Separación de las fases (30 min) 3. Recogida del extracto orgánico	2,53	LLE homogénea	CE (MEKC)	32-805	Takagai e Igarashi, 2002
4 (4)	5	1. Extracción con sales disueltas (25 min)	-	SPME	GC-MS	1-3	Bagheri y Roostaie, 2012
3 (3)	5	1. Extracción con líquido iónico (60 min) 2. Agitación en US 3. Dilución del extracto	0,2	ME líq. Iónica	HPLC-FLD	30-100	Xiao <i>et al.</i> , 2012

^aEntre paréntesis, n° HAP EPA; ^bConsumo de disolventes orgánicos por muestra; prepar.: preparación; determ.: Determinación; LD: Límite de detección; *Límite de cuantificación; n.e.: no especificado. DLLME: Microextracción líquido-líquido dispersiva, HFM-LPME: Microextracción en fase líquida con fibra hueca con membrana, L2MS: Espectrometría de masas láser de dos pasos, MEKC: Cromatografía electrocinética micelar.

No todos los niveles publicados en la bibliografía de HAP en agua de lluvia (Tabla 5) son igualmente representativos, ya que si bien algunos estudios abarcan un número grande de muestras (que debería ser representativo de las concentraciones reales de la zona) también hay algunos trabajos en los que se analizan pocas muestras, para validar el método. En esos casos los niveles deben considerarse únicamente resultados preliminares de la contaminación de la zona y aportan solo información puntual.

Tabla 5. Niveles de HAP encontrados en agua de lluvia de diferentes lugares (continúa).

HAP ^a	nº muestras	Lugar	Año	Niveles individuales (ng/L)	Suma HAP		Referencia
					Rango (ng/L)	Media (ng/L)	
20 (16)	n.e. (nº elevado)	Texas (EEUU)	1995-1996	n.e.	50-312	n.e.	Park <i>et al.</i> , 2001
19 (16)	12	Brisbane (Australia)	2007-2008	10-39	n.e.	n.e.	Huston <i>et al.</i> , 2009
18 (15)	1	Galicia (España)	n.e.	7,1-110,6	n.e.	171,3	Peña <i>et al.</i> , 2009
17 (15)	1	Minnesota (EEUU)	1991	0,4-24,5	n.e.	81	Franz y Eisenreich, 1998
17 (15)	52*	Estrasburgo y Erstein (Francia)	2002-2003	1,6-968,1	103,7-1981,3	n.e.	Delhomme <i>et al.</i> , 2007
17 (15)	90*	Estrasburgo y Erstein (Francia)	2002-2003	0,15-1596,45	0,02-5519,4	366,4 (Erstein) y 3259,9 (Estrasburgo)	Delhomme <i>et al.</i> , 2008
16 (n.e.)	3	Los Angeles (EEUU)	1981-1982	n.e.	50-100	n.e.	Kawamura y Kaplan, 1983
16 (16)	2	Veszprém (Hungría)	1994	3,9-1000	1142-1346	n.e.	Kiss <i>et al.</i> , 1996
16 (16)	60	Gdansk (Polonia)	1995-1997	0,05-12800	0,01-12,8 × 10 ³	n.e.	Polkowska <i>et al.</i> , 2000
16 (16)	30	Rieti (Italia)	1997	n.e.	43-1095	n.e.	Guidotti <i>et al.</i> , 2000
16 (16)	200*	Gdańsk-Sopot-Gdynia (Polonia)	1998-1999	0,72-265	n.e.	79-891	Grynkiewicz <i>et al.</i> , 2002
16 (16)	13 (6 eventos)	Pekín (China)	2006	1,2-425,5	n.e.	448	Zhang <i>et al.</i> , 2008a-b
16 (16)	40	Singapur	2005-2006	22-806	375-4239	2408	Rianawati <i>et al.</i> , 2009
16 (16)	20	Guangzhou (China)	2007	31,2-478	1264-6614	1915	Huang <i>et al.</i> , 2009
16 (16)	32	Singapur	2007-2008	3,83-423,4	n.e.	1218,1	He <i>et al.</i> , 2010
16 (16)	n.e.	Teherán (Irán)	n.e.	10-76 × 10 ³	372-527 × 10 ³	n.e.	Zahed <i>et al.</i> , 2010
16 (16)	19	BUTAL (Turquía)	2008-2009	5,12-293,33	n.e.	955	Birgül <i>et al.</i> , 2011
16 (16)	3	Singapur	n.e.	10-610	1160-1310	n.e.	Guo <i>et al.</i> , 2011a
16 (16)	12	Roma (Italia)	2011-2012	0,45-95,16	37,65-228,5	n.e.	Vinci <i>et al.</i> , 2013
16 (15)	6	Singapur	2001-2002	5-165	414-673	n.e.	Basheer <i>et al.</i> , 2003

^aEntre paréntesis, nº HAP EPA. n.e.: no especificado; * número aproximado.

Tabla 5. Niveles de HAP encontrados en agua de lluvia de diferentes lugares.

HAP ^a	nº muestras	Lugar	Año	Niveles individuales (ng/L)	Suma HAP		Referencia
					Rango (ng/L)	Media (ng/L)	
16 (15)	50 puntos de muestreo	Lucknow (India)	2005	1,61-1242,31	19,32-11112,09	2240,3	Malik et al., 2007
15 (15)	10	Lago Maggiore (Italia)	2003	n.e.	n.e.	103	Olivella, 2006
15 (15)	6	Feucherolles (Francia)	2006	1,4-28,1	31-105,1	n.e.	Bourdat-Deschamps et al., 2007
15 (15)	65	Brno (Rep. Checa)	2006-2008	0,73-23,0	2,8-571	93	Skrdliková et al., 2011
15 (13)	n.e.	Shanghai (China)	2009	n.e.	n.e.	481	Li et al., 2011
15 (13)	163	Shanghai (China)	2009	5,1-108,7	74-980	481	Yan et al., 2012
14 (14)	n.e. (nº elevado)	Cuenca del río Seine (Francia)	1999-2003	n.e.	6-1215	n.e.	Blanchard et al., 2007
14 (12)	5	Bahía Chesapeake (EEUU)	1992	0,5-6	n.e.	n.e.	Poster et al., 1996a-b
13 (13)	38	Lago Balaton (Hungría)	1995-1996	0,4-475	156-1993	n.e.	Kiss et al., 2001
13 (13)	4 muestras compuestas	Ankara (Turquía)	2000-2001	0,760-687,2	551,5-2415,9	n.e.	Gaga y Tuncel, 2003
13 (13)	50	Monte Taishan (China)	2005-2007	1,76-33,31	n.e.	81,16	Wang et al., 2010
11 (11)	1 evento, 2 muestras, 8 fracciones	Rotterdam (Holanda)	1983	7-180	380-684	n.e.	Van Noort y Wondergem, 1985
10 (9)	n.e. (nº pequeño)	Tokushima (Japón)	n.e.	2-7 x 10 ³	n.e.	n.e.	Liu et al., 2001
9 (6)	1	Dübendorf (Suiza)	1999	n.e.	5-10 x 10 ³	n.e.	Bucheli et al., 2000
8 (8)	30	Bombay (India)	2001	1,8-440,9	84,25-777,49	n.e.	Sahu et al., 2004
7 (7)	2 eventos, 2 muestras, 7 fracciones	Leidschendam (Holanda)	1982	6-2000	47-4745	n.e.	Van Noort et al., 1985

^aEntre paréntesis, nº HAP EPA. n.e.: no especificado; * número aproximado

Las concentraciones de los HAP individuales son en general del orden de partes por trillón (ppt, ng/L). Sin embargo, hay un par de casos en la bibliografía consultada con concentraciones más elevadas: 2-7 µg/L en Tokushima (Japón) [Liu y Korenaga, 2001] y 10-76 µg/L en Teherán (Irán) [Zahed *et al.*, 2010]. En el caso de Teherán, los autores explican que la elevada contaminación se debe a que la ciudad tiene un número muy elevado de habitantes (alrededor de 8,5 millones en 2010) y las emisiones de los vehículos son muy altas por el bajo precio de los combustibles y la presencia de motores poco eficientes. Además, en ese trabajo en el muestreo solo se recoge el agua de lluvia durante la primera hora del evento, lo que reduce el efecto de dilución y provoca concentraciones más altas de las que se encuentran en muestreos más prolongados.

Respecto a las concentraciones totales de HAP, no se pueden comparar de forma exhaustiva debido a que no todos los trabajos determinan el mismo número de HAP ni los mismos compuestos, aunque la suma (Σ HAP) suele estar entre 30 y 1×10^4 ng/L. Algunos autores determinan también los HAP en niebla y nieve, con valores de concentración en general algo superiores a los del agua de lluvia [Franz y Eisenreich, 1998; Li *et al.*, 2011].

En cuanto a la distribución, los HAP mayoritarios son el fluoranteno, el fenantreno y el pireno, tanto en la fracción disuelta del agua de lluvia como la fracción asociada a las partículas en suspensión. El naftaleno también es uno de los HAP que aparecen con mayor concentración en varios estudios [Kiss *et al.*, 1996; Basheer *et al.*, 2003; Delhomme *et al.*, 2008; Rianawati *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2011a], aunque no se determina en todos los métodos, probablemente debido a que su volatilidad dificulta su análisis con buenas recuperaciones.

En los trabajos en los que se analiza tanto la fracción disuelta como la materia particulada, los HAP suelen estar asociados mayoritariamente a las partículas en suspensión, en especial los más pesados [Poster *et al.*, 1996; Birgül *et al.*, 2011]. Por otra parte, los HAP en agua de lluvia siguen tendencias estacionales, con valores más altos en invierno que en verano. Esta tendencia se puede justificar por el mayor uso de las calefacciones, el aumento de emisiones de los vehículos debido a las bajas temperaturas y las peores condiciones para la dispersión de contaminantes en la atmósfera que hay durante el invierno.

Se ha documentado que la lluvia provoca un efecto lavado de los HAP de la atmósfera, lo que implica que las concentraciones en el agua de lluvia recogida van disminuyendo durante un evento de precipitación y también en eventos consecutivos, diluyendo la muestra recogida cuanto mayor sea su volumen [Bucheli *et al.*, 2000]. Por este motivo, podría ser de gran interés analizar muestras recogidas durante periodos de tiempo más cortos de lo habitual (diarias en lugar de mensuales), si bien muchos de los métodos de análisis empleados habitualmente en esta determinación requieren un volumen relativamente grande de muestra que podría no alcanzarse en un muestreo corto y/o con poca intensidad de precipitación.

El objetivo que se plantea en este capítulo es el desarrollo de un método analítico que permita la determinación de 15 HAP prioritarios de la EPA a nivel ultratrazo en muestras acuosas ambientales. El método debe combinar IT-SPME con HPLC-FLD para obtener la sensibilidad deseada con una única etapa y un consumo bajo tanto de disolventes orgánicos como de muestra, para poder aplicarlo (entre otras aguas ambientales) al análisis de muestras de agua de lluvia recogidas en periodos cortos.

4.2. METODOLOGÍA

El sistema cromatográfico empleado (Waters, Mildford, Massachusetts, EEUU) consta de un módulo 2695 Alliance, con dos detectores en serie, un detector de matriz de diodos (Waters 996, *Photodiode Array Detector*) y un detector de fluorescencia (Waters 474, *Scanning Fluorescence Detector*), además del software Empower 2.0. El equipo cuenta con un inyector automático, en el que no es posible colocar el capilar de extracción. Por este motivo, para llevar a cabo el procedimiento de IT-SPME se acopla un inyector manual (Rheodyne, modelos 7125 y 7725i) entre el inyector automático y la columna. En esta válvula externa se sustituye el bucle de inyección por un capilar, empleando conexiones de PEEK (*PolyEther Ether Ketone*, poliéter éter cetona) de 2,5 cm y 1/16 pulgadas en cada uno de los extremos del capilar. Un tubo de PEEK de 535 μm de diámetro interno es adecuado para los capilares empleados. Las conexiones se completan con ferrules, conectores y tuercas de acero inoxidable normales de 1/16 pulgadas.

Para la separación cromatográfica se utilizó una columna Waters® PAH C₁₈ (250 × 4,6 mm i.d., 5 μm). Esta columna está patentada para el análisis de estos compuestos y su fase posiblemente debe contener grupos fenilo en su cadena funcionalizada o cadenas C₁₈ poliméricas [Lee, 1995]. Para la identificación de los picos se emplea el detector de fotodiodos (DAD, *Diode Array Detector*), en el que se recogen datos entre 210 y 400 nm, con resolución 1,2 nm. La cuantificación se realiza con el detector de fluorescencia.

El capilar utilizado en IT-SPME es un tramo de 70 cm de una columna capilar de cromatografía de gases TRB-5 (Teknokroma, Barcelona, España), con fase entrecruzada y químicamente ligada de composición 95% dimetil-5% difenilpolisiloxano, con 3 μm de espesor. El diámetro interno es 0,32 mm.

Para llevar a cabo las inyecciones, se realiza la programación de la inyección en el software desde la opción de inyección automática, indicando al instrumento que inyecte un volumen de 0 μL del vial de acetonitrilo colocado en el muestreador automático. Antes de lanzar la secuencia, se realiza la inyección manual, con el inyector en posición de carga. A continuación, se indica al software que comience el análisis y se cambia a posición de inyección (para que la fase móvil comience a pasar por el capilar y desorba los analitos retenidos, introduciéndolos en el sistema cromatográfico) justo cuando el instrumento indica "*Gradient started*". Solo cuando el análisis finaliza se vuelve a colocar el inyector en posición de carga.

Para el paso de las muestras y disolventes a través del capilar se han empleado las siguientes jeringas en función del volumen: Hamilton 702 (25 µL) y 1002 TLL (2,5 mL) (Hamilton, Bonaduz, Suiza) y una jeringa de 5 mL completamente de vidrio (Ruthe, Portugal).

Los disolventes empleados son: acetonitrilo J. T. Baker (Phillipsburg, EEUU) de grado Ultra Gradiente HPLC, acetonitrilo Scharlau (Barcelona, España) de grado Supragradiente y acetonitrilo Merck (Darmstadt, Alemania) de grado Gradiente para cromatografía de líquidos; metanol de calidad gradiente HPLC (Romil, Cambridge, Reino Unido); 2-propanol de grado HPLC (Panreac, Barcelona, España) y tetrahidrofurano para cromatografía en fase líquida (Merck, Darmstadt, Alemania). Antes de su uso, los disolventes se filtran a través de filtros de PTFE de 0,45 µm (Teknokroma, Barcelona, España). El agua empleada en la fase móvil es de calidad Milli-Q, filtrada diariamente a través de filtros de nylon de 0,20 µm (Millipore, Darmstadt, Alemania). Las muestras y patrones se conservan en viales de vidrio color ámbar, de 2 mL con tapones con septum de PTFE/silicona (Waters, Mildford, Massachusetts, EEUU) y de 7 mL y de 22 mL con tapones con recubrimiento de PTFE (Supelco, Steinheim, Alemania).

El material de vidrio se lava en detergente alcalino durante 24 h y posteriormente se enjuaga con abundante agua de grifo, seguido de agua Milli-Q y finalmente acetonitrilo. Los viales nuevos se enjuagan de forma secuencial con hexano, acetona, tetrahidrofurano, metanol y agua Milli-Q. Posteriormente se secan en la estufa antes de su uso.

Para la preparación de las disoluciones patrón de los analitos se emplea una disolución en acetonitrilo *PAH Calibration Mix* (Supelco, Bellafonte, EEUU), que contiene los 15 HAP objeto de estudio: naftaleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno e indeno(1,2,3-cd)pireno, con una concentración de 10 µg/mL para cada uno de ellos. El acenaftileno, también incluido en la mezcla, no se considera por ser débilmente fluorescente. A partir de la disolución comercial se prepara una disolución de 200 ng/mL en acetonitrilo, que se usa para preparar diariamente el resto de disoluciones de trabajo, que se conservan a -18°C. El 2-metilnaftaleno (97,0% de pureza), evaluado como patrón interno, se obtuvo de Chem Service (West Chester, Nueva York, EEUU).

Para la optimización de la filtración de las muestras se probaron los siguientes filtros: OlimPeak® de PTFE (politetrafluoroetileno, 0,45 µm, 13 mm) de Teknokroma (Barcelona, España), Discmic®-13HP (hidrofílicos) de PTFE (0,50 µm, 13 mm) de Advantec MFS (Dublin, California, EEUU), Iso-Disc® N-13-2 de nylon (0,2 µm, 13 mm) de Supelco (Steinheim, Alemania) y Millex®-HV de PVDF (fluoruro de polivinilideno, 0,45 µm, 33 mm) de Millipore (Darmstadt, Alemania). Las muestras de mayor volumen se filtran a través de filtros de cuarzo precalcinado MK360 de 4,7 cm de diámetro (Munktell, Falun, Suecia).

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

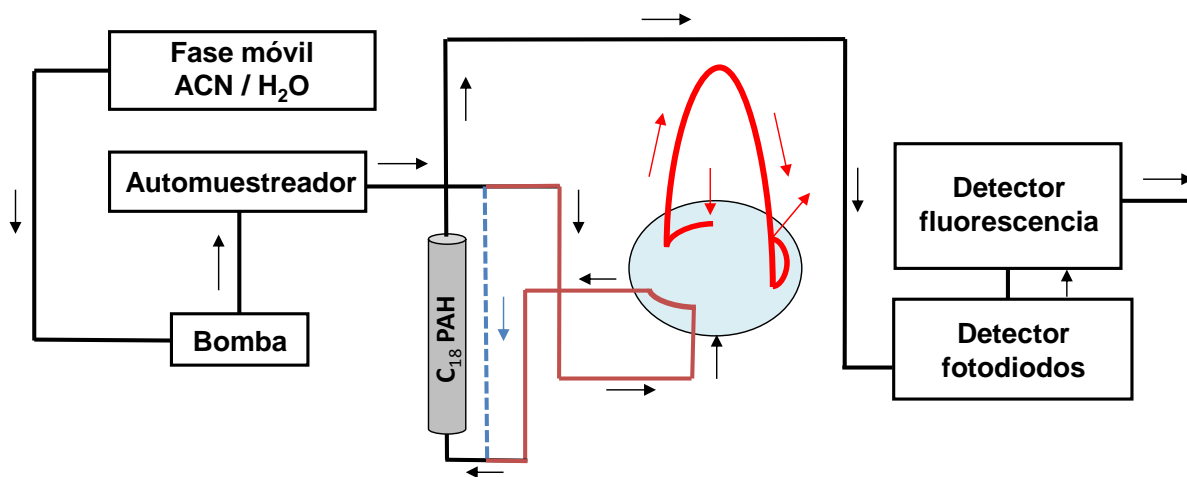
4.3.1. OPTIMIZACIÓN DE IT-SPME

En este apartado se presenta la selección previa de condiciones de trabajo (configuración de IT-SPME y gradiente cromatográfico), así como la optimización de las condiciones de la microextracción en fase sólida *in-tube*.

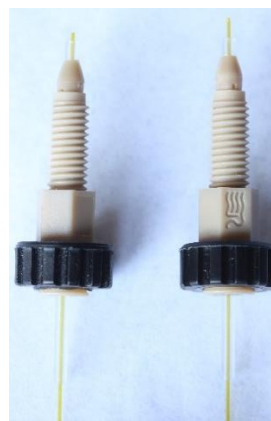
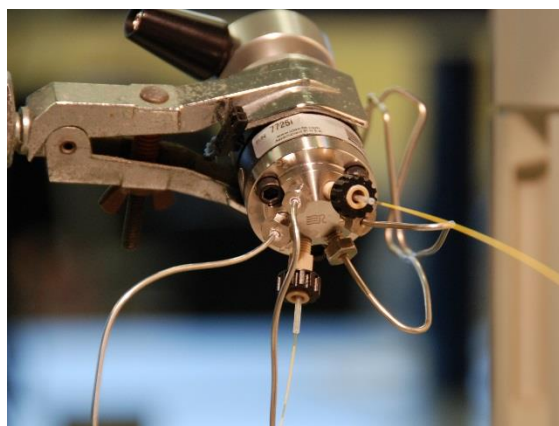
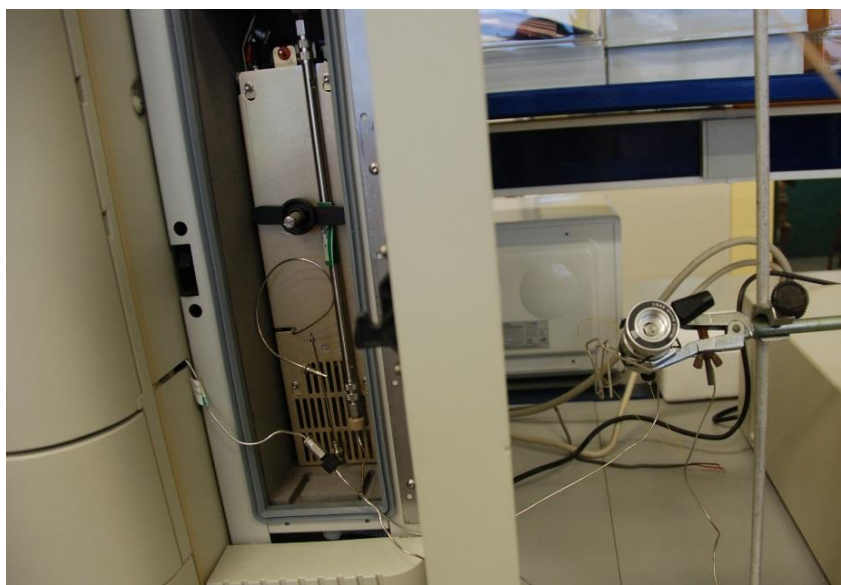
Dado que en la bibliografía previa sobre el análisis de HAP mediante IT-SPME [Ishizaki *et al.*, 2010; Campíns-Falcó *et al.*, 2008] se obtienen buenas eficiencias en la extracción empleando mezclas de disolvente orgánico y agua como fase dadora, parece necesario el uso de modificadores para obtener buenos resultados en la concentración de estos compuestos en el capilar. Por tanto, se han llevado a cabo pruebas con distintos modificadores orgánicos para las muestras acuosas. En este apartado se presenta la selección del modificador orgánico utilizado en IT-SPME y la optimización de su concentración y del volumen de muestra cargado en el capilar.

• Selección de la configuración de IT-SPME y del gradiente de separación cromatográfica

Como ya se ha comentado en el capítulo 3, existen diversas configuraciones instrumentales para llevar a cabo la microextracción en fase sólida *in-tube*. En este caso, dado que el muestreador automático del HPLC empleado no permite llevar a cabo el modo de ciclos, se ha empleado la modalidad de extracción única. Se ha probado una configuración diferente a las que se suelen utilizar en este modo, ya que el automuestreador tampoco permite sustituir el bucle por un capilar, debido a que está situado en un módulo compacto que también incluye la bomba del HPLC. En la configuración empleada se sitúa el capilar de extracción en una válvula de 6 vías externa, colocada entre el muestreador automático y la columna cromatográfica. El automuestreador no se desconecta del sistema, lo que permite cambiar de forma rápida y sencilla entre las dos configuraciones del HPLC: con IT-SPME e inyección manual o, desconectando este módulo externo, la convencional con inyección directa en el muestreador automático (Fig. 14). La alternancia de las dos configuraciones se ha llevado a cabo durante todo el desarrollo de esta Tesis Doctoral sin ningún problema de contaminaciones ni problemas en las conexiones. La configuración elegida permite un mayor aprovechamiento del cromatógrafo, aumentando su versatilidad. En la optimización de la separación cromatográfica cuando se trabaja con IT-SPME acoplada *on-line*, uno de los principales condicionantes es la presión, dado que el capilar no soporta presiones elevadas. Aunque experimentalmente se ha comprobado que el capilar y sus conexiones pueden llegar a soportar presiones de hasta 1800 psi de forma puntual, para asegurar una buena robustez es recomendable que la presión del sistema no supere los 1000-1100 psi, especialmente cuando el método se vaya a utilizar en periodos de tiempo prolongados (por ejemplo, si se implementa en análisis de rutina). Por este motivo, se optó por trabajar a un flujo bajo, de 0,5 mL/min, a pesar de que los flujos de trabajo habituales para la columna cromatográfica empleada (empaquetada de dimensiones 250 × 4,6 mm i.d., 5 µm) son más elevados (1 mL/min o incluso ligeramente superiores).



(a)



(b)

Figura 14. a) Esquema de la configuración empleada (posición de carga). El circuito en rojo se corresponde con la válvula de 6 vías externa. La línea discontinua azul muestra la configuración sin IT-SPME; b) Fotografía de la configuración IT-SPME y detalle del capilar y sus conexiones.

En la separación, la mayor dificultad es separar el par crítico acenafteno-fluoreno; esta separación se logra con una composición inicial que contiene un porcentaje elevado de agua (50%) y una rampa suave (15 min) hasta el 100% de acetonitrilo. Aunque la separación de ambos compuestos no es hasta línea de base, se considera un compromiso aceptable entre la resolución y el tiempo de análisis (Fig. 15).

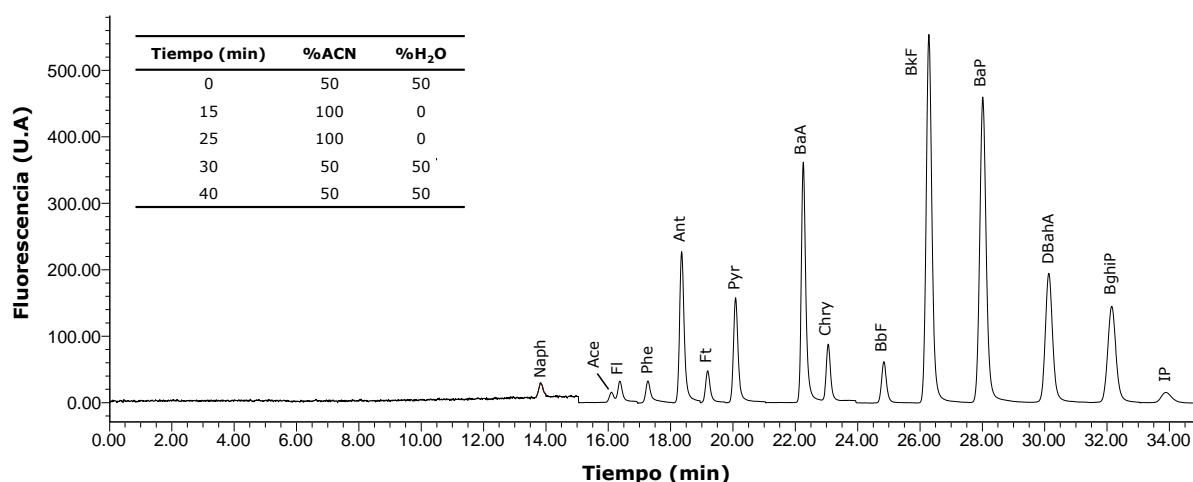


Figura 15. Cromatograma de una disolución patrón de 15 HAP prioritarios de la EPA (FLD) con el gradiente a flujo constante 0,5 mL/min.

Posteriormente se procede a modificar el gradiente con flujo constante 0,5 mL/min por uno con flujo variable (Tabla 6), que sin aumentar de forma significativa el tiempo de análisis amplía el margen respecto a la presión máxima que soporta el capilar. Además, disminuye ligeramente el consumo de disolventes, permite separar el fenantreno de una impureza de naturaleza desconocida con la que solapaba parcialmente con el gradiente a flujo constante y mejora la separación entre acenafteno y fluoreno (y también del 2-metilnaftaleno, probado como patrón interno y que eluye muy cerca de esos dos compuestos). Las condiciones de fluorescencia programada (Tabla 6) se han fijado en función de los tiempos de retención de cada compuesto y las longitudes de onda más adecuadas para cada analito o grupo de ellos [Prieto-Blanco *et al.*, 2010; UNE-EN ISO 17993:2004]. Están presentadas en la Tabla 6.

Tabla 6. Gradiente de fase móvil optimizado y condiciones de fluorescencia empleados en el método de determinación de 15 HAP en agua de lluvia.

GRADIENTE				CONDICIONES FLUORESCENCIA		
Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%ACN	%H ₂ O	Tiempo (min)	$\lambda_{excitación}$ (nm)	$\lambda_{emisión}$ (nm)
0	0,25	50	50	0	275	350
8	0,5	70	30	19,5	260	360
12	0,5	70	30	20,9	250	390
17	0,5	100	0	22,1	284	466
40	0,5	100	0	22,9	272	390
44	0,5	50	50	24,8	276	406
48	0,5	50	50	27,0	286	410
51	0,25	50	50	37,0	300	500

En la Figura 16 se muestra el cromatograma obtenido en estas condiciones optimizadas.

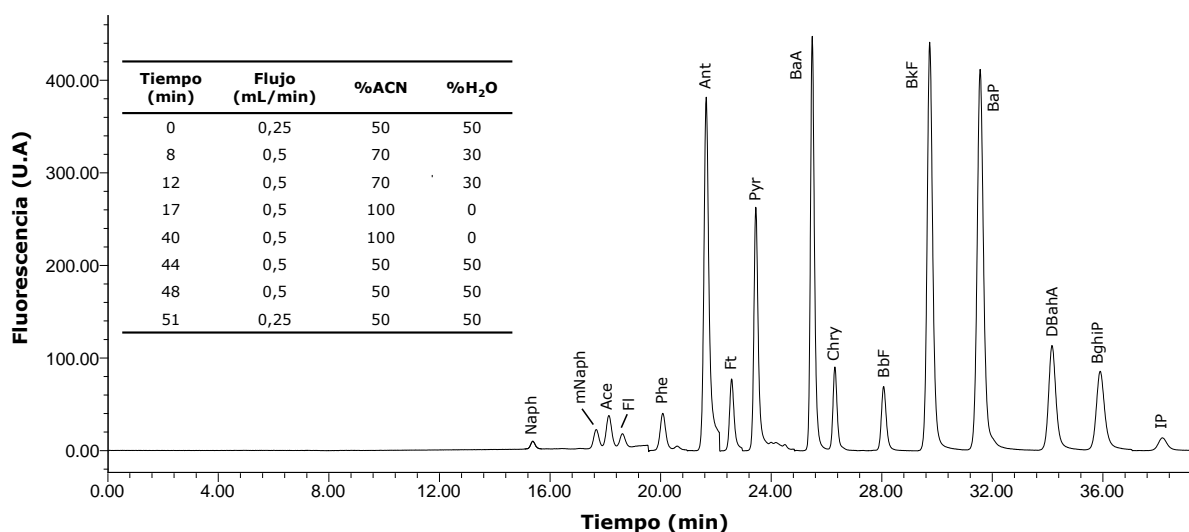


Figura 16. Cromatograma de una disolución patrón de 15 HAP prioritarios de la EPA + 2-metinaftaleno (FLD) con el gradiente final optimizado de flujo variable.

• Evaluación del efecto del modificador orgánico en la extracción

Como se ha comentado anteriormente, la adición de un modificador orgánico a las muestras acuosas puede mejorar la eficacia de la extracción, estrategia que ya se ha empleado con éxito en el análisis de HAP mediante IT-SPME. Se optimiza el porcentaje de tres modificadores orgánicos en la muestra acuosa: acetonitrilo (ACN), 2-propanol (IPA) y tetrahydrofurano (THF). En la Figura 17 se presentan los perfiles área de pico vs % de modificador obtenidos para cada uno de los 15 analitos con los 3 modificadores. Se ensayan proporciones de modificador entre 0% (ausencia de modificador) y 50%, excepto para el THF, para el que solo se han probado concentraciones hasta un 20% debido a su tendencia a formar peróxidos y a posibles problemas en la columna C₁₈ con proporciones elevadas de este disolvente.

Esta optimización se lleva a cabo para un volumen de carga en el capilar de 3 mL, con concentraciones de 125 ng/L de cada analito para IPA y THF y de 10 ng/L para ACN. En estas condiciones, los analitos se dividen en dos grupos con distinto perfil (Fig. 17): los más pesados presentan un perfil parabólico, mientras que los más ligeros siguen una tendencia descendente, dando lugar a las señales más elevadas para la mínima concentración probada de modificador, un 5%. Se observan estos dos grupos de compuestos con perfiles diferentes con el empleo de los tres modificadores ensayados. Sí hay diferencias entre ellos en cuanto al número de HAP con cada uno de los perfiles y al porcentaje óptimo de los compuestos con tendencia parabólica.

Usando ACN como modificador, presentan el perfil parabólico los HAP desde el BaA a BghiP, con un 30% de ACN como concentración óptima para ese grupo; mientras que presentan perfil descendente de Ace a Pyr (el naftaleno no se observa con ACN debido a la baja concentración de analitos empleada en ese ensayo). Con el 2-propanol, el grupo con perfil parabólico incluye desde el BaP al IP y su porcentaje óptimo es un 20% de IPA.

Para el tetrahidrofurano, desde el BbF hasta el IP presentan un perfil parabólico, con un 15% de tetrahidrofurano como porcentaje que proporciona los mejores resultados. En el grupo con perfil descendente el mejor porcentaje es un 5% para los tres modificadores. Con todos los modificadores probados se observa que se necesitan porcentajes superiores del modificador orgánico conforme aumenta el peso molecular del HAP.

En pruebas previas, se había llevado a cabo la optimización de la concentración de ACN para un volumen bajo (60 μ L de 1000 ng/L). Con ese volumen del orden de microlitros (en lugar de los 3 mL de los ensayos de la Figura 17), todos los HAP, incluidos los ligeros, presentan perfil parabólico, con un máximo correspondiente a un 30-40% de ACN [Fernández Amado, 2014].

El hecho de que los HAP presenten perfiles diferentes entre ellos para un mismo modificador orgánico ya se encontraba publicado en la bibliografía [Ishizaki *et al.*, 2010; Campíns-Falcó *et al.*, 2008]. Sin embargo, no se ha encontrado ninguna referencia sobre la variación de los perfiles de un mismo HAP con el volumen de carga que también se ha observado durante esta optimización. Una posible explicación a estas diferencias con el volumen de carga debería tener en cuenta dos efectos: por un lado la polaridad necesaria en la mezcla de disolventes (agua/acetonitrilo) para conseguir una extracción efectiva y por otro la solubilidad de los analitos en esa mezcla. Para volúmenes bajos (del orden de μ L) el primer efecto sería el predominante, mientras que para volúmenes del orden de mililitros, los compuestos más polares serían desorbidos por la propia muestra en un fenómeno parecido al del volumen de ruptura en SPE, al solubilizarse con porcentajes de disolvente orgánico elevados. Así, solo con fases muy polares (5% de modificador) se minimizaría este efecto proporcionando la mejor extracción para estos compuestos.

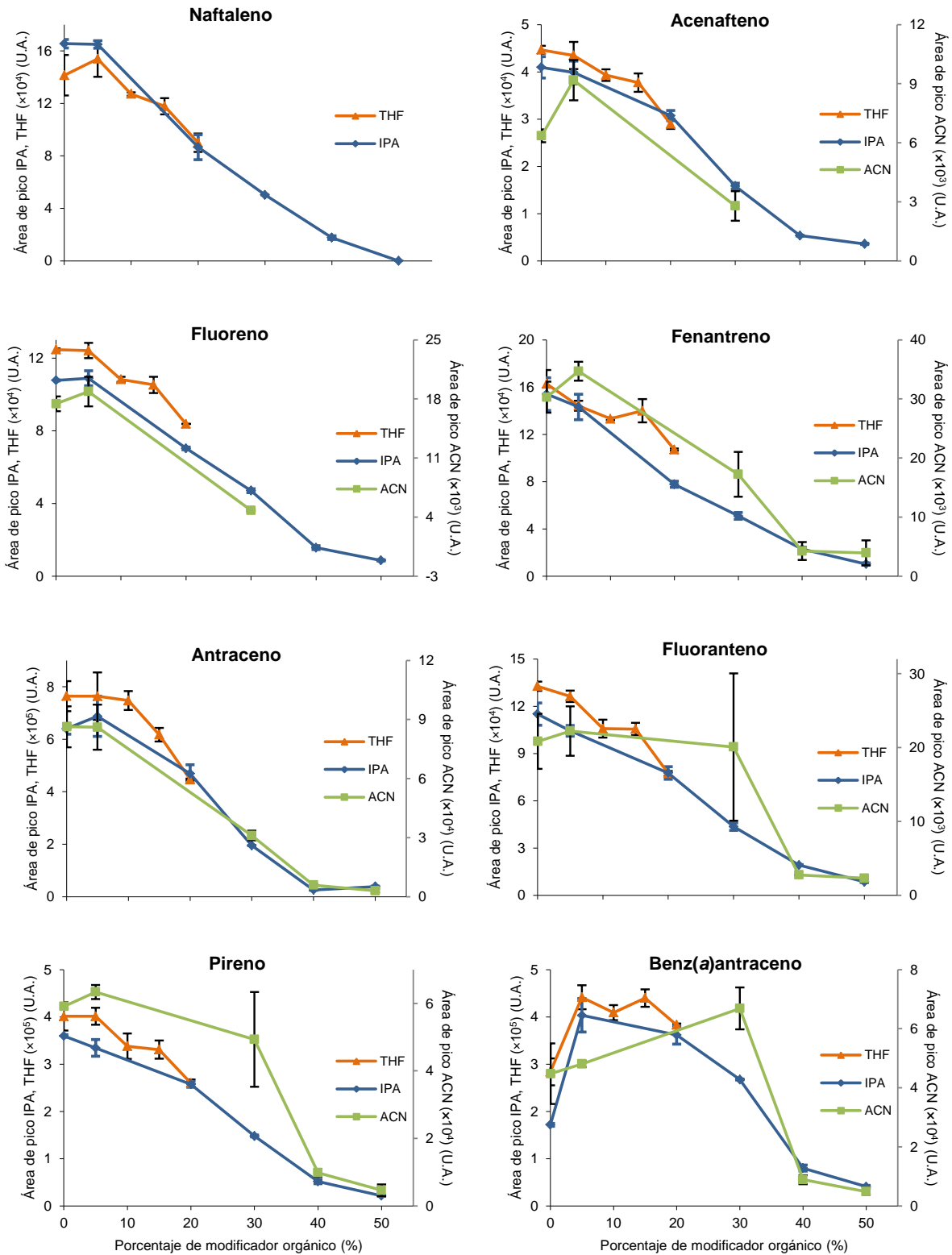


Figura 17. Efecto del porcentaje de ACN, IPA y THF en la respuesta de los HAP para un volumen de carga de 3 mL. Concentración de cada HAP: 125 ng/L para IPA y THF y 10 ng/L para ACN. Barras de error = \pm SD (n=2) (continúa).

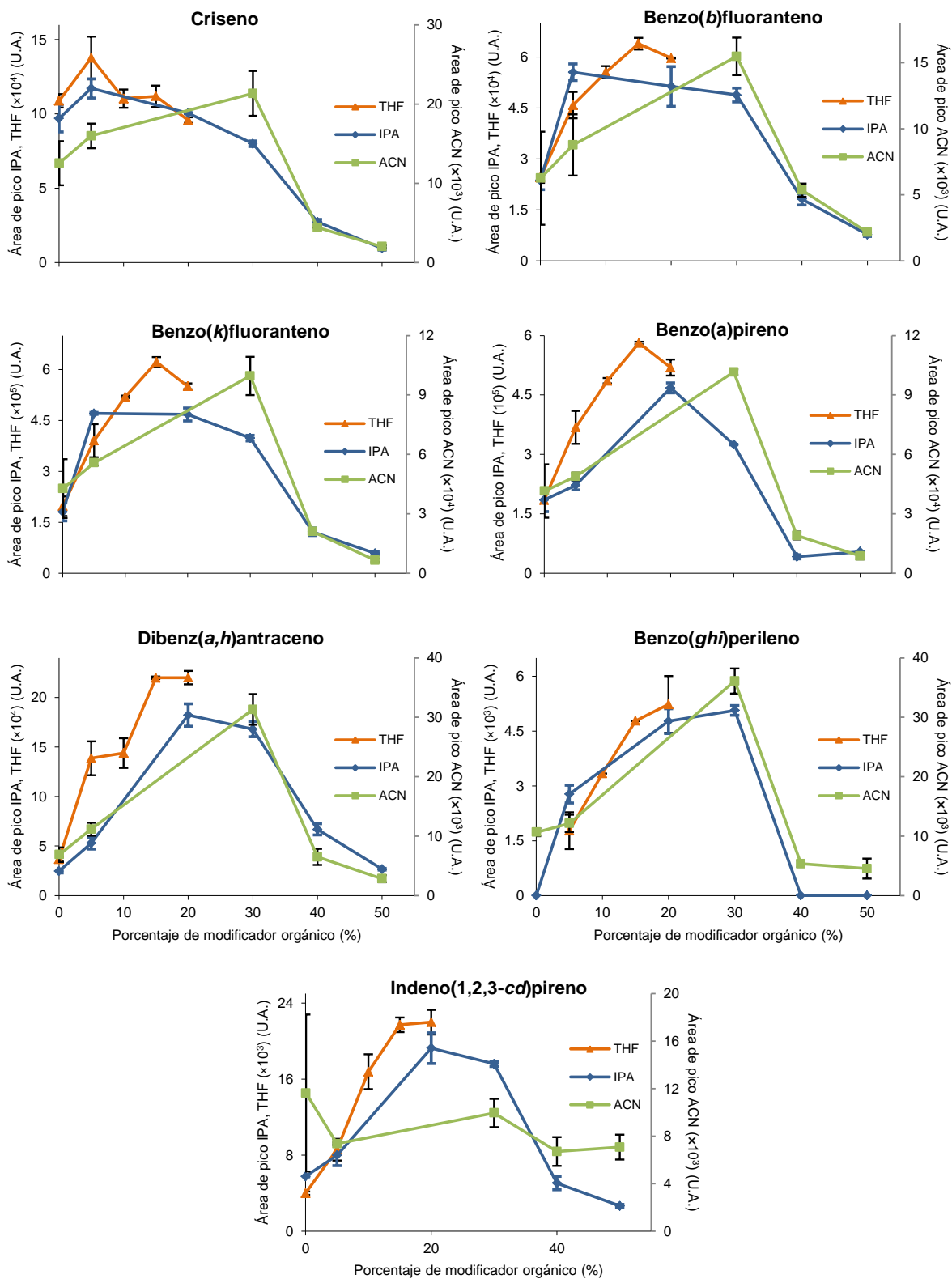


Figura 17. Efecto del porcentaje de ACN, IPA y THF en la respuesta de los HAP para un volumen de carga de 3 mL. Concentración de cada HAP: 125 ng/L para IPA y THF y 10 ng/L para ACN. Barras de error = \pm SD (n=2).

Debido a las tendencias distintas de los diferentes analitos, para llevar a cabo la determinación simultánea de los 15 HAP es necesario seleccionar unas condiciones de compromiso. También se podrían realizar dos determinaciones diferentes, una con el 5% de modificador y otra con el mejor porcentaje para los compuestos con comportamiento parabólico, pero una determinación en un único análisis es preferible al suponer un ahorro de tiempo, muestra y reactivos.

El tetrahidrofurano es el modificador que parece más adecuado para este fin, ya que el descenso en las señales de los compuestos más ligeros al aumentar el porcentaje de modificador no es especialmente acusado.

Se ha llevado a cabo una comparativa de los 3 modificadores en cuanto a sus posibilidades de alcanzar una buena solución de compromiso para todos los analitos. En la Figura 18 se muestran las relaciones entre las áreas obtenidas con un 5% de modificador (porcentaje óptimo para los analitos más ligeros) y las obtenidas para el porcentaje óptimo para los analitos con perfil parabólico (30, 20 o 15%, según el modificador). La línea horizontal en 1 se corresponde con la ausencia de diferencias entre ambos porcentajes, lo que sería la situación ideal para alcanzar una solución de compromiso. Las barras que superan esta línea implican que los resultados para un 5% de modificador orgánico son mejores que para el "porcentaje optimizado" (de los analitos más pesados), mientras que si quedan por debajo indica que se obtienen mayores señales para el porcentaje optimizado. Las diferencias varían según el modificador empleado.

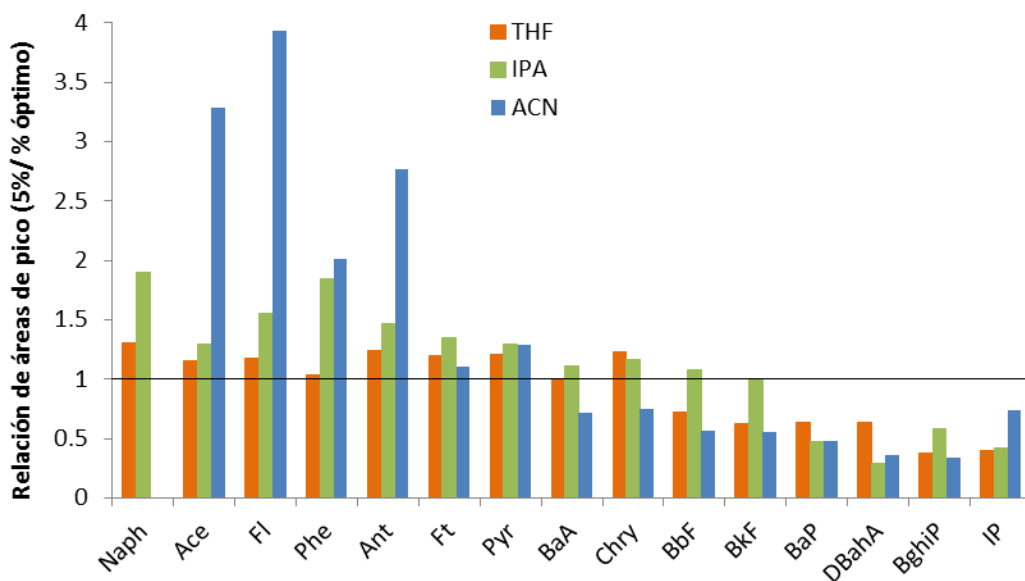


Figura 18. Cociente de las áreas obtenidas para los HAP con un 5% de modificador y las obtenidas con el porcentaje optimizado para cada modificador (30% ACN, 20% IPA y 15% THF).

Así, el acetonitrilo presenta diferencias muy elevadas, con valores entre 2 y 4 veces menores para los compuestos más ligeros con un 30% de ACN respecto al 5%. Por su parte, los compuestos más pesados sufren pérdidas de señal de la mitad o más al emplear un 5% de ACN como modificador. Por estos motivos, el acetonitrilo no se considera un modificador adecuado para alcanzar una buena solución de compromiso para los 15 HAP.

Respecto al 2-propanol, dado que solo 4 analitos presentan perfil parabólico, el 5% de IPA es el porcentaje óptimo para casi todos los HAP de interés. Sin embargo, entre los 4 compuestos con perfil parabólico se encuentra el benzo(a)pireno, uno de los HAP más importantes y frecuentemente usado como marcador de todos los demás [Danyi *et al.*, 2009; Campíns-Falcó *et al.*, 2008]. Además, la pérdida de sensibilidad en los analitos más ligeros al usar un 20% de IPA es menor que la sufrida por los compuestos más pesados al utilizar un 5% de IPA. Por tanto, se considera un 20% de IPA como la mejor solución de compromiso para los 15 HAP de interés al usar este modificador.

En cuanto al tetrahidrofurano, un 15% de este modificador se presenta como una muy buena solución de compromiso para todos los analitos, ya que supone una mejora significativa (señales 1,4-2,7 veces superiores) para los analitos más pesados respecto al uso de un 5% de tetrahidrofurano y pérdidas moderadas en las señales de los analitos más ligeros (<20% excepto para el naftaleno, con una pérdida del 24% del área respecto al 5%).

En conclusión, los perfiles de los compuestos en la extracción presentan un comportamiento diferente con acetonitrilo respecto al observado con tetrahidrofurano y 2-propanol. Para los dos últimos, hay un menor número de compuestos con perfil parabólico y con un porcentaje optimizado de modificador orgánico más bajo que en el caso del acetonitrilo. También presentan una menor pérdida de sensibilidad en la señal de los compuestos más ligeros al trabajar con el porcentaje óptimo del segundo grupo, especialmente en el caso del tetrahidrofurano. Esto supone que parecen más adecuados para determinar los 15 HAP de interés en un único análisis.

Los resultados obtenidos con ACN son similares a los presentados por Ishizaki *et al.* (2010), que emplean metanol (MeOH) como modificador para la determinación de los mismos 15 HAP con un capilar CP-Sil 19CB y el modo de ciclos (20 ciclos de 40 μ L a un flujo de 150 μ L/min). Con metanol, los grupos de compuestos con perfil descendente y parabólico son los mismos que se han observado al emplear acetonitrilo como modificador. El máximo para los compuestos más pesados se corresponde con un 30% de metanol y las diferencias entre ambos grupos parecen grandes, dado que los autores eligen determinar por separado los dos grupos de compuestos, con un 5% de metanol para los ligeros y un 30% para los pesados.

Para explicar las diferencias entre modificadores, es necesario considerar sus propiedades. Los cuatro modificadores (ACN, IPA, THF y MeOH) son disolventes orgánicos considerados polares. El acetonitrilo es el más polar de los cuatro (índice de polaridad de Snyder $P' = 5,8$), seguido por el metanol ($P' = 5,1$, la mitad que el del agua, $P' = 10,2$), mientras que el 2-propanol y el tetrahidrofurano presentan una polaridad inferior y muy similar entre ellos ($P' = 3,9$ y $P' = 4,0$, respectivamente). Por los resultados observados, parece que los disolventes menos polares dan lugar a porcentajes más bajos en los máximos (menor porcentaje de modificador y por tanto menor dilución) y a menor variación de señal entre el porcentaje óptimo y el 5%.

También se ha llevado a cabo una comparativa de la sensibilidad proporcionada por los 3 modificadores en las condiciones de compromiso (20% de 2-propanol, 15% de tetrahidrofurano y 30% de acetonitrilo, en este último caso el porcentaje óptimo para los HAP pesados de mayor relevancia). Se comparan las áreas obtenidas para cada uno de los HAP al analizar 3 mL de una disolución patrón de 125 ng/L, siendo esta concentración (con el modificador ya incluido) y por tanto igual para los 3 casos a pesar de añadir diferentes porcentajes de modificador (Fig. 19). Como era esperable al ser el porcentaje empleado el óptimo para los compuestos más pesados, son los analitos más ligeros los que dan lugar a las señales más bajas. Esto es especialmente acusado en el acetonitrilo, tal como se esperaba en función de los resultados anteriores. El 15% de tetrahidrofurano proporciona las áreas más elevadas para todos los compuestos a excepción del dibenzo(a,h)antraceno, que tiene un área ligeramente superior con un 30% de acetonitrilo. En cualquier caso, las áreas obtenidas para la adición de un 15% de tetrahidrofurano son muy similares o superiores a las correspondientes a un 20% de 2-propanol o un 30% de acetonitrilo para todos los compuestos.

Además, dado que el porcentaje de tetrahidrofurano es menor que el de los otros modificadores, al aplicarlo a muestras acuosas reales la dilución será menor, por lo que el tetrahidrofurano se destaca como el mejor modificador. Aunque la adición del modificador orgánico supone la dilución de la muestra, este efecto se compensa debido a que su presencia aumenta la eficacia de la extracción en el capilar.

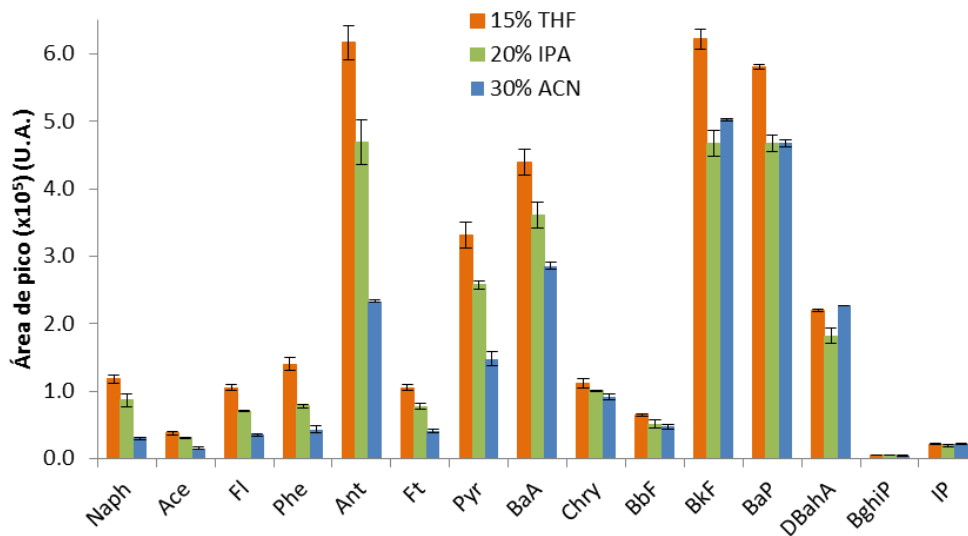


Figura 19. Sensibilidad obtenida para los HAP con el porcentaje optimizado de cada modificador. Barras de error = $\pm 1SD$ ($n=2$). Condiciones: 3 mL de disolución patrón de 125 ng/L (con modificador ya incluido) + 60 μ L agua Milli-Q (*El BghiP presenta unas señales muy bajas en estas pruebas debido a que se estaba determinando en unas condiciones de fluorescencia que no son las más adecuadas para él ($\lambda_{ex}=300$ nm, $\lambda_{em}=500$ nm). Para la validación y aplicación del método se variaron las longitudes de onda (Tabla 6), obteniendo señales más elevadas para este compuesto).

• Optimización del volumen de carga

Se ha optimizado el volumen de carga de muestra que se pasa a través del capilar. En la optimización de este parámetro es necesario alcanzar un compromiso entre la sensibilidad obtenida y el tiempo de análisis, ya que la carga de la muestra se realiza de forma manual con flujo constante y un aumento del volumen de carga supone más tiempo de extracción, además de un mayor consumo de muestra y modificador orgánico.

Si el mecanismo de extracción es la adsorción, se espera que al aumentar el volumen de muestra aumenten las áreas obtenidas hasta que se alcance la saturación de la fase sólida. Este comportamiento ha sido observado previamente para algunos HAP en IT-SPME [Campíns-Falcó *et al.*, 2008].

Se ha llevado a cabo la optimización con un 15% de tetrahidrofurano como modificador y probando volúmenes de hasta 5 mL (Fig. 20).

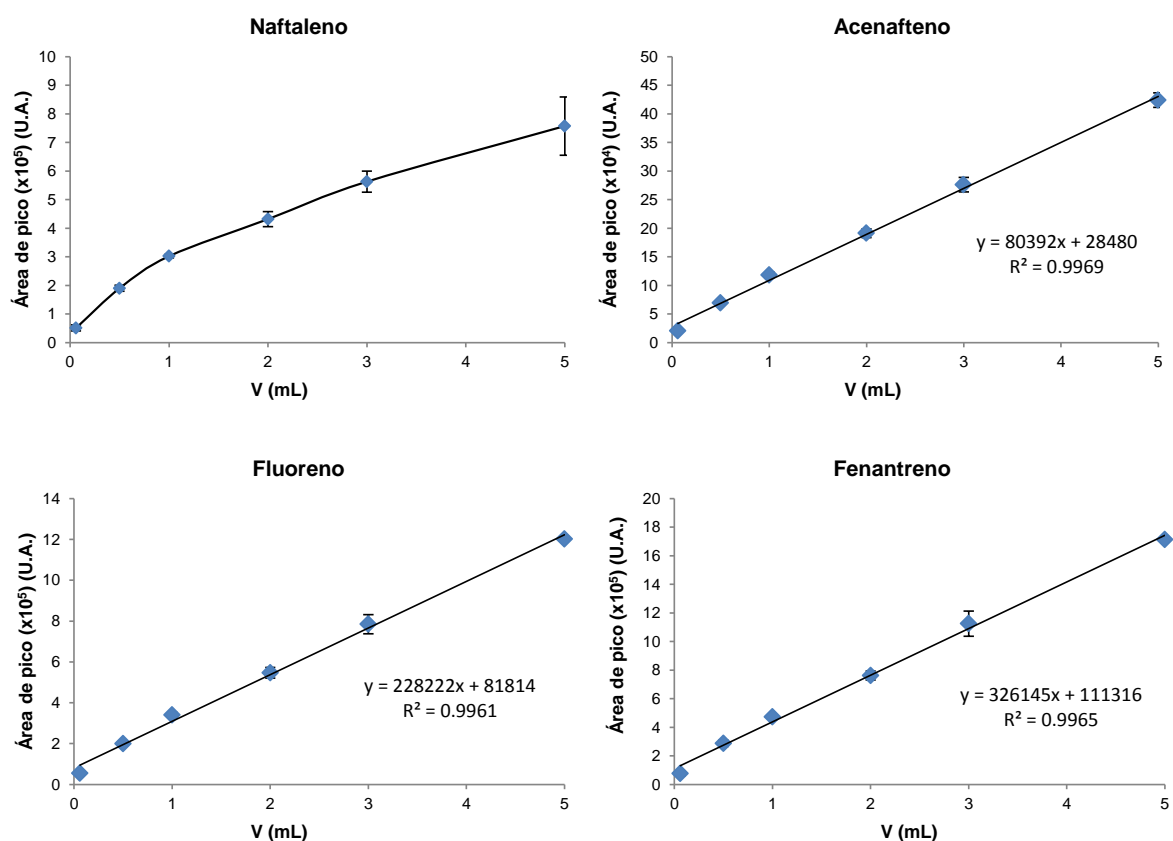


Figura 20. Efecto del volumen de carga en la respuesta de los HAP empleando un 15% THF como modificador. Barras de error = \pm SD (n=2-3) (continúa).

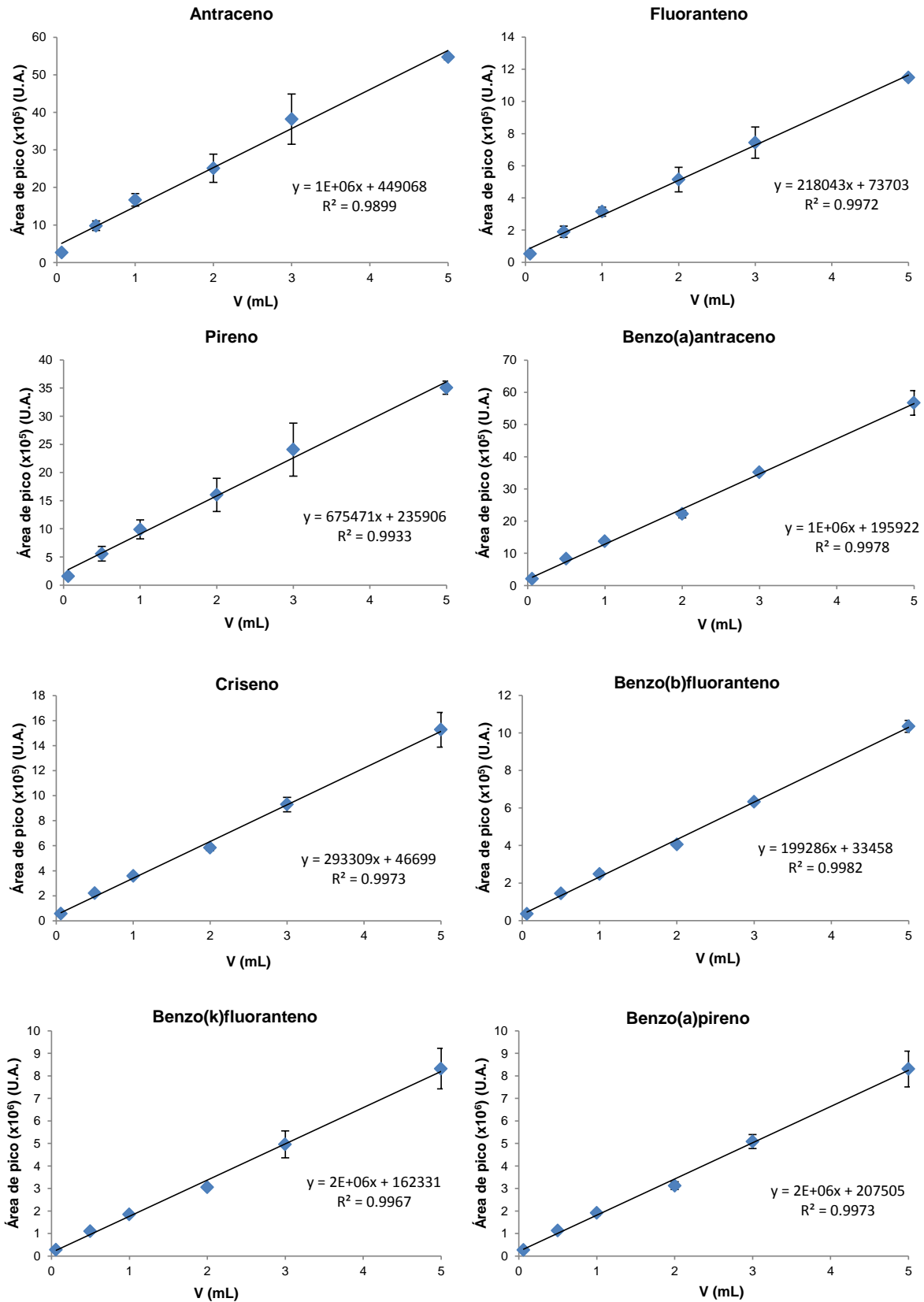


Figura 20. Efecto del volumen de carga en la respuesta de los HAP empleando un 15% THF como modificador. Barras de error = \pm SD (n=2-3) (continúa).

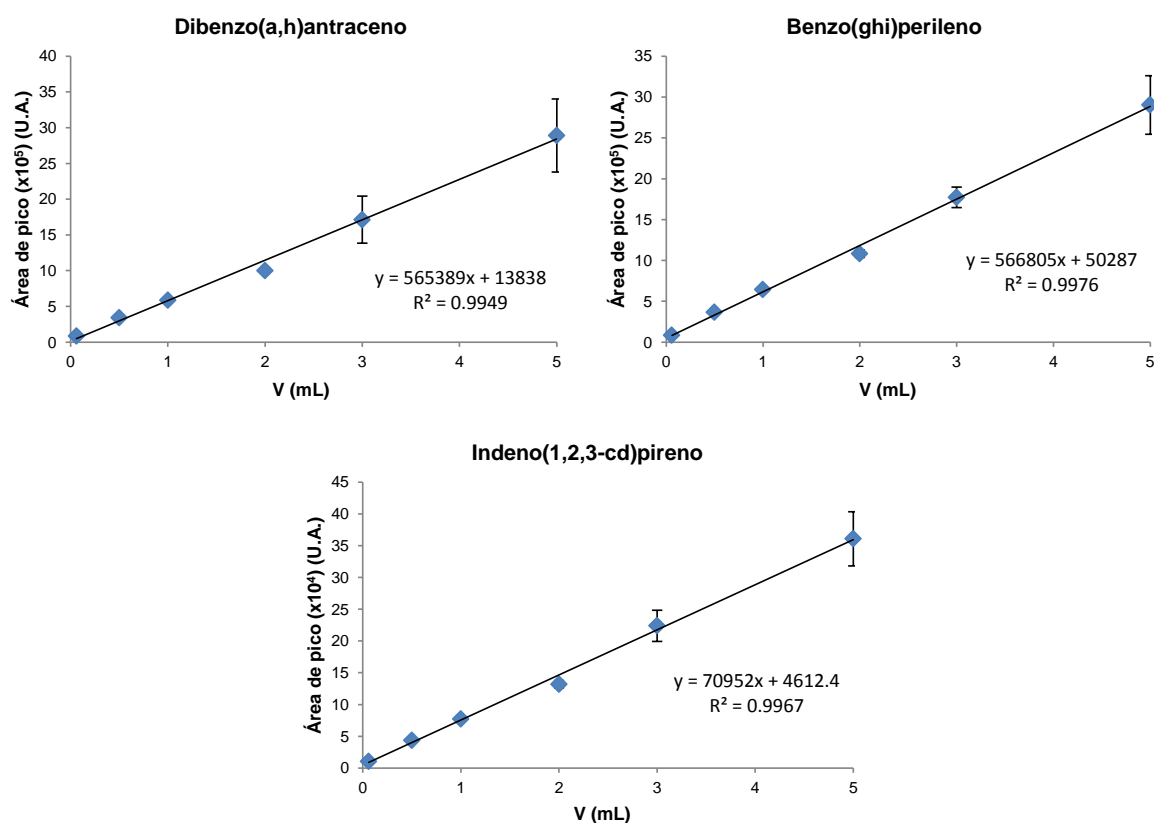


Figura 20. Efecto del volumen de carga en la respuesta de los HAP empleando un 15% THF como modificador. Barras de error = \pm SD (n=2-3).

Todos los analitos excepto el naftaleno presentan un incremento de señal linealmente proporcional al volumen en ese rango (se presentan las ecuaciones de las rectas en la Figura 20). El naftaleno presenta una disminución en la pendiente, indicando que la saturación se acerca, pero todavía no se ha alcanzado con 5 mL.

No se probaron volúmenes superiores al trabajar con inyección manual, y para no aumentar el consumo de muestra, ya que con 5 mL, el volumen seleccionado, se alcanza una sensibilidad adecuada para la aplicación propuesta. En ensayos realizados con anterioridad usando un 30% de ACN como modificador orgánico, los perfiles obtenidos para el volumen de carga eran diferentes. Con el ACN, para los HAP más ligeros (del naftaleno al fenantreno) la saturación se alcanzaba sobre 1 mL, mientras que en los compuestos más pesados entre 1 y 3 mL se observaba una disminución en la pendiente [Fernández Amado, 2014].

Por tanto, el THF proporciona mejores resultados que el ACN también respecto al volumen de carga, proporcionando un mayor margen que permite mejorar la sensibilidad, aunque a costa de aumentar el tiempo de análisis y el consumo de muestra.

4.3.2. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LAS DISOLUCIONES ACUOSAS DE HAP

Durante el periodo de trabajo se ha observado una disminución de la señal de algunos HAP en la matriz acuosa, conservada a 4°C. Esto podría deberse a la degradación (química o biológica) de los analitos o a una posible pérdida de los mismos, probablemente por adsorción en las paredes de los recipientes. La adsorción de los HAP de mayor peso molecular sobre el vidrio está documentada [Wolska *et al.*, 2005]. Se ha observado que esta disminución de la señal no afecta de igual modo a todos los analitos, además de variar según la matriz en la que se encuentran. Esta degradación o pérdida se observó en primer lugar en las disoluciones patrón en agua Milli-Q durante la optimización, y posteriormente también se ha observado en las muestras de agua de lluvia. La disminución en la señal es sensiblemente más rápida en la matriz de agua de lluvia que en el patrón en agua Milli-Q (horas frente a días). Por su parte, los analitos más afectados son el antraceno, el benzo(a)pireno, el pireno, el benzo(a)antraceno y el benzo(k)fluoranteno, especialmente los dos primeros.

Por este motivo, se lleva a cabo un estudio cinético de la estabilidad de los HAP en agua de lluvia. Dado que la disminución de señal en el patrón es más lenta, unas condiciones que mantengan estables los HAP en la muestra de agua de lluvia también lo harán en los patrones acuosos durante al menos el mismo tiempo. Se sobrecarga una muestra de agua de lluvia con 250 ng/L de los analitos y se conserva a 4°C durante 24 h, analizándola 4 veces consecutivas (0, 50, 100 y 150 min) y al cabo de las 24 h.

En la Figura 21a se presenta la variación de las áreas obtenidas a los diferentes tiempos de análisis, correspondiéndose el tiempo $t = 0$ con el momento en que se realiza la sobrecarga. La mayoría de HAP, especialmente los de mayor peso molecular, presentan pérdidas de señal, que llegan casi al 50%. Dado que la adición de alcoholes (metanol, 2-propanol) a las muestras acuosas ha demostrado evitar la degradación microbiana y la adsorción al vidrio [Guo y Lee, 2011b; Pena *et al.*, 2009; Mattiesen *et al.*, 1997], se ha probado la viabilidad de que el modificador orgánico que se debe añadir para la IT-SPME funcione también como conservante. En algunos métodos publicados que hacen uso de modificadores orgánicos han obtenido buenos resultados usando como conservante el porcentaje optimizado para la extracción (μ -SPE o DLLME) [Guo y Lee, 2011b; Pena *et al.*, 2009].

Así pues, se prueba la posibilidad de que un 15% de tetrahidrofurano actúe como conservante. Se ha probado también con un 20% de IPA, dado que este disolvente se ha empleado en la bibliografía como conservante en el análisis de HAP. La adición de un 15% de THF previa a la conservación a 4°C proporciona estabilidad a las señales de los analitos durante al menos 150 min, tiempo suficiente para el análisis de hasta 4 réplicas (Fig. 21b). Respecto a la conservación durante 24 h (que se muestra con mayor detalle en las figuras 21a' y 21b'), los compuestos de menor peso molecular no presentan diferencias significativas respecto a $t = 0$ si se han conservado con el 15% de THF. Sin embargo, sí se observa un aumento en los coeficientes de variación para todos los analitos (8 de ellos con CV = 15-26,5%, mientras que a $t = 0$ ningún HAP superaba el 10,6%). Además, los compuestos más pesados (a partir del benzo(a)pireno) sí presentan disminuciones de

señal (18-20%), aunque éstas son inferiores a las que se producen si la conservación se realiza sin la adición del tetrahidrofurano (Fig. 21a').

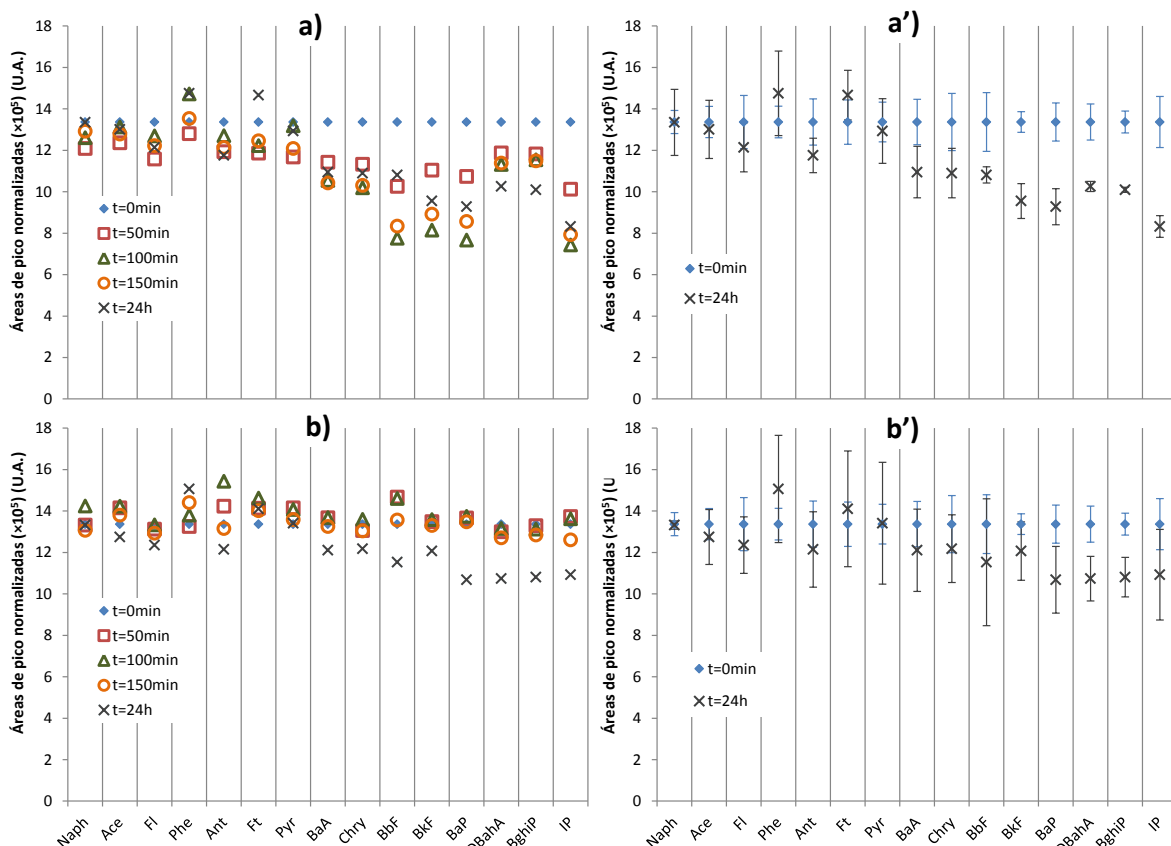


Figura 21. Efecto de la adición de tetrahidrofurano sobre la conservación de los HAP en agua de lluvia a 4°C. a) Muestra conservada sin THF; a') Detalle de los puntos inicial y tras 24 h de conservación sin THF, con barras de error = \pm SD (n=3); b) Muestra conservada con un 15% THF añadido; b') Detalle de los puntos inicial y tras 24 h de conservación con THF, con barras de error = \pm SD (n=3).

La posibilidad de utilizar un 20% de IPA como conservante se ha descartado porque los resultados tienen una variabilidad muy elevada (CV de hasta el 37%). Con el IPA como conservante, las áreas de los analitos más pesados aumentan con el tiempo, lo que podría deberse a que el equilibrio entre el disolvente orgánico, la matriz y los analitos aún no se ha alcanzado en el periodo de estudio (150 minutos). Esto podría ser por la mayor viscosidad del IPA respecto al tetrahidrofurano, a pesar de que las mezclas se homogeneizan mediante agitación por ultrasonidos. El efecto del IPA como conservante en 24 horas da lugar a resultados similares a los obtenidos con el tetrahidrofurano para los analitos más ligeros, mientras que para los más pesados se obtiene de nuevo una baja reproducibilidad en la respuesta, con tendencia a un aumento del área con el tiempo al conservar la muestra con el IPA añadido. Por tanto, se selecciona un 15% de THF para el método optimizado, al proporcionar los mejores resultados tanto como modificador en la extracción como en su función de conservante de los HAP.

También se ha evaluado la conservación de la muestra congelada, aunque este método de conservación de HAP en agua de lluvia ya ha sido empleado previamente por varios autores [Delhomme *et al.*, 2007; Sablayrolles *et al.*, 2011]. En el método optimizado se comparan los resultados obtenidos para dos alícuotas de una misma muestra sobrecargada con 250 ng/L de los analitos y conservada a -18°C durante una semana, con el 15% de THF añadido antes de la conservación (doble función conservante + modificador) y después (actuando solo como modificador). Para los HAP de menor peso molecular no se observan diferencias significativas entre ambos resultados, por lo que no sería necesario emplear el tetrahidrofurano como conservante para ellos. Los compuestos de mayor peso molecular presentan una ligera disminución de la señal, que es menor si se han conservado con el tetrahidrofurano añadido (8,5% de disminución frente a un 23% sin el tetrahidrofurano). También se ha reanalizado una muestra sobrecargada conservada a -18°C (sin tetrahidrofurano) durante un periodo de tiempo prolongado (más de 23 semanas), obteniéndose recuperaciones aceptables (77,4%) después de tanto tiempo. Los resultados obtenidos en estas pruebas indican que conservar las muestras de agua de lluvia a -18°C es una buena opción, y que la adición de tetrahidrofurano como conservante todavía mejora más su conservación.

4.3.3. OPTIMIZACIÓN DE LA FILTRACIÓN DE LAS MUESTRAS

El método optimizado se va a aplicar a la fracción disuelta del agua de lluvia, por lo que es necesario eliminar las partículas en suspensión de la muestra mediante filtración. Además, la filtración también es necesaria para evitar obstrucciones del capilar de extracción. La fracción particulada se podría analizar por separado mediante otro método analítico, e incluso se podría adaptar para ese análisis el método IT-SPME desarrollado, incluyendo una etapa previa de extracción de los HAP de la materia particulada.

Las muestras de deposición total de mayor volumen se filtran a través de un filtro de cuarzo precalcinado, empleando un matraz kitasato (procedimiento estandarizado para separar la fracción particulada de la fracción disuelta). Se han realizado ensayos previos para comprobar que los HAP no quedan retenidos en el filtro de cuarzo. Para las muestras de menor volumen, así como para otras matrices acuosas en las que también se ha probado el método (agua de río, de lago y de fuente), se optimiza un método de filtración alternativo más rápido y sencillo. Este procedimiento de filtración emplea filtros de jeringa y está pensado para filtrar únicamente el volumen necesario para el análisis (5 mL). La contrapartida es que la materia particulada en suspensión queda retenida en un filtro de jeringa, dificultando su posible extracción posterior para analizarla. Sin embargo, dado que solo se va a analizar la fracción disuelta esto no supone ningún problema.

Se realizan ensayos con filtros con membranas de diferente naturaleza: polifluoroetileno (PTFE), nylon y fluoruro de polivinilideno (PVDF). El PTFE es un polímero relativamente inerte respecto a su reactividad química y que se ha usado ocasionalmente en el muestreo de HAP en agua [Blanchard *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010]. No obstante, debido a su naturaleza hidrófoba opone resistencia el paso de muestras acuosas a su través. Por ello se ha probado también un filtro de PTFE especial, de naturaleza hidrofílica

(HP), más adecuado para filtrar muestras acuosas. Las pruebas consistieron en filtrar una disolución patrón de 1000 ng/L y comparar las áreas de la disolución filtrada con las áreas obtenidas para cada HAP de la disolución sin filtrar. En la Tabla 7 se muestran las recuperaciones obtenidas.

Tabla 7. Recuperaciones \pm SD ($n=3$) obtenidas para la filtración de 5 mL de una disolución patrón de HAP de 10^3 ng/L en agua Milli-Q a través de filtros de distinta naturaleza.

	% Recuperación			
	PTFE*	Nylon	PVDF	PTFE-HP
Naph	88 \pm 9	75,2 \pm 0,3	63 \pm 3	93 \pm 2
PI (mNaph)	88 \pm 11	37,9 \pm 1,7	32 \pm 3	91 \pm 3
Ace	90 \pm 7	18,6 \pm 2,6	35 \pm 3	93 \pm 3
FI	92 \pm 9	0	12 \pm 3	90 \pm 2
Phe	90 \pm 7	3,2 \pm 3,2	5 \pm 2	90 \pm 5
Ant	79 \pm 7	0,2 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	87 \pm 4
Ft	73 \pm 14	0,3 \pm 0,3	0,3 \pm 0,2	82 \pm 2
Pyr	75 \pm 15	0,5 \pm 0,4	0,4 \pm 0,1	79 \pm 3
BaA	49 \pm 6	1,3 \pm 0,2	3 \pm 0	43 \pm 4
Chry	48 \pm 7	1,0 \pm 0,6	2,8 \pm 0,3	43 \pm 4
BbF	15 \pm 2	4,2 \pm 0,1	13 \pm 2	16 \pm 2
BkF	13 \pm 2	4,9 \pm 0,5	15 \pm 1	15 \pm 1
BaP	16 \pm 2	5,2 \pm 0,1	15 \pm 2	16 \pm 1
DBahA	7 \pm 2	16,2 \pm 5,8	41 \pm 5	24 \pm 2
BghiP	8 \pm 2	14,0 \pm 1,6	41 \pm 5	24 \pm 3
IP	6 \pm 1	13,5 \pm 1,6	42 \pm 6	23 \pm 2

* $n=4$; PTFE: polifluoroetileno; HP: hidrofílico; PVDF: fluoruro de polivinilideno

Los filtros de PTFE, tanto el hidrófobo como el hidrofílico, son los que proporcionan los mejores resultados, con recuperaciones aceptables (73-92%) para los HAP más ligeros (hasta el pireno). Sin embargo, las recuperaciones disminuyen al aumentar la hidrofobicidad de los analitos, de tal modo que las de los HAP más pesados son muy pobres ($\leq 49\%$). Los compuestos de interés son altamente apolares, disminuyendo su polaridad al aumentar su peso. Por este motivo, los compuestos más pesados son los que poseen una menor solubilidad en agua y una mayor afinidad por la membrana del filtro, de naturaleza apolar.

Con los otros dos tipos de filtros probados el rendimiento para todos los HAP analizados es peor, y la tendencia en las recuperaciones es también algo distinta debido a la diferente naturaleza de las membranas. En los filtros de nylon y PVDF los analitos más retenidos en el filtro son los de polaridad intermedia, teniendo los más pesados y los más ligeros mejores recuperaciones, aunque igualmente bajas (%R = 0-75,2% para el filtro de nylon y 0,3-63% para el de PVDF).

Para obtener recuperaciones satisfactorias también para los HAP más pesados, se prueba a pasar el modificador orgánico a través del filtro para recuperar los analitos retenidos en él. Se comprueba que si tras filtrar la muestra se pasa un volumen de tetrahidrofurano que suponga un 15% en el volumen final del filtrado (el volumen optimizado de modificador), las recuperaciones sí son satisfactorias para todos los HAP (98-119%), para cualquiera de los dos filtros de PTFE (Tabla 8).

Los filtros de nylon y PVDF no han sido considerados debido a los pobres resultados obtenidos con ellos en el ensayo inicial. Se prueba el efecto del volumen filtrado (5, 10 o 20 mL) y de la concentración del patrón (250 o 1000 ng/L) sobre las recuperaciones, obteniéndose valores satisfactorios independientemente de esos parámetros.

Se eligen los filtros hidrofílicos al ofrecer menor resistencia al paso de la muestra acuosa, permitiendo una filtración más cómoda y rápida.

Tabla 8. Recuperaciones \pm SD (n=3) obtenidas para la filtración de distintos volúmenes de disoluciones patrón de HAP en agua Milli-Q a través de filtros de PTFE, pasando un 15% THF a través del filtro tras la muestra.

Concentración Volumen	%Recuperación			
	PTFE			PTFE-HP
	1 \times 10 ³ ng/L		250 ng/L	250 ng/L
	5 mL	10 mL		20 mL
Naph	99 \pm 3	107 \pm 7	101 \pm 5	103 \pm 6
PI (mNaph)	94 \pm 6	102 \pm 5	109 \pm 4	-
Ace	98 \pm 6	103 \pm 4	109 \pm 3	105 \pm 5
Fl	101 \pm 5	104 \pm 3	117 \pm 9	103 \pm 6
Phe	103 \pm 12	108 \pm 3	112 \pm 7	119 \pm 8
Ant	100 \pm 14	109 \pm 10	109 \pm 1	104 \pm 1
Ft	97 \pm 16	113 \pm 10	108 \pm 1	99 \pm 2
Pyr	98 \pm 12	103 \pm 8	110 \pm 3	101 \pm 1
BaA	92 \pm 5	107 \pm 3	109 \pm 1	104 \pm 7
Chry	93 \pm 5	108 \pm 4	111 \pm 1	104 \pm 7
BbF	87 \pm 6	113 \pm 7	111 \pm 6	101 \pm 11
BkF	86 \pm 5	115 \pm 10	111 \pm 2	101 \pm 11
BaP	87 \pm 5	115 \pm 8	109 \pm 1	101 \pm 11
DBahA	82 \pm 5	118 \pm 16	104 \pm 4	98 \pm 13
BghiP	87 \pm 5	122 \pm 14	109 \pm 4	101 \pm 11
IP	84 \pm 4	120 \pm 14	110 \pm 6	101 \pm 15

*n=4; PTFE: polifluoroetileno; HP: hidrofílico

4.3.4. ESTUDIO DE BLANCOS DE PROCEDIMIENTO

Como se ha mencionado en el apartado 4.1, por los resultados publicados en la bibliografía se esperan niveles de los HAP del orden de ng/L en agua de lluvia. Al trabajar a esos niveles ultratrazo, es fundamental tener controlados los blancos del procedimiento para determinar correctamente los límites de detección y cuantificación. Los blancos de procedimiento incluyen el paso de agua Milli-Q con un 15% de THF a través del capilar y su posterior análisis cromatográfico, incluyendo por tanto la contribución del agua Milli-Q empleada, el tetrahidrofurano, la jeringa para la carga de la muestra en el capilar, el acetonitrilo usado en el lavado, el posible efecto memoria en el capilar y el sistema cromatográfico.

En los blancos de sistema, por su parte, se evalúa la señal de fondo debida a la fase móvil y a posibles efectos memoria en el capilar y en la columna, ya que no se pasa nada por el capilar antes de pasar la válvula a posición de inyección. En general en los blancos de sistema no se detecta ninguno de los analitos (Fig. 22).

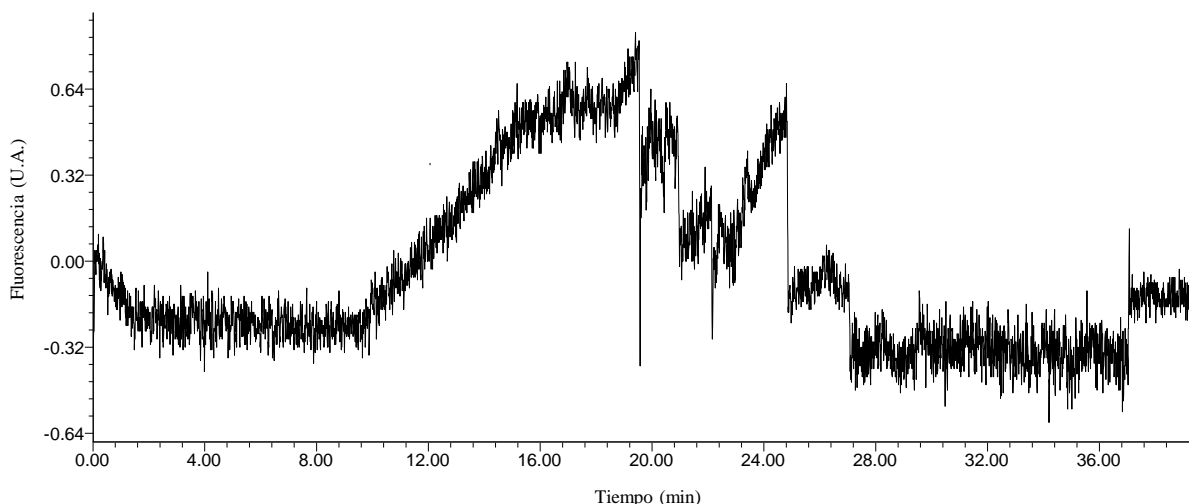


Figura 22. Cromatograma correspondiente a un blanco del sistema, realizado inmediatamente después de una inyección de una muestra.

Los blancos de procedimiento dan lugar a señales relativamente bajas. Lavando la jeringa tres veces con acetonitrilo, dejando el disolvente en el interior de la jeringa durante 30 min en el último lavado, no se observan efectos memoria. Se monitorizaron las señales de los blancos de procedimiento a lo largo de los días para evaluar la posible presencia de contaminaciones (Fig. 23). La línea horizontal negra indica la media de los datos (el valor esperado), y a su alrededor hay un límite de aviso (de color verde), que se sitúa en $\pm 2SD$, y un límite de acción (de color rojo), situado en $\pm 3SD$. Se considera fuera de control si:

- 1 resultado se va fuera de los límites de acción.
- 2 resultados consecutivos están fuera de los límites de aviso y al mismo lado de la media.
- 3 resultados consecutivos están fuera de los límites de aviso.
- 10 resultados consecutivos están del mismo lado de la media, aunque estén dentro de los límites de aviso (esto indicaría un desplazamiento de la media).

Cuando se está fuera de control sería necesario identificar la causa y corregirla. Sin embargo, en general se puede decir que las señales se mantienen estables para todos los compuestos (debe tenerse en cuenta que se trata de áreas relativamente pequeñas). No se aprecian tendencias temporales y la mayoría de los datos para todos los analitos se encuentran dentro de los límites de aviso. Además ningún HAP tiene más de tres puntos (en cualquier caso no consecutivos) fuera de ese intervalo, y todos los datos se encuentran dentro de los límites de acción.

Todos los HAP excepto el indeno(1,2,3-cd)pireno aparecen en los blancos de procedimiento, si bien Naph, Ace, Fl y DBahA solo aparecen en un 50% o menos de los blancos analizados. Las áreas obtenidas en los blancos de procedimiento corresponden con concentraciones de entre $2,5 \pm 1,9$ y 41 ± 24 ng/L, siendo Phe, Fl y Ft los que presentan valores más elevados (> 30 ng/L), si bien el Fl, que solo aparece en un 33% de los blancos, tiene una desviación estándar prácticamente igual a la media (38 ± 34 ng/L).

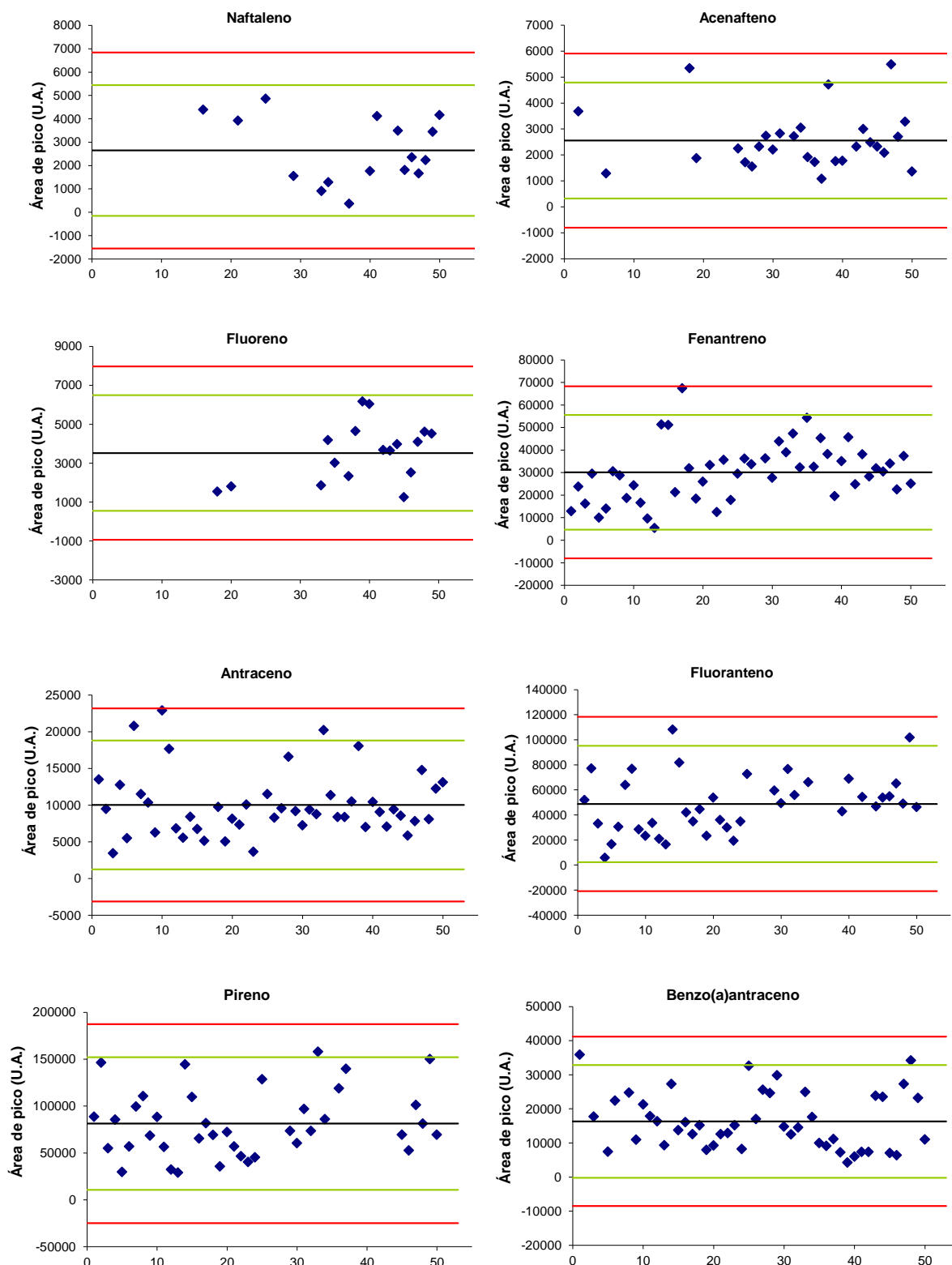


Figura 23. Gráficos de control de los blancos de procedimiento en la determinación de HAP en agua de lluvia (continúa).

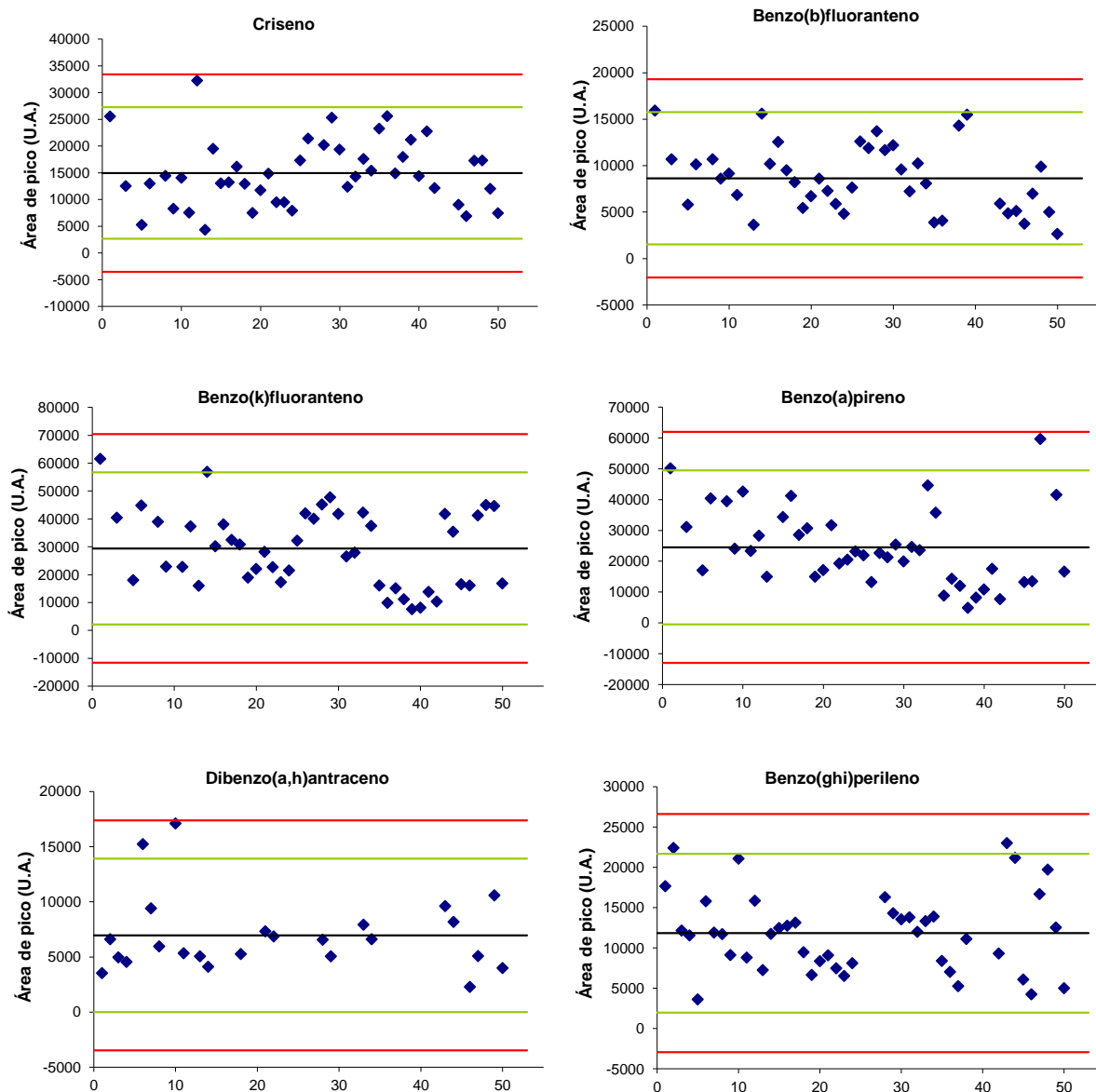


Figura 23. Gráficos de control de los blancos de procedimiento en la determinación de HAP en agua de lluvia.

4.3.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Para validar el método optimizado se han evaluado los rangos lineales, la precisión (inter-día), la exactitud y los límites de detección y cuantificación para los 15 HAP analizados, así como la posibilidad de usar el 2-metilnaftaleno como patrón interno tipo II (subrogado).

En la determinación de rangos lineales se prepararon curvas de calibración con 7 niveles de concentración entre 10 y 1500 ng/L (concentración con el 15% de THF ya incluido) y 2 réplicas por nivel. Todos los ajustes presentan $R^2 > 0,998$ y el rango lineal llega al menos hasta 1500 ng/L (1765 ng/L en la muestra antes de añadir el THF) para todos los analitos (Tabla 9).

Los límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LC) se han calculado a partir de las réplicas de los blancos de procedimiento, con las fórmulas siguientes, siguiendo la definición de la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*, Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) [IUPAC, 2014]:

$$LD = \frac{\text{Señal media del blanco} + 3 \times SD_{\text{blanco}}}{\text{Pendiente de la recta de calibrado}}; \quad LC = \frac{\text{Señal media del blanco} + 10 \times SD_{\text{blanco}}}{\text{Pendiente de la recta de calibrado}}$$

Para los compuestos que no aparecen regularmente en los blancos (naftaleno, acenafteno, fluoreno e indeno(1,2,3-cd)pireno), se ha determinado experimentalmente el LC como la menor concentración para la que se obtiene una señal reproducible (CV < 20%) y consistente con la recta de calibrado (es decir, que el área obtenida se corresponda con la concentración introducida). De este modo, el LC para para naftaleno, fluoreno e indeno(1,2,3-cd)pireno se fijó en 20 ng/L (CV = 13, 7 y 15% respectivamente para n=3), mientras que para el acenafteno se corresponde con 10 ng/L (CV < 3%). El límite de detección se ha calculado como la tercera parte del límite de cuantificación [ISO/TS 13530:2009; Tillner *et al.*, 2013]. Todos los límites se han comprobado experimentalmente, independientemente del método de cálculo. Además, las señales de los blancos de procedimiento se restan a las áreas obtenidas en las muestras.

Tabla 9. Calibrados y límites de detección (LD) y cuantificación (LC) obtenidos para el método optimizado para la determinación de HAP en agua de lluvia.

	Recta de calibrado ($y=a+b \cdot x$)			LD (ng/L)	LC (ng/L)
	$a \pm s_a$ (ng/L)	$b \pm s_b (\times 10^3)$ (ng/L)	R ²		
Naph	1 ± 4	0,364 ± 0,005	0,9991	6,7	20
Ace	-24 ± 13	1,18 ± 0,02	0,9989	3,3	10
Fl	-15 ± 7	0,56 ± 0,01	0,9984	6,7	20
Phe	-13 ± 11	1,24 ± 0,02	0,9993	28	65
Ant	-15 ± 152	11,6 ± 0,2	0,9985	2,3	5,7
Ft	0 ± 22	1,80 ± 0,03	0,9987	24	46
Pyr	-49 ± 80	6,6 ± 0,1	0,9987	13	27
BaA	-55 ± 102	9,6 ± 0,1	0,9990	3,7	8,0
Chry	-11 ± 24	1,91 ± 0,03	0,9986	5,9	8,7
BbF	-13 ± 19	1,87 ± 0,03	0,9991	9,3	21
BkF	-109 ± 138	13,7 ± 0,2	0,9991	4,6	9,6
BaP	-83 ± 150	13,9 ± 0,2	0,9990	4,4	9,2
DBahA	-86 ± 48	4,89 ± 0,06	0,9992	3,2	6,4
BghiP	-63 ± 48	4,53 ± 0,06	0,9990	5,2	12
IP	-21 ± 9	0,69 ± 0,01	0,9991	6,7	20

En general, los límites de detección están por debajo de 10 ng/L y los límites de cuantificación son menores de 20 ng/L (Tabla 9). Los tres compuestos con mayores señales en los blancos de procedimiento (fenantreno, fluoranteno y pireno) tienen valores más elevados. Por tanto, para mejorar estos límites habría que centrarse en determinar y minimizar las causas concretas de su aparición en los blancos, evaluando material, disolventes y ambiente del laboratorio. Los LD del método desarrollado son comparables

a los publicados en la bibliografía (Tabla 4), incluso a los de algunos métodos que consumen un volumen muy superior de muestra (hasta 8 L [Huang *et al.*, 2009], frente a los 5 mL de este método). En concreto, el LD del naftaleno (7 ng/L), un compuesto volátil que suele dar lugar a recuperaciones bajas, mejora los límites publicados en la mayoría de los métodos para este HAP (17-220 ng/L) [Delhomme *et al.*, 2007; Kiss *et al.*, 1996; Rianawati y Balasubramanian, 2009; Anil *et al.*, 2012; Guo y Lee, 2011b; Vinci *et al.*, 2013; Bagheri y Roostaie, 2012; Xiao *et al.* 2012].

Los LC obtenidos están por debajo de la cantidad máxima admisible fijada en la Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de agosto de 2013 para naftaleno, antraceno, fluoranteno, benzo(k)fluoranteno y benzo(a)pireno en aguas superficiales (Tabla 10). Para el benzo(b)fluoranteno el LC está por encima del límite, aunque el LD sí está por debajo, mientras que para el benzo(ghi)perileno ambos límites están por debajo de lo exigido por la legislación. Sin embargo, hay que tener en consideración que el método no se ha desarrollado pensando en aplicarlo a esta matriz.

Tabla 10. Normas de calidad ambiental para HAP recogidas en la Directiva 2013/39/UE.

	Media anual en aguas superficiales (continentales y otras) (ng/L)	Cantidad máxima admisible (ng/L)	
		Aguas superficiales continentales	Otras aguas superficiales
Naph	2000	1,3×10 ⁵	1,3×10 ⁵
Ant	100	100	100
Ft	6,3	120	120
BbF	-	17	17
BkF	-	17	17
BaP	0,17	270	27
BghiP	-	8,2	0,82

La precisión del método se evalúa mediante el análisis diario de disoluciones patrón (precisión inter-día), que también se emplean como controles para comprobar que la respuesta del método frente a una determinada concentración de analito se mantiene constante en el tiempo.

En la Tabla 11 se presentan los datos (en CV) para dos periodos de tiempo distintos, entre los cuales el cromatógrafo se utilizó para otro método sin IT-SPME. Se puede comprobar cómo la precisión entre turnos, si bien empeora ligeramente, se mantiene bastante aceptable (CV < 17,5%) a pesar de la falta de continuidad, indicando una buena robustez del sistema.

A pesar de que en general el método presenta buena reproducibilidad, se ha evaluado también el uso de un patrón interno tipo II o subrogado, que idealmente debe comportarse de forma muy similar (pero no idéntica) al analito y que no debe estar presente originalmente en las muestras. El patrón interno se añade a todas las muestras, patrones y blancos en una cantidad igual para todos con el fin de minimizar o corregir las posibles variaciones de las condiciones y/o de los instrumentos en cualquier etapa del análisis, al trabajar con la relación señal del analito/señal del patrón interno, que será independiente de las posibles fluctuaciones.

Tabla 11. Reproducibilidad inter-día a dos niveles de concentración (250 y 1000 ng/L), expresada en % de coeficientes de variación, del método de determinación de HAP en agua de lluvia.

	% CV inter-día (250 ng/L)				% CV inter-día (1×10 ³ ng/L) (n=7)
	Turno 1 (n=8)	Turno 2 (n=11)	Turnos 1+2 (n=19)	Turnos 1+2 (n=19), con patrón interno	
Naph	5,5	9,3	8,1	8,1	5,8
Ace	5,6	9,3	12,4	6,3	5,2
Fl	5,9	9,4	10,0	4,5	3,4
Phe	5,8	6,7	12,8	8,1	11,6
Ant	6,4	9,4	12,8	7,2	6,7
Ft	12,8 ^a	10,3	15,7 ^d	13,5	7,2
Pyr	6,9	10,1	14,6	8,1	5,7
BaA	9,7	10,0	17,5	12,6	6,9
Chry	4,5	8,5	15,1	10,6	7,4
BbF	4,4	12,3	14,8	12,1	8,5
BkF	3,9	12,5	15,4	12,3	8,7
BaP	4,6	13,1	17,4	13,8	10,4
DBahA	4,4	13,9 ^b	13,7 ^d	14,4	14,6
BghiP	7,0	12,9 ^c	15,1 ^d	12,4 ^d	13,1
IP	6,1	13,7 ^c	16,1 ^e	13,4 ^e	14,1

^an=7; ^bn=10; ^cn=9; ^dn=18; ^en=17

Se plantea la posibilidad de utilizar derivados metilados de los HAP como patrón interno. Se prueba el comportamiento cromatográfico de tres hidrocarburos aromáticos policíclicos metilados. El 1-metilfluoreno y el 1-metilfenantreno coeluyen con el antraceno y el fluoranteno, respectivamente, con el gradiente optimizado. El 2-metilnaftaleno, en cambio, no coeluye con ningún analito, aunque su tiempo de retención es próximo al del acenafteno. Al no estar totalmente resuelto el trío 2-metilnaftaleno, acenafteno y fluoreno, no es posible cambiar las condiciones de fluorescencia entre ellos, pero se pueden encontrar unas condiciones de compromiso que permiten determinar a los tres. Se adoptan las condiciones $\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$ para los HAP desde el naftaleno hasta el fluoreno [UNE-EN ISO 17993:2004]. Para el fenantreno se mantienen las condiciones $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$ (Tabla 6), ya que experimenta una pérdida de sensibilidad en las condiciones sugeridas en la norma UNE-EN ISO.

Evaluando su utilidad como patrón interno, se añade 2-metilnaftaleno a una concentración de 250 ng/L a muestras y patrones. El compuesto metilado se comporta de la misma manera que los HAP más ligeros (lo que permite utilizar la relación de áreas para corregir fluctuaciones); sin embargo, el comportamiento de los HAP más pesados (desde el benzo(a)antraceno hasta el indeno(1,2,3-cd)pireno) no es siempre proporcional al de este compuesto. Por tanto, el 2-metilnaftaleno no siempre sirve como patrón interno para los analitos más pesados. Se ha visto que si las fluctuaciones se deben a una variación en el volumen de muestra que se está pasando a través del capilar (por pérdidas en la jeringa), el 2-metilnaftaleno corrige bastante bien los resultados de todos los compuestos analizados, incluyendo los pesados, pero si las diferencias se deben a otra causa (relativa a la extracción o la desorción) únicamente se podría usar para corregir las señales de los analitos más ligeros. Por otra parte, algunas de las muestras analizadas pueden contener

niveles de 2-metilnaftaleno comparables a la cantidad añadida como patrón interno, lo que desaconseja su utilización. Aun así Dolan (2012) comenta que aunque lo ideal es que el patrón interno no esté presente en las muestras, si la señal en las muestras no es superior al 2% de la señal del pico del patrón interno añadido, no debería ser un problema, aunque recomienda una pre-validación con patrón interno y externo. Por los motivos expuestos, no se considera necesaria la utilización del método del patrón interno, ni el 2-metilnaftaleno como el subrogado más adecuado. Sin embargo, dado que la corrección de señales con este compuesto mejora ligeramente la reproducibilidad entre turnos (Tabla 11), se añade el 2-metilnaftaleno a blancos, muestras y patrones con el fin de emplear su señal para detectar cualquier posible anomalía relativa al instrumento o a las condiciones de extracción y concentración.

Por otra parte, se ha evaluado la exactitud mediante estudios de recuperación analítica sobre agua de lluvia de una zona suburbana a dos niveles, obteniendo valores aceptables. También se han llevado a cabo estudios de recuperación analítica en otras dos matrices acuosas, agua de río y agua de fuente (se sobrecarga con 250 ng/L en los dos casos). Las recuperaciones obtenidas también están en valores adecuados, por lo que el método se puede aplicar a estos tipos de muestra (Tabla 12).

En la misma tabla se indican los valores de las recuperaciones absolutas que se han calculado para evaluar la eficiencia de la microextracción en fase sólida *in-tube*. Éstas se calculan comparando las áreas obtenidas para una misma cantidad de analitos introducida en el sistema a través del capilar e inyectada directamente en el sistema cromatográfico sin tratamiento previo. Para introducir mediante inyección directa (con un volumen de 20 μ L) la misma masa que hay en los 5 mL que se pasan a través del capilar se necesita una disolución patrón de concentración elevada (250 veces mayor que la que se procesa por IT-SPME y por tanto superior a las concentraciones esperadas en agua de lluvia). Se comparan las áreas para 1,25 ng (250 ng/L en IT-SPME y $6,25 \times 10^4$ ng/L en inyección directa) y para 5 ng (10^3 ng/L en IT-SPME y $2,5 \times 10^5$ ng/L), presentando las recuperaciones absolutas a ambos niveles en la Tabla 12.

Dado que la IT-SPME es una técnica de extracción no exhaustiva, no se alcanza una recuperación del 100%, sino que se obtiene un valor medio de recuperación absoluta de 25,7%. Sin embargo, el factor de concentración alcanzado es de 64,2, lo que permite obtener muy buena sensibilidad y analizar concentraciones mucho menores de las que se detectan mediante la inyección directa. Los valores de recuperación absoluta obtenidos varían para cada HAP, siendo similares a los que se encontraban publicados previamente para HAP por IT-SPME para los compuestos más pesados (26-30%), pero mejorando ligeramente los valores previos para los más ligeros [Campíns-Falcó *et al.*, 2008].

Tabla 12. Recuperaciones analíticas obtenidas para muestras de distintas aguas sobrecargadas con disoluciones patrón de HAP y recuperaciones absolutas de la IT-SPME.

	%R ^{A,*}	%R ^{B,*}	%R ^{A,*}	%R ^{A,*}	%R absoluta (IT-SPME)	
	(agua de lluvia)		(agua de río)	(agua de fuente)	%R ^{A,*}	%R ^{B,*}
Naph	92 ± 4	83 ± 1	98 ± 1	96 ± 11	11,0 ± 0,3	11,0 ± 0,8
Ace	87 ± 5	86 ± 3	100 ± 5	89 ± 7	23,5 ± 0,2	23,9 ± 0,8
Fl	88 ± 6	85 ± 2	98 ± 5	95 ± 8	25,5 ± 0,3	25,4 ± 0,9
Phe	85 ± 7	90 ± 4	101 ± 7	92 ± 7	24,3 ± 0,2	24,2 ± 0,9
Ant	85 ± 9	92 ± 5	103 ± 6	93 ± 9	27,1 ± 0,3	27,1 ± 0,7
Ft	82 ± 8	93 ± 3	102 ± 6	93 ± 6	27 ± 1	27,4 ± 0,6
Pyr	80 ± 8	92 ± 4	98 ± 3	103 ± 19	28,1 ± 0,3	27,9 ± 0,7
BaA	72 ± 6	89 ± 5	101 ± 2	100 ± 9	29,9 ± 0,3	31,4 ± 0,3
Chry	72 ± 5	90 ± 6	100 ± 1	103 ± 8	29,0 ± 0,4	30,1 ± 0,3
BbF	79 ± 4	84 ± 6	105 ± 3	105 ± 11	26,3 ± 0,6	29,1 ± 0,7
BkF	78 ± 5	84 ± 7	105 ± 4	102 ± 11	27,4 ± 0,3	30,0 ± 0,7
BaP	80 ± 6	84 ± 7	103 ± 3	98 ± 11	27,1 ± 0,3	28,8 ± 0,4
DBahA	92 ± 3	82 ± 8	107 ± 8	102 ± 14	22,1 ± 0,6	27 ± 1
BghiP	93 ± 4	84 ± 7	110 ± 9	96 ± 14	23,5 ± 0,6	26,4 ± 0,9
IP	96 ± 1	84 ± 9	110 ± 9	100 ± 11	23 ± 2	26,4 ± 0,9

^A 250 ng/L; ^B 1×10³ ng/L

4.3.6. APLICACIÓN A MUESTRAS

El método validado se ha aplicado a varias muestras de agua de lluvia (diarias y mensuales) y también a otras matrices acuosas ambientales (agua de río, de fuente y de lago). Las muestras de agua de lluvia se recogen con un muestreador de vidrio Pyrex[®] silanizado (DEPOBULK[®], LabService Analytica, Fig. 24) de 10 L de capacidad y con un embudo de 218 mm de diámetro interno. Se recoge la deposición total (húmeda y seca), aunque solo se analiza la fracción soluble. Para evitar la alteración de la muestra durante el periodo de almacenamiento hasta el análisis, las muestras se filtran (apartado 4.3.3) antes de su almacenaje, congeladas a -18°C (Norma UNE-EN 15980).



Figura 24. Muestreador de vidrio Pyrex silanizado DEPOBULK[®], con su soporte.

Se han recogido dos tipos de muestra de agua de lluvia en función del periodo de muestreo: muestras diarias (código EV), recogidas en un área suburbana (Instituto Universitario de Medio Ambiente (IUMA), Liáns-Oleiros, A Coruña, España) durante 24 h, y muestras mensuales (código M), recogidas en una zona industrial (Ferroatlántica S.L., Polígono Industrial de Sabón, A Coruña, España) en un periodo de muestreo de un mes. Las muestras puntuales de agua de lago (As Pontes), de río (Eume) y de fuente (Ribeira Nova) se han recogido en la parte superficial del agua. Los puntos de muestreo se encuentran en As Pontes de García Rodríguez (A Coruña, España), en una zona cercana a una central térmica. Las botellas (lavadas previamente según el protocolo descrito en el apartado 4.2), se enjuagan tres veces con el agua correspondiente antes de llenarlas de muestra. Los niveles encontrados son del orden de ng/L, con la concentración total de HAP (Σ HAP) por debajo de 500 ng/L para todas las muestras (Tabla 13).

Las muestras de agua de lluvia diarias presentan valores de concentración superiores a las muestras mensuales (M-1 a M-3), lo que se puede explicar por el efecto lavado que el agua de lluvia tiene sobre los HAP. La precipitación inicial lava la atmósfera, con unas concentraciones más altas. El volumen posterior, con concentraciones más bajas, diluye la muestra. Por tanto, a menor volumen recogido mayores son los niveles de HAP encontrados. Este efecto se observa particularmente bien en las muestras EV-1, EV-2 y EV-3, que corresponden a días consecutivos. La concentración total de HAP disminuye notablemente del primer al último día de muestreo. En el segundo día las concentraciones son ligeramente más bajas que en el tercero, pero esto se explica porque la muestra EV-2 tiene un volumen más grande y por tanto mayor dilución. Las otras dos muestras diarias (EV-4 y EV-5) presentan valores más elevados para los HAP, lo que se justifica porque los días previos a ambos muestreos apenas había llovido. En concreto, cuando se recogió la muestra EV-5 llevaba 5 días sin llover, lo que probablemente sea una de las causas de que sea la muestra con los valores de concentración de HAP más elevados.

Los HAP que predominan en las muestras de agua de lluvia analizadas son los de peso molecular bajo y medio. El naftaleno es el compuesto que aparece con mayor frecuencia en las muestras, y es también el que presenta la concentración más elevada en la mayoría de ellas (suele ser uno de los HAP mayoritarios en agua de lluvia cuando es analizado), con niveles entre 106 y 221 ng/L en las muestras diarias (los demás HAP aparecen con concentraciones entre 6,4 y 124 ng/L). La única muestra en la que el naftaleno no es el compuesto mayoritario es M-3, de la zona industrial, en la que el fenantreno posee una concentración más elevada.

En cuanto a las muestras ambientales de aguas de diferente naturaleza: agua de río, lago y fuente, indicar que los niveles de HAP encontrados son muy bajos (< 15 ng/L) y la mayoría de los analitos se encuentran por debajo del límite de cuantificación. En la muestra de agua de fuente se detectan 6 HAP, todos por debajo del límite de cuantificación; en el agua de río también se detectan 6 HAP, pudiendo cuantificar solamente el benzo(a)pireno. Por último, en la muestra de agua de lago están por encima del límite de detección 9 de los HAP objeto de estudio, siendo cuantificables únicamente el acenafteno y el antraceno, y ambos con concentraciones bajas.

Tabla 13. Concentraciones (ng/L) de los HAP encontradas en las muestras de aguas ambientales analizadas.

Vol.*	AGUA DE LLUVIA										AGUA DE LAGO		AGUA DE RÍO							
	DIARIAS					MENSUALES					AP-1	AP-2								
	EV-1	EV-2	EV-3	EV-4	EV-5	M-1	M-2	M-3	M-3	M-3										
	275*	695*	470*	260*	75*															
Naph	180 ± 11	106 ± 10	146 ± 19	258 ± 15	221 ± 2	88 ± 9	47 ± 8	54 ± 12	n,d	n,d	12,2 ± 1,4	< LC	n.d.	< LC	n.d.	< LC	n.d.	< LC	n.d.	< LC
Ace	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC
Fl	n.d.	38,3 ± 0,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	47,9 ± 4,8	32,5 ± 0,6	n.d.	n.d.	124 ± 4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phe	< LC	< LC	n.d.	< LC	7,5 ± 0,03	6,5 ± 0,4	6,4 ± 0,2	4,6 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2
Ant	7,5 ± 1,1	n.d.	6,5	6,4 ± 0,2	7,5 ± 0,03	6,5 ± 0,4	6,4 ± 0,2	4,6 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2
Ft	< LC	n.d.	n.d.	61,2 ± 9,4	92,0 ± 19,2	n.d.	61,2 ± 9,4	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC
Pyr	18,0 ± 1,0	19 ± 1	< LC	42,4 ± 4,5	58,5 ± 3,5	n.d.	42,4 ± 4,5	35,7 ± 2,2	35,7 ± 2,2	35,7 ± 2,2	35,7 ± 2,2	35,7 ± 2,2	35,7 ± 2,2	35,7 ± 2,2	35,7 ± 2,2	35,7 ± 2,2	35,7 ± 2,2	35,7 ± 2,2	35,7 ± 2,2	35,7 ± 2,2
BaA	10,4 ± 4,5	n.d.	6,9	11,8 ± 0,4	11,5 ± 0,5	< LC	11,8 ± 0,4	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC
Chry	11,4 ± 8,1	n.d.	< LC	30,0 ± 0,2	21,4 ± 0,3	n.d.	30,0 ± 0,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BbF	< LC	n.d.	n.d.	< LC	< LC	n.d.	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC	< LC
BkF	10,7 ± 3,2	n.d.	n.d.	8,3 ± 0,4	9,8 ± 0,4	n.d.	8,3 ± 0,4	9,8 ± 0,4	9,8 ± 0,4	9,8 ± 0,4	9,8 ± 0,4	9,8 ± 0,4	9,8 ± 0,4	9,8 ± 0,4	9,8 ± 0,4	9,8 ± 0,4	9,8 ± 0,4	9,8 ± 0,4	9,8 ± 0,4	9,8 ± 0,4
BaP	13,1 ± 6,5	n.d.	n.d.	n.d.	8,6 ± 0,4	n.d.	n.d.	8,6 ± 0,4	8,6 ± 0,4	8,6 ± 0,4	8,6 ± 0,4	8,6 ± 0,4	8,6 ± 0,4	8,6 ± 0,4	8,6 ± 0,4	8,6 ± 0,4	8,6 ± 0,4	8,6 ± 0,4	8,6 ± 0,4	8,6 ± 0,4
DBahA	12,5	n.d.	11,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BghiP	13,0 ± 1,2	n.d.	11,2	n.d.	13,1 ± 0,6	n.d.	n.d.	13,1 ± 0,6	13,1 ± 0,6	13,1 ± 0,6	13,1 ± 0,6	13,1 ± 0,6	13,1 ± 0,6	13,1 ± 0,6	13,1 ± 0,6	13,1 ± 0,6	13,1 ± 0,6	13,1 ± 0,6	13,1 ± 0,6	13,1 ± 0,6
IP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Σ HAP	277 ± 37	164 ± 12	182 ± 19	418 ± 30	491 ± 32	94 ± 9	55 ± 8	277 ± 51	15,3 ± 1,4	9,5 ± 1,2	15,3 ± 1,4	9,5 ± 1,2	15,3 ± 1,4	9,5 ± 1,2	15,3 ± 1,4	9,5 ± 1,2	15,3 ± 1,4	9,5 ± 1,2	15,3 ± 1,4	9,5 ± 1,2

* Volumen recogido de las muestras de agua de lluvia diarias, en mL, n.d.: No detectado

4.3.7. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA SIMULTÁNEA DE HAP Y FTALATOS

Durante la aplicación a muestras del método optimizado se lleva a cabo un *screening* en los cromatogramas del detector de fotodiodos, que gracias a los espectros de absorción puede permitir identificar los picos encontrados. En las muestras de agua de lluvia se observan picos cuyos espectros parecen similares a los de los ftalatos (analitos que van a determinar en el capítulo 5).

Por este motivo, se optimiza una separación cromatográfica simultánea para los 16 HAP prioritarios de la EPA (los 15 del método optimizado más el acenaftileno, Acy) y 6 ftalatos (dimetilftalato (DMP), dietilftalato (DEP), butilbencilftalato (BBP), di-n-butilftalato (DBP), di(2-etilhexil)ftalato (DEHP) y di-n-octilftalato (DnOP)) mediante una variación del gradiente optimizado para la separación de los 15 HAP (16 en UV) y con la misma columna C₁₈. La modificación consiste en mantener un porcentaje elevado de agua durante más tiempo, suavizando la rampa inicial del gradiente (de 8 a 12 min) y aumentando el tiempo de la etapa isocrática posterior (de 4 a 10 min). Con el nuevo gradiente (Tabla 14), en menos de 50 min se separan los 22 compuestos, a excepción de la coelución que se produce del fluoreno y el butilbencilftalato (Fig. 25).

Tabla 14. Gradiente optimizado para la separación simultánea de HAP y ftalatos.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%ACN	%H ₂ O
0,01	0,25	50	50
12	0,5	70	30
22	0,5	70	30
27	0,5	100	0
48	0,5	100	0
52	0,5	50	50
56	0,5	50	50
59	0,25	50	50

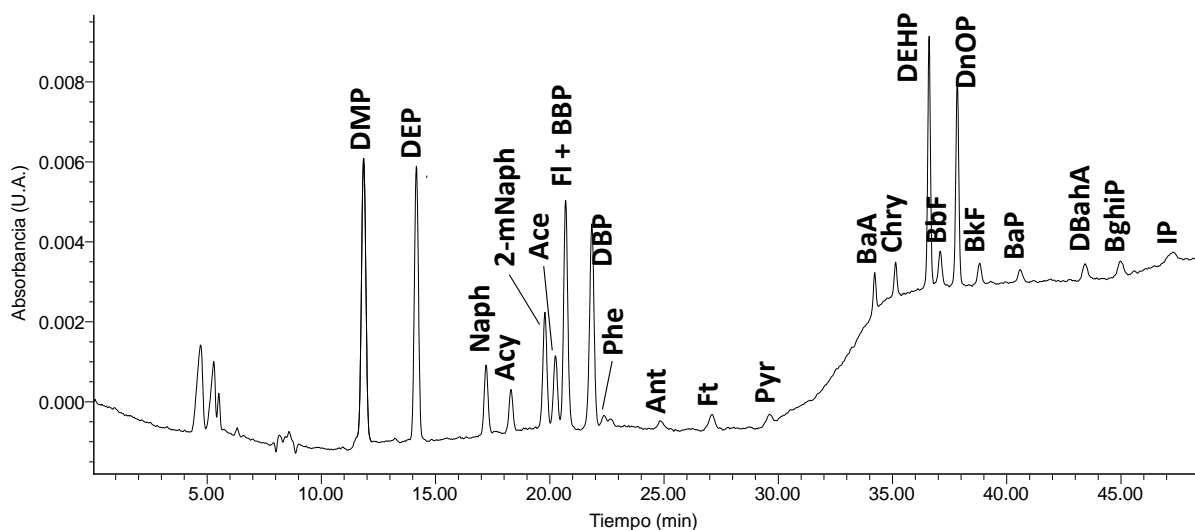


Figura 25. Cromatograma a 223,8 nm de la inyección directa (20 μ L) de una disolución patrón de ftalatos (1 μ g/mL) y HAP (25 ng/mL) con el gradiente optimizado para la separación simultánea.

La cuantificación de estos dos compuestos que coeluyen se podría solventar teniendo en cuenta que al no ser fluorescente el ftalato podría determinarse la concentración de fluoreno por fluorescencia sin que el butilbencilftalato (BBP) suponga una interferencia, si se poseen los detectores de DAD y fluorescencia en serie, como en este caso. La concentración del BBP se estimaría por diferencia o podría determinarse mediante análisis espectroscópico de mezclas con el detector de fotodiodos con un método quimiométrico, aprovechando las diferencias entre los espectros de absorción de ambos compuestos (Fig. 26).

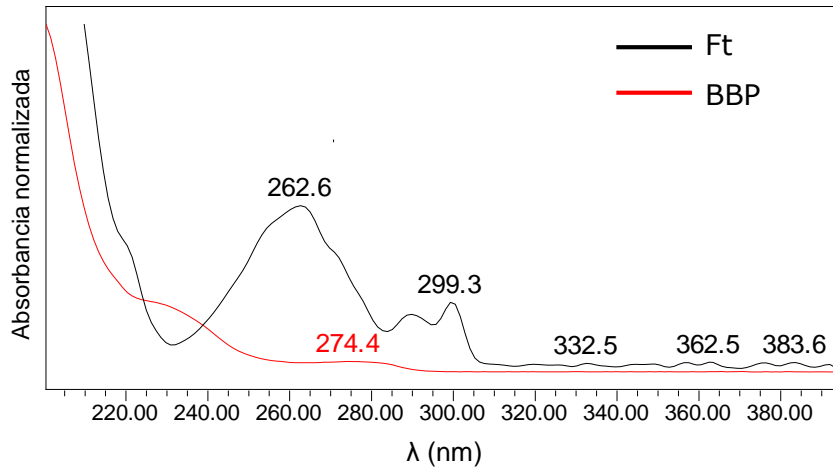


Figura 26. Espectros de absorción UV-Visible de fluoranteno y butilbencilftalato.

A pesar de que el método no se ha validado para los ftalatos ni se han determinado LD y LC para ellos, esta separación se puede emplear para el *screening* de estos compuestos (simultánea a la determinación de HAP) con una pequeña modificación del método de HAP en agua de lluvia propuesto en esta Tesis Doctoral. Los ftalatos hallados con mayor frecuencia son el DEHP y el DBP, seguidos del DEP. Los dos primeros se han encontrado en prácticamente todas las muestras procesadas, pero también en los blancos, mientras que el DEP no se ha identificado en los blancos.

En el caso del DEHP, prácticamente para todas las muestras el área del pico correspondiente es muy similar (e incluso algo inferior) a la del blanco de ese día, por lo que no se puede asegurar su presencia en las muestras. Por el contrario, en el caso del DBP, en casi todos los casos existe diferencia entre el área obtenida en la muestra y la obtenida en el blanco, con áreas en la muestra entre 3 y 9 veces superiores a las de los blancos. También hay algunas muestras en las que se encuentra el DBP mientras que en el correspondiente blanco no hay señal para este compuesto. Por tanto, parece que este ftalato sí está presente en las muestras de agua de lluvia, al igual que el DEP (que aparece en las muestras y no en los blancos).

4.4. CONCLUSIONES

En el presente capítulo se ha desarrollado un método para la determinación de 15 HAP en muestras acuosas ambientales. El método combina de forma *on-line* la microextracción en fase sólida *in-tube* para el tratamiento de muestra con HPLC con detección de fluorescencia para la determinación. La configuración instrumental elegida, con el capilar de extracción en una válvula externa, permite cambiar de forma sencilla entre el montaje con IT-SPME y el cromatógrafo de líquidos convencional. El método desarrollado ha demostrado una buena robustez frente a periodos alternos del uso del cromatógrafo con la configuración con y sin IT-SPME.

La determinación de los 15 analitos se lleva a cabo en un único análisis tras encontrar unas buenas condiciones de compromiso para todos ellos empleando tetrahidrofurano como modificador orgánico. Esto constituye una diferencia significativa con respecto a otros métodos de análisis de HAP mediante IT-SPME que requerían analizar por separado los compuestos más ligeros y los más pesados. El método incluye una única etapa, además de la filtración previa de la muestra, por lo que es mucho más sencillo y rápido que los procedimientos habituales para el análisis de HAP en este tipo de matrices y a niveles traza o ultratrazo, que suelen incluir varias etapas de preparación de muestra. Entre esas etapas suele estar la concentración del extracto por evaporación, una etapa crítica en la que se pueden producir pérdidas de los analitos y que se evita con el método desarrollado. Además, la cantidad de muestra (inferior a 5 mL) y el consumo de disolventes orgánicos (0,75 mL por muestra) son muy bajos, y esto permite analizar muestras recogidas en periodos de muestreo más cortos de lo habitual o con baja intensidad de precipitación. En comparación con otras técnicas miniaturizadas que también tienen bajo consumo de disolventes y muestra, el método optimizado en este capítulo es significativamente más rápido (7 min frente a tiempos de entre 25 y 75 min en SPME en fibra) [Anıl *et al.*, 2012; Guo and Lee, 2011b; Xiao *et al.* 2012] y con menos etapas que la microextracción líquido-líquido dispersiva [Pena *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2009a].

El método optimizado se ha utilizado para llevar a cabo un estudio cinético de la estabilidad de los HAP en agua de lluvia. A pesar de que la mayoría de los compuestos (en especial los más pesados) presentan una pérdida o degradación muy rápida en esta matriz, se ha comprobado que la adición previa del 15% de tetrahidrofurano (modificador orgánico empleado en la etapa de extracción) actúa como conservante estabilizando los HAP en la matriz de agua de lluvia durante su conservación a 4°C.

El método se ha validado obteniendo buenos valores de límites de detección y cuantificación, precisión inter-día y recuperaciones analíticas. Los blancos de procedimiento se han mantenido bajos y estables, controlándolos diariamente. Además, se ha descartado la presencia de efectos memoria.

En las muestras de agua de lluvia analizadas con el método validado los HAP predominantes son los más ligeros; el naftaleno es el más frecuente y mayoritario en casi todas las muestras. Por otra parte, se ha observado un efecto de dilución de muestra cuando los volúmenes recogidos son elevados. Por este motivo, las muestras diarias

presentan niveles más altos que las mensuales. En los otros tipos de aguas analizadas (río, lago y fuente) los niveles son más bajos que en agua de lluvia, con la mayoría de los analitos por debajo del límite de cuantificación.

Por último, se ha optimizado la separación simultánea de los HAP y 6 ftalatos, que permite el *screening* de estos últimos además de la cuantificación de los HAP, mediante una modificación del gradiente empleado en el método desarrollado. Los 22 compuestos se separan en menos de 50 min, a excepción de fluoreno y benzilbutilftalato, cuyas concentraciones se podrían determinar igualmente por separado al trabajar con un detector de fotodiodos y uno de fluorescencia en serie. DEP, DBP y DEHP se han identificado en las muestras, si bien el DEHP podría deberse a los valores de fondo, ya que aparece en los blancos de procedimiento con señales del mismo orden que en las muestras.

4.5. REFERENCIAS

- Anıl I., Öztürk N., Alagha O., Ergenekon P. Optimization of solid-phase microextraction using Taguchi design to quantify trace level polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Journal of Separation Science*, 35 (2012) 3561–3568.
- Bagheri B., Roostaie A. Aniline-silica nanocomposite as a novel solid phase microextraction fiber coating. *Journal of Chromatography A*, 1238 (2012) 22–29.
- Basheer C., Balasubramanian R., Lee. H. K. Determination of organic micropollutants in rainwater using hollow fiber membrane/liquid-phase microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1016 (2003) 11–20.
- Birgül A., Tasdemir Y., Cindoruk S. S. Atmospheric wet and dry deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) determined using a modified sampler. *Atmospheric Research*, 101 (2011) 341–353.
- Blanchard M., Teil M.-J., Guigon E., Larcher-Tiphagne K., Ollivon D., Garban B., Chevreuil M. Persistent toxic substance inputs to the river Seine basin (France) via atmospheric deposition and urban sludge application. *Science of the Total Environment*, 375 (2007) 232–243.
- Bourdat-Deschamps M., Daudin J.-J., Barriuso E. An experimental design approach to optimise the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from rainfall water using stir bar sorptive extraction and high performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1167 (2007) 143–153.
- Bucheli T. D., Haefliger O. P., Dietiker Jr. R., Zenobi R. Analysis of Water Contaminants and Natural Water Samples Using Two-Step Laser Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 72 (2000) 3671–3677.
- Campíns-Falcó P., Verdú-Andrés J., Sevillano-Cabeza A., Molins-Legua C., Herráez-Hernández. R. New micromethod combining miniaturized matrix solid-phase dispersion and in-tube in-valve solid-phase microextraction for estimating polycyclic aromatic hydrocarbons in bivalves. *Journal of Chromatography A*, 1211 (2008) 13–21.

- Danyi S., Brose F., Brasseur C., Schneider Y.-J., Larondelle Y., Pussemier L., Robbens J., De Saeger S., Maghuin-Rogister G., Scippo M.-L. Analysis of EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons in food supplements using high performance liquid chromatography coupled to an ultraviolet, diode array or fluorescence detector. *Analytica Chimica Acta*, 633 (2009) 293–299.
- Delhomme O., Rieb E., Millet M. Solid-Phase Extraction and LC with Fluorescence Detection for Analysis of PAHs in Rainwater. *Chromatographia*, 65 (2007) 163–171.
- Delhomme O., Rieb E., Millet M. Polycyclic aromatic hydrocarbons analyzed in rainwater collected on two sites in East of France (Strasbourg and Erstein). *Polycyclic Aromatic Compounds*, 28 (2008) 472–485.
- Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de agosto de 2013 por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas.
- Dolan J. W. Will an internal standard always improve data quality? *LCGC North America*, 30(6) (2012) 474–581.
- Franz T. P., Eisenreich S. J. Snow Scavenging of Polychlorinated Biphenyls and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Minnesota. *Environmental Science and Technology*, 32 (1998) 1771–1778.
- Fernández Amado M. *Evaluación de la microextracción en fase sólida in-tube para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en partes por trillón en muestras ambientales*. Tesis de Licenciatura, Departamento de Química Analítica, Universidade da Coruña (2014).
- Gaga E. O., Tuncel S. G. Occurrence and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in Ankara precipitation. *Water, Air, and Soil Pollution: Focus*, 3 (2003) 127–134.
- Grynkiewick M., Polkowska Z., Namieśnik J. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in bulk precipitation and runoff waters in an urban region (Poland). *Atmospheric Environment*, 36 (2002) 361–369.
- Guidotti M., Giovinazzo R., Cedrone O., Vitali M. Determination of organic micropollutants in rain water for laboratory screening of air quality in urban environment. *Environment International*, 26 (2000) 23–28.
- Guo L., Lee H. K. Low-density solvent-based solvent demulsification dispersive liquid–liquid microextraction for the fast determination of trace levels of sixteen priority polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples. *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011a) 5040–5046.
- Guo L., Lee H. K. Development of multiwalled carbon nanotubes based micro-solid-phase extraction for the determination of trace levels of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples. *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011b) 9321–9327.

- He J., Balasubramanian R. Semi-volatile organic compounds (SVOCs) in ambient air and rainwater in a tropical environment: Concentrations and temporal and seasonal trends. *Chemosphere*, 78 (2010) 742–751.
- Huang D., Peng P., Xu Y., Deng Y., Deng H. Distribution and deposition of polycyclic aromatic hydrocarbons in precipitation in Guangzhou, South China. *Journal of Environmental Sciences*, 21 (2009) 654–660.
- Huston R., Chan Y. C., Gardner T., Shaw G., Chapman H. Characterisation of atmospheric deposition as a source of contaminants in urban rainwater tanks. *Water Research*, 43 (2009) 1630–1640.
- International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). *Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book")*. Compilado por A. D. McNaught y A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997. Versión *on-line* corregida (2.3.3, actualizada a 24/2/2014), <https://doi.org/10.1351/goldbook.L03540>.
- Ishizaki A., Saito K., Hanioka N., Narimatsu S., Kataoka H. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 5555–5563.
- Istenič D., Arias C. A., Matamoros V., Vollertsen J., Brix H. Elimination and accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban stormwater wet detention ponds. *Water Science & Technology*, 64.4 (2011) 818–825.
- Kawamura K., Kaplan I. R. Organic Compounds in the Rainwater of Los Angeles. *Environmental Science & Technology*, 17 (1983) 497–501.
- Kiss G., Varga-Puchony Z., Tolnai B., Varga B., Gelencsér A., Krivácsy Z., Hlavay J. The seasonal changes in the concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in precipitation and aerosol near Lake Balaton, Hungary. *Environmental Pollution*, 114 (2001) 55–61.
- Kiss G., Varga-Puchony Z., Hlavay J. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in precipitation using solid-phase extraction and column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 725 (1996) 261–272.
- Lee H. K. Recent applications of gas and high-performance liquid chromatographic techniques to the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulates. *Journal of Chromatography A*, 710(1) (1995) 79–92.
- Li X., Li P., Yan L., Chen J., Cheng T., Xu S. Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in fog-rain events. *Journal of Environmental Monitoring*, 13 (2011) 2988–2993.
- Liu X., Korenaga T. Dynamics Analysis for the Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Rice. *Journal of Health Science*, 47(5) (2001) 446–451.

- Malik A., Singh V. K., Singh K. P. Occurrence and Distribution of Persistent Trace Organics in Rainwater in an Urban Region (India). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 79 (2007) 639–645.
- Matthiessen A. Use of a Keeper to Enhance the Recovery of Volatile Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in HPLC Analysis. *Chromatographia*, 45 (1997) 190–194.
- Norma ISO/TS 13530:2009. *Water quality - Guidance on analytical quality control for chemical and physicochemical water analysis*.
- Norma UNE-EN ISO 17993:2004. *Calidad del agua. Determinación de 15 hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) en agua mediante HPLC con detección por fluorescencia tras extracción líquido-líquido*.
- Norma UNE-EN 15980:2011. *Calidad del aire. Determinación de la deposición de benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[j]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno e indeno[1,2,3-cd]pireno*.
- Olivella M. À. Polycyclic aromatic hydrocarbons in rainwater and surface waters of Lake Maggiore, a subalpine lake in Northern Italy. *Chemosphere*, 63 (2006) 116–131.
- Park J.-S., Wade T. L., Sweet S. Atmospheric distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons and deposition to Galveston Bay, Texas, USA. *Atmospheric Environment*, 35 (2001) 3241–3249.
- Pena M^a T., Casais M^a C., Mejuto M^a C., Cela R. Development of an ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 6356–6364.

**CAPÍTULO 5. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE
FTALATOS EN AGUA DE LLUVIA**

Publicación:

M. Fernández-Amado, M.C. Prieto-Blanco, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez. A comparative study of extractant and chromatographic phases for the rapid and sensitive determination of six phthalates in rainwater samples. *Chemosphere* 175, Mayo 2017, 52–65.

Congresos:

M. Fernández-Amado, M.C. Prieto-Blanco, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez. Separation and concentration of phthalates by in tube solid phase microextraction coupled to liquid chromatography. Comunicación póster. *14as Jornadas de Análisis Instrumental (JAI 2014) / XIV Reunión Científica de la SECyTA*. Barcelona (España) 1-3 Octubre, 2014.

M. Fernández-Amado, M.C. Prieto-Blanco, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez. A cost-effective method for the determination of six phthalates in rainwater. Comunicación póster. *9th European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment / 15th Symposium on Chemistry and Fate of Modern Pesticides*. Santiago de Compostela (España) 4-7 Octubre, 2016. Libro de resúmenes (ISBN: 978-84-945958-1-3), pp. 180-181.

5.1. ANTECEDENTES DE LA DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN AGUA DE LLUVIA Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En este capítulo se presenta la optimización y validación de un método para la determinación de 6 ftalatos en agua de lluvia mediante IT-SPME acoplada a cromatografía de líquidos. Los analitos objeto de estudio son dimetilftalato (DMP), dietilftalato (DEP), butilbencilftalato (BBP), di-n-butilftalato (DBP), di(2-etilhexil)ftalato (DEHP) y di-n-octilftalato (DnOP).

En general, la separación cromatográfica de ftalatos mediante cromatografía de líquidos requiere de tiempos largos, superiores a 30 min [Lin *et al.*, 2003]. El uso de flujos elevados de fase móvil (2 mL/min), para acortar los tiempos, supone un gran consumo de disolventes orgánicos y trabajar a presiones altas en el sistema cromatográfico [Kataoka *et al.*; 2002]. Esto último podría impedir el acoplamiento del capilar para la IT-SPME con el cromatógrafo.

En el caso de los 6 analitos de interés, la principal dificultad para optimizar su separación es la presencia de tres pares críticos (DMP-DEP, BBP-DBP y DEHP-DnOP), en los que cada uno de los componentes del par crítico presenta un comportamiento similar al otro con las distintas variables usadas en la optimización (tipo de columna, porcentaje de modificador, etc). Además, las diferencias de hidrofobicidad entre los compuestos ($\log K_{ow} = 1,6-8,39$) [Xue *et al.*, 2014] y el hecho de que la retención en la columna (en cromatografía de fase inversa) aumente con el número de átomos de carbono contribuyen a alargar el tiempo necesario para la elución de todos los compuestos [Nesterenko *et al.*, 2005]. Para abordar estos problemas, se ha optado por una columna monolítica, cuya estructura porosa proporciona una muy buena resolución manteniendo presiones bajas [Zuo, 2014; Núñez *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2004]. En la bibliografía diversos autores han empleado este tipo de columnas cromatográficas en la separación de ftalatos. En general se aplica el método a un número más limitado de ftalatos (3 o 4) y con tiempos de análisis largos, de hasta 65 minutos [Núñez *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2013; Jornet-Martínez *et al.*, 2014]. Nesterenko *et al.* (2005) presentan una separación de 8 ftalatos en tan solo 8 minutos con una columna monolítica C₁₈, pero con el gradiente que proponen (de flujo variable) se alcanzan flujos de 10 mL/min, que implican presiones elevadas (incluso para la columna monolítica) y además suponen un importante consumo de disolventes.

Los métodos de determinación de ftalatos en agua de lluvia que se pueden encontrar publicados en la bibliografía (Tabla 15) son escasos y presentan puntos débiles que indican que la investigación en este tema no está cerrada, quedando por resolver problemas metodológicos y de carácter medioambiental. En primer lugar, los ftalatos, tal como se ha comentado en el capítulo de introducción, son compuestos ubicuos, presentes tanto en el ambiente del laboratorio como en multitud de materiales utilizados para llevar a cabo las determinaciones. Por este motivo, uno de los mayores problemas que se encuentran a la hora de analizar estos compuestos a niveles traza y ultratrazas es la presencia de valores de fondo en los blancos de procedimiento [Fankhauser-Noti y Grob, 2007; Vavrouš *et al.*,

2016; Guo y Kannan, 2012]. En general, a diferencia de lo que sucede con otros analitos, los blancos de ftalatos no siguen una pauta regular, lo que hace que no sea adecuado corregir los valores de las muestras restando el blanco de procedimiento [Munch *et al.*, 1995]. A pesar de la crítica importancia que tienen los blancos en la determinación de ftalatos, muchos de los métodos publicados no hacen mención a los mismos o la hacen de forma muy superficial. Algunos solucionan el problema restando los valores de los blancos [Zhao *et al.*, 2008; Peters *et al.*, 2008], a pesar de que se recomienda no hacerlo por los motivos antes mencionados. Además, en la mayoría de métodos se calculan los límites de detección a partir de la relación señal/ruido. Estos valores, generalmente, se refieren a límites instrumentales que no tienen en cuenta la contribución de los materiales y el ambiente del laboratorio durante el tratamiento de muestra, a pesar de que en la determinación de ftalatos en muestras medioambientales esta contribución de fondo es particularmente significativa y por tanto estos límites instrumentales no reflejan los límites reales del método.

Por otra parte, pocos métodos publicados hacen uso de técnicas miniaturizadas en la preparación de muestra [Xue *et al.*, 2014; Guidotti *et al.*, 2000]. La mayoría de los métodos, que suelen emplear SPE o extracción líquido-líquido, requieren elevados volúmenes de muestra [Teil *et al.*, 2006; Peters *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2010], lo que impide el análisis de muestras diarias y de eventos en las que se suelen recoger volúmenes pequeños. Además, estos métodos suelen incluir múltiples etapas que aumentan el tiempo de análisis y el consumo de disolventes orgánicos. Asimismo, hay algunos métodos muy específicos que solo permiten la determinación de un único ftalato [Zhang *et al.*, 2012; Baram *et al.*, 2000].

En cuanto a los niveles esperados para ftalatos en agua de lluvia, es complicado llevar a cabo una comparativa entre los valores publicados (Tabla 15). Cada trabajo analiza un número diferente de ftalatos, en distintos tipos de muestra (deposición húmeda o total, fase disuelta o disuelta + partículas), con tiempos de muestreo variables... A esto hay que añadirle la escasa información que se aporta en algunos casos tanto del lugar de muestreo y el tipo de muestra, como del estudio de blancos (que pueden afectar significativamente a las concentraciones obtenidas). En algunos casos se trata de muestras puntuales que son analizadas para comprobar únicamente la aplicabilidad del método frente a otros estudios con un número significativo de muestras [Guidotti *et al.*, 2000; Peters *et al.*, 2008]. Los niveles publicados están en el rango de 0,010 a 189 ng/mL y el DBP y el DEHP son los compuestos más abundantes en la mayoría de los estudios.

Tabla 15. Características de los métodos de determinación de ftalatos en agua de lluvia y niveles encontrados publicados en la bibliografía.

Ftalatos	Muestra (mL)	Etapas y tiempo	Dis. org. (mL) ^a	Técnica		LD (ng/L)	Blancos	Niveles encontrados (ng/mL)	Lugar y periodo de muestreo	n	Tipo de muestra	Ref.
				prepar.	determ.							
DEP, DIPP, DPP, DiBP, DBP, BBP, DEHP, DnOP	7	1. SPME con sales disueltas (30 min)	-	SPME (fibra PDMS)	GC-MS	6-94 (MDQ)	Proced.	3,2-11,4	Rieti (Italia), 1997	30	n.e.	Guidotti et al., 2000
DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DnOP	3000	1. Extracciones líquido-líquido (3x40 min) 2. Concentración	900	LLE	GC-ECD (inyector on column)	10-30	Por etapas	0,010-0,592. DBP y DEHP son los mayoritarios	París (Francia), May 2002-Abr 2003	12	Deposición total y solo húmeda, 15 días, fase disuelta y partículas	Tejl et al., 2006
DMP, DEP, DBP, DEHP, DnOP	50	1. Preacondicionamiento de la nanofibra 2. Extracción 3. Concentración en corriente de N ₂	0,9	SPE (nanofibras Nylon6)	HPLC-UV	2-33	n.e.	0,180 (DEHP), 0,370 (DnOP)	Nanjing (China), 23 Feb 2003	1	Fase disuelta	Xu et al., 2010
DMP	0,05	1. Recubrimiento de los pocillos (toda la noche) 2. Lavado (3 veces) 3. Incubación (30 min) 4. Lavado / Incubación (1,5 h) 5. Lavado / Incubación (2,5 h) 6. Lavado 7. Incubación/reacción enzimática (30 min) ^b	-	Sin extracción previa	ic-ELISA	10	n.e.	0,032	Wuhu (China)	1	Fase disuelta	Zhang et al., 2012
DMP, DEP, DBP, BBP	100	1. Preacondicionamiento del cartucho 2. Extracción con pH controlado 3. Lavado 4. Secado 5. Elución 6. Concentración en corriente de N ₂	10	SPE (carbón de bambú)	HPLC-UV	350-430	Proced. ^c	0,59 (DMP), 0,469 (DEP)	Jinan (China), 2 Ago 2007	1	Fase disuelta	Zhao et al., 2008
DEHP	20	-	-	Preconcentración directa en la columna cromatográfica	HPLC-UV	100	No considerados	<0,3-0,3	Irkutsk (Rusia), Jun 1998	n.e.	n.e.	Baram et al., 2000
DMP, DEP, DiBP, DBP, DCHP, DEHP, DPhP, DnOP, DiNP, DiDP	Toda la muestra (600-2300)	1. Ajuste de pH y adición de NaCl 2. Extracciones líquido-líquido (2x3 min) 3. Secado con sulfato sódico 4. Concentración en rotavapor y corriente de N ₂ 5. Redisolución	n.e. (>10,5)	LLE	GC-MS	10-100 (MDL)	0,030-0,600 µg/L ^c	<MDL-98,429. DEHP y DiNP son los mayoritarios	50 puntos (Alemania y Países Bajos), Feb-Mar 2013	50	Deposición total, 4 semanas	Peters et al., 2008
DMP, DEP, BBP, DBP, DEHP, DnOP	10	1. Extracción con sales y ajuste de pH (2 min) 2. Centrifugación (5 min) 3. Eliminación de la fase acuosa	0,79	DLLME	HPLC-UV	10-30	n.e.	1,01-6,36. DEHP y DBP son los mayoritarios	China, May 2013	1	Fase disuelta	Xue et al., 2014

^aConsumo de disolventes orgánicos por muestra; ^bSe pueden analizar 96 muestras a la vez; ^cSe restan los blancos. Técnica prepar.: Técnica de preparación; Técnica determ.: Técnica de determinación; n: Número de muestras analizadas; n.e.: No especificado; MDQ: Cantidad mínima detectable del procedimiento; LD: Límite de detección del método; ic-ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas indirecto competitivo; DCHP: Diciohexilftalato; DiBP: Diisobutilftalato; DiDP: Diisodocilftalato; DiNP: Diisobutilftalato; DiPP: Diisopropilftalato; DPP: Di-n-propilftalato

5.2. METODOLOGÍA

El sistema cromatográfico empleado, así como las jeringas y viales y la configuración de IT-SPME, se han descrito en el capítulo 4 (apartado 4.2) y al inicio del apartado 4.3.1 (Selección de la configuración de IT-SPME), respectivamente.

Como capilares de extracción para IT-SPME se emplean la columna capilar de gases TRB-5 (95% dimetil-5% difenilpolisiloxano, 0,32 mm i.d. y 3 μm de espesor) (Teknokroma, Barcelona, España); la columna PLOT Rt[®]-S-BOND (Restek, Bellefonte, PA, EEUU), con fase divinilbenceno con 4-vinilpiridina, de 0,32 mm i.d. y 10 μm de espesor, y la DB-FFAP (Agilent J&W, Santa Clara, CA, EEUU). Este último capilar es de alta polaridad, con fase de polietilenglicol modificada con ácido nitrotereftálico; que tiene menor cantidad de fase al tener un diámetro interno de 0,25 mm y 0,25 μm de espesor.

La columna analítica empleada ha sido una Onyx Monolithic C₁₈ (Phenomenex, Torrance, CA, EEUU) de 100 mm de longitud y 3 mm de diámetro. Se emplea el detector de fotodiodos, recogiendo los datos entre 210 y 400 nm. La integración se hace a 236 nm para DMP y DEP, a 225 nm para BBP y DBP y a 223,8 nm para DEHP y DnOP. También se ha probado una columna Nova-Pak CN HP (cianopropil silica, 150 mm \times 3.9 mm, 4 μm ; Waters, Milford, MA, EEUU).

El material de vidrio se lava en detergente alcalino durante 24 h y posteriormente se enjuaga con abundante agua de grifo, seguido de agua Milli-Q y finalmente acetonitrilo. Justo antes de utilizarlo, se enjuaga con metanol y se seca en la estufa a 130°C. Los viales nuevos se enjuagan de forma secuencial con hexano, acetona, tetrahidrofurano, metanol y agua Milli-Q. Posteriormente se secan en la estufa antes de su uso. Si no se emplean en el momento de retirarlos de la estufa, se guardan envueltos en papel de aluminio y cuando vayan a ser utilizados se enjuagan con metanol y se vuelven a secar en la estufa.

Los disolventes empleados son acetonitrilo J. T. Baker (Phillipsburg, EEUU) de grado Ultra Gradiente HPLC, acetonitrilo Scharlau (Barcelona, España) de grado Supragradiente; metanol de calidad gradiente HPLC (Romil, Cambridge, Reino Unido) y metanol LC-MS PAI (Panreac, Barcelona, España); 2-propanol de grado HPLC (Panreac, Barcelona, España) y tetrahidrofurano para cromatografía en fase líquida (Merck, Darmstadt, Alemania). Antes de su uso, los disolventes se filtran a través de filtros de PTFE de 0,45 μm (Teknokroma, Barcelona, España).

En este método, debido a los problemas de blancos habituales al determinar ftalatos, el agua Milli-Q usada para la preparación de blancos y patrones, así como para el desplazamiento de la muestra remanente en el capilar, se filtra a través de filtros de fibra de vidrio GF6 Grade (CHM, Barcelona, Spain), previamente lavados con 1 L de agua Milli-Q (descartada, para eliminar cualquier fondo de ftalatos que pudiese desprenderse del filtro). Se han probado también filtros de nylon (Millipore, Darmstadt, Alemania) y nitrocelulosa (Millipore, Darmstadt, Alemania). Además, se ha probado agua *Ultra-Resi-Analyzed* para Análisis Ambiental Inorgánico y Orgánico (J.T. Baker, Phillipsburg, EEUU), sin filtrar, en lugar de la Milli-Q.

Las disoluciones patrón se preparan en acetonitrilo a partir de la disolución comercial EPA 606-M Phthalate Esters Mix (Supelco, Bellefonte, PA, EEUU), que contiene dimetil-, dietil-, di-n-butil-, butilbencil-, di-2-etilhexil- y di-n-octil ftalalato a una concentración de 200 µg/mL cada uno en metanol. Todas las disoluciones se conservan a -18°C.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

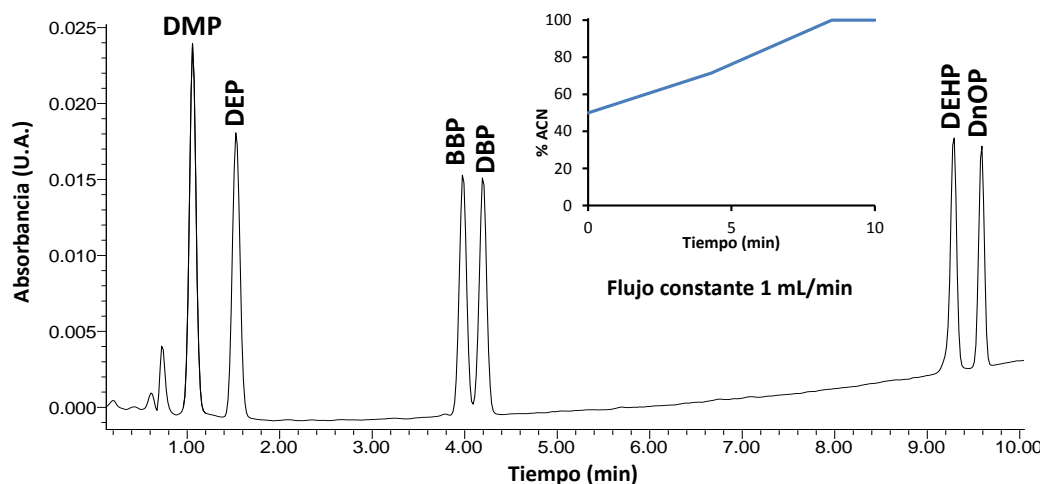
La separación cromatográfica se optimiza utilizando inyección directa, antes de conectar el sistema IT-SPME con el sistema cromatográfico, teniendo en cuenta la limitación en las presiones alcanzadas durante el análisis que viene dada por el posterior acoplamiento del capilar para la extracción. En la optimización de la separación selectiva de 6 ésteres del ácido ftálico (DMP, DEP, BBP, DBP, DEHP y DnOP) se evaluaron dos columnas diferentes, una columna monolítica con fase C₁₈ y una columna empaquetada con fase cianopropil sílice. Para ambas se desarrollaron gradientes binarios de acetonitrilo/agua y de metanol/agua.

Como se ha comentado, las características de la columna monolítica la hacen muy adecuada para su acoplamiento con IT-SPME. Por otro lado, la fase de la columna empaquetada probada (cianopropilo) es menos hidrófoba que una C₁₈, lo que implica una menor retención de los analitos y por tanto debe permitir alcanzar tiempos más cortos que una columna C₁₈ para la separación de estos compuestos.

La estrategia que se ha seguido en la optimización de la separación consiste en seleccionar una proporción inicial adecuada de acetonitrilo/agua o metanol/agua, que permita la separación de los dos primeros pares críticos (DMP-DEP y BBP-DBP). A partir de esa proporción, se aumenta el porcentaje del disolvente orgánico en la fase móvil para eluir el último par crítico (DEHP-DnOP) en el menor tiempo posible, aplicando una rampa que mantenga la separación de los pares críticos anteriores, especialmente del segundo, más afectado por estos cambios de composición de la fase.

Con los gradientes acetonitrilo/agua, en la columna monolítica es necesario aplicar una rampa más suave hasta la elución de este segundo par crítico (BBP-DBP) para no perjudicar su resolución, que no llega hasta línea de base (Fig. 27a). En cambio, en la columna cianopropilo esto no es necesario y se puede aplicar una variación de composición constante durante todo el cromatograma (Fig. 27b). Tal como se preveía por la distinta naturaleza de las fases, en la columna de cianopropilo basta con un 60% de acetonitrilo para la elución del par más hidrófobo (por la menor retención de los analitos), mientras que en la columna monolítica C₁₈ es necesario alcanzar el 100% de ACN para su elución. Los porcentajes iniciales también son diferentes: en la columna C₁₈ es suficiente con un 50% de agua inicial, mientras que para lograr una buena separación en la columna de cianopropilo es necesaria una proporción inicial de agua de un 65%. Debido a su condición de columna empaquetada y a esta mayor proporción de agua, en la columna de cianopropil sílice se alcanzan presiones superiores, haciendo más adecuada para el acoplamiento con IT-SPME la columna monolítica.

a)



b)

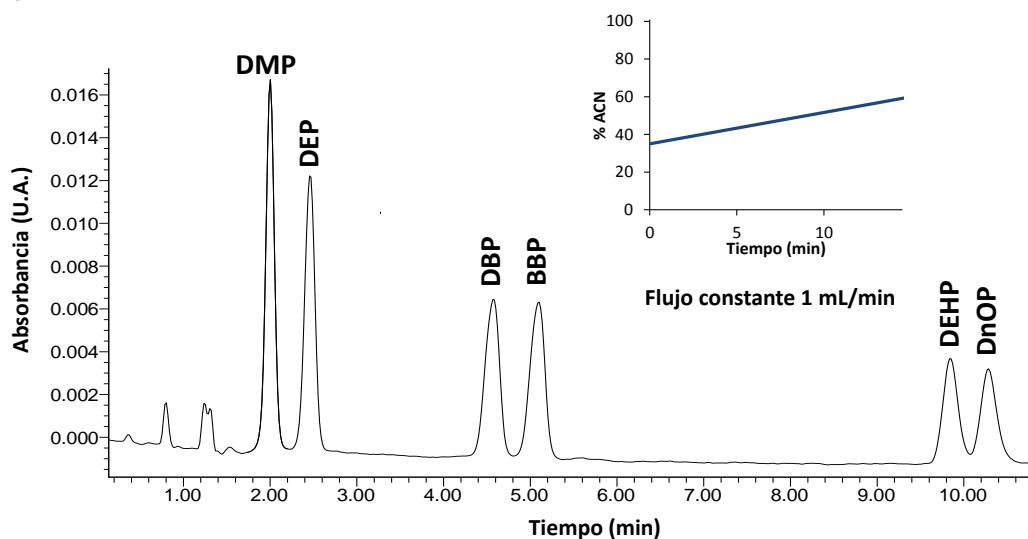


Figura 27. Cromatogramas obtenidos (223,8 nm) con los gradientes optimizados ACN/H₂O a flujo alto de una disolución de patrón de ftalatos (5 µg/mL) para: a) Columna monolítica; b) Columna cianopropilo.

Para mejorar la robustez en este acoplamiento, se desarrollan variaciones de los gradientes optimizados con flujos más bajos. Con estos gradientes, se reduce la presión del sistema y también el consumo de disolventes. En la columna monolítica (Fig. 28a) con el flujo variable se consumen 9,3 mL de acetonitrilo y 3,2 mL de agua por análisis frente a 10,7 mL de acetonitrilo y 3,3 mL de agua por análisis con el flujo constante, sin aumentar demasiado el tiempo del cromatograma (menos de un minuto de diferencia). Sin embargo, en la columna de cianopropilo el tiempo aumenta en más de 3 min (Fig. 28b).

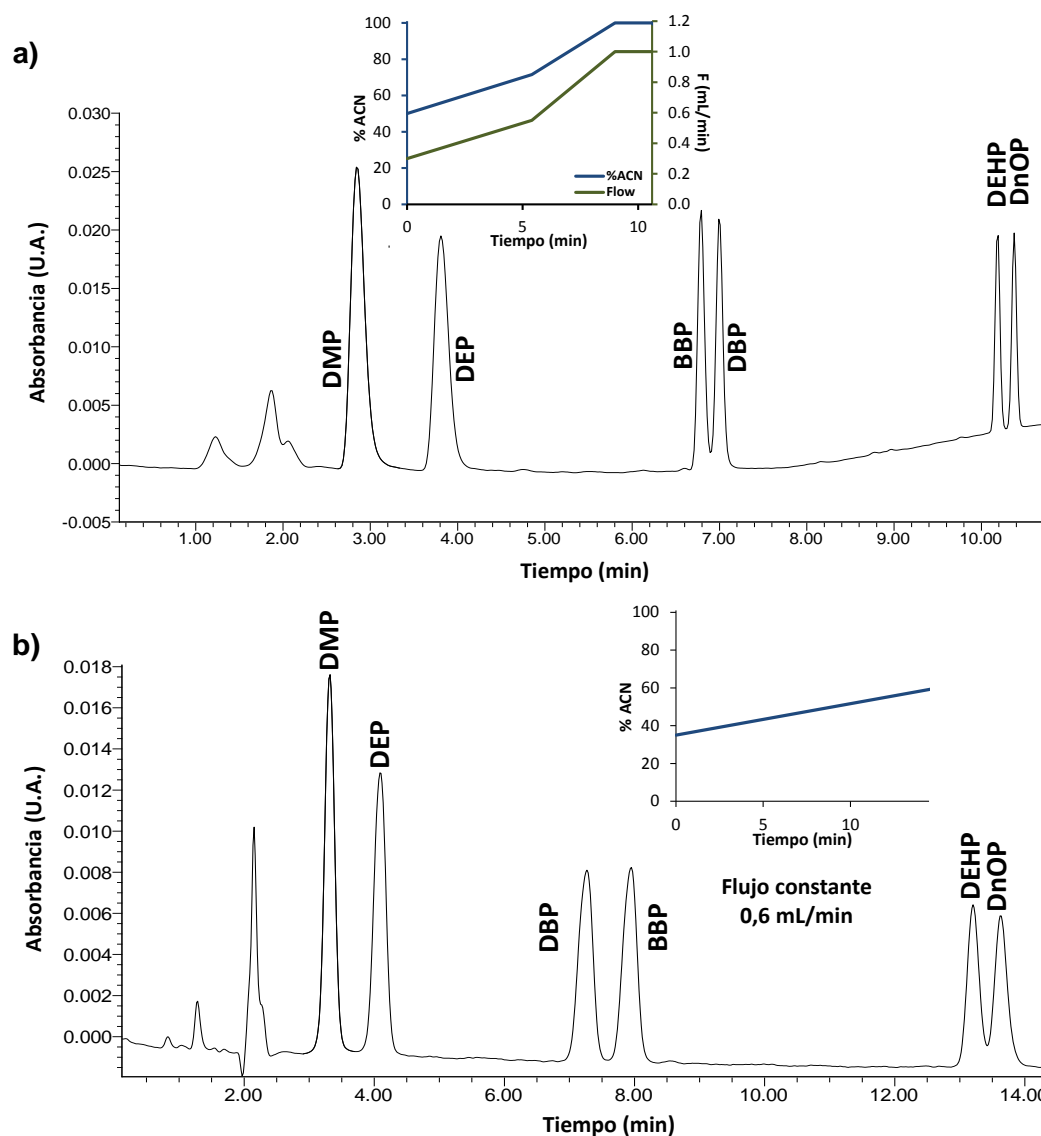


Figura 28. Cromatogramas obtenidos (223,8 nm) con los gradientes optimizados ACN/H₂O a flujo bajo de una disolución de patrón de ftalatos (5 µg/mL) para: a) Columna monolítica; b) Columna cianopropilo.

Respecto a los gradientes metanol/agua, no han resultado tan efectivos como los de acetonitrilo. Con la columna monolítica no fue posible separar el par crítico DBP-BBP (Fig. 29a). Tan solo se logró la separación de estos dos compuestos en condiciones poco adecuadas para su determinación. Con un flujo elevado (1,5 mL/min) la separación llega a producirse, pero el tiempo del cromatograma alcanza 1 h y los picos se ensanchan más. Para la columna de cianopropil sílice sí se alcanza la separación de los 6 analitos, pero en 23 min (frente a los 14 min del gradiente con acetonitrilo), y este tiempo afecta a los picos del último par crítico, más ensanchados en el gradiente con metanol (Fig. 29b). Probablemente el aumento de la retención de los compuestos con los gradientes metanol/agua se deba a un incremento de las interacciones por dispersión al usar este disolvente [Núñez *et al.*, 2007].

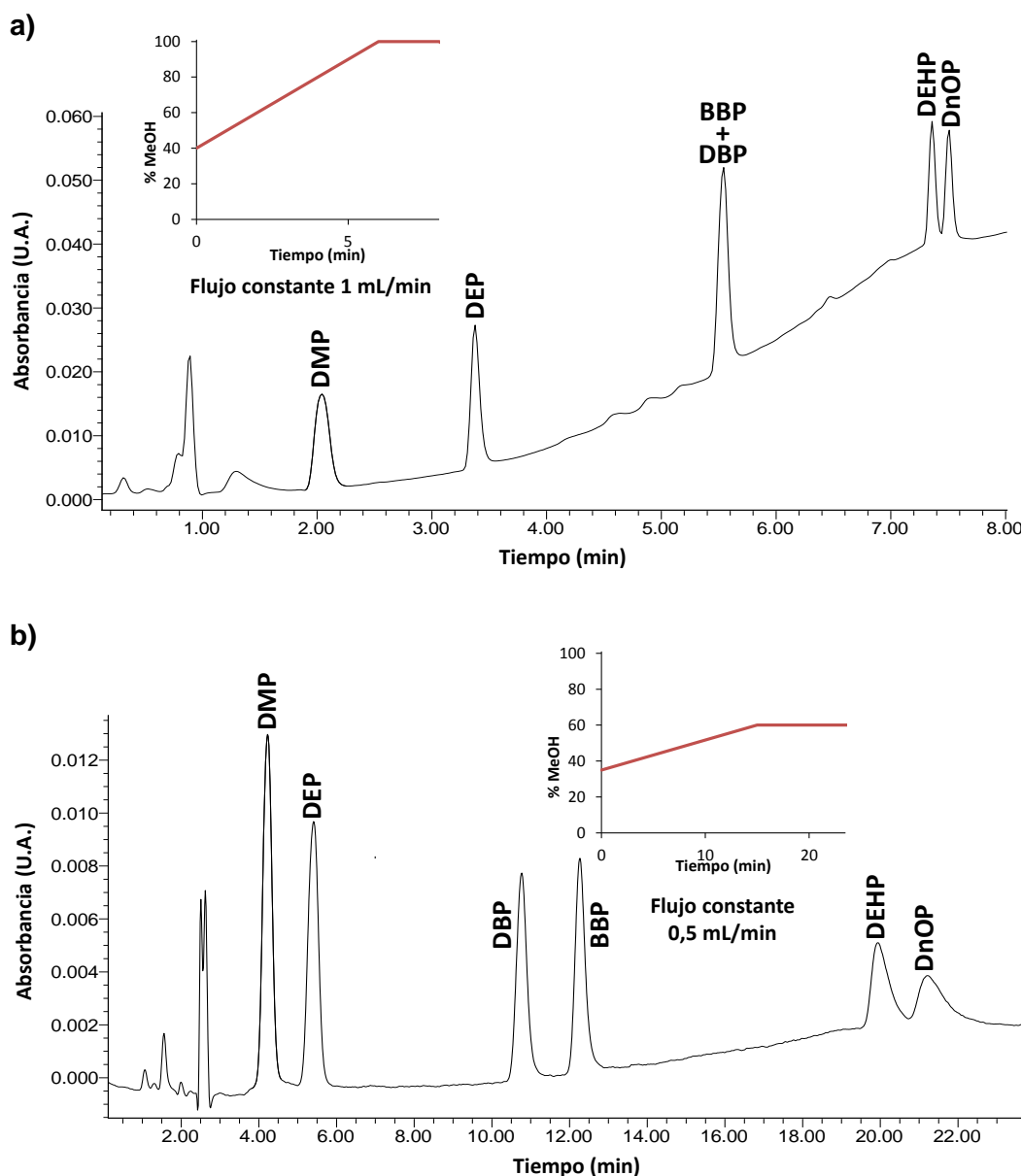


Figura 29. Cromatogramas obtenidos (223,8 nm) con los gradientes optimizados MeOH/H₂O a flujo bajo de una disolución de patrón de ftalatos (5 µg/mL) para: a) Columna monolítica; b) Columna cianopropilo.

Respecto a las diferencias entre ambas columnas, en la columna de cianopropilo en general los picos están más ensanchados, y el par más crítico parece ser el último (DEHP-DnOP), mientras que con la columna monolítica C₁₈ la separación más complicada es la del par BBP-DBP. Cabe destacar también que el orden de elución varía ligeramente en función de la columna: en el caso del par crítico BBP-DBP, en la columna empaquetada de cianopropilo el DBP eluye antes que el BBP (con ambos gradientes, acetonitrilo/agua y metanol/agua).

En cambio, en la columna monolítica C₁₈ el BBP eluye antes que el DBP con el gradiente acetonitrilo/agua, si bien el orden se invierte con el gradiente metanol/agua cuando éste es lo suficientemente drástico para separar ambos compuestos. Las interacciones π - π del BBP (aromático) con la fase cianopropilo son probablemente la causa de la mayor retención de este compuesto en esa columna [Croes *et al.*, 2005].

Con ambas columnas se ha alcanzado una buena separación de los 6 analitos en un tiempo corto (11 y 14 min) con presiones adecuadas para el acoplamiento con IT-SPME. Sin embargo, por la mejor resolución, el tiempo más corto y las presiones más bajas se ha seleccionado la columna monolítica con fase C₁₈ para el método final, con el gradiente con flujo variable que proporciona un mayor margen con las presiones de trabajo al acoplar el capilar de IT-SPME.

5.3.2. OPTIMIZACIÓN DE IT-SPME

Se han evaluado varios parámetros, como el tipo de capilar y su longitud, el disolvente de acondicionamiento y la desorción, además de optimizar el porcentaje y tipo de modificador orgánico en la muestra y el volumen de carga. Se han probado tres capilares de distinta polaridad: el capilar TRB-5 de baja polaridad, el capilar PLOT Rt[®]-S-BOND de polaridad intermedia y el capilar DB-FFAP de alta polaridad. Además, las estructuras de los tres capilares son diferentes: el TRB-5 y el DB-FFAP son capilares de pared recubierta (FSOT), mientras que el PLOT posee una estructura porosa. El DB-FFAP es el que tiene menor diámetro y espesor de los tres, lo que reduce su capacidad de carga respecto a los otros.

• Elección del modificador orgánico

En la optimización del porcentaje de modificador orgánico se han probado tres disolventes: acetonitrilo, metanol y tetrahidrofurano. Las tendencias encontradas respecto a la variación de las señales con la concentración de modificador están más afectadas por el capilar que por la propia naturaleza del modificador orgánico.

Así, para los tres modificadores, en el capilar TRB-5 se observan dos perfiles (Fig. 30): los compuestos de menor peso molecular (DMP, DEP, BBP y DBP) tienen un perfil descendente, correspondiendo las áreas mayores, a la ausencia de modificador orgánico (100% agua como disolvente). El DEHP y el DnOP tienen un perfil opuesto, con áreas crecientes según aumenta el porcentaje de modificador orgánico para los tres disolventes probados. Teniendo en cuenta estos perfiles contrapuestos, es necesario seleccionar unas condiciones de compromiso para la determinación simultánea de los 6 analitos.

Tanto un 15% de THF como un 25% de MeOH parecen soluciones aceptables, mientras que las diferencias entre compuestos son muy elevadas al usar acetonitrilo como modificador, por lo que este último se descarta.

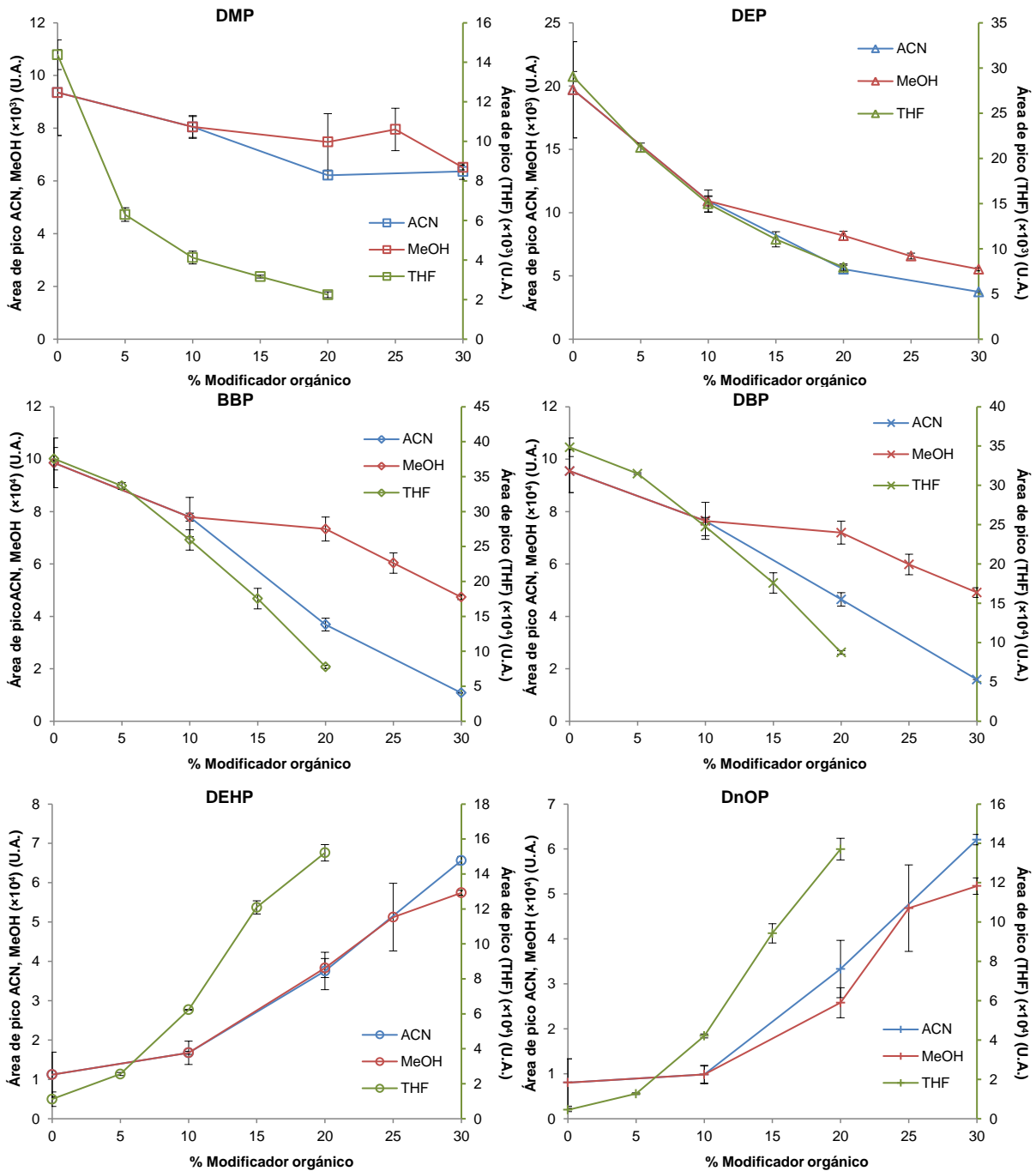


Figura 30. Efecto de la concentración de modificador orgánico en la extracción de los 6 ftalatos con el capilar TRB-5. Condiciones: 2 mL patrón 100 ng/mL + 60 μ L agua Milli-Q en un capilar de 70 cm para ACN y MeOH; 5 mL patrón 100 ng/mL + 60 μ L agua Milli-Q en un capilar de 45 cm para THF.

Con el capilar DB-FFAP de alta polaridad, los perfiles obtenidos son similares, pero con áreas mucho más bajas debido a una menor concentración de los analitos con este capilar (Fig. 31). Hasta los analitos más polares (DMP y DEP) se concentran de forma muy débil, incluso en ausencia de modificador orgánico que son las mejores condiciones para ellos (recuperaciones absolutas, medidas de la eficiencia de la extracción, por debajo del 1%). En el capítulo anterior (final del apartado 4.3.5) se ha descrito cómo se determinan

las recuperaciones absolutas en IT-SPME. En este caso se han calculado comparando las áreas obtenidas para 2 mL de 50 ng/mL (IT-SPME) con 20 μ L de 5 μ g/mL (inyección directa). En vista de las pobres eficiencias de concentración obtenidas con este capilar usando ACN y MeOH como modificadores, ya no se prueba el THF.

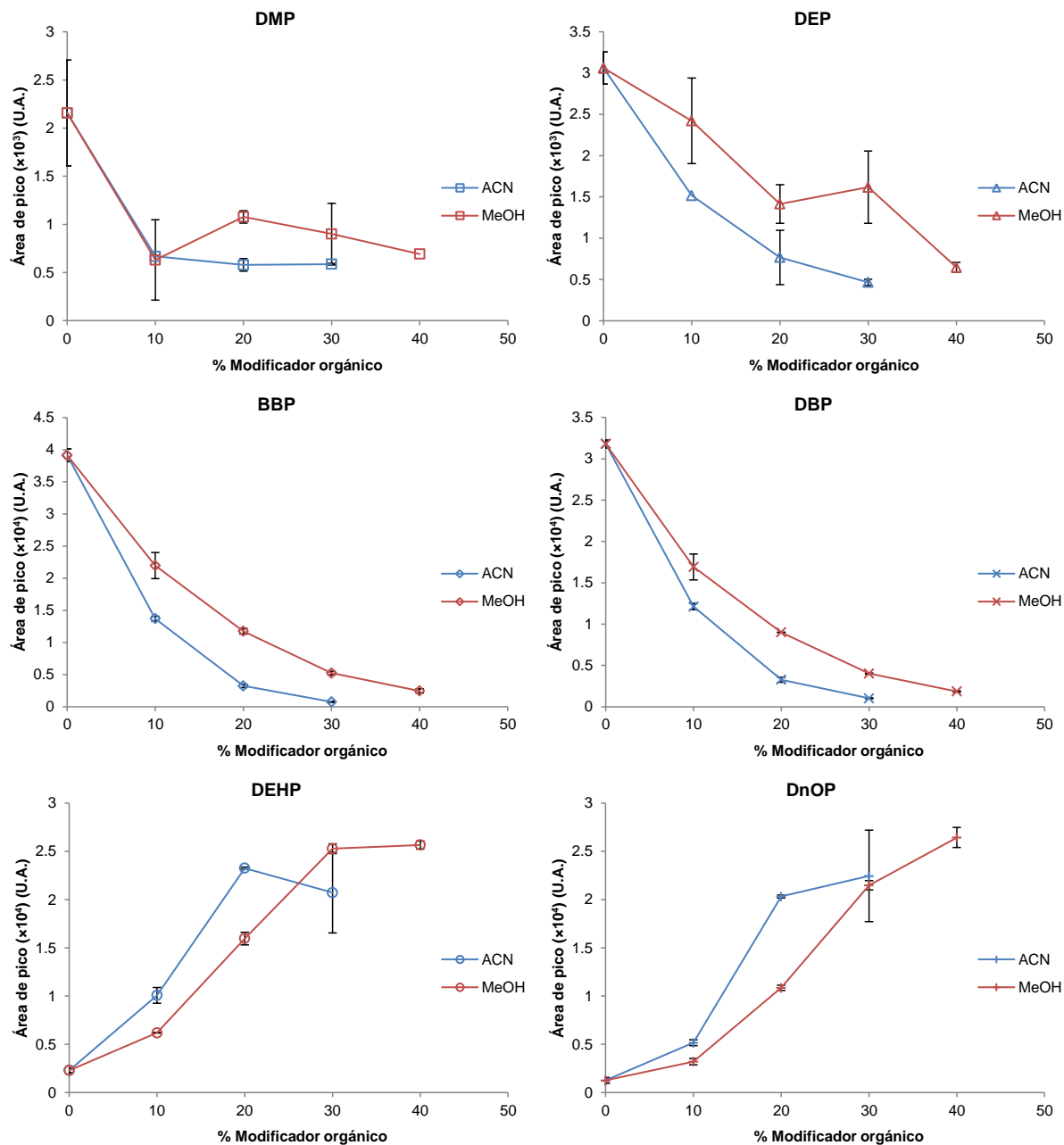


Figura 31. Efecto de la concentración de modificador orgánico en la extracción de los 6 ftalatos con el capilar DB-FFAP. Condiciones: 2 mL patrón 50 ng/mL + 60 μ L agua Milli-Q en un capilar de 70 cm.

Para el capilar PLOT Rt[®]-S-BOND los 6 analitos de interés se pueden dividir en tres grupos con diferente comportamiento (Fig. 32). El par DMP-DEP presenta una disminución de la señal obtenida al aumentar el porcentaje de cualquiera de los modificadores probados, como sucedía con los otros capilares. De igual modo, el par DEHP-DnOP presenta una tendencia opuesta a DMP-DEP, aumentando las áreas al incrementar la

proporción de modificador orgánico en la muestra acuosa y correspondiéndose la máxima señal para estos dos analitos con el porcentaje máximo probado para cada modificador (el 40% de MeOH da una señal ligeramente más alta que el 50% para el DEHP). El par BBP-DBP (y el DEP con metanol) sigue una tendencia parabólica en el rango de porcentajes de modificador probado, a diferencia de lo que ocurría con los otros capilares. El máximo de la parábola se sitúa entre un 10 y un 20% de acetonitrilo y metanol y en el 5% de tetrahidrofurano.

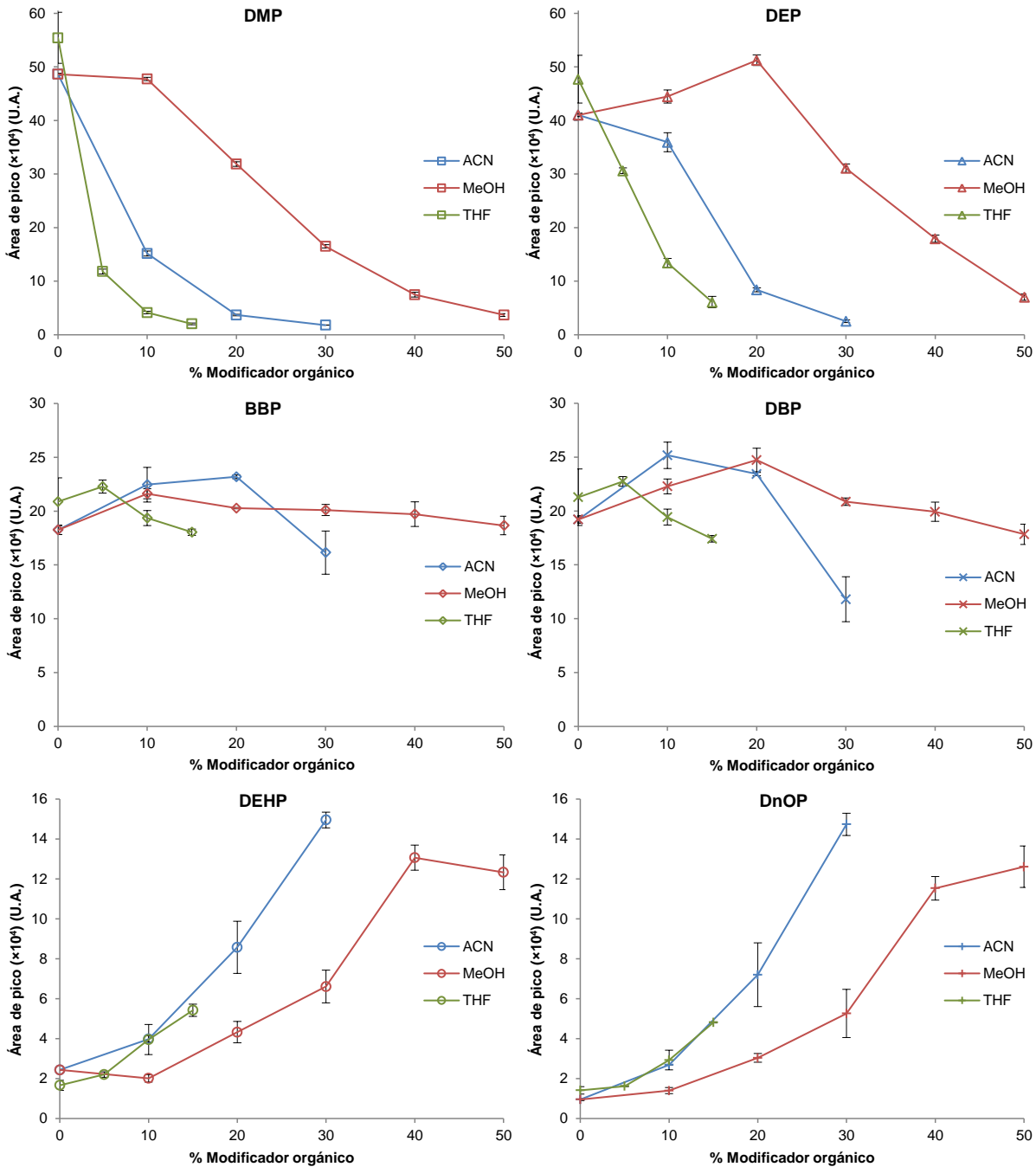


Figura 32. Efecto de la concentración de modificador orgánico en la extracción de los 6 ftalatos con el capilar PLOT Rt[®]-S-BOND. Condiciones: 2 mL patrón 100 ng/mL + 60 µL agua Milli-Q en un capilar de 70 cm.

En el caso del metanol las diferencias de señal entre el porcentaje óptimo y los demás porcentajes ensayados son significativamente menores que en el caso de los otros dos modificadores, lo que supone que el metanol permite alcanzar una mejor solución de compromiso para todos los compuestos. Además, también cabe destacar que con el capilar PLOT Rt®-S-BOND los dos analitos de menor peso molecular (DMP y DEP) se concentran mucho, a diferencia de lo que sucedía con los capilares TRB-5 y DB-FFAP. Este hecho permite seleccionar un porcentaje no tan favorable para estos dos analitos como porcentaje de compromiso y aun así seguir obteniendo señales relativamente elevadas para todos ellos. Por este motivo, y valorando que el DEHP es el compuesto con mayor presencia en la legislación, se selecciona como porcentaje de compromiso un 40% de metanol, concentración de modificador que da lugar a una respuesta analítica similar para los 6 compuestos de interés.

• Optimización del volumen de carga

El volumen de muestra que se pasa a través del capilar de extracción se ha optimizado con disoluciones patrón de los 6 ftalatos, ensayando volúmenes entre 0,5 y 5 o 10 mL. La tendencia que se suele observar al optimizar este parámetro es un aumento de la señal obtenida al aumentar el volumen, con una primera zona de aumento lineal del área de pico con el volumen de carga y una posterior disminución de la pendiente hasta llegar a una zona de pendiente cero que se correspondería con la saturación del capilar de extracción. Esto se produce cuando la adsorción es el mecanismo de extracción. Si se continuase aumentando el volumen de carga una vez alcanzada la saturación incluso se podría llegar a una disminución de la señal con el aumento del volumen si el disolvente de la muestra que se está pasando desorbe los analitos previamente retenidos en el capilar.

La optimización se lleva a cabo para dos de los capilares: TRB-5 y PLOT Rt®-S-BOND en las condiciones optimizadas seleccionadas en el apartado anterior (15% THF y 25% MeOH para TRB-5 y 40% MeOH para PLOT, 70 cm de longitud). No se realizan los ensayos para el capilar DB-FFAP debido a la pobre concentración de los analitos que se alcanza con ese capilar, descartado para el procedimiento final. Además, para el capilar TRB-5 y un 25% MeOH se comparan los perfiles obtenidos al aumentar el volumen de carga con dos longitudes de capilar, 70 y 45 cm.

Con el capilar TRB-5, para el DMP y el DEP, que concentran adecuadamente con este capilar, se obtiene un ligero aumento de la señal con el volumen cuando se utiliza un 25% de metanol como modificador (con ambas longitudes de capilar), observando ya una disminución de la pendiente para estos compuestos cerca de 5 mL (Fig. 33a-b). En este capilar TRB-5, para una disolución con un 15% de tetrahidrofurano no se aprecia demasiada variación de las áreas de estos compuestos con el volumen. Los otros cuatro analitos (BBP, DBP, DEHP y DnOP) presentan un claro aumento de señal al aumentar el volumen de carga en todas las condiciones probadas. Para un 15% de tetrahidrofurano, las pendientes empiezan a disminuir en el tramo final (se ha probado hasta un volumen máximo de 5 mL), lo que indica que la saturación está próxima a ese volumen (Fig. 33c).

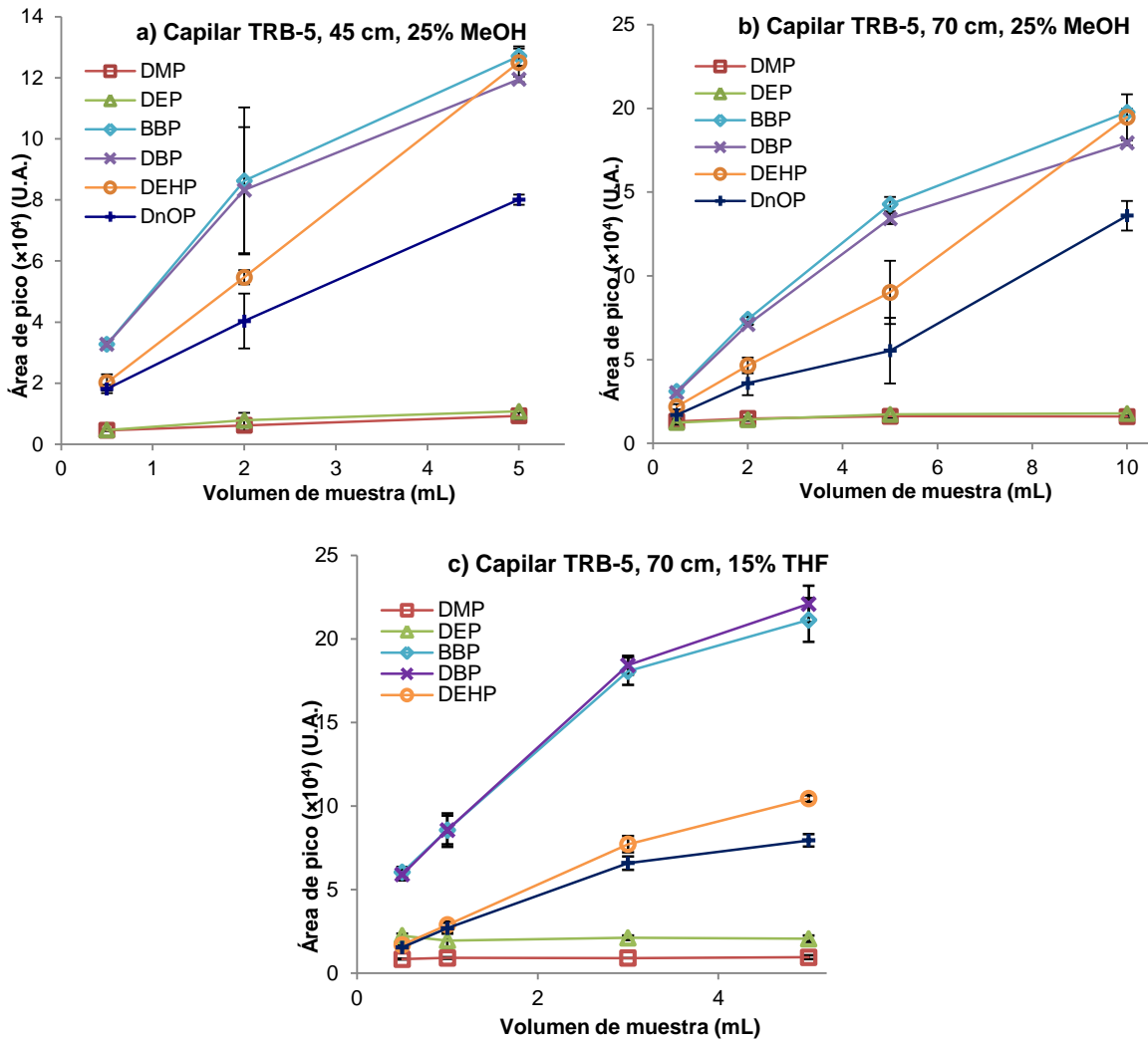


Figura 33. Efecto del volumen sobre la extracción IT-SPME de 6 ftalatos para el capilar TRB-5: a) 45 cm, usando 25% MeOH como modificador; b) 70 cm, usando 25% MeOH como modificador; c) 70 cm, usando 15% THF como modificador.

En el caso de un 25% de metanol, hay que diferenciar entre el par BBP-DBP y el par DEHP-DnOP, ya que presentan comportamientos algo distintos. BBP y DBP presentan una disminución de la pendiente entre 5 y 10 mL para el capilar de 70 cm (y entre 2 y 5 mL para el capilar de 45 cm), mientras que para los di-octil-ftalatos la relación área-volumen de carga se ajusta razonablemente bien a una recta en el rango probado (hasta 5 mL en el caso del capilar de 45 cm y hasta 10 cm con el capilar de 70 cm) (Fig. 33a-b).

En el capilar PLOT Rt®-S-BOND los 6 analitos muestran un incremento de las áreas obtenidas al aumentar el volumen de carga (Fig. 34). En el caso de DMP y DEP se encuentra un descenso de la pendiente a volúmenes elevados (entre 3 y 10 mL), mientras que para BBP, DBP, DEHP y DnOP la relación área-volumen de carga es lineal en el rango probado (hasta 10 mL). Debido a que la carga de muestra es manual y se realiza a flujo bajo se elige 5 mL como volumen de compromiso entre la sensibilidad obtenida y la rapidez y comodidad del análisis. Sin embargo, existe margen para mejorar los límites del método a cambio de aumentar la cantidad de muestra consumida y el tiempo del análisis.

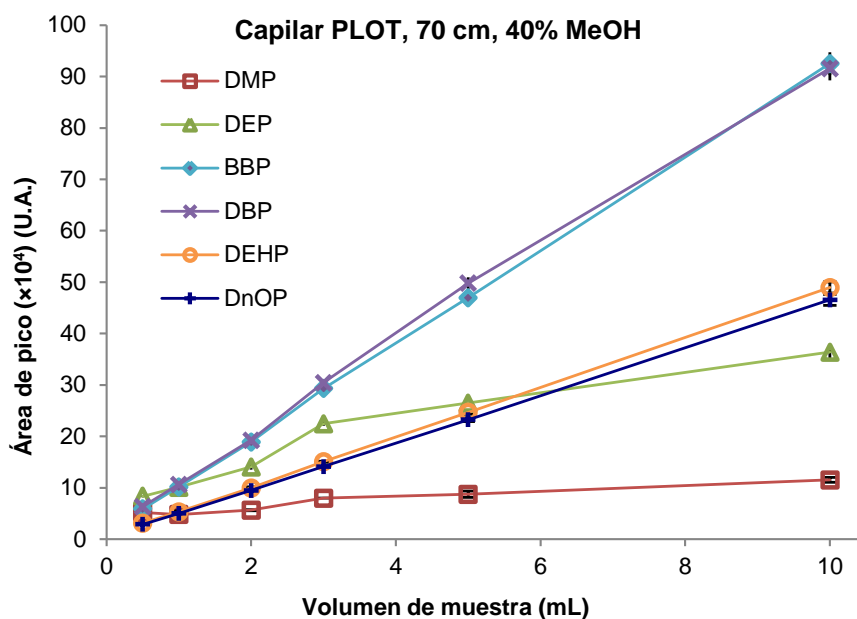


Figura 34. Efecto del volumen sobre la extracción IT-SPME de 6 ftalatos para el capilar PLOT Rt®-S-BOND de 70 cm, usando 40% MeOH como modificador.

• Optimización de la longitud del capilar, el acondicionamiento y la desorción

Se han optimizado la longitud del capilar, el acondicionamiento y la desorción, aunque en algunos casos con mejoras menos significativas para el proceso de extracción. Se han comparado los resultados obtenidos para un capilar TRB-5 con dos diferentes longitudes 70 cm y 45 cm. Inicialmente se trabaja con un capilar de 70 cm, con mayor fase extractiva, pero dado que el número y la concentración de compuestos es baja, se hacen ensayos con un capilar de menor longitud para comprobar si este sería suficiente para los objetivos propuestos.

El capilar de mayor longitud proporciona unas señales más elevadas para una misma concentración de disolución patrón concentrada (100 ng/mL), especialmente en el caso de los dos compuestos más ligeros: DMP y DEP, con aumentos del 170 y el 97% de la señal, respectivamente, mientras que para los otros cuatro analitos el incremento se sitúa en un 40-50% (Fig. 35).

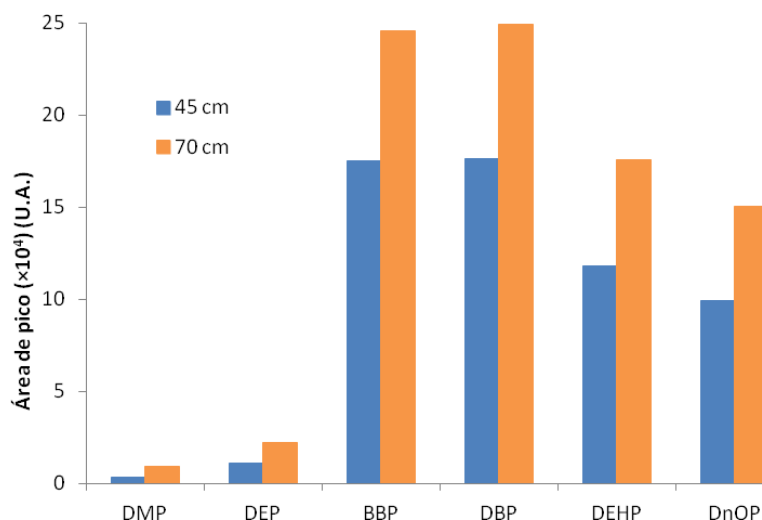


Figura 35. Efecto de la longitud del capilar sobre la extracción de 6 ftalatos.

El acondicionamiento del capilar TRB-5, como paso previo al análisis de muestras, se ha optimizado con diferentes disolventes orgánicos. Este paso también tiene la función de lavado de posibles restos del análisis anterior que puedan provocar interferencias o efectos memoria. No se han observado diferencias significativas entre las cuatro opciones ensayadas (solo acetonitrilo, solo metanol, agua Milli-Q seguida de acetonitrilo y agua Milli-Q seguida de metanol). Finalmente, se ha seleccionado como disolvente de acondicionamiento/lavado el acetonitrilo. Se ha comprobado que con 2 mL de este disolvente entre análisis es suficiente para evitar interferencias y efectos memoria.

Respecto a la desorción, se han probado diferentes disolventes para llevar a cabo una desorción estática de los analitos: acetonitrilo, metanol, 2-propanol y una mezcla acetonitrilo/agua 50:50 (composición inicial de la fase móvil al trabajar con la columna monolítica). También se ha probado el uso de agua Milli-Q, que no debería desorber significativamente los analitos (especialmente BBP, DBP, DEHP y DnOP), ya que su solubilidad en agua es baja, y se usaría solo para desplazar el remanente de muestra líquida que queda en el capilar antes del paso de la fase móvil. En este caso sería la propia fase móvil la que desorbería los analitos (desorción dinámica).

Para el capilar TRB-5 y la columna monolítica, no se han observado diferencias significativas entre los distintos disolventes empleados, ni tampoco entre el paso de 60 μ L y 100 μ L de disolvente. A la vista de estos resultados, la solución más simple es llevar a cabo una desorción dinámica con la fase móvil, desplazando previamente la muestra líquida del interior del capilar con 60 μ L de agua Milli-Q (60 μ L es el mínimo volumen necesario para desplazar la muestra). Se hicieron también pruebas con el capilar TRB-5 y la columna de cianopropilo. En este caso, con cualquiera de los dos gradientes optimizados el porcentaje inicial de agua en la fase móvil es elevado (65%). Esto provoca que la desorción dinámica con la fase móvil no sea efectiva para los compuestos de mayor peso molecular, observándose un claro ensanchamiento de los picos y una significativa pérdida de señal para los di-octil-ftalatos. Para la separación optimizada con la columna de cianopropilsilica sería necesario llevar a cabo una desorción estática.

Para el capilar PLOT también se han ensayado diferentes condiciones de desorción de los analitos del capilar: el paso de 60 μL de agua para desplazar la muestra líquida y llevar a cabo una desorción dinámica con la fase móvil, la desorción estática con 60 μL de acetonitrilo y la desorción estática con 60 μL de metanol. Asimismo se han probado dos tiempos diferentes para la desorción estática con acetonitrilo: 30 segundos y 3 minutos, sin encontrar diferencias significativas en la desorción al aumentar el tiempo de contacto del disolvente con los analitos retenidos en el interior del capilar. Respecto a los distintos disolventes, el agua Milli-Q (que en principio únicamente desplaza la muestra remanente para una posterior desorción dinámica con la fase móvil) proporciona los mejores resultados. Con desorción estática con acetonitrilo las áreas son comparables pero los picos se ensanchan significativamente, mientras que con la desorción estática con metanol además del ensanchamiento de picos se obtiene una pérdida de señal para DMP y DEP y un descenso en la precisión para todos los analitos.

• Otros modos de extracción

Durante la optimización se evaluaron dos estrategias adicionales para intentar mejorar la eficiencia de la extracción. La primera de ellas es intentar replicar el modo de ciclos en el equipo disponible, que como se ha comentado en capítulos anteriores no permite usar esta modalidad de IT-SPME. Aupartová *et al.* (2014) ya propusieron un modo intermedio entre la extracción única, en la que la muestra pasa a través del capilar de forma continua, en un mismo sentido y solo una vez, y el modo de ciclos, en el que un pequeño volumen de muestra es aspirado y expulsado repetidas veces del capilar. En este caso proponían llenar el capilar con un volumen pequeño de muestra que dejaban en el interior durante 2 min, antes de repetir la operación con otra pequeña alícuota de la muestra (otro "ciclo").

En el método que nos ocupa, se prueban dos posibilidades: (1) hacer ese tipo de "ciclos", manteniendo la muestra en el interior del capilar durante 2 min para aumentar el tiempo de contacto entre muestra y fase sólida (Fig. 36a, 1 ciclo de 5 mL vs. 5 ciclos de 1 mL), y (2) desplazando con agua entre ciclos (Fig. 36b, 1 ciclo de 2 mL vs. 4 ciclos de 0,5 mL), sacando la muestra del interior del capilar entre "ciclo" y "ciclo" (como sucede en el modo de ciclos tradicional, solo que este caso sin cambiar de sentido el flujo).

En ambos casos se obtienen resultados similares, que no difieren de forma significativa con las áreas obtenidas para los analitos cuando se usa el modo de extracción única con un volumen de muestra equivalente al del total de los ciclos. El DMP y el DEP empeoran con el modo de ciclos con desplazamiento intermedio, probablemente porque debido a su baja hidrofobicidad el agua intermedia los desorbe parcialmente. Debido a que no se obtiene una mejora en la extracción y ambos procesos con "ciclos" son más largos y tediosos, se descarta el uso de esta modalidad.

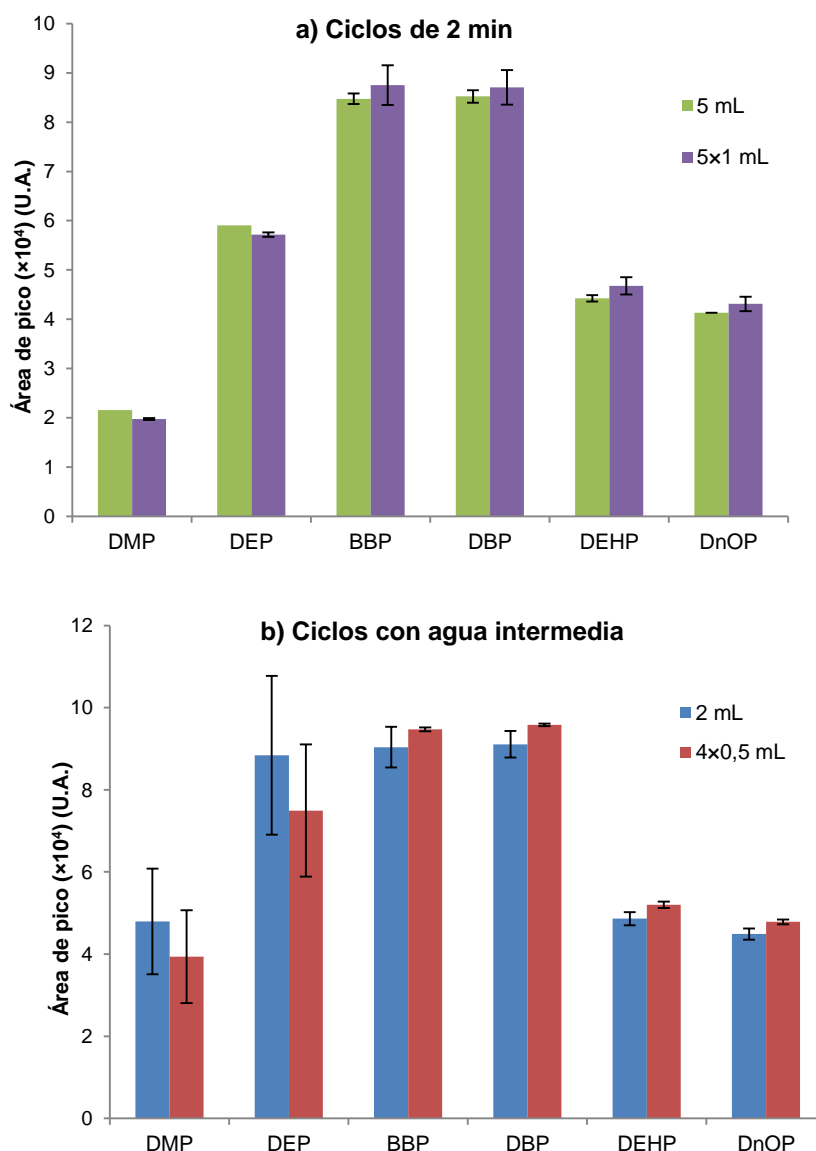


Figura 36. Efecto de la realización de ciclos en la introducción de muestra en la optimización IT-SPME para 6 ftalatos. a) 2 min entre ciclos; b) Desplazando con 60 μ L de agua entre ciclos.

La segunda alternativa que se ha probado consiste en combinar 2 capilares de extracción, colocándolos en serie (unidos mediante una conexión de PEEK). De esta forma, al tener diferente polaridad los dos capilares, podría ser más sencillo alcanzar unas condiciones de compromiso para todos los analitos. Se trabaja con los dos capilares que proporcionan mejores eficiencias, el PLOT y el TRB-5. Para mantener la longitud total de 70 cm, se unen tramos de 35 cm de cada capilar. En la Figura 37 se representa la recuperación absoluta para cada una de las configuraciones, no encontrándose diferencias significativas al cambiar el orden de los capilares, siendo indiferente por cuál pasa la muestra primero.

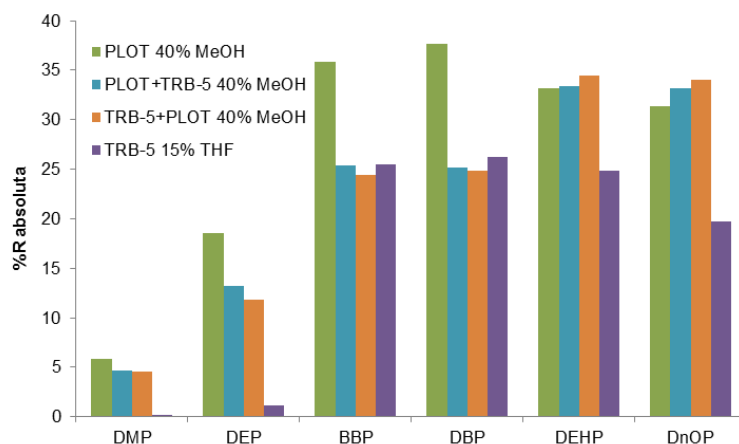


Figura 37. Eficiencia en la extracción de 6 ftalatos con un capilar individual o con dos capilares en serie.

A continuación se ha optimizado el porcentaje de metanol para los dos capilares en serie (Fig. 38), hasta obtener los mismos perfiles que cuando se trabaja con un único capilar TRB-5: DMP, DEP, BBP y DBP disminuyen su extracción al aumentar el porcentaje de MeOH y DEHP y DnOP siguen la tendencia contraria. La eficiencia de la extracción es menor que con el capilar PLOT solo, probablemente porque como ya se ha comentado la estructura PLOT tiene más influencia que la polaridad de los capilares (Fig. 37). Por este motivo, esta posibilidad tampoco ha sido considerada.

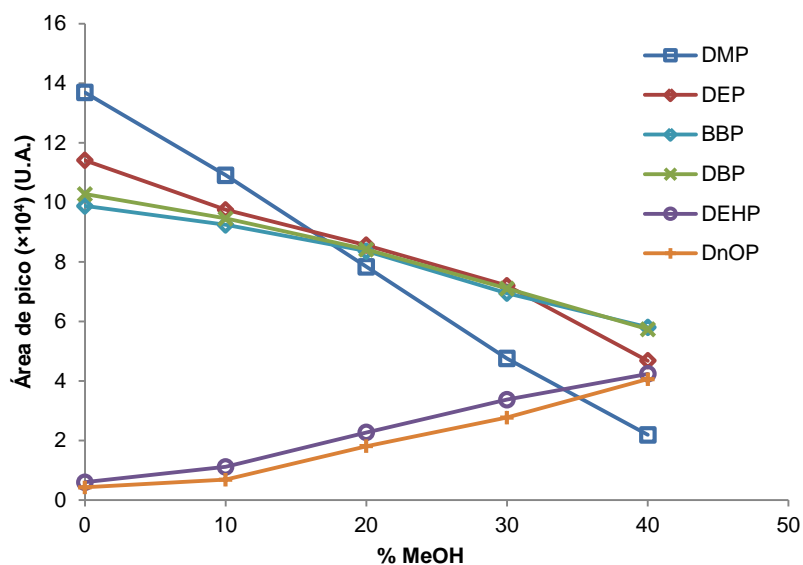


Figura 38. Efecto del porcentaje de metanol en la extracción de 6 ftalatos en los capilares PLOT+TRB-5 en serie.

• Comparativa entre los capilares de extracción

Para la misma concentración, el capilar PLOT Rt[®]-S-BOND proporciona una mayor respuesta (y por tanto mejor eficiencia de extracción) para los 6 analitos y para todos los porcentajes probados de los distintos modificadores. Se calcularon las recuperaciones absolutas, medida de la eficacia de la extracción, para los tres capilares con las condiciones de compromiso seleccionadas para cada uno de ellos (Tabla 16). El capilar DB-FFAP

proporciona los peores resultados, con eficiencias muy inferiores a las que se alcanzan con el TRB-5 y sobre todo con el PLOT, que es el único que concentra de forma aceptable los dos analitos más hidrofílicos, DMP y DEP. Se debe tener en cuenta que no se puede realizar una comparativa en términos absolutos porque el capilar DB-FFAP tiene una menor cantidad de fase extractante en comparación con los otros capilares, al tener menor diámetro interno y espesor y probarse un tramo más corto (35 cm). Sin embargo, se comprobó experimentalmente que no se había alcanzado la saturación del capilar en las condiciones probadas, por lo que los resultados obtenidos indican que el capilar DB-FFAP no es adecuado para la concentración de los 6 ftalatos de interés.

Tabla 16. Recuperaciones absolutas del método IT-SPME de 6 ftalatos respecto a la inyección directa para los 3 capilares de extracción para una concentración 100 ng de cada analito.

	PLOT 70cm 40% MeOH	TRB-5 70cm 15% THF	DB-FFAP 35 cm 20%MeOH
DMP	5,8	0,2	0,2
DEP	18,6	1,2	0,4
BBP	35,9	25,5	5,1
DBP	37,6	26,3	3,9
DEHP	33,2	24,9	12,6
DnOP	31,4	19,7	8,9

Por otra parte, los perfiles de los analitos con la proporción de modificador orgánico también varían con los capilares, en concreto los del BBP y DBP, que tienen tendencia descendente con TRB-5 y DB-FFAP y sin embargo siguen un perfil parabólico con el capilar PLOT. El capilar PLOT también tiene volúmenes de saturación más elevados que el TRB-5 y los analitos más ligeros (DMP y DEP), que no muestran una mejora significativa en las áreas al aumentar el volumen de carga con el capilar TRB-5, sí incrementan su señal con el volumen en el capilar PLOT. Esto se explica por su mayor capacidad de carga debido a su estructura porosa. Esta estructura parece ser el motivo principal de las diferencias entre capilares, ya que la elevada área interna del capilar PLOT permite concentrar mejor los analitos que en los capilares FSOT. Teniendo en cuenta que el capilar de polaridad intermedia es el que ofrece los mejores resultados para todos los analitos, parece que la estructura del capilar (PLOT frente a FSOT) tiene mucho más peso en la extracción que la polaridad de la fase. Por todo lo anterior, se puede concluir que el capilar PLOT Rt®-S-BOND es el más adecuado de entre los probados para la concentración mediante IT-SPME de los 6 ftalatos de interés.

5.3.3. ESTUDIO DE BLANCOS DE PROCEDIMIENTO

Los ftalatos están presentes en el ambiente del laboratorio, y pueden adsorberse sobre el material empleado en el análisis y contaminar los disolventes [Fankhauser-Noti *et al.*, 2007]. En el método desarrollado, se ha llevado a cabo un estudio para evaluar el efecto de varias posibles fuentes de ftalatos en los blancos: los disolventes, el sistema (cromatógrafo y capilar) y los distintos materiales utilizados, entre los que se encuentran algunos que contienen plásticos como los *septum* de los tapones de los viales, los filtros o las puntas de las micropipetas.

Se han comparado los resultados obtenidos para blancos preparados exclusivamente con material de vidrio (pipeta graduada y matraz aforado) y los preparados con micropipetas con puntas de plástico y viales cuyos tapones tienen septum plásticos. No se aprecian diferencias significativas en las áreas de los analitos obtenidas en los blancos de procedimiento al emplear ambos tipos de materiales, incluso agitando manualmente la mezcla agua/modificador, de modo que entre en contacto con el septum. Sí parece que el uso del material de vidrio mejora ligeramente la precisión respecto al uso de material con plásticos. Por ello se ha decidido emplear material de vidrio, aunque se continúan empleando las micropipetas con puntas de plástico para diluir las disoluciones patrón y realizar las sobrecargas, dado que no se ha detectado contaminación significativa por parte de estas puntas en los niveles de concentración a los que se trabaja.

Respecto al material de vidrio, se lava siguiendo un protocolo habitual en el análisis de contaminantes orgánicos: 24 h en detergente alcalino y enjuague con abundante agua de grifo y finalmente con agua Milli-Q. Antes de almacenarlo, se enjuaga también con acetonitrilo para evitar la proliferación microbiana. Una vez seco, el material se conserva tapado con papel de aluminio. Además, se comprobó experimentalmente que enjuagar con metanol ese material almacenado justo antes de usarlo (y secarlo en estufa) contribuye a reducir y controlar los blancos, por lo que se añadió esta parte final al protocolo de limpieza. También se comprobó experimentalmente que los viales nuevos aportaban ftalatos a los blancos de procedimiento, por lo que antes de usarlos por primera vez se llevó a cabo un lavado con hexano (para eliminar los compuestos más apolares), acetona (por motivos de miscibilidad), tetrahidrofurano, metanol y agua Milli-Q (los disolventes que se van a guardar en los viales, para lavar posibles interferencias solubles en ellos).

La jeringa utilizada para el paso de muestra a través del capilar está completamente hecha de vidrio. Se comprobó que lavándola 3 veces con acetonitrilo, dejándola llena hasta el inicio del siguiente análisis, se evitaban efectos memoria.

Por otro lado, algunos autores han encontrado contribución a los blancos del propio sistema cromatográfico, tanto en cromatografía de gases como de líquidos, que parece atribuirse a la fase móvil [Guo y Kannan, 2012]. En este método se ha evaluado esta posibilidad con los llamados blancos de sistema, que incluyen tanto el sistema cromatográfico como la válvula y capilar de IT-SPME. En estos blancos de sistema no se han detectado señales correspondientes a los analitos, ni siquiera tras el paso de muestras o disoluciones patrón, lo que descarta la presencia de efectos memoria en este método. Sin embargo, sí se han encontrado diferencias en el frente del cromatograma si se pasa acetonitrilo por el capilar antes del blanco de sistema o si la válvula se pasa a posición de inyección sin inyectar nada (Fig. 39). Estos resultados parecen indicar que el frente se debe a la concentración de impurezas del disolvente en el interior del capilar.

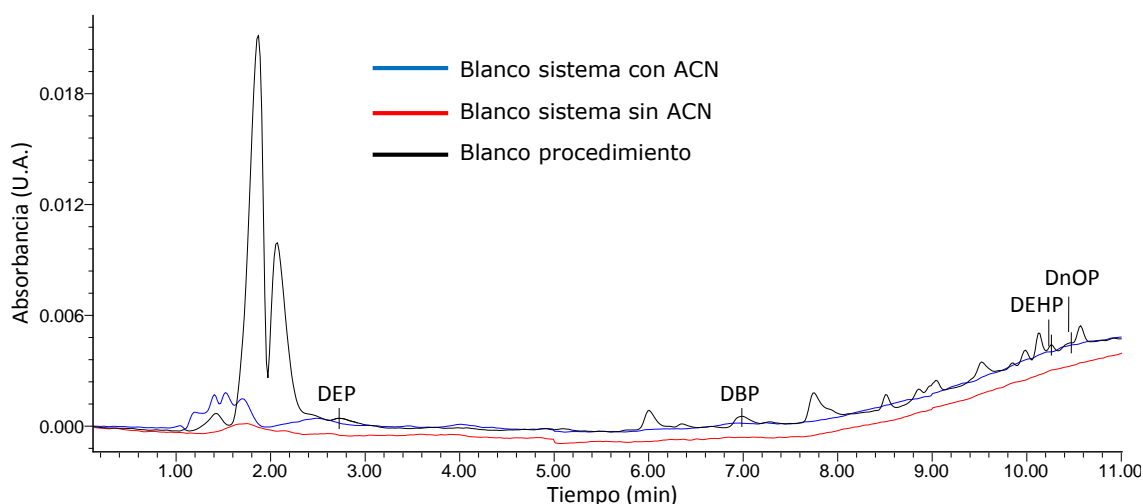


Figura 39. Cromatogramas de un blanco de sistema realizado tras lavar con ACN, un blanco de sistema realizado sin pasar ACN a través del capilar y un blanco de procedimiento (5 mL de agua Milli-Q con un 40% MeOH + 60 μ L agua Milli-Q). Capilar PLOT Rt[®]-S-BOND.

Para evaluar una posible concentración del fondo debido a la fase móvil en la columna cromatográfica se llevaron a cabo pruebas analizando blancos de procedimiento tras acondicionar la columna durante 30 y 60 min con las condiciones iniciales de la fase móvil (ACN/H₂O 50:50). Las diferencias entre esos blancos y los realizados inmediatamente después de alcanzar la estabilización son inapreciables, por lo que se considera que la fase móvil no contribuye a los blancos.

En el caso de los filtros empleados para filtrar las fases sí se han encontrado diferencias. Se ha hecho la prueba realizando un filtrado adicional del agua Milli-Q (que ya se filtra a la salida del equipo de purificación de agua) a través de filtros de nylon, de fibra de vidrio y de nitrocelulosa. Se ha elegido el agua para la prueba porque además de formar parte de la fase móvil en el caso de los blancos se pasa a través del capilar, concentrando las posibles contaminaciones que hubiese. Las áreas obtenidas al filtrar el agua a través de todos los filtros son ligeramente superiores para DMP, DBP y DEHP que en el caso de no filtrar el agua por segunda vez (Fig. 40). El filtro de nitrocelulosa proporciona los peores resultados, con las áreas más elevadas. El filtro de fibra de vidrio es el que menor cantidad de DBP libera, mientras que el de nylon es que libera menos DEHP. Se ha encontrado que la señal obtenida para los analitos en los blancos disminuye si los filtros se lavan previamente con un cierto volumen de agua Milli-Q que se desprecia. De este modo, las señales obtenidas con filtros de fibra de vidrio lavados previamente con un volumen igual o superior a 500 mL de agua Milli-Q son comparables a las que se obtienen para el agua sin filtrar. Por este motivo cabe esperar que el filtro del equipo de agua Milli-Q no libere ftalatos ya que un gran volumen de agua ha pasado por él antes de coger el agua Milli-Q empleada como fase móvil y para la preparación de blancos y patrones.

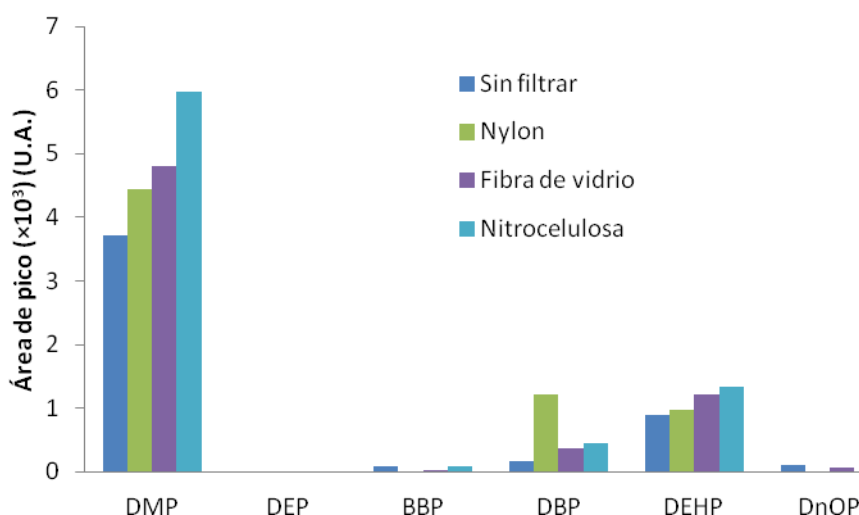


Figura 40. Ftalatos que aparecen en los blancos del proceso de filtración del agua Milli-Q en función del tipo de filtro.

Otra posible fuente de contaminación de ftalatos son los disolventes. En el método con el capilar PLOT se ha estudiado la contribución del metanol usado como modificador mediante la comparativa de metanol de calidad HPLC y de calidad LC-MS. Aunque los resultados son muy similares, el metanol de calidad LC-MS reduce ligeramente las áreas en los blancos, especialmente para DBP y DEP.

Por otra parte, en este método no es posible preparar blancos de procedimiento sin agua. Por desgracia, si el agua aporta fondo éste se reflejará en los blancos pero no necesariamente en las muestras, que tienen una matriz acuosa diferente. Por este motivo es particularmente importante elegir un agua libre de ftalatos para los blancos de procedimiento y evitar sobreestimar los valores de estos blancos. Se ha probado agua Milli-Q de tres equipos diferentes, así como agua comercial de grado *Ultra Resi-Analyzed* (especial para análisis de trazas). Entre las aguas Milli-Q no se encuentran diferencias significativas entre los tres equipos probados. Respecto al agua *Ultra Resi-Analyzed*, a pesar de estar pensada para este tipo de análisis y estar conservada en una botella de vidrio (mientras que los depósitos de los equipos de agua Milli-Q son de plástico), no aporta ninguna mejora respecto al agua Milli-Q, siendo los resultados comparables.

Se simultaneó el uso del agua *Ultra Resi-Analyzed* con agua Milli-Q durante un mes, obteniendo valores comparables para los blancos de procedimiento con ambos tipos de agua. Para el agua Milli-Q, se estima una media \pm SD ($n=18$) de $0,59 \pm 0,04$ ng/mL para el DBP, $1,14 \pm 0,78$ ng/mL para el DEHP y $0,47 \pm 0,43$ ng/mL para el DnOP, mientras que agua *Ultra Resi-Analyzed* ($n=16$), los niveles encontrados en los blancos de procedimiento son $0,32 \pm 0,28$ ng/mL para el DBP, $0,81 \pm 0,51$ ng/mL para el DEHP y $0,83 \pm 0,68$ ng/mL para el DnOP. Como se puede comprobar, los rangos de concentración solapan para los 3 compuestos con los tipos de agua.

A pesar de no haber sido posible eliminar por completo la presencia de algunos analitos en los blancos de procedimiento, éstos se mantienen controlados y las áreas obtenidas para todos los analitos son bajas y relativamente constantes en el tiempo, tanto

con el procedimiento optimizado para el capilar PLOT Rt[®]-S-BOND como para el del capilar TRB-5.

En general, los analitos más frecuentes y que aparecen con mayor concentración en los blancos de procedimiento con el método optimizado para el capilar PLOT Rt[®]-S-BOND son el DBP y el DEHP. Otros compuestos como DEP, el BBP y el DnOP aparecen esporádicamente en los blancos, con áreas muy bajas y por debajo de los límites de detección del método.

Con el capilar TRB-5, de nuevo los compuestos que más aparecen en los blancos de procedimiento (en cuanto a frecuencia y en cuanto a áreas) son el DBP y el DEHP. El BBP y el DnOP aparecen esporádicamente y con área muy bajas, mientras que el DEP no aparece nunca en los blancos.

Cuando se utiliza tetrahidrofurano como modificador, el DMP no aparece nunca en los blancos con el capilar TRB-5, pero sí está siempre (y con áreas relativamente elevadas) si se emplea como modificador orgánico el metanol. Sin embargo, su presencia no parece poder explicarse por aportación del metanol, ya que en el método con el capilar PLOT Rt[®]-S-BOND, con el que se concentra mejor el DMP y que además utiliza una mayor proporción de metanol (40% frente a 25%), el DMP no aparece en los blancos de procedimiento. La presencia de DMP en los blancos con el capilar TRB-5 y metanol como modificador no ha podido explicarse.

5.3.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO

Se ha llevado a cabo la validación del método optimizado para los dos capilares, ambos con 70 cm de longitud: con el capilar PLOT y un 40% de metanol como modificador y con el capilar TRB-5 y utilizando un 15% de tetrahidrofurano como modificador, que proporciona unas áreas ligeramente superiores al 25% de metanol para un mismo volumen de carga.

En el caso del capilar TRB-5, se ha determinado que el rango lineal llega al menos hasta 150 ng/mL para todos los analitos, concentración con el modificador orgánico incluido (usando un 15% de tetrahidrofurano), lo que se corresponde con 176 ng/mL de concentración real en la muestra. Las pendientes y ordenadas en el origen de las rectas obtenidas junto con sus errores asociados se presentan en la Tabla 17. Para los compuestos que tienen blancos, los límites de detección y cuantificación se estiman a partir de las señales de los blancos de procedimiento y las pendientes de las rectas de calibrado [IUPAC, 2014]:

$$LD = \frac{\text{Señal media del blanco} + 3 \times SD_{\text{blanco}}}{\text{Pendiente de la recta de calibrado}} \quad LC = \frac{\text{Señal media del blanco} + 10 \times SD_{\text{blanco}}}{\text{Pendiente de la recta de calibrado}}$$

Los valores finales se comprueban y ajustan experimentalmente. Al no presentar señal en los blancos, para DMP y DEP los límites se determinan de forma experimental. Se considera el límite de cuantificación la mínima concentración que da lugar a una señal reproducible (CV < 20%) y el límite de detección como la tercera parte del límite de cuantificación experimental [ISO/TS 13530:2009]. Se ha evaluado la precisión inter-día

del método a un nivel de 20 ng/mL (concentración sin modificador; concentración final con el tetrahidrofurano incluido = 17 ng/mL), presentando los resultados como coeficientes de variación (Tabla 17). El método proporciona resultados aceptables en términos de precisión al obtenerse coeficientes de variación por debajo del 15% para BBP, DBP, DEHP y DnOP. Como se ha indicado previamente, este capilar no es el más adecuado para los dos analitos más ligeros (DMP y DEP), para los que el nivel de concentración empleado para evaluar la precisión se corresponde con el límite de cuantificación. Por este motivo, los coeficientes de variación para estos dos compuestos son más elevados, pero se mantienen en cualquier caso por debajo del 20%.

Para evaluar la exactitud del método, ante la inexistencia de materiales de referencia certificados para estos analitos en agua de lluvia, se han realizado estudios de recuperación analítica sobre agua de lluvia a dos niveles de concentración (20 y 100 ng/mL, concentraciones sin modificador). Los valores obtenidos para la recuperación analítica se encuentran entre el 84 y el 116% para todos los analitos y a ambos niveles, lo que se considera un resultado satisfactorio (Tabla 17).

Tabla 17. Pendientes y ordenadas en el origen de las rectas de calibrado obtenidas, límites de detección y cuantificación y reproducibilidad inter-día (n=12) del método optimizado para la determinación de 6 ftalatos el capilar TRB-5.

	Rectas calibrado		LD (ng/mL)	LC (ng/mL)	CV (%)	%R	
	Pte. \pm S _b	o.o. \pm S _a				20 ng/mL	100 ng/mL
DMP	99 \pm 5	-1399 \pm 459	6,7	20	15,6*	104 \pm 6	95 \pm 9
DEP	246 \pm 1	802 \pm 108	6,7	20	15,5*	84 \pm 11	93 \pm 1
BBP	2620 \pm 113	12250 \pm 9422	0,2	0,7	7,9	98 \pm 2	88 \pm 2
DBP	2558 \pm 102	9683 \pm 9299	>1,18	1,8	6,8	116 \pm 1	93 \pm 1
DEHP	1606 \pm 20	-874 \pm 1701	0,6	1,8	12,5	99 \pm 16	106 \pm 5
DnOP	1245 \pm 25	-605 \pm 2091	0,4	1,2	13,7	102 \pm 19	104 \pm 7

*n=10

También se ha llevado a cabo la validación del método que utiliza el capilar PLOT Rt®-S-BOND. En este caso se ha determinado que el rango lineal llega al menos hasta 120 ng/mL (concentración con el modificador orgánico incluido, equivalente a 200 ng/mL en la muestra acuosa antes de añadir el metanol) para todos los analitos excepto el DEP, para el que el rango lineal, en estas condiciones, llega hasta 50 ng/mL (83 ng/mL en la muestra). Las pendientes y ordenadas en el origen de las rectas obtenidas junto con sus errores asociados y sus coeficientes de determinación se presentan en la Tabla 18.

Debido a que la presencia de ftalatos en los blancos, a pesar de permanecer controlada en general, en ocasiones muestra un comportamiento irregular, la posibilidad de sustracción del valor del blanco a las muestras no resulta adecuada [Munch *et al.*, 1995] y se decidió calcular los límites de detección del método según el protocolo descrito en 40CFR Apéndice B a la parte 136 (*Definition and procedure for the determination of the method detection limit - Revision 1.11*) [Glaser *et al.*, 1981]. Este límite de detección del método, se denomina MDL y se emplea en métodos EPA para contaminantes orgánicos en agua [Munch *et al.*, 1995; Price *et al.*, 2005] y algunos autores lo han empleado en métodos para contaminantes orgánicos en muestras acuosas [Focazio *et al.*, 2008; Cahill

et al., 2004]. El MDL se calcula, con un 99% de confianza, a partir de la desviación estándar obtenida para 7 réplicas de un blanco sobrecargado con una determinada cantidad de analitos. Para aceptar el valor calculado, la concentración sobrecargada para cada analito debe ser superior al valor obtenido para el MDL, pero no más de 10 veces el valor de ese MDL calculado.

Los límites de cuantificación se calcularon como 10 veces la desviación estándar obtenida para las 7 réplicas de la concentración usada en cada caso para el cálculo del MDL. Posteriormente todos los límites calculados fueron comprobados experimentalmente. Los límites de detección y cuantificación del método se presentan en la Tabla 18. Excepto el DMP, todos los analitos presentan un MDL inferior a 0,9 ng/mL y los límites de cuantificación varían entre 0,69 y 2,80 ng/mL. Para el dimetilftalato los límites obtenidos son sensiblemente más elevados debido a que el porcentaje de compromiso elegido para el modificador no es el más adecuado para este analito y a que el compuesto eluye muy próximo al frente de elución, viéndose solapado con éste a concentraciones muy bajas y dificultando su detección y cuantificación. El único ftalato legislado es el DEHP, para el cual se establece en la Directiva 2013/39/CE del Parlamento Europeo y del Consejo un valor máximo dado como media anual de 1,3 µg/L en aguas superficiales. Ese valor se encuentra entre el límite de detección y el de cuantificación obtenidos con el método IT-SPME-HPLC-UV presentado, por lo que el método no permite cuantificar valores que superen levemente la legislación para aguas superficiales, aunque sí permitiría detectarlos.

El MDL tiene en cuenta el fondo de todo el procedimiento analítico, por lo que es más representativo que los límites instrumentales calculados a partir de la relación señal/ruido (LD instrumental, Tabla 18). Aun así, el valor de los blancos de procedimiento, al no poder restarse por su posible variabilidad, debe tenerse en cuenta de otra manera. En este caso se ha optado por calcular los niveles o límites para informar (*reporting levels*, RL). Estos límites se calculan como 10 veces la concentración media de cada compuesto en los blancos [Barnes *et al.*, 2008]. Los RL calculados para todos los compuestos se muestran en la Tabla 18. Si el analito no aparece en los blancos o el RL es menor que el LC, se utiliza el valor del límite de cuantificación como RL. Cuando el valor de concentración de un analito está por debajo de su RL, aunque esté por encima del LC, se dará como una estimación, al no poder determinar cuánto de ese valor se debe al fondo y por tanto si esa es la concentración real en la muestra o está afectada por los blancos. A pesar de que los valores medios de los analitos en los blancos de procedimiento que se obtienen con este método están por debajo de los publicados por otros autores (Vavrouš *et al.* (2016) publican valores de 4,5 y 11 ng/mL para DBP y DEHP en los blancos), el DBP, el DEHP y el DnOP aparecen en los blancos con unas señales que provocan que sus RL sean significativamente superiores a sus respectivos límites de cuantificación.

Se ha evaluado la precisión inter-día del método a un nivel de 20 ng/mL (concentración con modificador, equivalente a 33,3 ng/mL en la muestra). Se presentan los resultados como coeficientes de variación de las áreas (Tabla 18). El método proporciona buenos resultados en términos de precisión al obtenerse coeficientes de variación por debajo del 13% para todos los analitos a excepción del dimetilftalato, que

presenta un coeficiente de variación algo superior (16,2%), lo que se justifica debido a la cercanía de la concentración empleada en el estudio de la precisión con el límite de cuantificación de ese compuesto.

Tabla 18. Parámetros analíticos del método optimizado con el capilar PLOT para la determinación de 6 ftalatos: Pendientes, ordenadas en el origen, coeficientes de determinación, rangos lineales (ng/mL sin modificador añadido), reproducibilidad inter-día (nivel 20 ng/mL con modificador, n=17) y límites de detección instrumentales (LD), de detección del método (MDL), de cuantificación (LC) y para informar (RL) (todos en ng/mL sin modificador añadido).

	Rectas calibrado			Rango lineal	CV (%)	LD inst.	MDL	LC	RL
	Pte. $\pm S_b$	o.o. $\pm S_a$ ($\times 10^3$)	R ²						
DMP	524 \pm 36	19 \pm 3	0,9763	LC - 200	16,2 ^a	0,5	9,4	30	30
DEP	2888 \pm 58	1,8 \pm 1,3	0,9951	LC - 83,3	9,3 ^b	0,08	0,4	1,2	1,2
BBP	4474 \pm 54	0,3 \pm 2,5	0,9979	LC - 200	7,0	0,04	0,2	0,7	0,7
DBP	4470 \pm 56	2,2 \pm 2,4	0,9980	LC - 200	12,5	0,07	0,6	2,0	5,9
DEHP	2375 \pm 31	-0,5 \pm 1,3	0,9975	LC - 200	5,3	0,14	0,9	2,8	11,4
DnOP	2232 \pm 41	-2,5 \pm 1,8	0,9951	LC - 200	6,9	0,21	0,8	2,4	4,7

^an=15; ^bn=16; LD inst.: Límite de detección instrumental; RL: Límite para informar

Para evaluar la exactitud del método se llevaron a cabo estudios de recuperación analítica sobre agua de lluvia sobrecargada con una concentración de cada uno de los 6 ftalatos de 50 ng/mL (concentración con modificador añadido). Los resultados de recuperación analítica obtenidos son satisfactorios (Tabla 9), con valores entre el 82 y el 101%, y entre el 96 y el 101% para los 4 compuestos más pesados. Los dos analitos más ligeros presentan recuperaciones levemente inferiores debido a que las condiciones de compromiso seleccionadas no son las más adecuadas para ellos. El frente de elución del cromatograma puede verse bastante incrementado en algunas muestras puntuales, afectando a la integración del pico del DMP e incluso del DEP. Se ha comprobado que si se ajusta el pH a aproximadamente 7 el frente disminuye en estas muestras problemáticas. Por si fuese necesario basificar la muestra para disminuir el frente, se ha comprobado que las recuperaciones analíticas no se ven afectadas por este ajuste del pH, a excepción de una ligera disminución en el caso del DMP (Tabla 19).

Se calcularon las recuperaciones absolutas del procedimiento IT-SPME a tres niveles de concentración, comparando las áreas obtenidas al pasar 5 mL de disolución patrón de 5, 20 y 50 ng/mL (25, 100 y 250 ng respectivamente) a través del capilar con las obtenidas para la inyección directa de 10 μ L de 2,5 μ g/mL (25 ng), 10 μ L de 10 μ g/mL (100 ng) y 25 μ L de 10 μ g/mL (250 ng) (Tabla 19). Los últimos cuatro analitos presentan buenas recuperaciones absolutas, con valores entre 31 y 39%. El DEP tiene un valor más bajo (17%) al no ser las condiciones de compromiso seleccionadas las mejores para él.

Tabla 19. Recuperaciones analíticas (%) \pm SD ($n=3$) para agua de lluvia sobrecargada con 50 ng/mL, con pH ajustado y sin ajustar, y recuperaciones absolutas del método con el capilar PLOT Rt®-S-BOND.

	%R agua de lluvia		%R absoluta IT-SPME			
	sin ajustar	pH \approx 7	25 ng	100 ng	250 ng	Media 3 niveles
DMP	71 \pm 4*	61 \pm 3*	<LC	6 \pm 1	4,1 \pm 0,1	5,0 \pm 0,4
DEP	83 \pm 10	80 \pm 2*	18 \pm 1	19 \pm 3	14,6 \pm	17 \pm 1
BBP	98 \pm 5	99 \pm 2	36 \pm 1	36 \pm 1	37,7 \pm	37 \pm 1
DBP	96 \pm 4	99 \pm 4	39 \pm 2	37,6 \pm	40 \pm 1	39 \pm 1
DEHP	99 \pm 5	100 \pm 1	34 \pm 2	33 \pm 2	36 \pm 1	34 \pm 2
DnOP	101 \pm 5	106 \pm 2	29 \pm 3	31 \pm 3	33 \pm 1	31 \pm 2
Media	91 \pm 5	91 \pm 2	31 \pm 2	27 \pm 2	28 \pm 1	27 \pm 1

* $n=2$

En la Figura 41 se muestra el efecto de concentración logrado en el capilar. La disolución patrón procesada mediante IT-SPME es 21 veces más diluida que la inyectada directamente, pero la respuesta obtenida para ella es mucho mayor. Esto aún es más acusado en el caso del DMP. Con el método con el capilar TRB-5, las recuperaciones absolutas de los cuatro últimos ftalatos son un 10% más bajas de media (entre el 18 y el 26%), y considerablemente peores para DEP (1,2%) y DMP (0,2%).

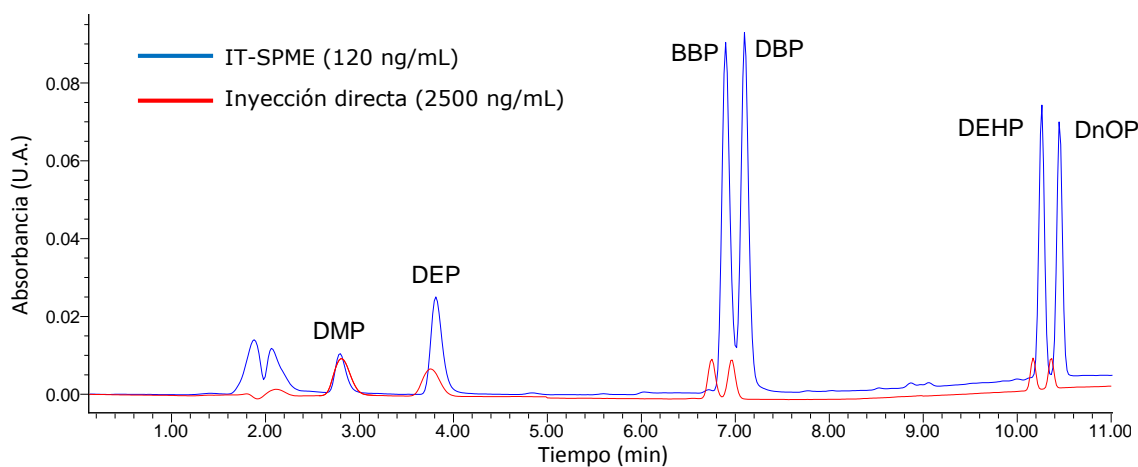


Figura 41. Cromatogramas obtenidos para la inyección directa de 10 μ L de 2500 ng/mL y 5 mL de 120 ng/mL mediante IT-SPME.

Las figuras de mérito obtenidas para los dos métodos (capilar TRB-5 con un 15% THF y capilar PLOT con un 40% MeOH) son similares, aunque el método con el capilar PLOT supone una cierta mejora, con una mejor reproducibilidad inter-día, especialmente para DEHP y DnOP, y mayor sensibilidad en las rectas de calibrado de todos los analitos. Además, los límites de detección son algo menores, con una clara mejora en los límites de detección y cuantificación del DEP, que no se concentra bien en el capilar TRB-5.

5.3.5. APLICACIÓN A MUESTRAS DE AGUA DE LLUVIA

Los métodos optimizados se han aplicado a muestras de agua de lluvia recogidas en el IUMA (área suburbana, véase apartado 4.3.6 para más información). Las muestras se filtran a través de filtros de fibra de vidrio previamente lavados con 1 L de agua Milli-Q.

Con el método validado para el capilar PLOT se han analizado dos tipos de muestras: cinco con periodos de muestreo muy cortos (de menos de 12 horas, EV), de eventos concretos, y tres de periodos más largos, de entre 16 y 56 h (M). Además, dos de las 5 muestras de evento se recogieron tras un periodo con poca precipitación (EV-F1 y EV-F2), lo que permite evaluar el efecto lavado de la lluvia sobre los ftalatos de la atmósfera. Los niveles encontrados se muestran en la Tabla 20. Tanto el DBP como el DEHP se detectan en las 8 muestras, si bien el DEHP solo está por encima del LC en una de ellas (y solo se puede dar una estimación de la concentración al estar por debajo del RL). El DBP, en cambio, es el analito mayoritario en todas las muestras. El DEP se encuentra en 6 de las 8 muestras, con concentraciones entre las del DBP y el DEHP. Por su parte, el DnOP también se detecta en 6 de las muestras, pero en todas ellas está por debajo del LC. El DMP y el BBP no se detectaron en ninguna de las muestras analizadas. Los niveles totales (suma de las concentraciones de los 6 ftalatos determinados) se encuentran entre 9,9 y 203 ng/mL para los eventos y entre 3,8 y 72 ng/mL para las muestras de periodos más largos. Los niveles de concentración encontrados, del orden ng/mL, están en los rangos publicados por otros autores (véase Tabla 15), si bien no se puede hacer una comparativa detallada debido a las distintas características de las muestras (distintos periodos de muestreo, deposición húmeda/total, etc.).

En general, se observa que cuanto menor es el volumen de muestra recogido mayores son las concentraciones de ftalatos presentes, lo que se corresponde con el efecto de dilución de la lluvia que ya se encontró para los HAP (capítulo 4). Así, el DEHP solo es cuantificable en la muestra con el volumen más pequeño (EV-5), mientras que en las dos muestras con más volumen (M-2 y M-3) el DEP está por debajo del LC. Respecto al efecto lavado, se ha encontrado correlación ($r = -0,79$) entre la precipitación acumulada la semana anterior al muestreo y las concentraciones de ftalatos en las muestras. Parece que la precipitación acumulada tiene un mayor efecto en los niveles de ftalatos que el tiempo que lleve sin llover (Tabla 20). Esto está de acuerdo con el hecho de que las dos muestras con menos litros por metro cuadrado acumulados en la semana previa (EV-F1 y EV-F2) son las dos con las mayores concentraciones totales de ftalatos.

En cualquier caso, los datos de precipitación acumulada y del tiempo previo sin lluvia pertenecen a una estación cercana debido a la imposibilidad de obtener los datos concretos del punto de muestreo, por lo que los resultados deben tomarse con cautela. Es necesario un estudio más profundo acerca de esta posible relación entre la precipitación acumulada en la semana previa y los niveles de ftalatos encontrados.

Tabla 20. Concentraciones de ftalatos (ng/mL) ± SD (n=3) en las muestras de agua de lluvia analizadas.

	EV-F1	EV-F2	M-1	EV-3	EV-4	EV-5	M-2	M-3
Características muestra								
Tiempo de muestreo (h)	4,5	8,5	16	4	8	8,5	31,5	56,5
Vol. muestra (mL)	89	195	84	107	130	19	295	530
Precipitación (L/m ²)	2,4	5,2	2,2	2,9	3,5	0,5	7,9	14,9
Tiempo previo sin llover (h)	18,7	7,3	76,5	4,8	2,3	3	15,7	9,5
L/m ² acumulados en la semana anterior	10	16	26,9	23,4	20,5	19,3	22,2	22,9
Compuestos								
DMP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DEP	14 ± 1	25,3 ± 0,4	3,4 ± 0,3	1,82 ± 0,07	1,9 ± 0,3	6,3 ± 0,4	n.d.	n.d.
BBP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DBP	189 ± 5	101 ± 3	69 ± 1	12 ± 4	8 ± 1	38 ± 1	3,8 ± 0,8	9,3 ± 0,7
DEHP	<LC	<LC	<LC	<LC	<LC	3,0 ± 0,9*	<LC	<LC
DnOP	<LC	<LC	n.d.	<LC	n.d.	<LC	<LC	<LC
ΣPAES	203	126	72	13,8	9,9	47,3	3,8	9,3

*Valor estimado (<RL); n.d. No detectado; PAEs: Ftalatos (totales)

Por otra parte, el método optimizado y validado para el capilar TRB-5 y un 15% THF como modificador también se ha probado en 4 muestras de agua de lluvia: 3 de ellas se corresponden con la fracción disuelta de la deposición total recogida durante un periodo de mes y medio (M-4 a M-6) y la otra con la fracción disuelta del agua de lluvia recogida durante 24 horas (EV-6) (Tabla 21). En este caso los únicos analitos que se pueden detectar son DBP (en 3 de las 4 muestras, siendo también cuantificable), DEHP (en las mismas 3 muestras, aunque solo se llega a cuantificar en una) y DnOP (en 2 de las muestras, en ninguna por encima del límite de cuantificación). La muestra EV-6, correspondiente al periodo de 24 horas, es la que corresponde con los valores más elevados, lo que se puede explicar por la dilución que se produce al acumularse un mayor volumen de agua en las muestras de mes y medio.

Tabla 21. Concentraciones de ftalatos (ng/mL) \pm SD ($n=2$) para las muestras diaria y mensuales analizadas con el método del capilar TRB-5. Condiciones: capilar TRB-5, 5 mL muestra con 15% THF + 60 μ L agua Milli-Q. No se han restado los blancos.

	EV-6	M-4	M-5 ^a	M-6 ^a
DMP	n.d.	n.d.	n.d.	<LC
DEP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BBP	n.d.	n.d.	0.8	<LC
DBP	14,0 \pm 0,3	4,9 \pm 0,1*	1,9*	<LC
DEHP	4,5 \pm 0,2*	<LC	<LC	<LC
DnOP	<LC	n.d.	n.d.	<LC

*Valor estimado (<RL). n.d. no detectado. ^a $n=1$

Por último, mencionar que para ambos métodos el análisis de muestras reales no ha provocado ningún problema en la robustez del sistema ni tampoco en la separación cromatográfica, de tal modo que no aparecen compuestos adicionales que interfieran con los compuestos de interés (Fig. 42).

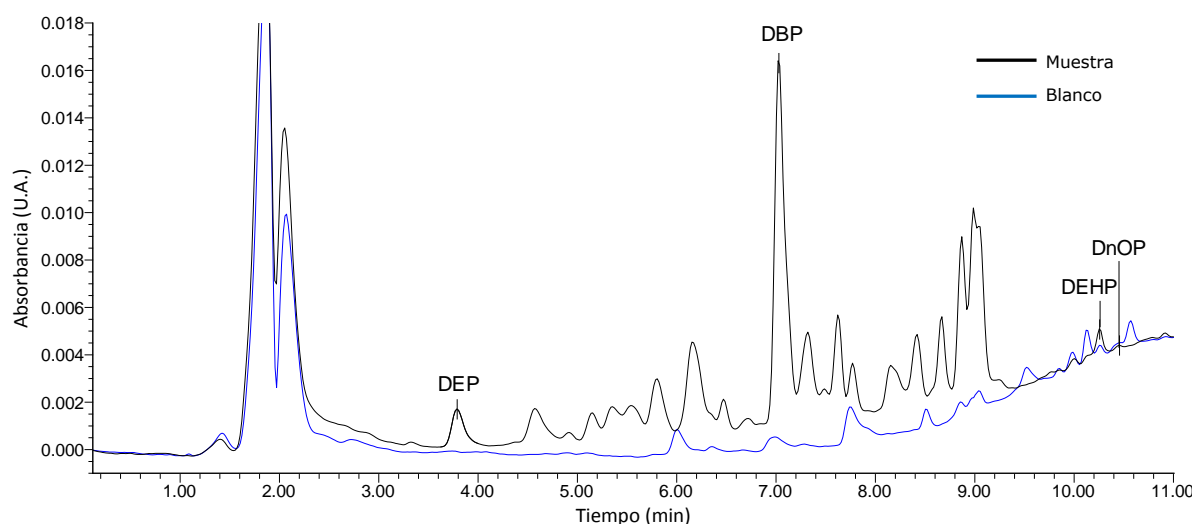


Figura 42. Cromatograma de una muestra de agua de lluvia de evento y un blanco de procedimiento. Condiciones: capilar PLOT Rt[®]-S-BOND, 5 mL de muestra con 40% MeOH + 60 μ L agua Milli-Q.

5.4. CONCLUSIONES

Se han optimizado gradientes binarios ACN/H₂O para la separación de 6 ftalatos en un tiempo relativamente corto con dos columnas de distintas características (monolítica C₁₈ y empaquetada de cianopropilo), siendo la monolítica más adecuada para el acoplamiento con IT-SPME. En la optimización de la extracción, el capilar PLOT Rt[®]-S-BOND proporciona los mejores resultados de entre los tres probados, obteniéndose una buena solución de compromiso para los 6 analitos, con tendencias diferentes, empleando 5 mL de muestra con un 40% de metanol como modificador orgánico. La estructura porosa del capilar PLOT parece estar detrás de los buenos resultados obtenidos con ese capilar. Aun así, el capilar TRB-5 con un 15% de tetrahidrofurano como modificador orgánico proporciona también unos resultados aceptables y no demasiado inferiores a los del método con el capilar PLOT para BBP, DBP, DEHP y DnOP, aunque no es adecuado para los compuestos menos pesados (DMP y DEP). Ambos métodos han sido validados y se han aplicado a muestras.

Los problemas habituales de blancos en la determinación de ftalatos se han afrontado mediante un estudio de las posibles fuentes de estos analitos en los blancos de procedimiento lo cual ha permitido minimizarlos y mantenerlos bajo control. Además, se han calculado los límites de detección del método (MDL) y los niveles para informar (RL) para mejorar la fiabilidad de las concentraciones que se determinen con este método. Los RL podrían reducirse llevando a cabo la determinación en una sala limpia.

El método desarrollado resuelve ciertas limitaciones en aspectos metodológicos que se apreciaban en los métodos de la bibliografía para la determinación de ftalatos en agua de lluvia (véase Tabla 15). Es un análisis más rápido (tanto en la preparación de muestra como en la etapa de determinación cromatográfica), más sencillo (con un único paso), con menor gasto de disolventes orgánicos y también un menor consumo de muestra (3 mL por análisis), que lo convierten en un método ideal para el análisis de agua de lluvia de muestreos cortos (eventos, muestras diarias...). Además, a pesar de emplear un detector de matriz de fotodiodos, con sensibilidad limitada, los límites obtenidos (reales al considerar el procedimiento completo) son bajos y adecuados para los niveles que se esperan en este tipo de muestras.

Los métodos validados se han aplicado a muestras de agua de lluvia de diferentes tiempos y volúmenes de muestreo, que han permitido observar el efecto lavado y la dilución del agua de lluvia en los ftalatos. Estos resultados, si bien limitados por el pequeño número de muestras analizadas, abren aspectos medioambientales importantes para un estudio posterior, como son la detección de eventos de máxima contaminación o las variaciones temporales de ftalatos y su relación con variables meteorológicas y de la matriz de estudio, como la temperatura, la lluvia acumulada o la estación del año (dado que se ha encontrado un lavado más eficiente de los contaminantes en invierno [Teil *et al.*, 2006]). Como se ha comentado en el capítulo 1, el muestreo de eventos y periodos cortos puede aportar una información medioambiental de gran interés. Frente a muchos métodos publicados para la determinación de ftalatos en agua de lluvia, que requieren volúmenes de muestra que podrían no alcanzarse en un muestreo de estas características,

el método propuesto en este capítulo es ideal para este tipo de muestras gracias al bajo volumen de muestra que necesita y a su sencillez, rapidez y bajo coste.

A pesar de que el método desarrollado solo se ha aplicado a muestras de agua de lluvia, también podría ser posible su aplicación a otro tipo de muestras acuosas sin necesidad de modificación, como por ejemplo aguas ambientales con matrices relativamente limpias como agua de río o de lago (la concentración salina del agua de mar podría requerir de modificaciones en el procedimiento para su aplicación).

5.5. REFERENCIAS

- Aufartová J., Torres-Padrón M. E., Sosa-Ferrera Z., Nováková L., Solich P., Santana-Rodríguez J. J. Development of a novel in-tube solid phase microextraction based on micellar desorption followed by LC-DAD-FD for the determination of some endocrine disruptor compounds in environmental liquid samples. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 37 (2014) 1654–1672.
- Baram G. I., Azarova I. N., Gorshkov A. G., Vereshchagin A. L., Lang B., Kiryukhina E. D. Determination of bis(2-ethylhexyl) phthalate in water by high-performance liquid chromatography with direct on-column preconcentration. *Journal of Analytical Chemistry*, 55(8) (2000) 750–754.
- Barnes K. K., Kolpin D. W., Furlong E. T., Zaugg S. D., Meyer M. T., Barber L. B. A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - I) Groundwater. *Science of the Total Environment*, 402(2-3) (2008) 192–200.
- Cahill J. D., Furlong E. T., Burkhardt M. R., Kolpin D., Anderson L. G. Determination of pharmaceutical compounds in surface- and ground-water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1041(1-2) (2004) 171–180.
- Croes K., Steffens A., Marchand D. H., Snyder L. R. Relevance of π - π and dipole-dipole interactions for retention on cyano and phenyl columns in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1098(1-2) (2005) 123–130.
- Fankhauser-Noti A., Grob K. Blank problems in trace analysis of diethylhexyl and dibutyl phthalate: Investigation of the sources, tips and tricks. *Analytica Chimica Acta*, 582(2) (2007) 353–360.
- Focazio M. J., Kolpin D. W., Barnes K. K., Furlong E. T., Meyer M. T., Zaugg S. D., Barber L. B., Thurman M. E. A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - II) Untreated drinking water sources. *Science of the Total Environment*, 402(2-3) (2008) 201–216.
- Glaser J. A., Foerst D. L., McKee G. D., Quave S. A., Budde W. L. 40 CFR, Part 136, Appendix B. *Environmental Science and Technology*, 15 (1981) 1426–1435.

Guidotti M., Giovinazzo R., Cedrone O., Vitali M. Determination of organic micropollutants in rain water for laboratory screening of air quality in urban environment. *Environment International*, 26(1-2) (2000) 23–28.

Guo Y., Kannan K. Challenges encountered in the analysis of phthalate esters in foodstuffs and other biological matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(9) (2012) 2539–2554.

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). *Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book")*. Compilado por A. D. McNaught y A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997. Versión *on-line* corregida (2.3.3, actualizada a 24/2/2014), <https://doi.org/10.1351/goldbook.L03540>.

Jin Y. F., Zhang Y. P., Huang M. X., Bai L. Y., Lee M. L. A novel method to prepare monolithic molecular imprinted polymer fiber for solid-phase microextraction by microwave irradiation. *Journal of Separation Science*, 36(8) (2013) 1429–1436.

Jornet-Martínez N., Muñoz-Ortuño M., Moliner-Martínez Y., Herráez-Hernández R., Campíns-Falcó P. On-line in-tube solid phase microextraction-capillary liquid chromatography method for monitoring degradation products of di-(2-ethylhexyl) phthalate in waters. *Journal of Chromatography A*, 1347 (2014) 157–160.

Kataoka H., Ise M., Narimatsu S. Automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the analysis of bisphenol A, alkylphenols, and phthalate esters in foods contacted with plastics. *Journal of Separation Science*, 25(1-2) (2002) 77–85.

Lim L. W., Hirose K., Tatsumi S., Uzu H., Mizukami M., Takeuchi T. Sample enrichment by using monolithic precolumns in microcolumn liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1033(2) (2004) 205–212.

Lin Z. P., Ikonomou M. G., Jing H., Mackintosh C., Gobas F. A. P. C. Determination of phthalate ester congeners and mixtures by LC/ESI-MS in sediments and biota of an urbanized marine inlet. *Environmental Science and Technology*, 37(10) (2003) 2100–2108.

Munch J., Eichelberger J., Behymer T., Budde W. *Method 525.2*. US EPA, Washington DC, EEUU, 1995.

Nesterenko P. N., Rybalko M. A. Separation of homologues of organic compounds using the gradient of the eluent flow rate on a monolithic porous column. *Journal of Analytical Chemistry*, 60(4) (2005) 349–354.

Norma ISO/TS 13530:2009. *Water quality - Guidance on analytical quality control for chemical and physicochemical water analysis*.

Núñez O., Ikegami T., Miyamoto K., Tanaka N. Study of a monolithic silica capillary column coated with poly(octadecyl methacrylate) for the reversed-phase liquid chromatographic separation of some polar and non-polar compounds. *Journal of Chromatography A*, 1175(1) (2007) 7–15.

- Peters R. J. B., Beeltje H., Van Delft R. J. Xeno-estrogenic compounds in precipitation. *Journal of Environmental Monitoring*, 10(6) (2008) 760–769.
- Price E., Prakash B., Domino M., Pepich B., Munch D. *Method 527*. US EPA, Washington DC, EEUU, 2005.
- Su R., Zhao X., Li Z., Jia Q., Liu P., Jia J. Poly(methacrylic acid-co-ethylene glycol dimethacrylate) monolith microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of phthalate esters in cosmetics. *Analytica Chimica Acta*, 676(1-2) (2010) 103–108.
- Teil M. J., Blanchard M., Chevreuil M. Atmospheric fate of phthalate esters in an urban area (Paris-France). *Science of the Total Environment*, 354(2-3) (2006) 212–223.
- Vavrouš A., Pavloušková J., Ševčík V., Vrbík K., Čabala R. Solution for blank and matrix difficulties encountered during phthalate analysis of edible oils by high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1456 (2016) 196–204.
- Xu Q., Yin X., Wu S., Wang M., Wen Z., Gu Z. Determination of phthalate esters in water samples using Nylon6 nanofibers mat-based solid-phase extraction coupled to liquid chromatography. *Microchimica Acta*, 168(3) (2010) 267–275.
- Xue L., Zhang D., Wang T., Wang X. M., Du X. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography for determination of phthalic esters in environmental water samples. *Analytical Methods*, 6(4) (2014) 1121–1127.
- Zhang M., Liu S., Zhuang H., Hu Y. Determination of dimethyl phthalate in environment water samples by a highly sensitive indirect competitive ELISA. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(2) (2012) 436–445.
- Zhao R. S., Wang X., Yuan J. P., Lin J. M. Investigation of feasibility of bamboo charcoal as solid-phase extraction adsorbent for the enrichment and determination of four phthalate esters in environmental water samples. *Journal of Chromatography A*, 1183(1-2) (2008) 15–20.
- Zuo Y. (Ed.). *High-performance Liquid Chromatography (HPLC): Principles, Procedures and Practices*. Nova Science Publishers, Inc., New York, 2014.

**CAPÍTULO 6. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE
FTALATOS EN MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO**

Publicación:

M. Fernández-Amado, M.C. Prieto-Blanco, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez. Ion-pair in-tube solid phase microextraction for the determination of phthalates and degradation products in atmospheric particulate matter (en fase de redacción).

Congresos:

M. Fernández-Amado, M.C. Prieto-Blanco, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez. Determination of phthalates and their degradation products in PM₁₀ by ion-pair in-tube solid phase microextraction. Comunicación póster. *19th International Symposium on Advances in Extraction Technologies (ExTech 2017)*. Santiago de Compostela (España) 27-30 Junio, 2017.

6.1. ANTECEDENTES DE LA DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En este capítulo se presenta la optimización y validación de un método con IT-SPME para la determinación de 15 ftalatos (13 diésteres y 2 monoésteres) en material particulado atmosférico. Los analitos escogidos son dimetilftalato (DMP), dietilftalato (DEP), di-n-propilftalato (DPP), butilbencilftalato (BBP), di-n-butilftalato (DBP), diisobutilftalato (DiBP), di-n-pentilftalato o diamilftalato (DAP), di-n-hexilftalato (DHP), di-n-heptilftalato (DHepP), di-(2-etilhexil)ftalato (DEHP), di-n-octilftalato (DnOP), diisonilftalato (DiNP), diisodecilftalato (DiDP), mono-n-butilftalato (MBP) y mono(2-etilhexil)ftalato (MEHP).

Como se ha comentado en el capítulo de Introducción, DiNP y DiDP son los ftalatos más utilizados y están regulados en ciertas aplicaciones [ECPI, 2015; Regulación 1907/2006]. El resto de diésteres seleccionados también tienen un extendido uso en la industria y/o posibles efectos adversos sobre la salud. Por su parte, la determinación de MBP y MEHP, productos de biodegradación de DBP y DEHP respectivamente, podría ser de gran interés para comprender los procesos de degradación de los ftalatos en la atmósfera y/o el reparto de esos monoésteres entre las fases aire/material particulado atmosférico/agua de lluvia.

En la Tabla 22 se presentan varios métodos de determinación de ftalatos en material particulado atmosférico publicados en la bibliografía. La gran mayoría de los métodos analizan un número de entre 5 y 7 ftalatos, generalmente DMP, DEP, BBP, DBP, DiBP, DEHP y/o DnOP. Algunos métodos distinguen entre los isómeros DBP y DiBP que son compuestos más abundantes en PM, y dependiendo de la zona de muestreo puede ser mayoritario el DiBP (Mar Mediterráneo [Romagnoli *et al.*, 2016], las megaciudades Xi'an (China) y Nueva Delhi (India) [Li *et al.*, 2014], India tropical [Fu *et al.*, 2010]) o el DnBP (Nanjing (China), en zonas de diferente tipología tanto del centro urbano como de las afueras [Wang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012]). Gu *et al.* (2010) analizan muestras de tres puntos próximos entre sí situados en Taizhou (China), cerca de una planta de desmontaje de desechos electrónicos. En los dos puntos de muestreo más cercanos a esta planta (0,5-1 km) el DiBP es el ftalato mayoritario, mientras que en el punto de muestreo algo más alejado (6 km) el DnBP presenta mayores concentraciones. Algunos métodos también determinan los ftalatos de cadena larga DiNP y DiDP [Wang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012; Weschler, 1984]. Ninguna publicación menciona el análisis de los productos de degradación MBP y MEHP.

A excepción de los dos métodos que hacen uso de la desorción térmica [Weschler, 1984; Wang *et al.*, 2016], todos los demás métodos publicados requieren varias etapas, que además de la extracción incluyen en muchos casos purificación y concentración de los extractos (Tabla 22). Algunos métodos que determinan más familias de compuestos incluyen además fraccionamiento o derivatización. Respecto a la extracción de los ftalatos del material particulado atmosférico, la opción más extendida es la extracción asistida por US [Li *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2012], que generalmente debe realizarse en 2 o 3

extracciones consecutivas [Kong *et al.*, 2013; Romagnoli *et al.*, 2016; Salapasidou *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2014; Gu *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2010]. Otra técnica ampliamente utilizada es la extracción Soxhlet [Wang *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2007], que requiere de tiempos de extracción más largos (entre 16 y 40 h). También Teil *et al.* (2006) realizan la extracción con un extractor por volatilización-condensación durante 12 h. Jiao *et al.* (2015) emplean la extracción en fase microsólida asistida por microondas, una técnica que consume pocos disolventes pero que requiere varias etapas (lavado, secado, desorción... además de la preparación previa del dispositivo de extracción), mientras que Salgueiro-González *et al.* (2013) optan por la extracción con líquidos a presión. En estos dos últimos casos el disolvente elegido es el metanol, pero el disolvente más frecuente en extracciones Soxhlet y con ultrasonidos es el diclorometano, solo o en mezclas con metanol, hexano o acetona.

Respecto a las técnicas de determinación, debido a los bajos niveles a los que se encuentran los ftalatos en el material particulado atmosférico (del orden de ng/m^3), lo más habitual es emplear espectrometría de masas para la detección, generalmente acoplada a cromatografía de gases. Algunos métodos hacen uso de la cromatografía de líquidos, con detección por MS/MS [Salgueiro-González *et al.*, 2013] o UV [Wang *et al.*, 2012; Jiao *et al.*, 2015]. Aunque hay un mayor número de métodos publicados para la determinación de ftalatos en material particulado atmosférico que en agua de lluvia, los métodos adolecen de los mismos problemas: varias etapas en el tratamiento de muestra, consumo relativamente elevado de disolventes orgánicos, falta de automatización y escaso control de blancos.

Los niveles de ftalatos publicados se encuentran en el rango 0,001-1748 ng/m^3 (Tabla 22). Las comparaciones de niveles totales son estimativas de los niveles de concentración alcanzados en particulado atmosférico, toda vez que el número de ftalatos analizados es diferente en cada método. También debe tenerse en cuenta que parte de las muestras se corresponden con material particulado total en suspensión (TSP) y otras PM_{10} y/o $\text{PM}_{2,5}$. Además, los volúmenes de muestra y los tiempos de muestreo son diferentes dependiendo del muestreador: captadores de alto, bajo y/o medio volumen. Por todo esto y a pesar de no poder realizar una discusión exhaustiva, los resultados publicados, sin embargo, sí permiten observar la presencia de variaciones estacionales en la concentración de los ftalatos en material particulado atmosférico: los niveles pueden ser más altos en invierno [Wang *et al.*, 2016], siguiendo tendencias estacionales habituales por el mayor número de fuentes de contaminación y la peor dispersión de contaminantes en esa época, o en verano, ya que el calor favorece la evaporación de los ftalatos aumentando su presencia en la atmósfera [Fu *et al.*, 2010]), independientemente de las diferencias según la localización del punto de muestreo (Tabla 22). En general, estas variaciones no afectan por igual a todos los ftalatos. Parece que la localización del punto de muestreo afecta más que la tipología de la zona, lo que parece indicar que las fuentes concretas tienen más peso en las concentraciones de ftalatos. En general el ftalato más abundante suele ser el DEHP, seguido de los isómeros DBP y DiBP [Xie *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008, 2012, 2016], que suelen estar entre los más abundantes en la mayoría de estudios.

Tabla 22. Características de los métodos de determinación de ftalatos en PM y niveles encontrados publicados en la bibliografía (continúa).

Ftalatos	Etapas	Dis. org. (mL) ^a	Técnica determ.	LD	Niveles encontrados (ng/m ³)	Lugar y periodo de muestreo, nº muestras	Tipo de muestra	Ref.
DMP, DEP, dialifitalato, DPP, DBP, DiBP, BBP, butiloftalato, DHEP, DEHP, DnOP, DiOP, DiNP, DiDP	1. Extracción Soxhlet (40 h) 2. Purificación por SPE 3. Concentración	> 70	GC-MS	0,0004-0,0013	0,05-17,9 (urbano), 0,01-7,8 (suburbano). DBP es el mayoritario	Nanjing (Jiangsu, China), Abr, Jul y Oct 2005 y Ene 2006, n=170	12h-TSP (alto volumen) Urbano y suburbano	Wang <i>et al.</i> , 2008
BBP, DBP, DiBP, DEHP, butilobutil-ftalato	1. Extracción US 2. Concentración	n.e.	GC-MS	0,26 para DEHP	3,3-164 (Xi'an, 24h), 12-689 (Nueva Delhi, 24h). DEHP es el mayoritario	Xi'an, China (Ene-Feb 2009) y Nueva Delhi, India (Nov 2006-Feb 2007 y Ene 2008), n=28 (n=15 para 24h)	TSP (día/noche) (alto y medio volumen) Urbano	Li <i>et al.</i> , 2014
DMP, DEP, dialifitalato, butiloftalato, BBP, DPP, DBP, DiBP, DHEP, DEHP, DnOP, DiOP, DiNP, DiDP	1. Extracción US (30 min) 2. Filtración 3. Concentración 4. Purificación por SPE 5. Concentración 6. Redisolución	> 100	HPLC-UV	0,01-0,06 ng	<LD-150,0. DBP es el mayoritario	10 localizaciones en Nanjing (China), Abr 2009-Abr 2010, n=450	TSP Industrial, tráfico, comercial, residencial	Wang <i>et al.</i> , 2012
DMP, DEP, DBP, DiBP, BBP, DEHP	1. Extracción Soxhlet (24 h) 2. Purificación por SPE 3. Concentración 4. Ajuste de volumen	> 85	GC-MS	0,0002-0,024	0,001-0,735. DEHP es el mayoritario	Ártico, Verano 2004, n=6	TSP (alto volumen)	Xie <i>et al.</i> , 2007
DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DnOP	1. Extracción Soxhlet (16 h) 2. Purificación por SPE 3. Concentración 4. Ajuste de volumen	190	GC-MS	5-34,4 ng	<LD-1,2. DEHP es el mayoritario	Mar del Norte, 29 Feb - 10 Mar 2004, n=6	TSP (alto volumen)	Xie <i>et al.</i> , 2005

^aConsumo de disolventes orgánicos por muestra; Técnica determ.: Técnica de determinación; TSP: Partículas totales en suspensión; DiOP: diisooftalato.

Tabla 22. Características de los métodos de determinación de ftalatos en PM y niveles encontrados publicados en la bibliografía (continúa).

Ftalatos	Etapas	Dis. org. (mL) ^a	Técnica determ.	LD	Niveles encontrados (ng/m ³)	Lugar y periodo de muestreo, nº muestras	Tipo de muestra	Ref.
DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DnOP	1. Extracción por volatilización-condensación (12 h) 2. Concentración 3. Redisolución	100	GC-ECD	0,025-0,075	<LD-10,4. DEHP es el mayoritario	París (Francia), May 2002-Abr 2003, n=20	TSP (alto volumen) Urbano	Teil <i>et al.</i> , 2006
DMP, DEP, DBP, DiBP, BBP, DEHP, DnOP	1. Extracción Soxhlet (16 h) 2. Evaporación 3. Almacenamiento para eliminar residuos de agua (toda la noche) 4. Purificación por SPE 5. Evaporación	210	GC-MS	0,001-0,013	<LD-6,85. DBP y DiBP son los mayoritarios	Centro de Investigación GKSS (Alemania) y Mar del Norte, n=16	TSP (alto volumen) Suburbano y oceánico	Xie <i>et al.</i> , 2006
DEP, DBP, DEHP	1. Extracción en fase micro sólida asistida por microondas (15 min) 2. Lavado y secado 3. Desorción con US (25 min) 4. Filtración 5. Evaporación en corriente de N ₂ 6. Redisolución	~ 10	HPLC-UV	2-5,7	0,57-5,56 (urbano), 4,5-11,9 (centro empresarial), 19,2-68,8 (industrial). DEHP es el mayoritario	Dongguan (China), n=3	24h-TSP (alto volumen) Urbano, centro empresarial e industrial	Jiao <i>et al.</i> , 2015
DMP, DEP, DBP, DiBP, BBP, DEHP	1. Extracción US (3x10 min) 2. Concentración	15	GC-MS	n.e.	0,3-1748. DEHP es el mayoritario	14 ciudades (China), Ene, Jun y Jul 2003, n=56	24h-PM _{2,5} (mini-volumen)	Wang <i>et al.</i> , 2006
DMP, DEP, DBP, DEHP	1. Sobrecarga con deuterados (toda la noche) 2. PLE (3x8 min) 3. Concentración en evaporador con corriente de N ₂ 4. Redisolución	n.e.	LC-MS/MS	0,002-0,010	<LC-35,3 (suburbano), <LD-10,2 (urbano), 0,221-54,7 (industrial). DBP es el mayoritario	A Coruña (España), n=8	24h-PM _{2,5} (alto volumen) Industrial, urbano y suburbano	Salgueiro-González <i>et al.</i> , 2013

^aConsumo de disolventes orgánicos por muestra; Técnica determ.: Técnica de determinación; TSP: Partículas totales en suspensión.

Tabla 22. Características de los métodos de determinación de ftalatos en PM y niveles encontrados publicados en la bibliografía (continúa).

Ftalatos	Etapas	Dis. org. (mL) ^a	Técnica determ.	LD	Niveles encontrados (ng/m ³)	Lugar y periodo de muestreo, n° muestras	Tipo de muestra	Ref.
DMP, DBP, DiBP, DEHP, DnOP	1. Extracción US (3x15 min) 2. Filtración 3. Concentración 4. Redisolución	180	GC-MS	n.e.	0,02-191,82. DEHP es el mayoritario	Taizhou (China), Jul 2006 y Ene 2007, n=26	24h-PM _{2,5} (alto volumen) Urbano	Gu et al., 2010
DMP, DEP, BBP, DBP, DEHP, DnOP, bis(2-etilhexil) adipato	1. Desorción térmica	-	GC-MS	0,023-0,822 ng	<LD-811 (invierno), <LD-1242 (verano). DBP es el mayoritario	Guangzhou (China), Invierno y verano 2012/2013, n=24	24h-PM _{2,5} (alto volumen) Urbano	Wang et al., 2016
DMP, DEP, DiBP, DBP, BBP, DHP, DCHP, DEHP, DnOP	1. Sobrecarga con deuterados y equilibrado (3h) 2. Extracción US y agitación en un orbital (3x(30+20) min) 3. Centrifugación (5 min) 4. Concentración en corriente de N ₂	12	GC-MS	0,05 (LC)	<LC-441 (PM ₁₀), <LC-154 (PM _{2,5}). DEHP, DBP y DiBP son los mayoritarios	Shanghai (China), Oct 2011-Ago 2012, n=77	24h-PM _{2,5} y PM ₁₀ (alto volumen) Área residencial suburbana	Ma et al., 2014
DMP, DEP, BBP, DBP, DEHP, DnOP	1. Extracción US (2x15 min) 2. Filtración 3. Concentración en corriente de N ₂ 4. Ajuste de volumen	20	GC-MS	0,002-0,016	<LD-191,93 (PM _{2,5}), <LD-283,13 (PM ₁₀). DEHP es el mayoritario	7 localizaciones en Tianjin (China), Ene, Abr y Jul 2010, n=150	24h-PM _{2,5} y PM ₁₀ (medio volumen) Urbano	Kong et al., 2013
DBP, BBP, DEHP, DHEP, DNP, DDP	1. Desorción térmica	-	GC-MS	n.e.	0,2-2,2 (exterior), 0,2-55 (interior). DEHP es el mayoritario	Wichita, EEUU (Otoño-Invierno 1981-1982); Lubbock, EEUU (Invierno-Primavera 1982), n=36	PM _{2,5} y PM _{2,5-15} (84h exteriores y 168h interiores) Oficinas	Weschler, 1984
DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DnOP	1. Extracción US (3x30 min) 2. Purificación por SPE 3. Evaporación 4. Redisolución	n.e.	GC-MS	n.e.	<LD-45 (tráfico), <LD-6,50 (industrial). DEHP es el mayoritario	Tesalónica (Grecia), Ene-Feb 2007, n=20	24h-PM ₁₀ (bajo volumen) Urbano (tráfico e industrial)	Salapavidou et al., 2011

^aConsumo de disolventes orgánicos por muestra; Técnica determ.: Técnica de determinación; DCHP: diciohexilftalato; DNP: dinonilftalato; DDP: didecilftalato.

Tabla 22. Características de los métodos de determinación de ftalatos en PM y niveles encontrados publicados en la bibliografía.

Ftalatos	Etapas	Dis. org. (mL) ^a	Técnica determ.	LD	Niveles encontrados (ng/m ³)	Lugar y periodo de muestreo, nº muestras	Tipo de muestra	Ref.
DMP, DEP, DBP, DiBP, DEHP	<ol style="list-style-type: none"> 1. Extracción US (3x10 min) 2. Filtración 3. Concentración 	n.e.	GC-MS	n.e.	<LD-373 (invierno), 0,04-579 (verano). DEHP es el mayoritario	Chennai (India), Ene, Feb y May 2007, n=49	PM ₁₀ (día/noche) (alto volumen)	Fu <i>et al.</i> , 2010
DMP, DEP, DiBP, DBP, BBP, DEHP	<ol style="list-style-type: none"> 1. Extracción US (3x20 min) 2. Reducción de volumen 3. Fraccionamiento en columna 4. Evaporación 5. Redisolución 	n.e.	GC-MS	n.e.	0,01-31. DEHP es el mayoritario en la mayoría de sitios (DEP, DiBP y DBP en el otro)	Mar Mediterráneo (Sur y Este), 27 Jul - 11 Ago 2013, n=40	PM ₁₀ (alto volumen)	Romagnoli <i>et al.</i> , 2016

^aConsumo de disolventes orgánicos por muestra; Técnica determ.: Técnica de determinación.

6.2. METODOLOGÍA

El sistema cromatográfico empleado y la configuración de IT-SPME, se han descrito en el capítulo 4 (apartado 4.2) y al inicio del apartado 4.3.1 (Selección de la configuración de IT-SPME), respectivamente.

Como capilar de extracción para la IT-SPME se emplea un tramo de 70 cm de la columna capilar de gases PLOT Rt[®]-S-BOND (Restek, Bellefonte, PA, EEUU), con fase divinilbenceno con 4-vinilpiridina, de 0,32 mm i.d. y 10 µm de espesor. Las jeringas empleadas son una de 5 mL completamente de vidrio (Ruthe, Portugal) para la muestra y una 100F-LC (100 µL, SGE, Melbourne, Australia) para el desplazamiento.

La columna analítica empleada es una Onyx Monolithic C₁₈ (Phenomenex, Torrance, CA, EEUU) de 100 mm de longitud y 3 mm de diámetro. Se emplea el detector de fotodiodos, recogiendo los datos entre 210 y 400 nm. La integración se lleva a cabo a 225 nm hasta los 9,5 min (hasta el DBP) y a partir de ese tiempo (desde el DAP) se integra a 223,8 nm.

Los viales empleados (descritos en el apartado 4.2) se lavan siguiendo el protocolo indicado en el apartado 5.2. Los disolventes utilizados son acetonitrilo J. T. Baker (Phillipsburg, EEUU) de grado Ultra Gradiente HPLC, metanol LC-MS PAI (Panreac, Barcelona, España), ambos filtrados a través de filtros de PTFE de 0,45 µm (Teknokroma, Barcelona, España) antes de su uso, y agua *Ultra-Resi-Analyzed* para Análisis Ambiental Inorgánico y Orgánico (J.T. Baker, Phillipsburg, EEUU), sin filtrar, para la preparación de blancos y patrones, y también como agua de desplazamiento en el capilar. Para la fase móvil se emplea agua Milli-Q.

Los reactivos comerciales utilizados para preparar las disoluciones de trabajo son la disolución EPA 606-M Phthalate Esters Mix (DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP y DnOP, 200 µg/mL en metanol; Supelco, Bellefonte, PA, EEUU), los ftalatos sólidos di-n-hexil-, di-n-heptil-, diisodecil-, mono-n-butil- y mono(2-etilhexil)ftalato (todos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU), el sólido diisononilftalato y disoluciones en acetona de di-n-propil- (100 µg/mL), diisobutil- (2500 µg/mL) y di-n-pentil- ftalato (5000 µg/mL) (Chem Service, West Chester, PA, EEUU). Todas las disoluciones se conservan a -18°C.

La trietilamina (TEA), de grado síntesis, se obtiene de Merck (Darmstadt, Alemania). El pH se ajusta a 3, aproximadamente, con ácido ortofosfórico 1M, preparado a partir del comercial al 85% (Panreac, Barcelona, España).

Para filtrar los extractos de PM, se emplean filtros de jeringa Discmic[®]-13HP (PTFE para hidrofílicos, 0,50 µm, 13 mm, Advantec MFS, Dublin, CA, EEUU), previamente lavados con 10 mL de agua Milli-Q para evitar que desprendan ftalatos a la muestra.

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la determinación de ftalatos en material particulado atmosférico, además de cuantificar el contenido total de ftalatos, también resulta de gran interés conocer su concentración en la fracción soluble en agua, debido a que se comportará de manera diferente en cuanto al reparto de los ftalatos entre los distintos compartimentos ambientales y respecto a la biodisponibilidad de estos contaminantes.

Dado que ya se poseen unas condiciones optimizadas para el análisis de ftalatos en matrices acuosas (capítulo 5), se llevan a cabo unas pruebas con extractos acuosos de PM. La extracción se lleva a cabo con las siguientes condiciones: se extraen 2 círculos de filtro ($\phi = 1,8$ y 2 cm) con 10 mL de agua Milli-Q durante 20 min en US.

Los extractos deben filtrarse antes de introducirlos en el capilar, para evitar que se obture. Teniendo en cuenta el bajo volumen de extracto, en lugar de filtrarlos como el agua de lluvia (apartado 5.3.5), a través de filtros de fibra de vidrio (que requieren el gasto de 1 L de agua Milli-Q para su lavado previo con el fin de evitar que desprendan ftalatos), se evalúa la posibilidad de emplear un procedimiento de filtración alternativo para pequeños volúmenes que haga uso de filtros de jeringa.

Se han realizado pruebas de filtración con patrones acuosos de 20 ng/mL a través de diferentes filtros (fibra de vidrio, fibra de cuarzo, PTFE hidrofílico) y filtrando distintos volúmenes (20 y 100 mL) (Tabla 23). Las pruebas se han llevado a cabo con los 6 analitos del método optimizado para agua de lluvia (DMP, DEP, BBP, DBP, DEHP y DnOP).

Los filtros de cuarzo y fibra de vidrio se lavan con 100 mL de agua Milli-Q antes del paso de la muestra para eliminar su posible contribución de fondo. En el caso del filtro de jeringa de PTFE, se ha comprobado experimentalmente que el paso de 10 mL de agua Milli-Q a través del filtro antes de filtrar la muestra es suficiente para que no aporte fondo a los blancos de procedimiento.

Tabla 23. Recuperaciones obtenidas (%) para una disolución patrón acuosa de ftalatos de 20 ng/mL (antes de añadir el modificador orgánico) tras la filtración a través de distintos tipos de filtros, y evaluación del efecto del volumen.

Naturaleza	Fibra de vidrio	Cuarzo	PTFE hidrofílico		
Volumen (mL)	100	20	20	20	20
Paso del modificador* tras el patrón	No	No	No	No	Sí
DMP	78,0	60,9	96,8	168	90,8
DEP	103	129	77,3	88,4	98,8
BBP	92,5	65,3	54,6	92,8	105
DBP	91,0	61,5	76,2	90,8	103
DEHP	83,2	72,2	46,4	37,8	105
DnOP	79,5	80,3	50,5	43,1	90,4

*Se emplea un 40% MeOH como modificador orgánico.

Las recuperaciones obtenidas para la filtración de 100 mL a través del filtro de fibra de vidrio, condiciones de referencia, se encuentran en valores aceptables. Sin embargo, para un volumen más bajo (20 mL), las recuperaciones obtenidas no son satisfactorias para ninguno de los tres filtros ensayados si no se pasa el modificador orgánico después del patrón a través del filtro.

Empleando un filtro de jeringa (más apropiado para volúmenes bajos) de PTFE hidrofílico, y filtrando solo 20 mL, se obtienen valores satisfactorios (90-105%) para la recuperación analítica de todos los compuestos si se pasa el modificador orgánico (40% MeOH) a través del filtro después del patrón acuoso, por lo que se selecciona este procedimiento para la filtración de los extractos de PM.

A continuación se lleva a cabo una comparativa entre la extracción acuosa y la orgánica para determinar qué proporción de los analitos es soluble en agua. Para ello se emplean las mismas condiciones de extracción (1 círculo de 1,8 cm + 1 círculo de 2 cm, 10 mL, 20 min en US), empleando en un caso 10 mL de agua Milli-Q y en el otro 10 mL de metanol. Este disolvente ya ha sido empleado con anterioridad para la extracción de ftalatos del material particulado [Salgueiro-González *et al.*, 2013; Jiao *et al.*, 2015] y, dado que es el modificador orgánico empleado, no supone cambios en el procedimiento de IT-SPME.

Ambas extracciones tienen recuperaciones similares para DMP (en torno al 50%), DEP (recuperación moderada, 72-74%) y DBP (buena en ambos casos, 90-92%). Sin embargo, para los otros tres analitos la extracción orgánica va mucho mejor que la acuosa, con una recuperación del 100% (Tabla 24).

La mejoría se nota en especial para DEHP y DnOP (los más hidrófobos), para los que la extracción acuosa muestra rendimientos muy pobres debido a su baja solubilidad en agua. En vista de estos resultados preliminares, parece que la extracción acuosa podría ser suficiente para determinar las concentraciones totales de los ftalatos de menor peso molecular, ofreciendo rendimientos comparables a la extracción orgánica.

Tabla 24. Recuperaciones analíticas obtenidas (%) \pm SD (n=3) para la extracción acuosa y orgánica de un filtro de PM₁₀ sobrecargado con una cantidad de ftalatos equivalente a 20 ng/mL en el extracto con modificador.

	%R	
	Extracción acuosa	Extracción orgánica
DMP	56 \pm 16	51 \pm 11
DEP	74 \pm 7	72 \pm 7
BBP	72 \pm 6	99 \pm 5
DBP	90 \pm 15	92 \pm 1*
DEHP	31 \pm 14	107 \pm 21
DnOP	28 \pm 6	103 \pm 4

*n=2

Sin embargo, debido a su elevada hidrofobicidad, la extracción acuosa de DEHP y DnOP posee unos rendimientos bajos. A pesar del interés que también tiene la caracterización de la fracción soluble, se decide continuar desarrollando el método para el extracto orgánico, teniendo en cuenta el interés de las concentraciones totales de los analitos más pesados, en especial del DEHP por su ubicuidad y probada toxicidad.

6.3.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

Durante las pruebas previas realizadas, se observan en los cromatogramas de las muestras de PM varios picos sin identificar cuyos espectros de absorción parece que podrían corresponderse a ftalatos. Teniendo en cuenta cuáles son los ftalatos más utilizados, los niveles hallados en la bibliografía y los tiempos de retención de estos picos sin identificar, se introducen en el método nuevos ftalatos hasta un total de 15, incluyendo los productos de degradación MBP y MEHP.

La separación cromatográfica de los 15 ftalatos se ha llevado a cabo con una columna monolítica C₁₈ y un gradiente binario de ACN/H₂O. Las dos grandes dificultades encontradas en esta optimización son, por un lado, la variación del comportamiento de MBP y MEHP con el pH, y por otro la separación de los dos isómeros DBP y DiBP.

Los dos monoésteres, debido a su grupo ácido carboxílico, pueden estar protonados o desprotonados según el pH, y para lograr una retención reproducible, es necesario fijar este parámetro. El pK_a del MEHP es 3,08 [Jornet-Martínez et al., 2014], mientras que para el MBP se espera un valor en torno a 3,79, calculado en función de su estructura [Keys et al., 2000]. Un pH = 3, por tanto, da lugar a las formas protonadas de ambos analitos, y es el que se ha escogido para la separación. Además, con el objetivo de mejorar la resolución de estos analitos, se añade trietilamina (TEA) a la fase móvil. La TEA es un reactivo de par iónico ampliamente utilizado en cromatografía en fase inversa, pero generalmente con pH alcalino, en la forma acetato de trietilamonio, mientras que con pH ácido se suelen emplear sulfonatos [Kumar y Sangeetha, 2013]. Sin embargo, la TEA se ha empleado en la separación a pH neutro de ácidos nucleicos [Close et al., 2016] y ácidos cloroacéticos [Prieto-Blanco et al., 2012a], y a un pH en el rango 2,3-6,7 para la separación de descarboxi-β-cianinas [Wybraniec, 2006]. A pesar de que en este caso se trabaja con las formas protonadas (y por tanto no iónicas) de los ácidos, la adición de la TEA reduce la cola de los picos cromatográficos de MBP y MEHP. Por tanto, parece claro que existe algún tipo de interacción entre la TEA y los analitos protonados y/o la fase estacionaria de la columna, que en definitiva contribuye a mejorar la resolución cromatográfica de estos picos. Se prueban tres concentraciones de TEA en la fase móvil (0,05, 0,1 y 0,15%). Entre 0,05 y 0,1% no se encuentran grandes diferencias, pero el pico del MBP da lugar a áreas algo mayores con 0,1% así que se selecciona esa concentración. Por su parte, la concentración de 0,15% aumenta la deriva de la línea base sin mejorar la forma de los picos, por lo que se descarta. Para ajustar el pH, se han probado tanto ácido fosfórico como ácido fórmico. Este último también provoca una deriva grande en la línea de base, así que se elige el ácido fosfórico, que produce menor deriva.

La dificultad en la separación de DBP y DiBP se ve incrementada por el hecho de que el BBP presenta una retención similar, por lo que los 3 compuestos eluyen en un corto espacio de tiempo. Aunque no fue posible la separación hasta línea de base manteniendo un tiempo reducido para el cromatograma, sí que se ha conseguido separar los tres analitos mediante la introducción de una etapa isocrática con un porcentaje alto de la fase acuosa con TEA (45%). Un aumento del flujo (de 0,55 a 1 mL/min) durante esta etapa no perjudica de forma significativa la separación y permite reducir el tiempo de análisis (Fig. 43).

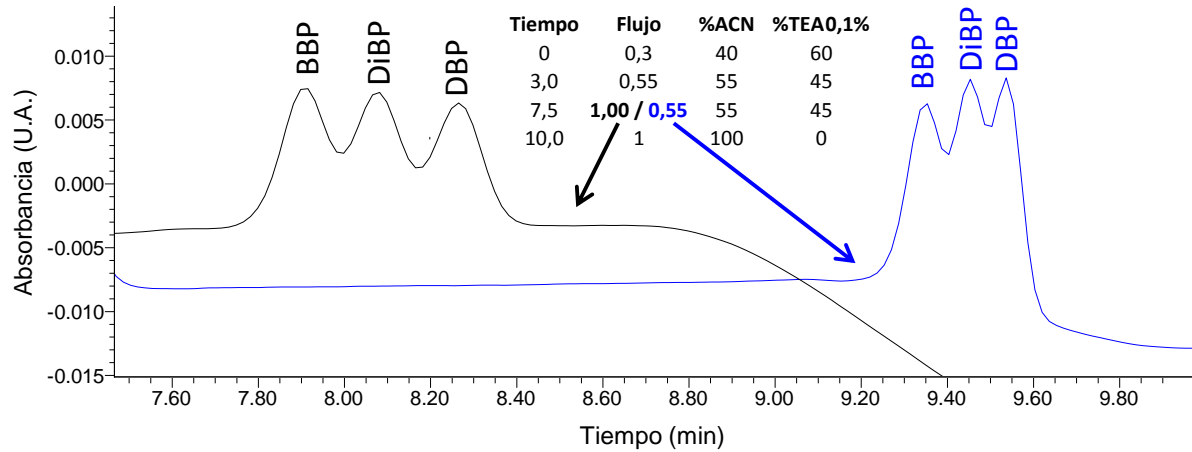


Figura 43. Efecto del flujo de la fase móvil sobre la separación de BBP, DiBP y DBP (etapa final de la optimización).

La separación de los 15 analitos se alcanza finalmente en solo 13 min. En la Figura 44 se muestra el cromatograma de una disolución patrón. Los picos correspondientes a DiNP y DiDP están más ensanchados que el resto de diésteres debido a que estos compuestos son mezcla de isómeros.

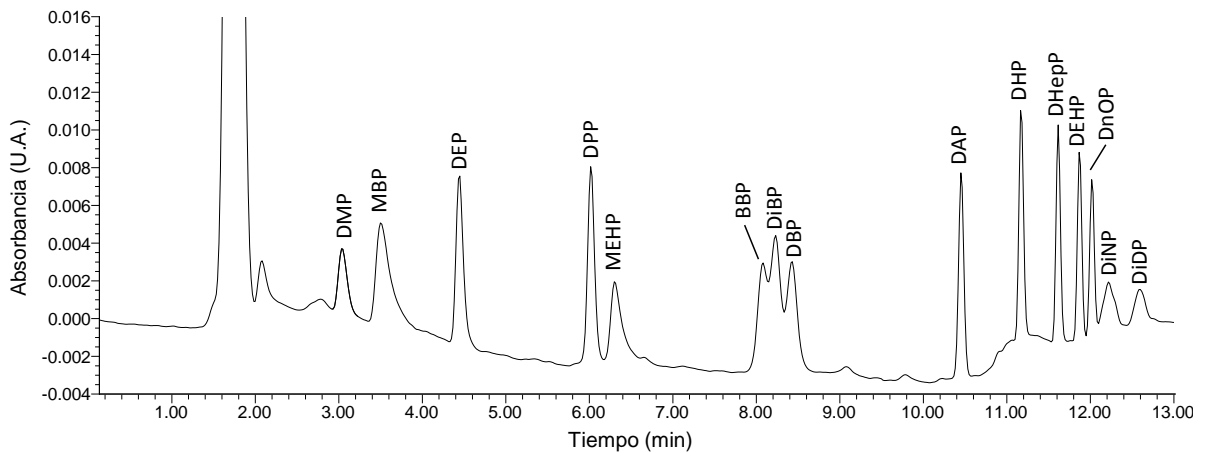


Figura 44. Cromatograma de una disolución patrón de ftalatos de 20 ng/mL con las condiciones de gradiente seleccionadas.

6.3.2. OPTIMIZACIÓN DE IT-SPME

En la optimización de la etapa IT-SPME se ha partido de las condiciones finales (capilar PLOT Rt®-S-BOND, 5 mL de mezcla agua/metanol 60:40) del método de 6 ftalatos en agua de lluvia presentado en el Capítulo 5. Esos seis analitos abarcan un amplio rango de hidrofobicidad, que incluyen los valores del resto de ftalatos determinados en este método, por lo que su comportamiento en la extracción y las condiciones de compromiso elegidas para ellos deberían poder hacerse extensivas al total de ftalatos analizados en PM.

Al realizar una extracción orgánica con metanol, el extracto estará en este disolvente y el agua actuará como modificador. Por tanto, la proporción metanol/agua 40:60 supone diluir el extracto en una proporción bastante elevada. Sin embargo, ya se ha comprobado en el Capítulo 5 que una mayor proporción de metanol perjudicaría enormemente la extracción de los compuestos más hidrofílicos, por lo que se mantiene la proporción 40:60 como compromiso para todos los analitos. La concentración en el capilar compensará la dilución previa del extracto con el modificador acuoso.

El parámetro que se ha optimizado es la composición de ese modificador acuoso. El pH debe ajustarse a 3 para protonar el MBP y el MEHP, como sucede en la separación cromatográfica. Dado que el ácido fosfórico proporciona los mejores resultados en la fase móvil, también se ha seleccionado para acidificar el modificador acuoso, y al igual que en la separación cromatográfica, se evalúa el efecto de la adición de TEA para crear interacciones tipo par iónico en la extracción. La técnica del par iónico tan solo se ha aplicado a IT-SPME en una ocasión, para el análisis de cloruro de lauralconio en aguas [Prieto-Blanco *et al.*, 2012]. El uso de TEA (pH \approx 3 ajustado con H_3PO_3) como modificador da lugar a un gran descenso en la señal de los compuestos más hidrofílicos (hasta el DAP, con pérdidas de entre el 86 y el 94% para DMP, DEP, DPP y MBP). Sin embargo, se comprueba que si se acondiciona el capilar con la disolución de TEA antes del paso de la muestra el problema se soluciona drásticamente (Fig. 45).

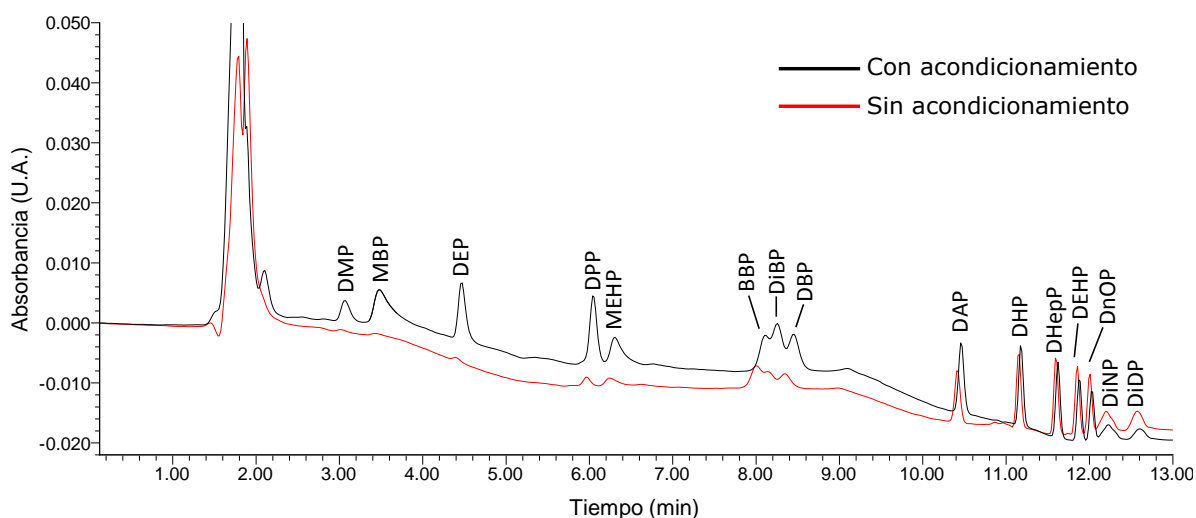


Figura 45. Efecto del acondicionamiento del capilar de extracción con TEA 0,1%, como paso previo a la introducción de la muestra.

El hecho de que el acondicionamiento afecte a la extracción implica que la TEA o el par iónico formado con el ácido quedan retenidos en el capilar, reduciendo la diferencia de polaridades entre las dos fases (dadora y extractante) y generando por tanto una mayor afinidad de la primera por la segunda.

El siguiente paso consiste en optimizar la concentración de TEA en el modificador acuoso y compararlo con el modificador formado únicamente por ácido fosfórico 1 M (Fig. 46). Las eficiencias de extracción de las tres opciones probadas como modificador son muy similares para los compuestos más hidrófobos, a partir del BBP e incluso para el MEHP. Sin embargo, los 4 analitos más hidrófilos mejoran su eficiencia de extracción cuando la TEA está presente en el modificador. Además de afectar a los monoésteres (en especial al MBP) en lo que podrían ser interacciones similares a las de par iónico, la presencia de TEA también mejora la extracción de DMP y DEP. En este caso el efecto se podría explicar con una disminución de la afinidad de ambos analitos por la fase líquida en presencia de la disolución de TEA, que favorece su paso a la fase sólida del capilar. La concentración de TEA 0,05% es la que proporciona los mejores resultados, por lo que se selecciona esta concentración para el método final.

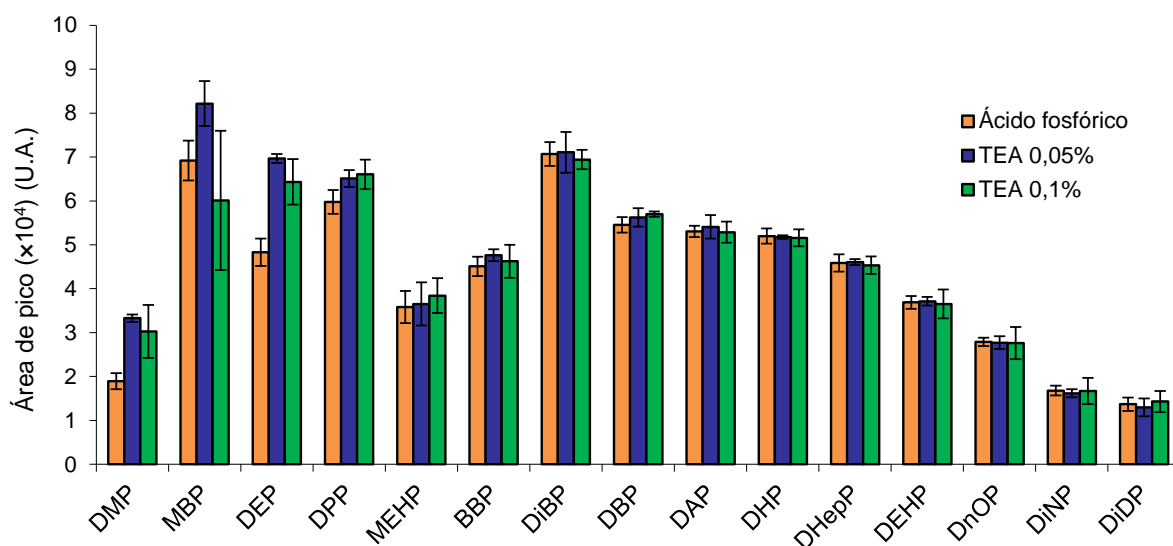


Figura 46. Efecto de la adición de TEA como modificador y de su concentración sobre la determinación de ftalatos con IT-SPME. Barras de error = \pm SD (n=2).

6.3.3. OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN ASISTIDA MEDIANTE ULTRASONIDOS (US)

En el apartado de antecedentes se ha comentado que el diclorometano suele ser el disolvente preferido para la extracción de los ftalatos del material particulado atmosférico. Sin embargo, el metanol también se ha empleado en alguna ocasión [Salgueiro-González *et al.*, 2013; Jiao *et al.*, 2015]. Este último disolvente ofrece varias ventajas: además de tener una menor toxicidad que el diclorometano, es completamente miscible con la fase móvil empleada en la cromatografía y también es el disolvente que se emplea como modificador orgánico en la IT-SPME. Por tanto, emplear metanol como disolvente de extracción evitaría cambios de disolvente. El metanol se ha utilizado como fase extractante

en las pruebas previas de extracción orgánica logrando buenas eficiencias para los compuestos más hidrófobos.

Sobre esas condiciones (área 5,7 cm² de filtro, 10 mL de metanol y 20 min de extracción asistida por US), se optimiza el volumen de metanol y el tiempo de extracción y se evalúa el efecto del pH y de la adición de TEA. En todas las pruebas se emplea un área de 5,7 cm² (un círculo de $\phi = 1,8$ cm y otro con $\phi = 2$ cm) de filtro sobrecargado con 20 ng/mL. Con esa cantidad de muestra (3,7% del área total) se deja suficiente filtro para poder llevar a cabo otros análisis sobre la muestra, lo que resulta de gran importancia en los estudios de caracterización del material particulado atmosférico.

El volumen y el tiempo de extracción se evalúan simultáneamente mediante la comparación de dos procedimientos: 10 mL de metanol y 20 min de extracción vs. 5 mL de metanol y 10 min de tiempo de extracción (Fig. 47). Con los dos procedimientos se obtienen recuperaciones similares para varios analitos, por lo que 10 min podría ser suficiente para la extracción de estos compuestos. Sin embargo, la precisión con 10 min es peor y algunos compuestos dan lugar a recuperaciones excesivamente elevadas (hasta un 130% para el DiBP). Además, la eficiencia de la extracción mejora mucho para los dos monoésteres con el procedimiento de 20 min y 10 mL, sobre todo para el MBP (más del doble). La extracción de los monoésteres no es completa, pero sí reproducible, por lo que se puede aplicar una corrección teniendo en cuenta la recuperación analítica para estos compuestos.

Respecto al efecto del volumen, parece que con 5 mL no se alcanza la saturación del disolvente, dado que la eficiencia de la extracción se mantiene para la mayoría de los analitos e incluso aumenta para algunos. Por tanto, 5 mL podría ser suficiente como volumen de extracción. Sin embargo, ese volumen cubre de forma muy justa la alícuota de filtro extraída, lo que provoca que durante la extracción, con el movimiento de la agitación por ultrasonidos, una parte del filtro pueda desplazarse y no quedar sumergida en el disolvente. Esto afectaría negativamente a la reproducibilidad, que es peor para el procedimiento con 5 mL. Por este motivo se selecciona el volumen de 10 mL para una mayor seguridad. Adicionalmente, el volumen de 10 mL hace más improbable la posible saturación del metanol en muestras particularmente concentradas.

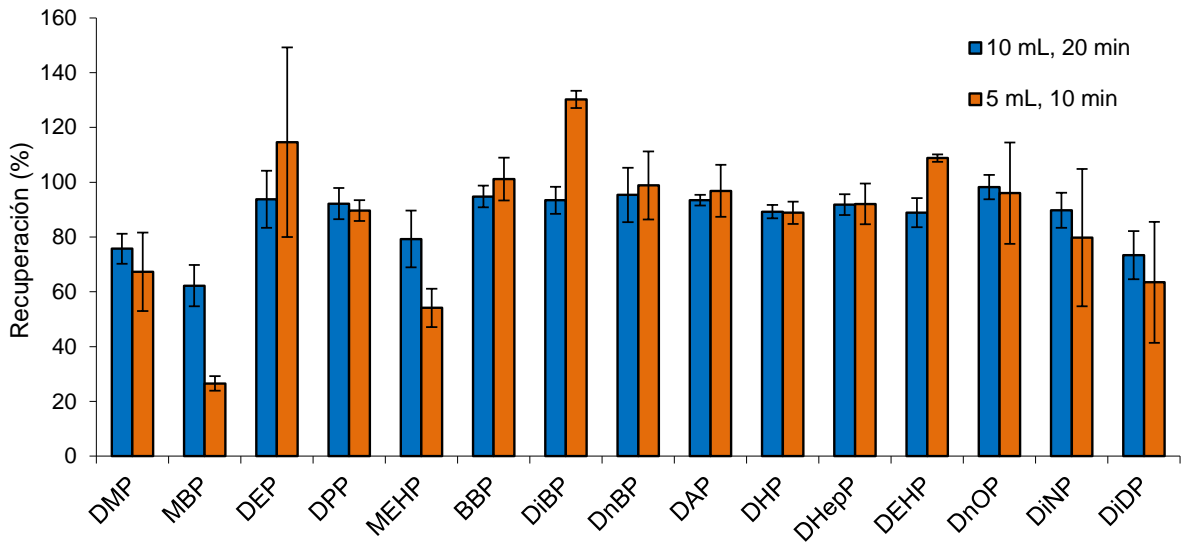


Figura 47. Efecto del volumen de disolvente y tiempo de extracción sobre la extracción US de ftalatos en PM, seguido de IT-SPME en las condiciones previamente optimizadas. Concentración ftalatos = 20 ng/mL. Barras de error = \pm SD (n=2).

Una vez fijadas las condiciones de 10 mL y 20 min, se evalúa la posibilidad de modificar el disolvente. Se prueba la extracción con metanol acidificado a $\text{pH} \approx 3$ con ácido fosfórico, para extraer las formas protonadas de MBP y MEHP, pero los resultados son comparables a los obtenidos sin ajuste del pH. Por otra parte, se prueba a añadir el modificador (fase acuosa con TEA) antes de la extracción con US, llevando a cabo la extracción con una mezcla 40:60 MeOH/TEA 0,25% (Fig. 48). La extracción de los analitos más hidrofílicos (DMP, DEP y sobre todo MBP) mejora al añadir la fase acuosa, pero por el contrario se ve reducida en los más hidrófobos (DEHP, DnOP, DiNP y DiDP), con solo un 45% de eficiencia en la extracción del DiDP. Por este motivo, se selecciona el metanol sin TEA como disolvente, al permitir alcanzar un mejor compromiso para los 15 analitos, con todas las recuperaciones por encima del 60%.

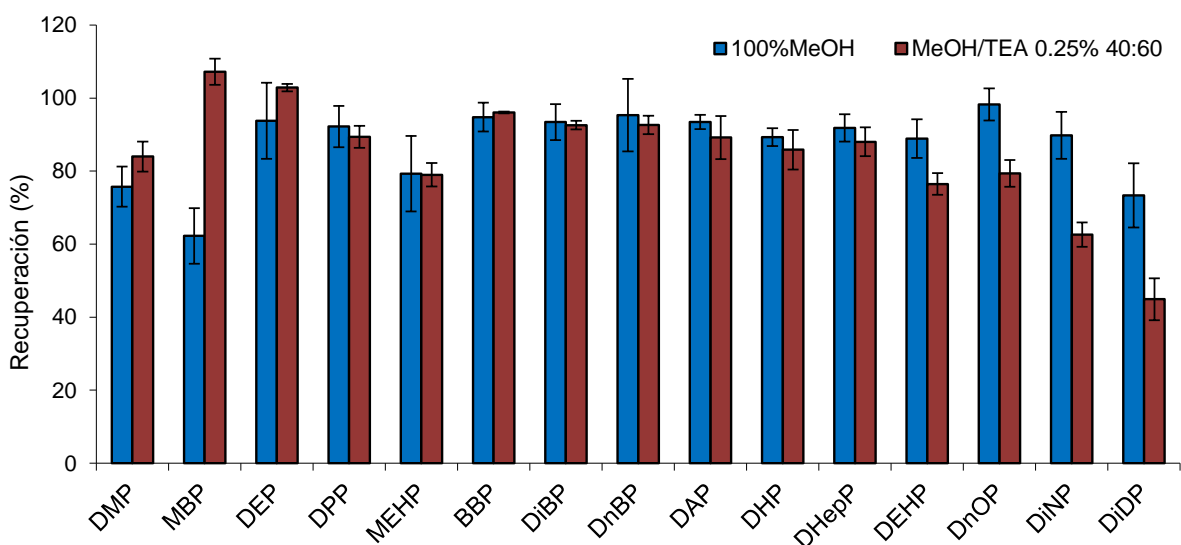


Figura 48. Efecto de la adición de TEA 0,25% sobre la extracción ultrasonidos de ftalatos en PM. Concentración ftalatos = 20 ng/mL. Barras de error = \pm SD (n=2).

A continuación, los extractos se filtran siguiendo una modificación del procedimiento optimizado previamente: se filtra el extracto acuoso a través de filtros de PTFE hidrofílico (lavados con 10 mL de agua Milli-Q) y posteriormente se pasa el modificador acuoso a través del filtro. Aunque no se han calculado las recuperaciones del paso concreto de filtración, dado que las recuperaciones globales del procedimiento son aceptables parece claro que no se pierden analitos durante el filtrado. Además, no es necesario filtrar 20 mL como en las pruebas previas para obtener buenos resultados; con el volumen justo (2 mL de extracto seguidos de 3 mL de modificador) es suficiente para que las recuperaciones sean adecuadas.

6.3.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO

El método optimizado se ha validado mediante la determinación de la linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión y recuperaciones analíticas. Se presentan los resultados obtenidos en las Tablas 25-26. Los rangos lineales llegan al menos hasta 109 ng/m³ para la mayoría de los analitos, a excepción de los diésteres más hidrofílicos (DMP, DEP y DPP), que tienen un rango algo más corto (Tabla 25). Todos los analitos tienen $R^2 > 0,995$. La precisión se evalúa mediante el análisis diario de un "control" (disolución patrón de ftalatos de 20 ng/mL). Todos los analitos presentan un coeficiente de variación inter-día inferior al 15%, con la mayoría por debajo del 8%. Los valores más altos corresponden a MBP, MEHP, DiNP y DiDP. Estos ftalatos tienen picos más ensanchados que el resto de analitos debido al grupo ácido carboxílico y su correspondiente equilibrio ácido-base en el caso de los monoésteres y al hecho de ser mezcla de isómeros en el caso de los dos compuestos de mayor peso molecular. Esto provoca que la integración de estos picos no sea tan reproducible como la de los demás, empeorando ligeramente su precisión.

Los límites de detección del método (MDL) se calculan de acuerdo al protocolo 40CFR Apéndice B a la parte 136, con un 99% de confianza [Glaser *et al.*, 1981]. Los LC se calculan como 10 veces la SD obtenida para las réplicas usadas para el cálculo del MDL. Todos los límites calculados se comprueban experimentalmente. Los MDL y LC se encuentran en los rangos 0,09-0,52 y 0,27-1,65 ng/m³ respectivamente (Tabla 25).

Los límites de detección obtenidos son superiores en general a los de los métodos publicados (veáse Tabla 22), pero es necesario tener en cuenta dos aspectos: el primero es que la mayoría de los límites publicados están calculados a partir de la relación señal/ruido, siendo límites instrumentales que no tienen en cuenta el procedimiento completo como sí hace el MDL, mucho más representativo del límite real. El segundo aspecto a considerar es que la inmensa mayoría de los métodos emplean detección con espectrometría de masas, mucho más sensible que la detección UV.

El método optimizado sí que mejora (más de 10 veces) los límites de detección de los métodos que hacen uso de UV como detección [Jiao *et al.*, 2015] e incluso el límite del DEHP del método de Li *et al.* (2014), que usa GC-MS. Por otra parte, tomando una alícuota mayor de muestra podría ser posible mejorar los límites del método propuesto, si bien sería necesario comprobar previamente cómo afecta un área más grande de filtro tanto a

la extracción US (donde podría alcanzarse la saturación) como a IT-SPME (ya que la presencia de más interferentes podría afectar en la extracción en el capilar).

Tabla 25. Parámetros analíticos del método optimizado para la determinación de 16 ftalatos: pendiente, ordenada en el origen y coeficiente de determinación de las rectas de calibrado, rango lineal, límite de detección del método (MDL), límite de cuantificación (LC) y límite para informar (RL) (todos en ng/m³). La reproducibilidad inter-día (CV) se calcula para una disolución control de 20 ng/mL en 40%MeOH/60%TEA 0,05% (n=15).

	Rectas calibrado			Rango lineal	MDL	LC	RL	CV (%)
	Pte. $\pm S_b$	o.o. $\pm S_a$	R ²					
DMP	1233 \pm 46	2816 \pm 1225	0,9945	LC-60	0,52	1,65	1,65	11,4
MBP	3830 \pm 67	-5611 \pm 2443	0,9982	LC-116	0,22	0,71	21,9	14,6
DEP	2605 \pm 86	9123 \pm 3337	0,9946	LC-73	0,33	1,05	1,05	8,0
DPP	3115 \pm 30	-173 \pm 1112	0,9994	LC-73	0,14	0,44	1,17	4,2
MEHP	2309 \pm 43	-4840 \pm 2286	0,9975	LC-137	0,20	0,65	26,9	10,2
BBP	2641 \pm 46	-2385 \pm 2427	0,9979	LC-109	0,14	0,43	0,43	5,8
DiBP	3272 \pm 32	2954 \pm 1814	0,9994	LC-109	0,28	0,89	0,89	7,0
DBP	2915 \pm 36	-759 \pm 1887	0,9989	LC-109	0,18	0,56	3,06	5,3
DAP	2738 \pm 22	-1811 \pm 1143	0,9996	LC-109	0,14	0,43	0,43	5,4
DHP	2721 \pm 31	-2289 \pm 1651	0,9991	LC-109	0,11	0,33	0,33	5,0
DHepP	2357 \pm 21	-1212 \pm 1087	0,9995	LC-109	0,14	0,43	5,39	4,6
DEHP	1873 \pm 12	225 \pm 636	0,9997	LC-109	0,18	0,56	3,00	5,1
DnOP	1431 \pm 9	640 \pm 459	0,9997	LC-109	0,09	0,27	0,27	6,3
DiNP	841 \pm 10	1152 \pm 555	0,9992	LC-109	0,51	1,62	1,62	10,9
DiDP	691 \pm 13	1425 \pm 755	0,9977	LC-148	0,40	1,27	1,27	12,7

Debido a que para los ftalatos no se recomienda restar los niveles de los blancos, se calculan los niveles para informar (*Reporting levels*, $RL = 10 \times$ Media de la concentración en el blanco) para tenerlos en cuenta [Munch *et al.*, 1995; Barnes *et al.*, 2008]. Para minimizar y controlar los blancos se han seguido los protocolos determinados para el método de ftalatos en agua de lluvia (Apartado 5.3.3). Se ha comprobado que los blancos de procedimiento (extracción US, filtración, IT-SPME y determinación) eran comparables a los correspondientes únicamente a la etapa de IT-SPME (+ determinación), por lo que estos últimos son los que se registran y controlan diariamente.

El DEHP y el DiBP son los únicos analitos que aparecen en todos los blancos analizados, aunque en el caso del DiBP la desviación estándar es mucho mayor que el propio valor medio ($0,79 \pm 1,28$ $\mu\text{g/mL}$), por lo que su concentración en los blancos se puede asimilar a cero. El DEHP presenta un valor medio de $0,33 \pm 0,10$ $\mu\text{g/mL}$ en los blancos. El DnBP ($0,34 \pm 0,31$ $\mu\text{g/mL}$) y el DiNP ($0,10 \pm 0,05$ $\mu\text{g/mL}$) también aparecen con frecuencia en los blancos, aunque los valores obtenidos están por debajo de sus respectivos LC, al igual que para DEHP y DiBP. Los RL están por debajo de 3 ng/m³ para casi todos los analitos; sin embargo, algunos compuestos con apariciones esporádicas en los blancos se presentan con áreas elevadas en las ocasiones en que están presentes, lo que aumenta considerablemente sus RL.

Los dos monoésteres son los compuestos más afectados por esta circunstancia, con RL superiores a 20 ng/m³. De todos modos, dado que su aparición en los blancos es poco frecuente (8-12%), en la mayoría de los análisis su límite real vendría dado por el LC (en ausencia del fondo que determina sus RL). Aun así, entre el LC y el RL se dará solo una estimación de la concentración, al no poder determinarse con exactitud si una parte del valor obtenido se debe en realidad a los blancos.

Evaluando la exactitud, para la gran mayoría de los analitos las recuperaciones analíticas del procedimiento completo se encuentran en valores aceptables de entre 89 y 98% (Tabla 26). Para los cuatro analitos con recuperaciones por debajo del 80% (DMP, MBP, MEHP y DiDP), teniendo en cuenta que los valores de %R son reproducibles, se corrigen las concentraciones obtenidas con la recuperación analítica. El motivo de que la extracción de estos compuestos tenga un rendimiento moderado se encuentra en las condiciones de compromiso elegidas para los 15 ftalatos, tanto en la extracción con US como en IT-SPME, que no son ideales ni para los analitos más hidrofílicos ni para los más hidrófobos.

Las recuperaciones absolutas de la etapa de IT-SPME, calculadas a 2 niveles, se encuentran en el rango habitual de la técnica, a excepción de para el DMP, debido a que las condiciones de compromiso no son muy adecuadas para este compuesto (Tabla 26). Son resultados muy similares a los que se obtuvieron con el método para agua de lluvia (Capítulo 5, Tabla 19), mejorando ligeramente las eficiencias de extracción para DMP y DEP pero reduciéndose levemente para BBP, DBP, DEHP y DnOP.

Tabla 26. Recuperaciones analíticas (%R) ± SD (n=6) para el método completo (filtro de PM sobrecargado con 0,5 µg de los analitos, correspondiente a 20 ng/mL en la etapa IT-SPME), y recuperaciones absolutas de la IT-SPME (%R abs.) ± SD (n=3).

	%R Método	%R absolutas IT-SPME		
		50 ng	100 ng	Media 2 niveles
DMP	76 ± 5*	8 ± 1	5 ± 1	7 ± 3
MBP	62 ± 8	16 ± 1	33 ± 4	25 ± 11
DEP	94 ± 10	23,5 ± 0,3	23 ± 1	23,3 ± 0,2
DPP	92 ± 6	32 ± 1	29 ± 2	30 ± 2
MEHP	79 ± 10	19 ± 2	21 ± 3	20 ± 1
BBP	95 ± 4	28 ± 2	29 ± 2	28 ± 1
DiBP	93 ± 5	42 ± 2	36 ± 2	39 ± 4
DBP	95 ± 10	37 ± 1	36 ± 2	36 ± 1
DAP	93 ± 2	34 ± 2	33 ± 2	33 ± 1
DHP	89 ± 2	32 ± 2	32 ± 2	31,8 ± 0,3
DHepP	92 ± 4	32 ± 2	31 ± 2	31 ± 1
DEHP	89 ± 5	30 ± 2	29 ± 2	29 ± 1
DnOP	98 ± 4	28 ± 2	26 ± 2	27 ± 1
DiNP	90 ± 6	22 ± 2	20 ± 3	21 ± 1
DiDP	73 ± 9	18 ± 2	16 ± 2	17 ± 1

*n=5

6.3.5. APLICACIÓN A MUESTRAS

El método optimizado se ha aplicado a 12 muestras de 5 puntos de muestreo distintos, con diferentes tipologías, todos localizados en Galicia (España). Las muestras de material particulado atmosférico analizadas se recogen sobre filtros de cuarzo ($\phi = 150$ mm, MK360 Munktell, Falun, Suecia) con captadores de alto volumen Digitel DHA-80 (Digitel Elektronik AG, Hegnau, Suiza) con cabezal para PM_{10} durante muestreos de 24 h (Fig. 49). La determinación gravimétrica se hace siguiendo la norma EN-12341:2014. Los filtros se conservan a $-18^{\circ}C$ hasta su análisis. Cinco muestras pertenecen a un área suburbana (SU, IUMA, Oleiros), dos a un área urbana (U, San Diego, A Coruña) y otras cinco a tres estaciones urbanas de tráfico: T-AC (Sanidad, A Coruña), T-SC (San Caetano, Santiago de Compostela) y T-C (Coia, Vigo). En la Figura 50 se muestran cromatogramas de una muestra de cada localización.



Figura 49. Captador de alto volumen Digitel DHA-80.

Los valores encontrados se presentan en la Tabla 27, de los 15 analitos, solo 4 se han detectado en estas muestras: DEP, DiBP, DBP y DEHP. El DiBP, con un rango de concentraciones entre 3,23 y 202,86 ng/m^3 , es el ftalato mayoritario en prácticamente todas las muestras, a excepción de las de la estación T-C (tráfico con influencia industrial) y una del área urbana (U1). En estos 3 casos, es su isómero DBP el compuesto más abundante (0,98-25,71 ng/m^3). En el área suburbana, en cambio, el DBP está por debajo del RL para 4 de las 5 muestras. En esta zona, el DEP tiene una concentración muy superior a la del DBP, y también a las encontradas para ese mismo compuesto en el resto de puntos de muestreo. En cambio, el DEP está por debajo del MDL para los tres puntos de la ciudad de A Coruña, los dos urbanos (U1-U2) y el de tráfico de esa ciudad (T-AC1). Por tanto, es posible que las características de la ciudad (ausencia de fuentes de DEP y/o vientos predominantes que no favorezcan su transporte hacia la ciudad) sean responsables de que este compuesto no supere los límites de detección en estas 3 muestras. El DEHP también es detectado con niveles bajos e inferiores al RL para 6 de las muestras. En la muestra T-SC2 no se pudo determinar este compuesto debido a la presencia de un pico interferente en el cromatograma. Dado que parece un caso puntual y la otra muestra del mismo punto de muestreo (que además es la más contaminada de entre las analizadas) no presenta este problema, no se considera preocupante sino una contaminación aislada.

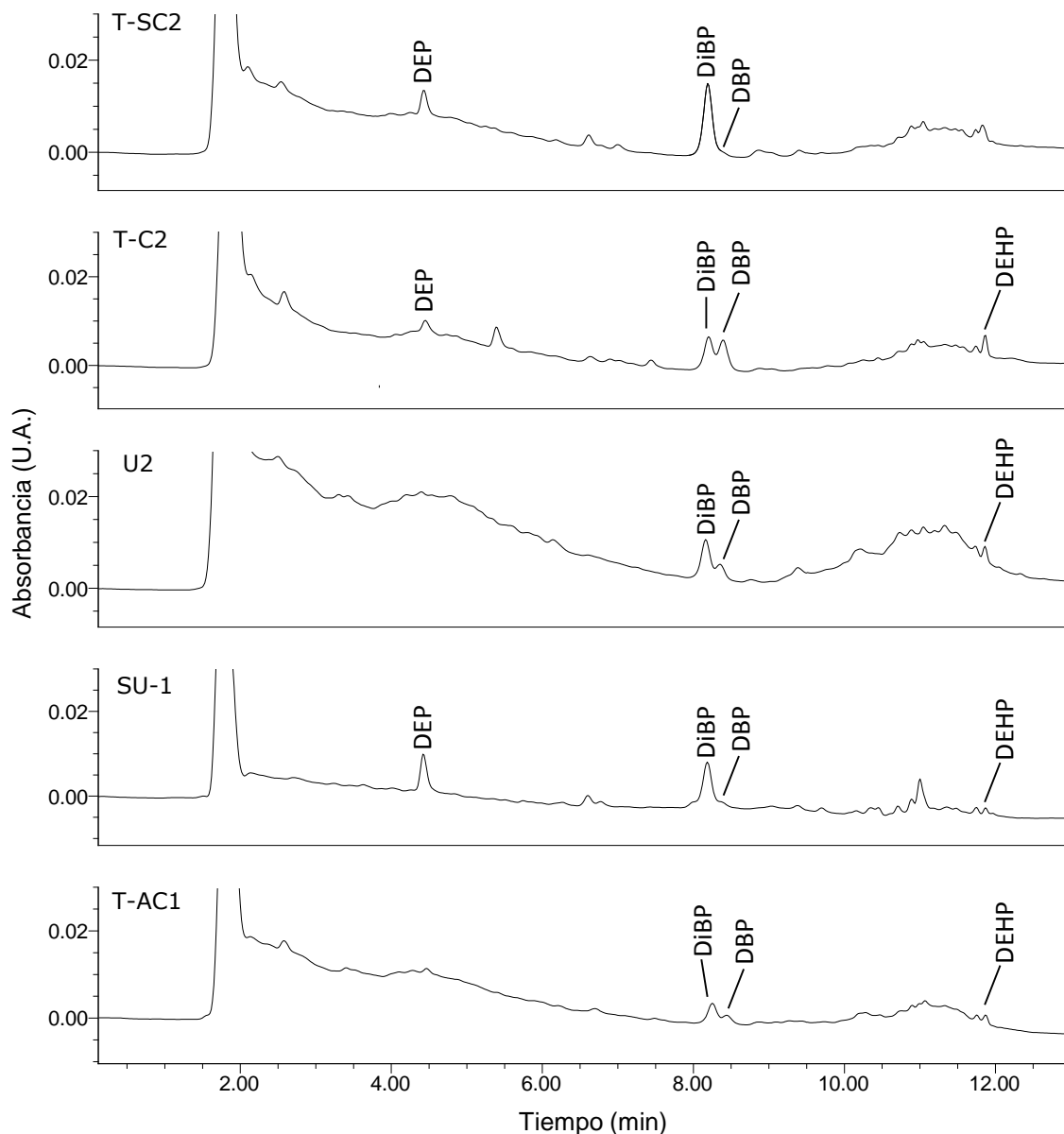


Figura 50. Cromatogramas obtenidos para muestras de los diferentes puntos de muestreo.

Los productos de degradación MBP y MEHP no se han detectado en las muestras analizadas, pero dado que se trata de un número reducido no se descarta que estos analitos puedan aparecer en el material particulado atmosférico de otras zonas y/o tipologías. La hidrólisis de DEHP a MEHP se ha observado con el compuesto adsorbido en forma de monocapa sobre polvos dispersados de algunos óxidos (Al_2O_3 , TiO_2 y Fe_2O_3) [Behnke *et al.*, 1987]. A pesar de tratarse de condiciones de laboratorio, parece plausible que esta degradación pueda producirse con el DEHP adsorbido a ciertas partículas en la atmósfera. Los monoésteres también podrían encontrarse en el PM si se adsorben a las partículas una vez se hayan formado, lo cual también es factible porque la adsorción de MEHP sobre polvo doméstico está documentada [Nakamiya *et al.*, 2005].

Tabla 27. Niveles (ng/m³) de ftalatos en las muestras de PM₁₀ analizadas.

	SU1	SU2	SU3	SU4	SU5	U1	U2	T-AC1	T-SC1	T-SC2	T-C1	T-C2
PM₁₀^a	11	15	13	10	5	42	19	25	24	16	29	25
DMP	< 0,52	< 0,52	< 0,52	< 0,52	< 0,52	< 0,52	< 0,52	< 0,52	< 0,52	< 0,52	< 0,52	< 0,52
MBP	< 0,22	< 0,22	< 0,22	< 0,22	< 0,22	< 0,22	< 0,22	< 0,22	< 0,22	< 0,22	< 0,22	< 0,22
DEP	15,81	2,42	3,54	9,31	11,42	< 0,33	< 0,33	< 0,33	2,73	7,48	< 0,33	3,43
DPP	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14
MEHP	< 0,20	< 0,20	< 0,20	< 0,20	< 0,20	< 0,20	< 0,20	< 0,20	< 0,20	< 0,20	< 0,20	< 0,20
BBP	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14
DiBP	20,44	30,56	51,55	14,11	24,93	14,72	20,57	10,11	202,86	37,50	3,23	17,42
DBP	1,89*	1,42*	3,18	0,98*	1,60*	25,71	9,17	5,37	21,69	1,48*	3,28	18,75
DAP	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14
DHP	< 0,11	< 0,11	< 0,11	< 0,11	< 0,11	< 0,11	< 0,11	< 0,11	< 0,11	< 0,11	< 0,11	< 0,11
DHepP	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14	< 0,14
DEHP	2,06*	2,65*	1,71*	1,78*	1,39*	3,95	5,17	2,84*	18,23	n.d.	7,98	7,53
DnOP	< 0,09	< 0,09	< 0,09	< 0,09	< 0,09	< 0,09	< 0,09	< 0,09	< 0,09	< 0,09	< 0,09	< 0,09
DiNP	< 0,51	< 0,51	< 0,51	< 0,51	< 0,51	< 0,51	< 0,51	< 0,51	< 0,51	< 0,51	< 0,51	< 0,51
DiDP	< 0,40	< 0,40	< 0,40	< 0,40	< 0,40	< 0,40	< 0,40	< 0,40	< 0,40	< 0,40	< 0,40	< 0,40
ΣPAEs	40,19	37,05	59,98	26,17	39,33	44,38	34,92	18,32	245,51	46,46	14,50	47,12

^aPM₁₀ in µg/m³; * Valor estimado (< RL); n.d. No determinado debido a una interferencia en el cromatograma; PAEs: Ftalatos (totales).
 SU: Área suburbana; U: Área urbana; T: Área urbana de tráfico (3 localizaciones: AC, SC y C).

Debido al pequeño número de muestras analizadas no es posible sacar conclusiones definitivas, pero sí que parece que el ftalato mayoritario es el DiBP en todas las zonas estudiadas a excepción de Coia (Vigo), en la que el isómero DBP tiene concentraciones relativas más elevadas y es el compuesto mayoritario de entre los analizados. Dado que los demás puntos de muestreo de tipo tráfico-urbano no presentan esta tendencia, parece deberse más a la localización que a la tipología del lugar de muestreo. La estación de tráfico de Coia tiene una fuerte influencia industrial que podría ser responsable de este perfil. El DEP es un compuesto bastante importante en el área suburbana analizada, con concentraciones relativamente elevadas, mientras que en la ciudad de A Coruña, tanto en la estación urbana como en la de tráfico, este compuesto se halla por debajo del MDL. El área más contaminada de entre las estudiadas parece San Caetano, la estación con mayor volumen de tráfico. La muestra con niveles más elevados (T-SC1) pertenece a este punto de muestreo. Presenta una concentración total de PAEs de 245,5 ng/m³, lo que supone un 1% de la masa total de PM₁₀ en esa muestra. Su elevada contaminación, con niveles totales de ftalatos casi 5 veces superiores a los que presenta la otra muestra del mismo punto de muestreo (T-SC2), podría deberse a la presencia de una fuente puntual (la concentración de PM₁₀ también es más elevada que en T-SC2). También podría verse influida por la temperatura, ya que la muestra T-SC1 pertenece al verano y la T-SC2 se muestreó en otoño. Las temperaturas altas favorecen la migración de ftalatos desde los materiales plásticos a la atmósfera [Fu *et al.*, 2010].

En general, en las muestras analizadas ΣPAEs (14,5-245,5 ng/m³) contribuye de media un 0,3% a la masa total de PM₁₀, variando desde 0,1% (en Sanidad, San Diego y Coia) hasta un 0,6% en San Caetano. También merece la pena mencionar que el DEHP, que es en muchas ocasiones el ftalato mayoritario en la bibliografía (Tabla 22), en las muestras analizadas presenta niveles relativamente bajos e inferiores a los de DiBP y en muchos casos también a los DBP y DEP (en el área suburbana).

6.4. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado y validado un método sencillo, rápido y asequible para determinar 15 ftalatos, incluyendo los productos de degradación MBP y MEHP, en material particulado atmosférico. El método consta de 3 etapas: una extracción asistida por US con únicamente 10 mL de metanol, una rápida filtración a través de un filtro de jeringa y la etapa de IT-SPME, acoplada *on-line* a HPLC-DAD para la determinación. Se ha logrado una separación rápida de un número elevado de ftalatos, de tal modo que separación cromatográfica se lleva a cabo en solo 13 min para los 15 compuestos.

El uso de TEA para la formación de interacciones de tipo par iónico, tanto en la etapa de IT-SPME como en la separación cromatográfica, ha mejorado la eficiencia de extracción de los compuestos más hidrofílicos y la resolución y reproducibilidad de MBP y MEHP en la cromatografía. El método evita algunas tediosas etapas frecuentes en la determinación de ftalatos en PM como la evaporación y la purificación, además de necesitar una única extracción asistida por US y lograr una separación rápida de un número más elevado de lo habitual de ftalatos. Todo esto conlleva una importante reducción tanto en tiempo como

en consumo de disolventes orgánicos frente a los métodos habituales para esta determinación. El método posee buena reproducibilidad, límites adecuados para los niveles esperados en el particulado atmosférico (MDL = 0,09-0,52 ng/m³) y buenas recuperaciones analíticas para casi todos los compuestos. Para los 4 analitos con recuperaciones relativamente bajas, los valores se pueden corregir al obtenerse recuperaciones reproducibles.

El método se aplicó a 12 muestras de diferentes tipologías (urbana, tráfico y suburbana), en las que tan solo se detectaron 4 analitos: DEP, DBP, DiBP y DEHP, siendo el DiBP el mayoritario en casi todas las muestras. En los niveles y los perfiles de los ftalatos que aparecen en cada muestra afectan más las características y entorno de la ciudad que si la muestra es urbana o de tráfico.

6.5. REFERENCIAS

- Barnes K. K., Kolpin D. W., Furlong E. T., Zaugg S. D., Meyer M. T., Barber L. B. A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - I) Groundwater. *Science of the Total Environment*, 402(2-3) (2008) 192–200.
- Behnke W., Nolting F., Zetzsch C. The atmospheric fate of di(2-ethylhexyl-)phthalate, adsorbed on various metal oxide model aerosols and on coal fly ash. *Journal of Aerosol Science*, 18(6) (1987) 849–852.
- Close E. D., Nwokeoji A. O., Milton D., Cook K., Hindocha D. M., Hook E. C., Wood H., Dickman M. J. Nucleic acid separations using superficially porous silica particles. *Journal of Chromatography A*, 1440 (2016) 135–144.
- ECPI (2015). European Council for Plasticisers and Intermediates (ECPI) estimations based on IHS published data about the use of phthalate plasticizers in Europe in 2005-2014, http://www.plasticisers.org/en_GB/plasticisers/Orthophtalates.
- Fu P. Q., Kawamura K., Pavuluri C. M., Swaminathan T., Chen J. Molecular characterization of urban organic aerosol in tropical India: Contributions of primary emissions and secondary photooxidation. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 10(6) (2010) 2663–2689.
- Glaser J. A., Foerst D. L., McKee G. D., Quave S. A., Budde W. L. 40 CFR, Part 136, Appendix B. *Environmental Science and Technology*, 15 (1981) 1426–1435.
- Gu Z., Feng J., Han W., Wu M., Fu J., Sheng G. Characteristics of organic matter in PM_{2.5} from an e-waste dismantling area in Taizhou, China. *Chemosphere*, 80(7) (2010) 800–806.
- Jiao Z., Guo Z., Zhang S., Chen H., Xie H., Zeng S. Novel Extraction for Endocrine Disruptors in Atmospheric Particulate Matter. *Analytical Letters*, 48(8) (2015) 1355–1366.
- Jornet-Martínez N., Muñoz-Ortuño M., Moliner-Martínez Y., Herráez-Hernández R., Campíns-Falcó P. On-line in-tube solid phase microextraction-capillary liquid chromatography method for monitoring degradation products of di-(2-ethylhexyl) phthalate in waters. *Journal of Chromatography A*, 1347 (2014) 157–160.

- Keys D. A., Wallace D. G., Kepler T. B., Conolly R. B. Quantitative Evaluation of Alternative Mechanisms of Blood Disposition of Di(*n*-butyl) Phthalate and Mono(*n*-butyl) Phthalate in Rats. *Toxicological Sciences*, 53 (2000) 173–184.
- Kong S., Ji Y., Liu L., Chen L., Zhao X., Wang J., Bai Z., Sun Z. Spatial and temporal variation of phthalic acid esters (PAEs) in atmospheric PM₁₀ and PM_{2.5} and the influence of ambient temperature in Tianjin, China. *Atmospheric Environment*, 74 (2013) 199–208.
- Kumar N., Sangeetha D. Separation and estimation of process related impurities and degradation products of levetiracetam in solid pharmaceutical formulation using ion-pair chromatography. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 36(13) (2013) 1835–1848.
- Li J., Wang G., Aggarwal S. G., Huang Y., Ren Y., Zhou B., Singh K., Gupta P. K., Cao J., Zhang R. Comparison of abundances, compositions and sources of elements, inorganic ions and organic compounds in atmospheric aerosols from Xi'an and New Delhi, two megacities in China and India. *Science of the Total Environment*, 476–477 (2014) 485–495.
- Ma J. Chen L.-l., Guo Y., Wu Q., Yang M., Wu M.-h., Kannan K. Phthalate diesters in Airborne PM_{2.5} and PM₁₀ in a suburban area of Shanghai: Seasonal distribution and risk assessment. *Science of the Total Environment*, 497–498 (2014) 467–474.
- Munch J., Eichelberger J., Behymer T., Budde W. *Method 525.2*. US EPA, Washington DC, EEUU, 1995.
- Nakamiya K., Takagi H., Nakayama T., Ito H., Tsuruga H., Edmonds J. S., Morita M. Microbial production and vaporization of mono-(2-ethylhexyl) phthalate from di-(2-ethylhexyl) phthalate by microorganisms inside houses. *Archives of Environmental and Occupational Health*, 60(6) (2005) 321–325.
- Norma EN-12341:2014. *Ambient air. Standard gravimetric measurement method for the determination of the PM₁₀ or PM_{2.5} mass concentration of suspended particulate matter*.
- Prieto-Blanco M. C., Alpendurada M. F., López-Mahía P., Muniategui-Lorenzo S., Prada-Rodríguez D., Machado S., Gonçalves C. Improving methodological aspects of the analysis of five regulated haloacetic acids in water samples by solid-phase extraction, ion-pair liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta*, 94 (2012a) 90–98.
- Prieto-Blanco M. C., Moliner-Martínez Y., López-Mahía P., Campíns-Falcó P. Ion-pair in-tube solid-phase microextraction and capillary liquid chromatography using a titania-based column: Application to the specific lauralkonium chloride determination in water. *Journal of Chromatography A*, 1248 (2012b) 55–59.
- Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) nº 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) nº 1488/94 de la Comisión así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión.

- Romagnoli P., Balducci C., Perilli M., Perreca E., Cecinato A. Particulate PAHs and *n*-alkanes in the air over Southern and Eastern Mediterranean Sea. *Chemosphere*, 159 (2016) 516–525.
- Salapavidou M., Samara C., Voutsas D. Endocrine disrupting compounds in the atmosphere of the urban area of Thessaloniki, Greece. *Atmospheric Environment*, 45(22) (2011) 3720–3729.
- Salgueiro-González N., De Alda M. L., Muniategui-Lorenzo S., Prada-Rodríguez D., Barceló D. Determination of 13 estrogenic endocrine disrupting compounds in atmospheric particulate matter by pressurised liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(27) (2013) 8913–8923.
- Teil M. J., Blanchard M., Chevreuil M. Atmospheric fate of phthalate esters in an urban area (Paris-France). *Science of the Total Environment*, 354(2-3) (2006) 212–223.
- Wang J., Ho S. S. H., Ma S., Cao J., Dai W., Liu S., Shen Z., Huang R., Wang G., Han Y. Characterization of PM_{2.5} in Guangzhou, China: Uses of organic markers for supporting source apportionment. *Science of the Total Environment*, 550 (2016) 961–971.
- Wang W., Zhang Y., Wang S., Fan C. Q., Xu H. Distributions of phthalic esters carried by total suspended particulates in Nanjing, China. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184(11) (2012) 6789–6798.
- Wang P., Wang S. L., Fan C. Q. Atmospheric distribution of particulate- and gas-phase phthalic esters (PAEs) in a Metropolitan City, Nanjing, East China. *Chemosphere*, 72(10) (2008) 1567–1572.
- Wang G., Kawamura K., Lee S., Ho K., Cao J. Molecular, seasonal and spatial distributions of organic aerosols from fourteen Chinese cities. *Environmental Science and Technology*, 40(15) (2006) 4619–4625.
- Weschler C. J. Indoor-outdoor Relationships for Nonpolar Organic Constituents of Aerosol Particles. *Environmental Science and Technology*, 18(9) (1984) 648–652.
- Wybraniec S. Effect of tetraalkylammonium salts on retention of betacyanins and decarboxylated betacyanins in ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1127 (2006) 70–75.
- Xie Z., Ebinghaus R., Temme C., Lohmann R., Caba A., Ruck W. Occurrence and air-sea exchange of phthalates in the arctic. *Environmental Science and Technology*, 41(13) (2007) 4555–4560.
- Xie Z., Selzer J., Ebinghaus R., Caba A., Ruck W. Development and validation of a method for the determination of trace alkylphenols and phthalates in the atmosphere. *Analytica Chimica Acta*, 565(2) (2006) 198–207.
- Xie Z., Ebinghaus R., Temme C., Caba A., Ruck W. Atmospheric concentrations and air-sea exchanges of phthalates in the North Sea (German Bight). *Atmospheric Environment*, 39(18) (2005) 3209–3219.

**CAPÍTULO 7. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN Y DERIVATIZACIÓN
DE AMINAS ALIFÁTICAS**

7.1. ANTECEDENTES DE LA DETERMINACIÓN DE AMINAS EN MATRICES ATMOSFÉRICAS Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En este capítulo se presenta la optimización de la separación de los derivados de 5 aminas alifáticas y de la propia derivatización en el interior del capilar.

Las aminas alifáticas de bajo peso molecular, con entre 1 y 6 átomos de carbono (metilamina (MA), dimetilamina (DMA), trimetilamina (TMA), etilamina (EA), dietilamina (DEA), trietilamina (TEA), 1-propilamina y 1-butilamina), son mayoritarias en la atmósfera, como se ha comentado en el capítulo de Introducción. Su eliminación de este compartimento ambiental se produce fundamentalmente por deposición húmeda, debido a su elevada presión de vapor. Por ello, aminas como MA, DMA, TMA, DEA, EA y etanolamina (EtA), así como algunos aminoácidos, se han ubicado en agua de lluvia en distintas ocasiones [Ge *et al.*, 2011; Gibb *et al.*, 1999; Grönberg *et al.*, 1992; Gorzelska y Galloway, 1990; Van Neste *et al.*, 1987; Mopper y Zika, 1987]. También se han identificado en niebla y nieve. Los niveles habituales de aminas alifáticas en agua de lluvia están alrededor de $<0,002-2,7 \mu\text{mol N/L}$ [Cornell *et al.*, 2003].

A pesar de que las aminas alifáticas de cadena corta, por su elevada presión de vapor, no tienen tanta tendencia como otros compuestos a adsorberse al material particulado atmosférico, en la bibliografía consultada se encuentran entre las aminas que se han identificado en esta matriz con más frecuencia y en mayores niveles de concentración. Esto se debe a su abundancia general en la atmósfera, debido a que son emitidas por una gran cantidad de fuentes tanto antropogénicas como naturales. La presencia de aminas alifáticas de cadena corta en el particulado atmosférico se ve incrementada cuando existe una gran influencia oceánica entre las fuentes del PM, debido a que el aerosol marino es una de las fuentes más importantes de compuestos como la metilamina, la dimetilamina, la trimetilamina, la etilamina, la dietilamina y la etanolamina [Ge *et al.*, 2011].

Respecto al número de estudios con valores publicados de aminas en material particulado atmosférico, es bastante limitado. Hay que tener en cuenta que en algunos trabajos tan solo se lleva a cabo una identificación de compuestos, generalmente mediante espectrometría de masas. De entre los que sí aportan valores de concentración, DMA, DEA y MA son las que suelen aparecer en mayor concentración (hasta 570, 320 y 180 ng/m^3 respectivamente), mientras que la EA y EtA tienen niveles más moderados (1,3-20,9 y 0,3-14,4 ng/m^3 respectivamente) [Ge *et al.*, 2011]. También se han identificado algunas aminas aromáticas y cíclicas como la piperazina, que puede ser mayoritaria en algunos lugares (Zonguldak, Turquía, con una contaminación muy elevada) [Akyüz, 2008]. La concentración total de aminas es difícil de estimar, al determinarse un número distinto de compuestos en cada trabajo, pero puede llegar a niveles del orden de $\mu\text{g/m}^3$, contribuyendo hasta un 11% a la fracción orgánica del PM [Liu *et al.*, 2009].

Para la determinación de aminas en material particulado atmosférico se emplean diferentes procedimientos. Así, el muestreo se puede realizar con filtros, membranas o impactadores. Las etapas posteriores del tratamiento de muestra suelen incluir, además

de la extracción, etapas de preconcentración y derivatización. La determinación final se lleva a cabo generalmente con cromatografía de gases o líquidos, aunque también hay algunos métodos que hacen uso de otras técnicas como la cromatografía de fluidos supercríticos, la cromatografía iónica, la electroforesis capilar e incluso determinaciones directas mediante algunas espectrometrías (distintos tipos de espectrometría de masas, espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier) o sensores (narices electrónicas o *e-noses*) [Szulejko y Kim, 2014].

En cromatografía de gases, las aminas se derivatizan para mejorar la resolución formando derivados menos polares y por tanto más adecuados para este tipo de cromatografía. Por su parte, en cromatografía de líquidos la derivatización suele estar más relacionada con la detección de los compuestos, mejorando la eficiencia de la ionización cuando se usa detección por espectrometría de masas o permitiendo el uso de detectores de UV y fluorescencia. Las aminas alifáticas no absorben en la región del ultravioleta ni presentan fluorescencia, por lo que es habitual derivatizarlas para poder emplear esos detectores en su determinación. Existen varios agentes derivatizantes muy utilizados para este fin, entre los que se encuentran el cloruro de dansilo (DNSCI) [Preti *et al.*, 2016], el *o*-ftalaldehído (OPA) [Hanczko *et al.*, 2007], el 1-naftil isotiocianato (NITC) [Claeson *et al.*, 2004], el 1,2-naftoquinona-4-sulfonato (NQS) [García-Villar *et al.*, 2006] y los cloroformiatos [Szulejko y Kim, 2014], entre los que destaca el cloruro de 9-fluorenilmetoxicarbonilo (FMOc) [Iqbal *et al.*, 2014; Herráez-Hernández *et al.*, 2006]. Este último agente derivatizante es uno de los más utilizados debido a su versatilidad (tiene capacidad para derivatizar aminas primarias, secundarias y terciarias y es válido tanto para detección por UV como por fluorescencia) y también a la rápida cinética de su reacción, al menos con aminas primarias y secundarias [Szulejko y Kim, 2014; Iqbal *et al.*, 2014].

El uso de la derivatización combinada con IT-SPME (*off-line* u *on-line*) ha sido escaso, posiblemente debido a la complejidad de la optimización (véase capítulo 3). Algunos trabajos fruto de la colaboración del grupo de investigación de Miniaturización y métodos totales (MINTOTA) de la Universitat de València y del grupo QANAP (UDC) han probado con éxito la derivatización combinada con IT-SPME para aminas alifáticas y compuestos carbonílicos [Prieto-Blanco *et al.*, 2008; 2009; 2011]. En los estudios que usan la configuración "en válvula" con inyección manual para la determinación de compuestos carbonílicos y algunas aminas como etilendiamina, la mejor opción fue la derivatización en disolución (*off-line*) y la extracción de los derivados mediante IT-SPME. En cambio, se consiguió una derivatización y extracción simultánea de la dimetilamina usando IT-SPME en modo ciclos, aunque en un método en el que la concentración de DMA en la matriz no exigía límites de detección muy bajos (50 ng/mL).

El objetivo de este capítulo es evaluar la posibilidad de llevar a cabo la derivatización de cinco aminas alifáticas mediante la combinación de derivatización usando FMOc con IT-SPME en modo válvula con la suficiente sensibilidad para una futura aplicación en matrices atmosféricas (material particulado y agua de lluvia).

7.2. METODOLOGÍA

El sistema cromatográfico empleado en la optimización, así como los disolventes, el material utilizado y su protocolo de lavado, han sido descritas en el capítulo 4 (apartado 4.2). Se emplea el detector de fotodiodos, recogiendo datos entre 210 y 400 nm. La integración se realiza a 265 nm. La columna analítica es una Onyx Monolithic C₁₈ (Phenomenex, Torrance, CA, EEUU) de 100 mm de longitud y 3 mm de diámetro.

Las pruebas con el detector de fluorescencia en este método se han llevado a cabo en un equipo Waters Alliance e2695 con detectores 2998 PDA Detector y 2475 FLR Detector en serie y el software Empower 3.0.

La configuración de IT-SPME se describe al inicio del apartado 4.3.1 (Selección de la configuración de IT-SPME). Se han probado como capilares de extracción el PLOT Rt[®]-S-BOND (Restek, Bellefonte, PA, USA) y el DB-FFAP (Agilent J&W, Santa Clara, CA, EEUU). La jeringa empleada es una 100F-LC (100 µL, SGE, Melbourne, Australia).

Las disoluciones patrón se han preparado a partir de una disolución de metilamina (40% en agua) y de los clorhidruros de dimetilamina (99%), trimetilamina (grado material de referencia analítica), etilamina (98%), dietilamina (99%) y etanolamina (≥99%), todos ellos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU).

El FMOC 1 mM en acetonitrilo se prepara cada 2 días a partir de una disolución 10 mM que a su vez se prepara tras disolver FMOC sólido (Merck, Darmstadt, Alemania) en acetonitrilo. El tampón borato se prepara disolviendo ácido bórico (99,99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) en agua y ajustando el pH con NaOH 0,5 M (preparada a partir de NaOH 99,999%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU).

7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.3.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN DE LOS DERIVADOS DE AMINAS ALIFÁTICAS

Las aminas seleccionadas son aminas alifáticas de cadena corta, de entre las mayoritarias en matrices atmosféricas: metilamina, dimetilamina, etilamina, dietilamina y etanolamina. Se valoró la introducción de la trimetilamina (TMA) como analito, aprovechando que el FMOC también es capaz de derivatizarla. Sin embargo, debido al grupo amino terciario presente en esta molécula, sus condiciones de derivatización son muy diferentes a las del resto, incluyendo entre otras cosas un tiempo de reacción significativamente más largo. Por este motivo se descartó la TMA en el método final.

Para llevar a cabo la optimización de la separación, se derivatizan previamente las aminas siguiendo las condiciones optimizadas con anterioridad en el grupo de investigación para la DMA [Prieto-Blanco *et al.*, 2008]: 300 µL borato 0,05 M pH = 11,5 + 600 µL FMOC 1 mM + 300 µL Mix aminas 4 µg/mL. Posteriormente se realiza la inyección directa de 20 µL de los derivados sin la válvula de IT-SPME acoplada.

La separación de los 5 derivados finalmente seleccionados se lleva a cabo con una columna monolítica C₁₈ y un gradiente de ACN/H₂O. Uno de los problemas en la derivatización con FMOC es la formación de múltiples subproductos que pueden interferir

en la separación. Uno de ellos, al estar presente el agua en el medio, es el FMOC-OH, compuesto relativamente polar que por tanto se espera que eluya pronto, en el tramo de los derivados de las aminas objeto de estudio. Su tiempo de retención está entre los de los derivados de la EtA y de la MA. Debido a que se trabaja con un gran exceso de FMOC para favorecer la cinética de la reacción, este pico del FMOC-OH es mucho mayor que el de los derivados de las aminas que le rodean. Cuando este efecto se combina con el típico ensanchamiento de picos que se produce al acoplar el sistema *in-tube* (provocado por la desorción de los analitos del interior del capilar), el resultado es que una separación eficiente en inyección directa pierde resolución cuando los derivados pasan a través del capilar.

Por otro lado, en la detección por UV aparece otra dificultad: la presencia de un pico producido por una impureza con un tiempo de retención muy similar al del derivado de la DEA. A pesar de que con la detección por fluorescencia esta impureza no supondría ningún obstáculo, ya que no presenta fluorescencia, se ha intentado separarla (al menos parcialmente) del analito con el objetivo de ampliar la aplicabilidad del método y poder utilizarlo en equipos con detección UV, siempre que esto no supusiera aumentar de forma significativa el tiempo de separación. Su espectro de absorción es muy diferente al del compuesto de interés, lo que permite distinguirlos.

Para optimizar la separación, en primer lugar se ajusta la proporción inicial de ambas fases y la rampa de aumento de concentración de acetonitrilo. Un 55% de agua inicial fue suficiente para lograr una buena separación. Para separar el derivado de la DEA de la impureza, se introdujo una etapa inicial (primer minuto) con una rampa poco pronunciada, que proporciona mejores resultados que aumentar la proporción inicial de agua. A continuación se aplica una rampa moderada (hasta el 70% ACN en el minuto 4,5) hasta que salgan todos los picos de interés. Por último, antes de volver a condiciones iniciales es necesario eluir un último pico (otro subproducto). Para acortar al máximo el tiempo del cromatograma, se aumenta el porcentaje de acetonitrilo al 100% hasta que salga este último pico. El gradiente final se presenta en la Tabla 28.

Tabla 28. Gradiente optimizado para la separación de 5 derivados de aminas. La temperatura de columna es $30 \pm 5^\circ\text{C}$.

Tiempo	Flujo	%ACN	%H ₂ O
0	0,5	45	55
1	0,7	55	45
4,5	1	70	30
6	1	100	0
11	0.5	45	55

El derivado de la etanolamina, por la elevada polaridad que le confiere el grupo hidroxilo, eluye en primer lugar, antes incluso que el FMOC-OH. En la cola de éste aparece el derivado de la MA, seguido por los derivados de EA y DMA, que se separan hasta línea de base. Como se puede observar en la Figura 51a, la separación entre el derivado de la DEA (último derivado que eluye) y la impureza no es hasta línea de base (como se ha

comentado, no afectaría en fluorescencia), mientras que al acoplar el capilar la separación entre el FMOC-OH y el derivado de la MA tampoco llega a línea de base (Fig. 51b) por los motivos antes expuestos. En 5 minutos salen los derivados de las 5 aminas, aunque el tiempo final del cromatograma son 7,5 min para eluir el último subproducto del FMOC.

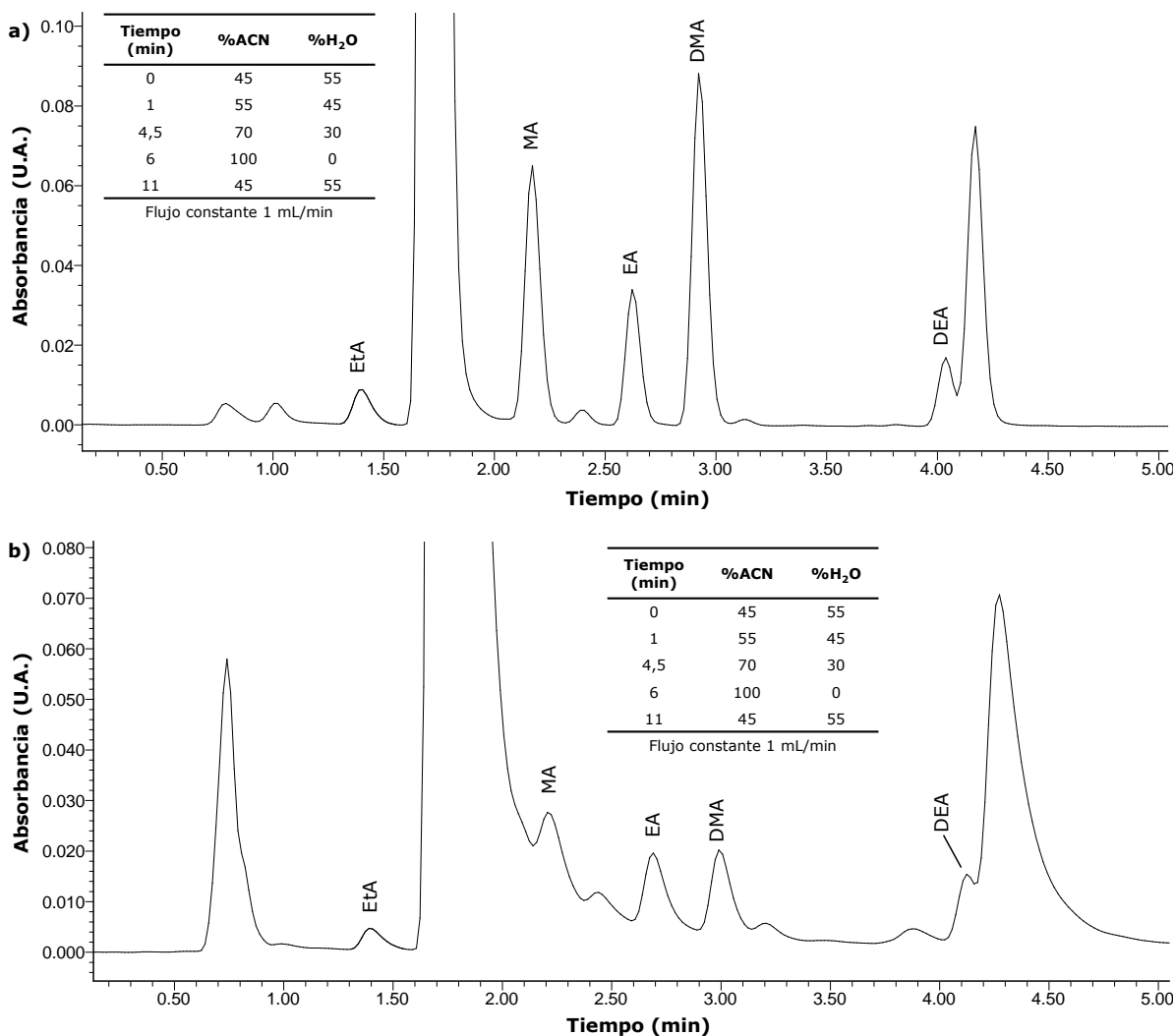


Figura 51. Cromatograma de una disolución patrón de las 5 aminas de interés derivatizadas *off-line* con el gradiente a flujo constante. a) Inyección directa de 20 µL; b) Inyección de 2 mL + 60 µL agua por IT-SPME. Condiciones derivatización: 1125 µL borato 0,05 M pH = 11,5 + 2250 µL FMOC 1 mM + 1125 µL Mix aminas (600 ng/mL en IT-SPME y 4 µg/mL en inyección directa).

Con objeto de reducir la presión inicial del sistema y asegurar con ello una mayor robustez en el acoplamiento *on-line* de la válvula de IT-SPME, se lleva a cabo un ajuste final del gradiente incluyendo un gradiente de flujo, que además disminuye ligeramente el consumo de disolventes durante la separación cromatográfica. Con esta nueva modificación, se reduce la presión del sistema manteniendo el tiempo total del cromatograma y sin afectar significativamente a la resolución (Fig. 52).

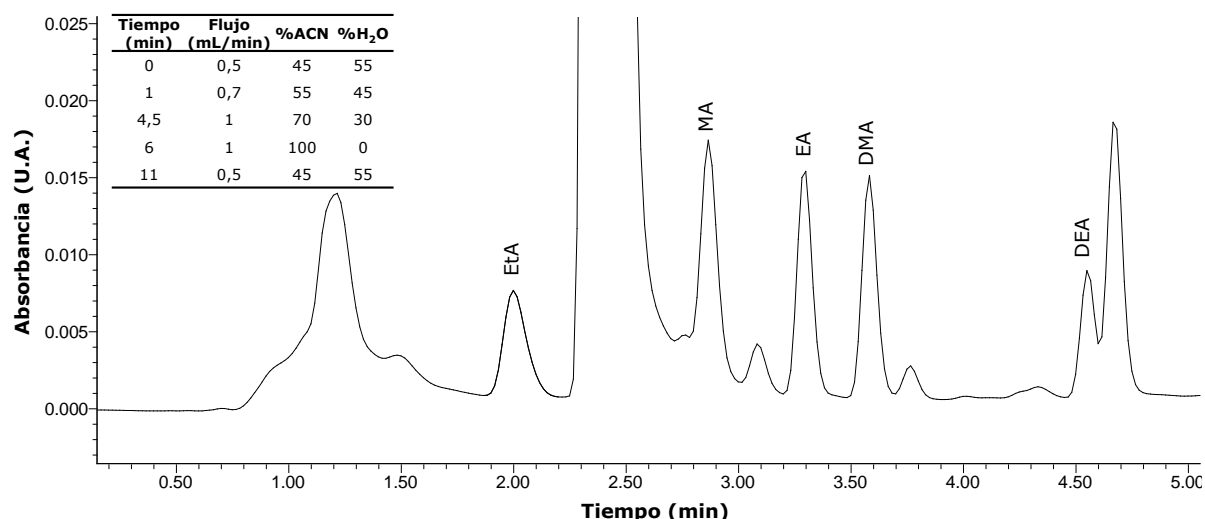


Figura 52. Cromatograma de la inyección directa de 20 μ L una disolución patrón de las 5 aminas de interés derivatizadas *off-line* con el gradiente final a flujo variable. Condiciones derivatización: 300 μ L borato 0,16 M pH = 11,5 + 600 μ L FMOC 1 mM + 300 μ L Mix 600 ng/mL.

7.3.2. OPTIMIZACIÓN DE LA DERIVATIZACIÓN DE LAS AMINAS

Al trabajar con derivatización en IT-SPME, existen dos posibilidades. La primera es realizar la derivatización *off-line*, previamente, y extraer los derivados ya formados en el capilar del mismo modo que se hace con los analitos que no requieren derivatización, tal como sucedía en los capítulos anteriores. La otra posibilidad es llevar a cabo esta derivatización en el interior del capilar, lo que a su vez puede producirse de dos maneras: o bien se extraen los analitos y se derivatizan pasando el agente derivatizante después, o bien se extrae el agente derivatizante primero y al pasar posteriormente los analitos a través del capilar éstos se derivatizan y extraen simultáneamente.

Para la derivatización de las aminas se parte de nuevo de las condiciones previamente optimizadas por Prieto-Blanco *et al.* (2008) para la DMA. Ese método, además de estar optimizado para otro tipo de matrices (tensioactivos) y para concentraciones más elevadas de la amina, hace uso del modo de ciclos en el capilar, un modo que no se puede utilizar en el equipo empleado en este caso. Además, el capilar empleado es diferente tanto en la fase estacionaria (en el método de partida se trataba de una fase poco polar, mientras que en esta optimización se prueban fases de polaridad intermedia y alta) como en su estructura (FSOT en el trabajo de referencia frente a un capilar de capa porosa PLOT).

Por estos motivos, y debido a la inclusión de un mayor número de aminas, a partir de esas condiciones se han optimizado diversos parámetros relacionados con el agente derivatizante (concentración, volumen, medio), el tampón (pH y concentración), el acondicionamiento del capilar, el desplazamiento de la muestra antes de la desorción dinámica o el volumen pasado a través del capilar.

Además, se han probado tres opciones:

- Extraer primero las aminas y derivatizarlas después.
- Extraer primero el agente derivatizante y a continuación realizar el paso de la muestra, para que se produzca la extracción y derivatización simultánea de las aminas.
- Realizar la extracción en el capilar de los derivados formados *off-line*.

Se realizaron las pruebas con dos capilares de distinta naturaleza: un capilar PLOT de polaridad intermedia y un capilar FSOT de alta polaridad (DB-FFAP).

Para llevar a cabo la derivatización en el capilar, es necesario pasar los diferentes reactivos de forma secuencial, por lo que se hacen "ciclos" manuales, llenando el capilar consecutivamente con cada reactivo.

En primer lugar se determina qué orden de paso de los reactivos a través del capilar proporciona los mejores resultados. Se prueban tres opciones, siempre pasando el tampón borato antes que el agente derivatizante (ya que además de establecer el pH adecuado para la reacción, reduce la hidrólisis del FMOC): la extracción del FMOC seguida de la extracción/derivatización de las aminas (orden borato-FMOC-muestra, BFM) y la extracción de las aminas seguida de derivatización, tanto acondicionando con el borato antes de pasar las aminas (orden borato-muestra-FMOC, BMF) como pasando la muestra en primer lugar (orden muestra-borato-FMOC, MBF).

En la Figura 53 se puede observar cómo la mejor opción es claramente extraer el FMOC en primer lugar para la posterior extracción/derivatización de las aminas, tanto con el capilar PLOT (a) como con el DB-FFAP (b). Las áreas obtenidas con las dos alternativas en las que se extraen primero las aminas son muy similares a las de sus correspondientes blancos. Resulta algo sorprendente que el capilar DB-FFAP, de alta polaridad, no sea capaz de extraer de forma relativamente eficaz las aminas. Se realiza una prueba con una concentración elevada de aminas (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y el orden muestra-borato-FMOC. Para esta concentración se hallan unas recuperaciones absolutas de entre el 12 y el 15% para las 5 aminas en el capilar DB-FFAP, mientras que para 0,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estos valores eran prácticamente cero. Estos resultados permiten concluir que el problema con la extracción de las aminas previa a la derivatización se debe a su baja eficiencia, derivada de que la capacidad de extracción de las aminas por parte de ambos capilares sea muy baja o de que los analitos extraídos no reaccionen de forma efectiva con el FMOC posteriormente.

Los límites de detección, aunque no se han calculado, parece que tienden a valores elevados que no permiten la aplicación de este procedimiento (extrayendo las aminas antes de la derivatización) en muestras atmosféricas, al esperarse niveles más bajos en éstas. Así pues, se selecciona el orden borato-FMOC-muestra. Como se observa en la Figura 53, el capilar PLOT da lugar a mejores resultados que el DB-FFAP, especialmente para las aminas primarias, así que se elige como capilar de extracción.

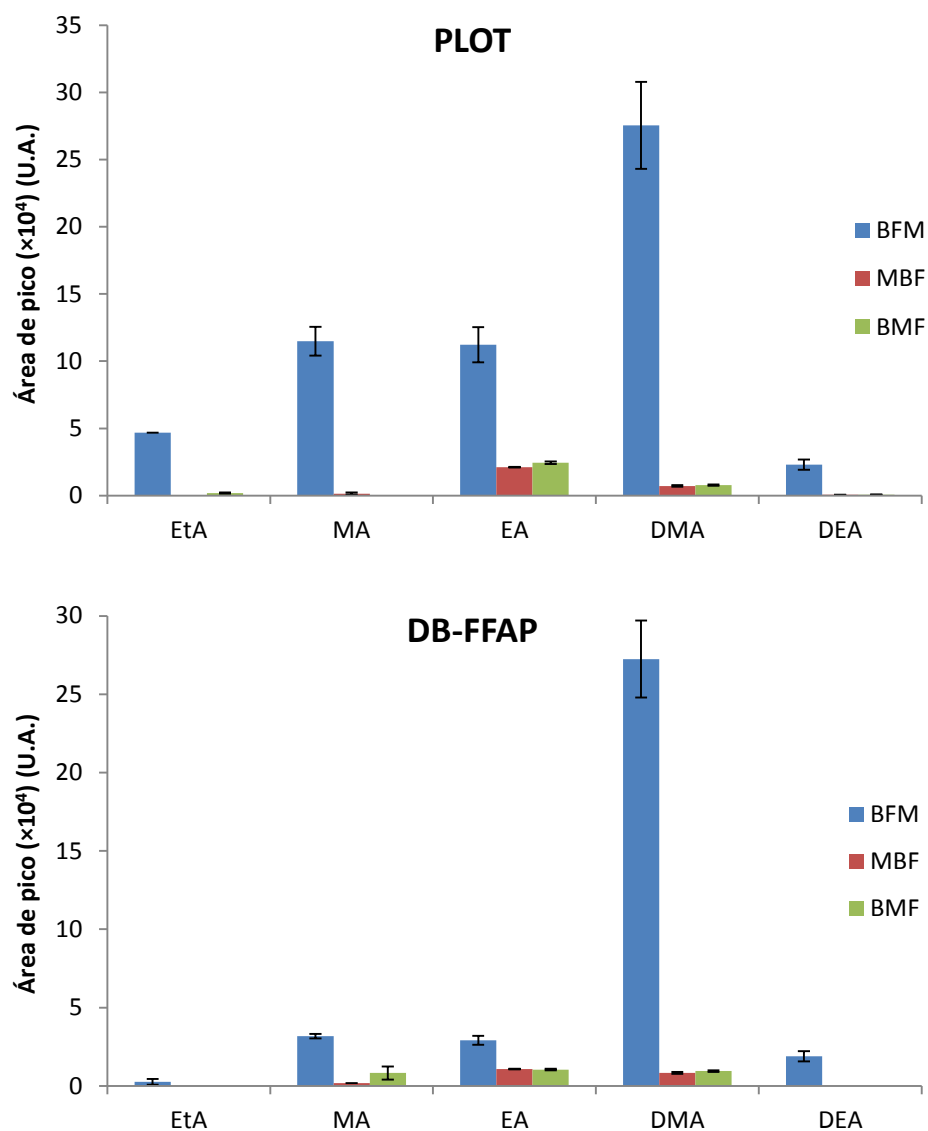


Figura 53. Efecto del orden de los reactivos en la derivatización de las aminas en el interior del capilar para (a) el capilar PLOT y (b) el capilar DB-FFAP. Concentración de aminas 600 ng/mL (1 ciclo de aminas, 1 ciclo de borato y 2 ciclos de FMOC 1 mM en cada caso, en el orden indicado). Barras de error = \pm SD (n=2).

A partir de esas condiciones se optimiza el tiempo de derivatización en el capilar, el volumen de acetonitrilo de acondicionamiento, la concentración y pH del tampón borato, el disolvente de desplazamiento y varias características relacionadas con el FMOC.

Respecto al tiempo de reacción, no se encuentran diferencias significativas entre mantener la disolución de aminas 5 min en el capilar o pasar el agua de desplazamiento inmediatamente después de la muestra (Fig. 54), por lo que se determina que no es necesario esperar varios minutos para que la reacción se produzca de forma reproducible.

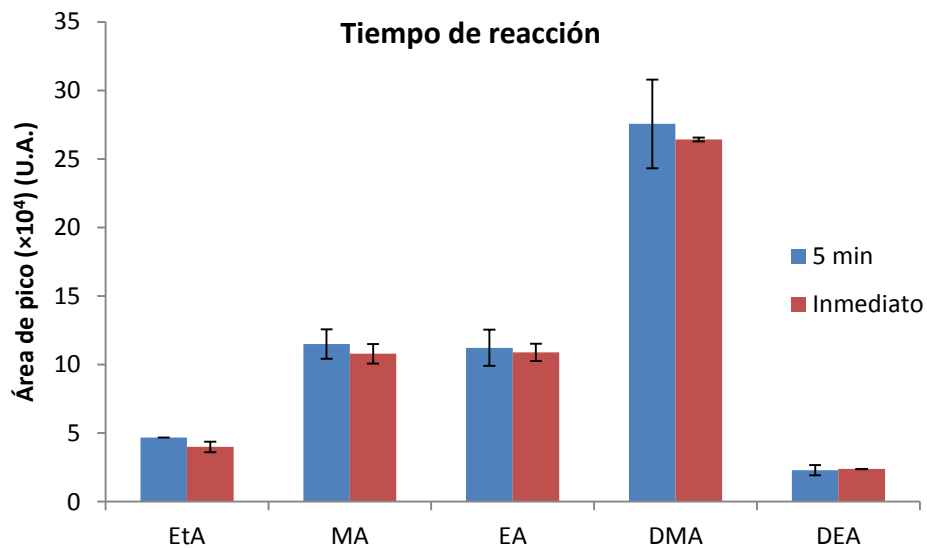


Figura 54. Efecto del tiempo de reacción en el capilar en la optimización de la derivatización de las aminas en el interior del capilar. Barras de error = \pm SD (n=2).

Tampoco se encuentran diferencias significativas al quintuplicar el volumen de acetonitrilo usado en el acondicionamiento del capilar (Fig. 55), por lo que decide que con un ciclo (60 μ L) es suficiente.

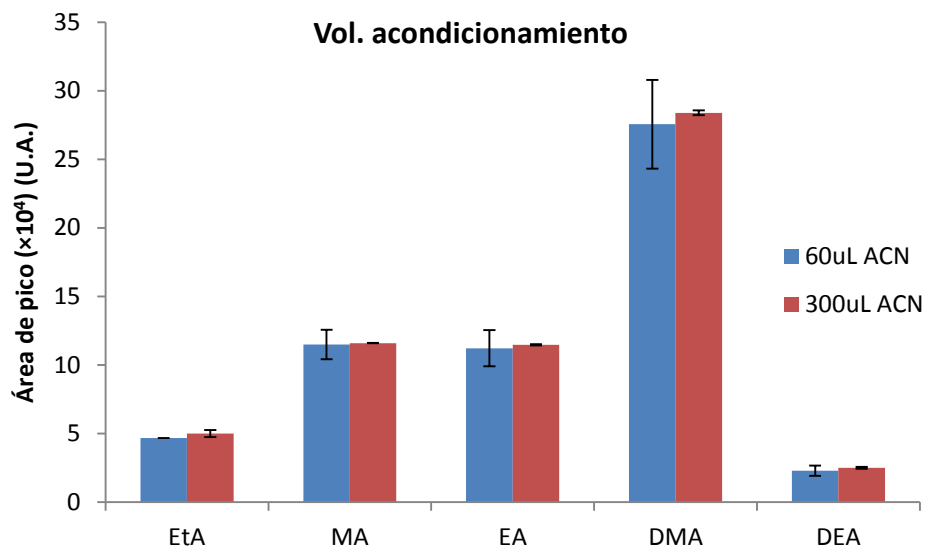


Figura 55. Efecto del volumen de ACN de acondicionamiento en la optimización de la derivatización de las aminas en el interior del capilar. Barras de error = \pm SD (n=2).

Para una misma concentración de FMOC (1 mM), las diferencias obtenidas al variar la concentración del tampón borato no son muy elevadas, pero un 0,15 M da lugar a señales ligeramente más altas (Fig. 56), por lo que se selecciona esa concentración.

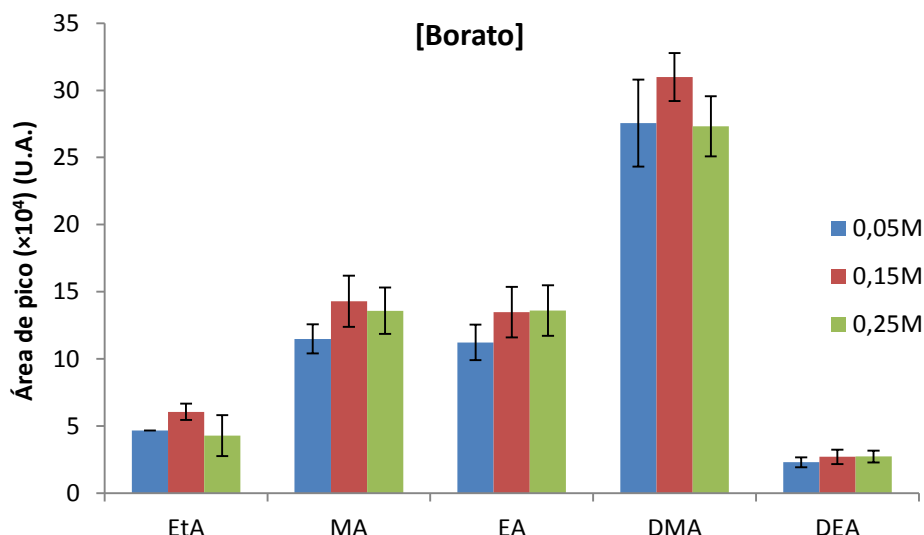


Figura 56. Efecto de la concentración del tampón borato en la optimización de la derivatización de las aminas en el interior del capilar. Barras de error = \pm SD (n=2).

Respecto al pH, si se disminuye hasta 9 las áreas obtenidas se resienten de forma significativa (Fig. 57), por lo que se mantiene en 11,5.

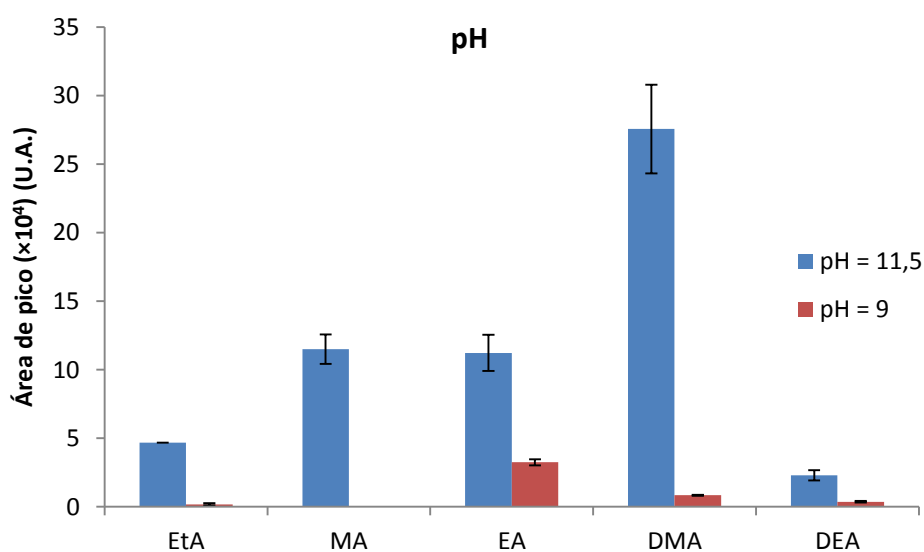


Figura 57. Efecto del pH del tampón borato en la optimización de la derivatización en el interior del capilar. Barras de error = \pm SD (n=2).

En cuanto a la composición de la disolución de desplazamiento, el paso de una mezcla ACN/H₂O 45:55 (composición inicial de la fase móvil) reduce considerablemente la señal de los derivados (Fig. 58), lo que indica que el acetonitrilo desorbe los derivados y los elimina del sistema (ya que se introducen 60 μ L y el volumen interno del capilar es menor, 50 μ L). Por tanto, se mantiene el desplazamiento con un 100% de agua.

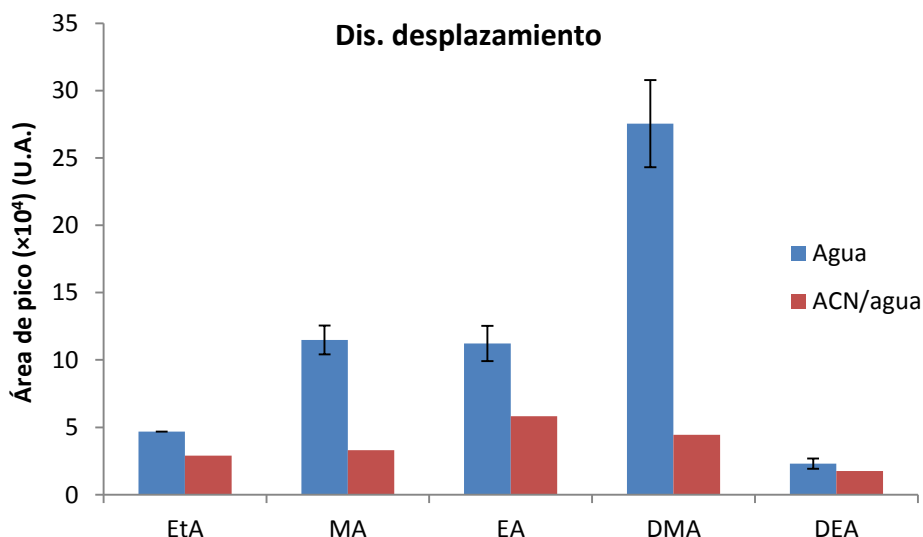


Figura 58. Efecto del disolvente empleado en el desplazamiento en la optimización de la derivatización de las aminas en el interior del capilar. Barras de error = \pm SD (n=2).

Se evalúa el efecto del disolvente del FMOC, ya que la composición del líquido afecta a su extracción en el capilar. Se probó una mezcla de ACN/H₂O 50:50, pero los resultados son peores que cuando el FMOC está disuelto en 100% ACN (Fig. 59), por lo que se mantiene el acetonitrilo como disolvente del FMOC.

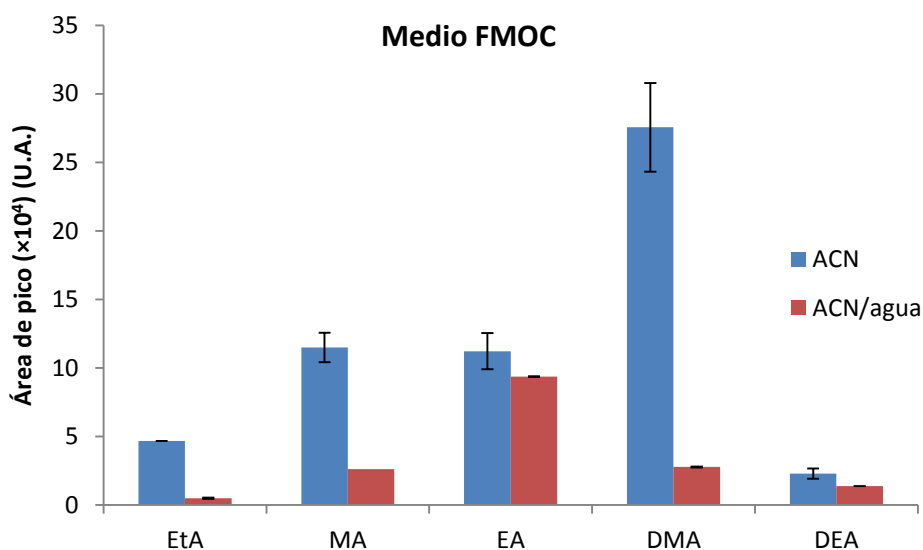


Figura 59. Efecto del medio del FMOC en la optimización de la derivatización de las aminas en el interior del capilar. Barras de error = \pm SD (n=2).

También se ha evaluado el efecto del exceso de FMOC variando tanto la concentración como el volumen. Si se aumenta la concentración del FMOC hasta 5 mM (relación FMOC:aminas 135:1), las áreas obtenidas para el derivado de la etilamina aumentan ligeramente, pero a cambio todas las de las demás aminas disminuyen, perdiéndose la EtA y la MA (Fig. 60). Por tanto, se mantiene la concentración 1 mM de FMOC.

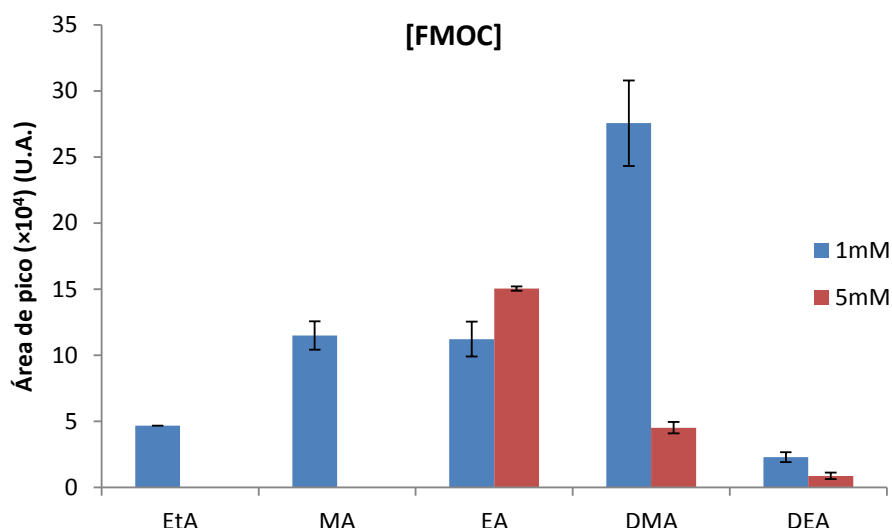


Figura 60. Efecto de la concentración del FMOC en la optimización de la derivatización de las aminas en el interior del capilar. Barras de error = \pm SD (n=2).

Por otra parte, si se varía el número de ciclos (volúmenes de 60 μ L pasados por el capilar) de FMOC no se observan diferencias tan grandes. Se parte de 2 ciclos de FMOC (por uno de muestra), que supone una relación FMOC:aminas de 27:1 para la concentración de aminas empleada en la optimización (600 ng/mL). Con un ciclo (relación FMOC:aminas 13,5:1) las señales disminuyen ligeramente, mientras que con 4 ciclos de FMOC, a pesar de aumentar la cantidad de FMOC (relación FMOC:aminas 54:1), también se obtienen peores resultados que con 2 ciclos (Fig. 61). Por si se tratase de que el tampón borato (un solo ciclo) sea insuficiente para los 4 ciclos de FMOC, se prueba a doblar también los ciclos de borato (2 ciclos de borato para 4 de FMOC). Las señales obtenidas manteniendo la proporción borato:FMOC son similares a las obtenidas para 2 ciclos de FMOC y 1 de borato, por lo que se mantiene esta última opción, que consume menos reactivos y tiempo.

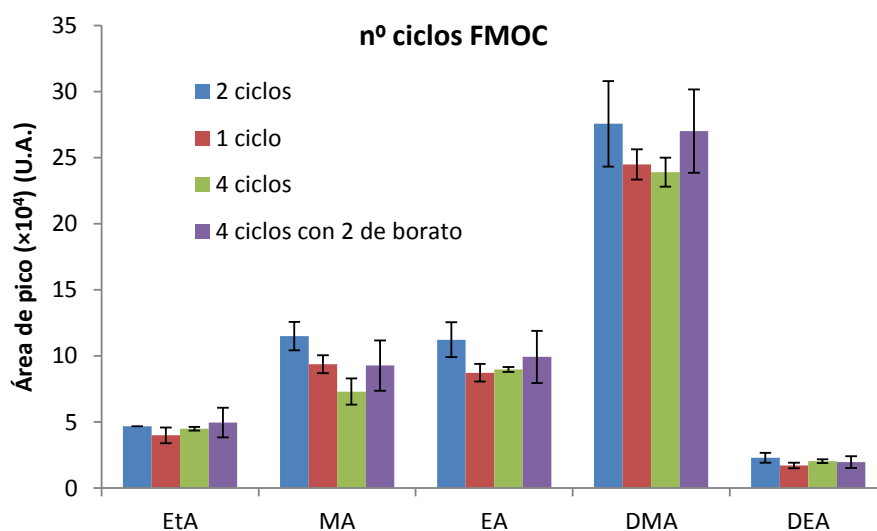


Figura 61. Efecto del número de ciclos de FMOC en la optimización de la derivatización de las aminas en el interior del capilar. Barras de error = \pm SD (n=2).

A partir de estos resultados, se fijan las proporciones optimizadas entre reactivos: 1 ciclo de ACN para acondicionar, 1 ciclo de tampón borato, 2 ciclos de FMOC, 1 ciclo de muestra y 1 ciclo de agua para el desplazamiento. Manteniendo estas proporciones, se pasa a optimizar el volumen (Fig. 62) de cada ciclo. Los resultados obtenidos indican que el aumento de la señal con el volumen es muy suave: entre 60 y 120 μL los resultados son prácticamente idénticos. Con 1 mL (volumen 17 veces mayor) sí se llegan a apreciar diferencias, pero la mejora está entre un 41 y un 81% para todos los derivados excepto el de la DMA, que aumenta un 143%. Además, para 1 mL de volumen por ciclo la precisión empeora considerablemente (Fig. 62). El gasto adicional de reactivos y tiempo no compensan la mejora en las señales y la pérdida de precisión, por lo que se elige el volumen de 60 μL .

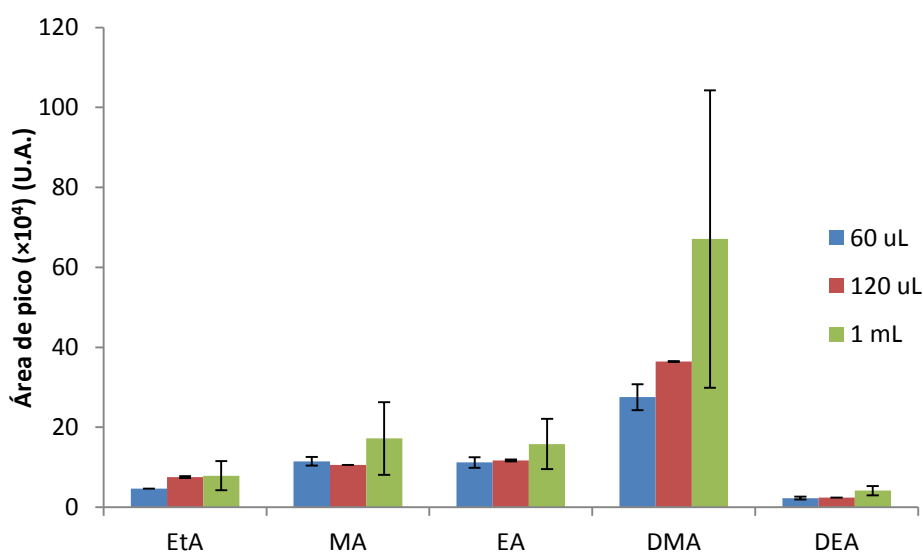


Figura 62. Efecto del volumen sobre la derivatización de las aminas, variando el volumen de cada ciclo. Barras de error = $\pm\text{SD}$ ($n=2$).

Otra forma diferente de aumentar el volumen es realizar una "inyección doble", en la que tras pasar por el capilar 1 ciclo de borato, 2 ciclos de FMOC y 1 ciclo de muestra, se vuelve a pasar de nuevo otro ciclo de borato, otros 2 ciclos de FMOC y un segundo ciclo de muestra (Fig. 63). Tal como sucedía con los ciclos de 120 μL , los resultados son prácticamente idénticos que cuando se pasa una sola vez cada reactivo. También se prueba el efecto de desplazar con agua cada reactivo antes de pasar el siguiente, pero los resultados son peores. Probablemente el agua desorbe parte del tampón borato antes del paso del FMOC, haciendo que la reacción final con las aminas vaya peor (Fig. 63).

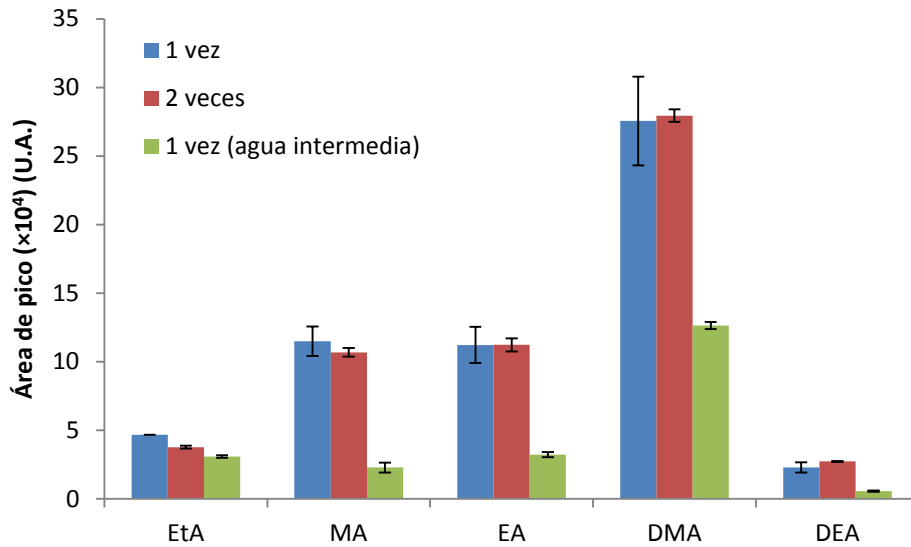


Figura 63. Efecto del volumen sobre la derivatización de las aminas, variando el número de veces que se pasan los ciclos. Barras de error = \pm SD (n=2).

Otra de las pruebas que se ha llevado a cabo consiste en la presencia del tampón borato en la muestra, lo que se ha probado preparando la disolución patrón con borato en lugar de agua Milli-Q (Fig. 64). La presencia de borato en la muestra (M_B) aumenta las áreas obtenidas en los derivados. No parece ser necesario acondicionar el capilar previamente con el tampón borato (BFM_B), ya que los resultados son prácticamente idénticos a cuando no se acondiciona (FM_B). En cambio, es imprescindible pasar el borato al inicio si la muestra no lo lleva incluido (FM).

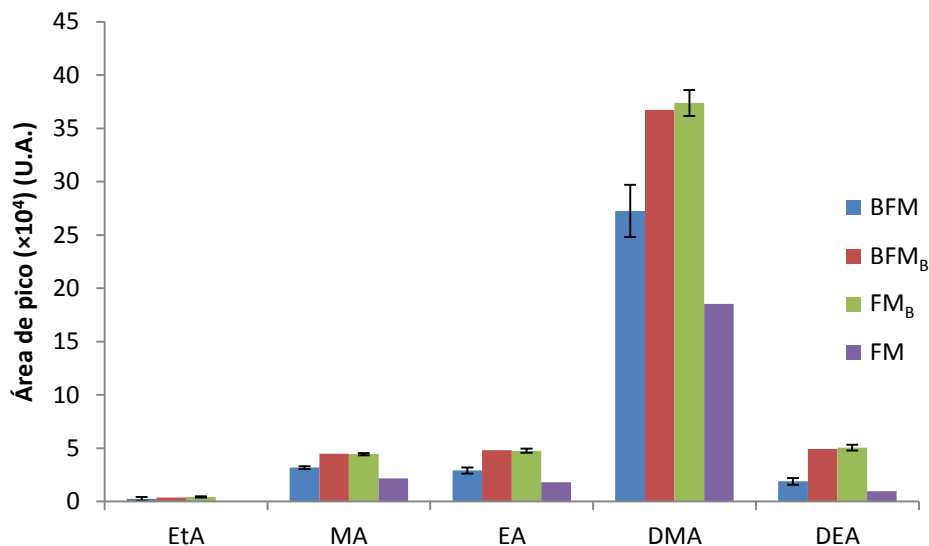


Figura 64. Efecto de la presencia de borato en la muestra. Barras de error = \pm SD (n=2).

Que el borato esté incluido en la muestra mejora la extracción/derivatización en el capilar, pero para ello es necesario extraer las aminas del material particulado atmosférico con borato 0,15 M en lugar de con agua Milli-Q. Esto puede llevarse a cabo siempre que la presencia de borato no afecte al rendimiento de la extracción del PM (o lo mejore). Otra

posibilidad sería añadir el borato al extracto en agua Milli-Q, diluyéndolo, siempre que el efecto beneficioso en la extracción/derivatización en el capilar compense esta dilución. Para el agua de lluvia, sería necesario llevar a cabo esta dilución para que la muestra que se pasa a través del capilar incluya el borato. De nuevo, sería necesario determinar si la dilución se ve compensada por la mejora en la extracción/derivatización en el capilar.

Por último, se ha comparado la extracción de los derivados formados *off-line* con la derivatización en el capilar. Dentro de la extracción de los derivados, se ha optimizado el acondicionamiento (Fig. 65). Aunque las diferencias no son demasiado grandes, acondicionar el capilar con 0,5 mL del tampón borato parece mejorar ligeramente la extracción de los derivados.

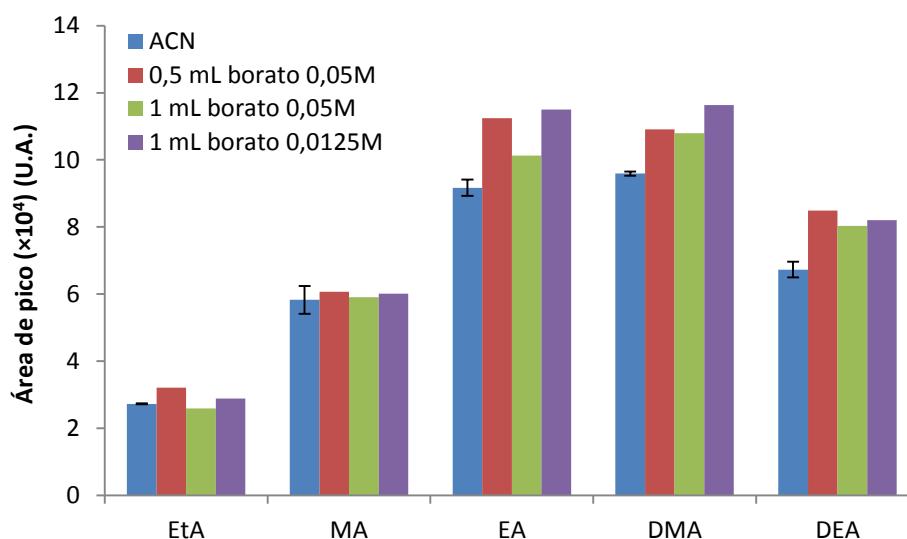


Figura 65. Efecto del acondicionamiento en la extracción de derivados de las aminas formados *off-line* (capilar DB-FFAP). Barras de error = \pm SD (n=2).

Por otro lado, el medio en que se hallan los derivados afecta sobremanera a la extracción. Al estar el FMOC en 100% ACN y mezclarlo con borato y muestra de modo que suponga la mitad del volumen final, los derivados se encuentran en un medio acuoso con un 50% de acetonitrilo. La disminución del porcentaje de ACN favorece la extracción de los derivados. Sin embargo, es necesario disolver el FMOC, que no es soluble en agua, en mezclas ACN/H₂O para disminuir la proporción final de acetonitrilo. Las pruebas realizadas (25% de ACN en la mezcla de derivatización) indican que podrían existir problemas de solubilidad, por lo que el uso de una baja proporción de ACN en la extracción de los derivados se descarta.

Con respecto al volumen de carga en la derivatización *off-line*, al igual que sucedía con la derivatización en el capilar, su efecto no es demasiado acusado. Las señales presentan una cierta mejoría al aumentar el volumen, pero quintuplicar el volumen solo produce una mejora de alrededor del 30% en las señales (Fig. 66).

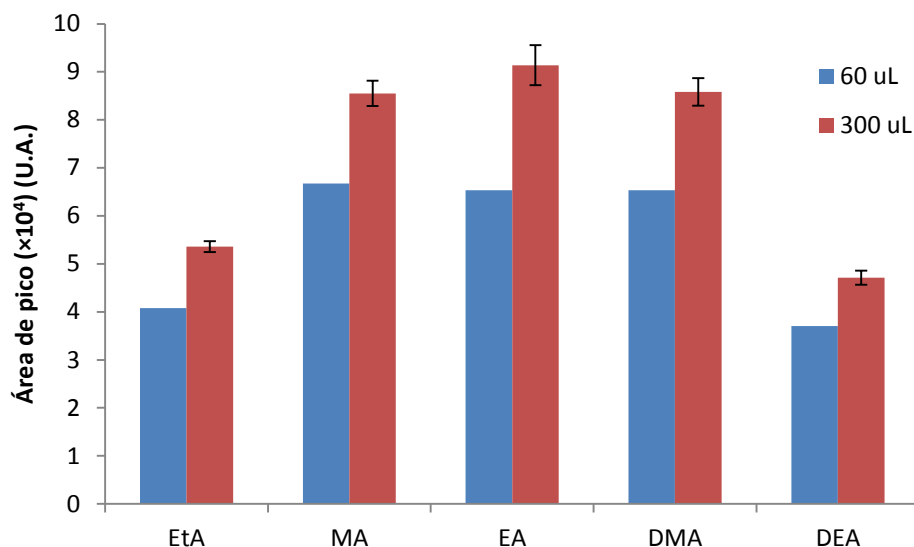


Figura 66. Efecto del volumen inyectado en la optimización de la extracción de derivados formados *off-line* (capilar DB-FFAP). Barras de error = \pm SD (n=2).

De este modo, si se pasan únicamente 60 μ L de disolución por el capilar, las recuperaciones absolutas son relativamente elevadas (20-55%), pero al aumentar el volumen éstas disminuyen drásticamente, perdiéndose la ventaja de la IT-SPME (concentrar volúmenes del orden de mL). Por este motivo, la extracción en el capilar de los derivados formados *off-line* no es especialmente beneficiosa, ya que si se introducen 60 μ L de disolución solo se está triplicando el volumen que se puede introducir mediante inyección directa (20 μ L no sobrecargan la columna monolítica). La señal de EA, DMA y DEA aumenta en torno a un 60% respecto a la inyección directa, pero la de EtA y MA disminuye un 40%.

En cambio, si se compara la inyección directa con la derivatización en el capilar, las señales aumentan entre un 45 (MA) y un 327% (DMA), a excepción de la DEA que disminuye un 30%. Aun así, en este caso la disminución para la DEA sí que se ve compensada por la importante mejora obtenida para las otras aminas, por lo que la derivatización en el interior del capilar con las condiciones previamente optimizadas ofrece mejores resultados globales que la inyección directa de derivados formados *off-line*.

En pruebas preliminares realizadas para estimar los límites de detección que se podrían alcanzar con el procedimiento final (con derivatización en el capilar PLOT), parece que estos límites se encontrarían alrededor de 20 ng/mL, siendo algo menores para la DMA (con áreas elevadas para esa concentración) y algo más altos para la EA (debido a los blancos para este compuesto). Estos límites de detección ya mejorarían los obtenidos para la determinación de dimetilamina en tensioactivos policatiónicos usando el modo de ciclos, también con derivatización en el capilar (50 ng/mL) [Prieto-Blanco *et al.*, 2008].

Además, con el método optimizado se puede emplear la detección de fluorescencia, dado que el FMOC y sus derivados son fluorescentes. Ese tipo de detección, mucho más sensible, debería permitir mejorar considerablemente los límites de detección, haciéndolos más adecuados para su posterior aplicación a muestras atmosféricas.

Se han llevado a cabo pruebas preliminares con el detector de fluorescencia, trabajando a $\lambda_{\text{excitación}} = 265 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 315 \text{ nm}$. Se observa que algunos subproductos (en especial el FMOC-OH) saturan el detector. Este problema se soluciona reduciendo la concentración de FMOC y utilizando unas longitudes de onda menos favorables ($\lambda_{\text{excitación}} = 232,6 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 330 \text{ nm}$) en el rango en el que salen los subproductos conflictivos y así evitar la saturación. Si se reduce demasiado la concentración de FMOC, aparecen problemas de reproducibilidad en la formación de los derivados. Una concentración de FMOC de 0,3 mM se considera adecuada para el detector de fluorescencia, ya que es la mínima que da lugar a reacciones reproducibles de forma inmediata.

7.4. CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS

Se consigue la separación de los derivados de 5 aminas alifáticas (EtA, MA, EA, DMA y DEA) en un tiempo de análisis muy corto (7,5 min) con un gradiente acetonitrilo/agua, compatible con el acoplamiento *on-line* de IT-SPME en modo válvula. Se obtienen mejores resultados con derivatización *on-line* en el capilar PLOT que realizando la derivatización en disolución (*off-line*) y extrayendo posteriormente los derivados. La extracción y derivatización simultánea de las aminas fue la mejor opción de las ensayadas para IT-SPME *on-line*. Los parámetros optimizados en el procedimiento previo en modo de ciclos para DMA (concentración de FMOC, pH, número de ciclos, volumen del ciclo) son también las mejores condiciones de compromiso usando el modo "en válvula" para las cinco aminas ensayadas. La disolución de la muestra en el tampón borato es otra alternativa favorable para la derivatización/extracción *on-line*. Para la DMA, los resultados obtenidos con los ciclos manuales en válvula (en una sola dirección) parecen tener buena correspondencia con los obtenidos en ciclos de llenado/eyección en modo automático.

Las condiciones optimizadas consisten en pasar consecutivamente a través del capilar PLOT 60 μL de acetonitrilo para lavarlo y acondicionarlo, 60 μL de tampón borato 0,15 M con $\text{pH} \approx 11,5$, 120 μL de FMOC 1 mM, 60 μL de muestra o disolución patrón acuosa y finalmente 60 μL de agua Milli-Q para el desplazamiento. Aunque no se han determinado los límites de detección y cuantificación, las pruebas preliminares indican que se podrían detectar concentraciones de alrededor de 20 ng/mL de las aminas. Estos límites todavía pueden mejorarse, para hacerlos más adecuados para la aplicación a muestras atmosféricas, mediante el uso de un detector de fluorescencia en lugar del DAD. En las pruebas realizadas, parece que el método podría adaptarse a la detección de fluorescencia simplemente ajustando la concentración de FMOC a 0,3 mM.

La robustez del capilar PLOT para procesar un número elevado de patrones o muestras no se ha probado. El capilar FSOT con fase 95% dimetil/5% difenil polisiloxano, dio lugar a resultados muy reproducibles para la determinación de DMA en tensioactivos policatiónicos en modo ciclos [Prieto-Blanco *et al.*, 2008]. En investigaciones futuras, debería examinarse la viabilidad de este capilar y la robustez del PLOT para la determinación de las cinco aminas propuestas, antes de proceder a la validación del método.

7.5. REFERENCIAS

- Akyüz M. Simultaneous determination of aliphatic and aromatic amines in ambient air and airborne particulate matters by gas chromatography-mass spectrometry. *Atmospheric Environment*, 42 (2008) 3809–3819.
- Claeson A.-S., Östin A., Sunesson A.-L. Development of a LC-MS/MS method for the analysis of volatile primary and secondary amines as NIT (naphthylisothiocyanate) derivatives. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378 (2004) 932–939.
- Cornell S. E., Jickells T. D., Cape J. N., Rowland A. P., Duce R. A. Organic nitrogen deposition on land and coastal environments: a review of methods and data. *Atmospheric Environment*, 37 (2003) 2173–2191.
- García-Villar N., Saurina J., Hernandez-Cassou S. High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in wines with an experimental design optimization procedure. *Analytica Chimica Acta*, 575 (2006) 97–105.
- Ge X., Wexler A. S., Clegg S. L. Atmospheric amines – Part I. A review. *Atmospheric Environment*, 45 (2011) 524–546.
- Gibb S. W., Mantoura R. F. C., Liss P. S. Ocean-atmosphere exchange and atmospheric speciation of ammonia and methylamines in the region of the NW Arabian Sea. *Global Biogeochemical Cycles*, 13 (1999) 161–178.
- Gorzelska K., Galloway J. N. Amine nitrogen in the atmospheric environment over the north Atlantic ocean. *Global Biogeochemical Cycles*, 4 (1990) 309–333.
- Grönberg L., Lovkvist P., Jönsson J. Å. Measurement of aliphatic amines in ambient air and rainwater. *Chemosphere*, 24 (1992) 1533–1540.
- Hanczko R., Jambor A., Perl A., Molnar-Perl I. Advances in the o-phthalaldehyde derivatizations: comeback to the o-phthalaldehydeethanethiol reagent. *Journal of Chromatography A*, 1163 (2007) 25–42.
- Herráez-Hernández R., Cháfer-Pericás C., Verdú-Andrés J., Campíns-Falcó P. An evaluation of solid phase microextraction for aliphatic amines using derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1104 (2006) 40–46.
- Iqbal M. A., Szulejko J. E., Kim K.-H. Determination of methylamine, dimethylamine, and trimethylamine in air by high-performance liquid chromatography with derivatization using 9-fluorenylmethylchloroformate. *Analytical Methods*, 6 (2014) 5697–5707.
- Liu S., Takahama S., Russell L. M., Gilardoni S., Baumgardner D. Oxygenated organic functional groups and their sources in single and submicron organic particles in MILAGRO 2006 campaign. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 9 (2009) 6849–6863.

- Mopper K., Zika R. G. Free amino acids in marine rains: evidence for oxidation and potential role in nitrogen cycling. *Nature*, 325 (1987) 246–249.
- Preti R., Bernacchia R., Vinci G. Chemometric evaluation of biogenic amines in commercial fruit juices. *European Food Research and Technology*, 242(12) (2016) 2031–2039.
- Prieto-Blanco M. C., López-Mahía P., Campíns-Falcó P. On-line analysis of carbonyl compounds with derivatization in aqueous extracts of atmospheric particulate PM₁₀ by in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(30) (2011) 4834–4839.
- Prieto-Blanco M. C., López-Mahía P., Campíns-Falcó P. In-Tube Solid-Phase Microextraction and Liquid Chromatography Using a Monolithic Column for the Selective Determination of Residual Ethylenediamine in Industrial Cationic Polymers. *Analytical Chemistry*, 81(14) (2009) 5827–5832.
- Prieto-Blanco M. C., Cháfer-Pericás C., López-Mahía P., Campíns-Falcó P. Automated on-line in-tube solid-phase microextraction-assisted derivatization coupled to liquid chromatography for quantifying residual dimethylamine in cationic polymers. *Journal of Chromatography A*, 1188 (2008) 118–123.
- Szulejko J. E., Kim K.-H. A review of sampling and pretreatment techniques for the collection of airborne amines. *Trends in Analytical Chemistry*, 57 (2014) 118–134.
- Van Neste A., Duce R. A., Lee C. Methylamines in the marine atmosphere. *Geophysical Research Letters*, 7 (1987) 711–714.

**CHAPTER 8. ATMOSPHERIC PARTICULATE MATTER
CHARACTERIZATION AND SOURCE APPORTIONMENT**

Publication:

M. Fernández-Amado, M.C. Prieto-Blanco, P. López-Mahía, M. Piñeiro-Iglesias, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, C. Alves, D. Custódio, V. Esteves, T. Nunes. Interrelationships between major components of PM₁₀ and sub-micron particles: Influence of Atlantic air masses (Manuscript).

Meetings:

M. Fernández-Amado, M.C. Prieto-Blanco, P. López-Mahía, M. Piñeiro-Iglesias, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, V. Esteves, D. Custodio, T. Nunes, C. Alves. Assessment of carbonaceous particulate matter in a suburban site of Galicia. Poster communication. *XXI Encontro Galego-Portugués de Química*. Pontevedra (Spain) November 18th-20th, 2015. Book of abstracts (ISBN: 978-84-608-3441-0), p.134.

M. Fernández-Amado, M.C. Prieto-Blanco, P. López-Mahía, M. Piñeiro-Iglesias, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, C. Alves, D. Custódio, T. Nunes. Major components of PM₁₀ and their relationships with sub-micron particles in a suburban area of northwest Spain. Poster communication. *5th Iberian Meeting on Aerosol Science and Technology (RICTA '17)*. Barcelona (Spain) July 4th-6th, 2017.

8.1. INTRODUCTION

In the Introduction (chapter 1), the interest of the characterization of atmospheric particulate matter (PM) and source apportionment has been introduced. The characterization of PM, as part of air quality monitoring, is an important research area of the QANAP research group, financed by several research projects, both national and international. In addition, part of the work presented in this chapter (the determination of the carbonaceous fraction and WSOC) was carried out during a research stay in the Department of Environment and the Centre for Environmental and Marine Studies (CESAM) of the University of Aveiro (Portugal), in a research group with a large experience in that kind of measures, considered a reference group in atmospheric environmental studies in Europe.

In the present chapter, the characterization of 140 particulate matter (PM₁₀) samples collected in a suburban area (IUMA, Liáns, Oleiros, Spain) was performed. The samples were distributed in four sampling campaigns covering all seasons throughout a year (April 2014 to January 2015). The carbonaceous fraction, water soluble organic carbon (WSOC) and the major ions were analyzed in the samples. Trace metals were determined, carbon and nitrogen isotopic analyses were carried out, along with elemental analysis. Data on ultrafine particles were also recorded for one of the sampling campaigns. The obtained results are analyzed in this chapter, including a comparison with the values reported in the literature, recognition of seasonal trends and determination of correlations between different parameters. Afterwards, the values and correlations were used for source apportionment by means of *Positive Matrix Factorization*.

Among the components of PM, carbonaceous matter is usually an important fraction, accounting for 10-43% of the total PM mass. Carbonaceous PM is highly related to the effects over health, climate and visibility produced by the particulate matter. Carbonaceous PM is classified into organic carbon (OC) and elemental carbon (EC). Organic carbon may be composed of primary OC, directly emitted from different sources (marine or vegetation origin, biomass burning and fossil-fuel combustion), and secondary OC. The latter is produced in the atmosphere by oxidation of the primary organic compounds (including volatile organic compounds, VOCs) or by gas-particle condensation on the particulate. EC, which only has a primary origin, is considered a marker of primary emissions from traffic, and to a lesser extent of biomass burning. OC/EC ratios and their minimum values [(OC/EC)_{min}] are used to assess the sources of the carbonaceous fraction in PM [Pio *et al.*, 2011].

Water soluble organic carbon (WSOC) is the soluble fraction of OC, composed of soluble and oxidized organic compounds. It has both natural and anthropogenic sources, as some primary organic compounds of both origins are part of WSOC. In addition, WSOC is strongly linked to aerosol ageing and several WSOC components are believed to be oxidation products of atmospheric reactions [Zong *et al.*, 2016; Jafrezzo *et al.*, 2005].

Other important components of PM are ions. The major ions have both natural and anthropogenic origin, including an important contribution of secondary inorganic aerosol (SIA), which accounts for the largest part of ions fraction in PM. SIA (including species NO_3^- , NH_4^+ , SO_4^{2-} ...) is formed in the atmosphere through chemical and/or physical transformations of precursor gases (SO_2 , NO_2 and NH_3). Other important ions have a marine origin (Cl^- , Na^+ , Mg^{2+}), are linked to biomass burning (K^+) or have mainly a mineral contribution (Ca^{2+}).

Besides, several trace metals, including heavy metals, have been identified in PM. They are highly associated with anthropogenic sources, as the highest levels are usually found in industrial and traffic sites. Their determination is very useful for public health information, due to their toxicity, and especially for the application of receptor modeling for source apportionment, due to their relation with different types of sources [Moreda-Piñeiro *et al.*, 2015; Blanco Heras, 2009; Querol *et al.*, 2008].

Stable isotopic compositions are widely used in the evaluation of the contribution of different sources to PM. The stable isotopic composition of an element is expressed in delta notation, parts per thousand units. For carbon and nitrogen, the expressions are the following:

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = \left(\frac{\left\{ \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right\}_{\text{sample}}}{\left\{ \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right\}_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000 \quad \delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = \left(\frac{\left\{ \frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} \right\}_{\text{sample}}}{\left\{ \frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}} \right\}_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000$$

Therefore, the higher the delta value, the higher is the enrichment of the sample in the heavier isotope [López-Veneroni, 2009]. Negative values for delta are obtained when the sample contains lighter isotopes than the standard. $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ are really useful in understanding the contribution of several sources to organic aerosols. Carbon isotopic ratios provide information about the carbon cycle and long-range transport. Moreover, they are very useful to distinguish between marine and terrestrial sources, as marine carbon is enriched in the heavier isotope. $\delta^{13}\text{C}$ also helps to identify the presence of SOA. In turn, nitrogen isotopic signatures allow for distinguishing between particles derived from NO_x originated in high and low temperature processes, which helps to distinguish between diesel and coal sources. The combined data of both analyses allow identifying (and distinguishing between) different sources, including road traffic, industrial, diesel, fuel oil and biomass burning [Mkoma *et al.*, 2014; Dusek *et al.*, 2013; Mašalaitė *et al.*, 2012; Górká *et al.*, 2012; Jung and Kawamura, 2011].

Linking meteorological parameters with characterization data for PM has been used for years to gain a better understanding of sources and atmospheric processes. Weather has important effects over air quality, due to the washout produced by precipitation or the photochemical degradation caused by solar radiation. Weather conditions also affect kinetics in secondary aerosol formation reactions and have a critical part in dispersion and transport of contaminants. Wind direction dominates the impact of local sources, whereas backward trajectories, which estimate the origin of air masses, are really useful to assess long-range transport [Masiol *et al.*, 2017].

Size distribution of the atmospheric particles is a very important property of aerosols. It is related to the origin and journey of the particles and also has a critical influence over health effects of PM. The smaller the size, the more dangerous the particles are, as they have a higher degree of penetration in the respiratory system and also a longer residence time in the atmosphere. Nanoparticles or submicron particles are strictly nanometre-sized particles (<1 μm), but different definitions for the term nanoparticles are used in the literature, and usually only a smaller size is considered. Despite the fact that nanoparticles refer sometimes to particles with size <100 nm only, there are several authors who considered nanoparticles only those with a size below 300 nm. This size range includes more than 99% of the total number concentration of particles (N) in the ambient atmospheric environment (despite the fact that their contribution to the total mass of particles is lower due to their small size). In turn, nanoparticles are usually classified in three modes: nucleation (1-30 nm), Aitken (20-100 nm) and accumulation (90-300 nm). Nucleation mode particles, whose life time in the atmosphere is relatively short, have no primary contribution, but they are formed through gas-to-particle conversion in the atmosphere. Aitken mode particles are formed due to growing or coagulation of the nucleation mode particles, although primary emissions (such as combustion sources) also contribute to the Aitken mode. Finally, accumulation mode particles are derived from combustion processes, as well as through coagulation of smaller sized particles. They are carbonaceous agglomerates with different components due to their formation mechanism. Although washout is an efficient removal mechanism for this type of particles, neither diffusion nor settling are effective for atmospheric removal of this mode, thus accumulation mode particles have a longer atmospheric life time (days to weeks) than the other modes [Kumar *et al.*, 2010; Gómez-Moreno *et al.*, 2011].

The identification of sources and the apportionment of their contribution to the concentrations of pollutants in PM are of great interest in air quality management. This type of knowledge is really useful to control the pollution and even to minimize it by acting over the identified main sources. Receptor modeling is used for this purpose. It is based on the assumption that each source type emits a specific pattern of chemical species that may be used to identify it and distinguish it from other sources. The fundamental principle of receptor modeling is mass conservation, which is supposed to allow the use of a mass balance for the apportionment. The mass balance equation is:

$$x_{ij} = \sum_{k=1}^p g_{ik} f_{kj}$$

where x_{ij} is the concentration of species j in sample i , f_{kj} is the concentration of species j emitted by source k and g_{ik} is the contribution of source k to sample i . As both f_{kj} and g_{ik} are usually unknown, mathematic algorithms have to be used to solve the equation. There are several models for receptor modeling, but the most widely used nowadays is *Positive Matrix Factorization* (PMF), developed by Paatero and Tapper (1993) and later released by the US EPA [Hopke, 2016].

8.2. METHODOLOGY

8.2.1. SAMPLING

A Digital DHA-80 high-volume sampler (Digital Elektronik AG, Hegnau, Switzerland) was used for the collection of particulate matter (PM₁₀) on quartz-fiber filters ($\phi = 150$ mm, MK360 Munktell, Falun, Sweden) for 24 h periods. For mass determination, all filters were weighed before and after sampling, in both cases after 48 h of conditioning at constant temperature (20 ± 1 °C) and relative humidity conditions (50 ± 5 %), according to the EN 12341 European Norm [EN 12341:2014]. Samples were stored at that controlled temperature and humidity conditions until further analysis. The sampling site is the University Institute of Environment (*Instituto Universitario de Medio Ambiente, IUMA*). It is located in a suburban area in Liáns, Oleiros (Northwestern Spain), in a residential area surrounded by small forests (Fig. 67). The possible pollution sources include A Coruña (medium-size city, 5 km), the sea (500 m), a nearby road (500 m, with low traffic, ~ 25000 vehicles per day, increased during rush hours and during summer due to the close beaches), two power stations (25 and 60 km), a solid waste incinerator (25 km), an airport (6 km), a petrochemical refinery (10 km), a harbor (4 km) and two small industrial zones (10 km) [Juncal Bello, 2012].

(a)



(b)

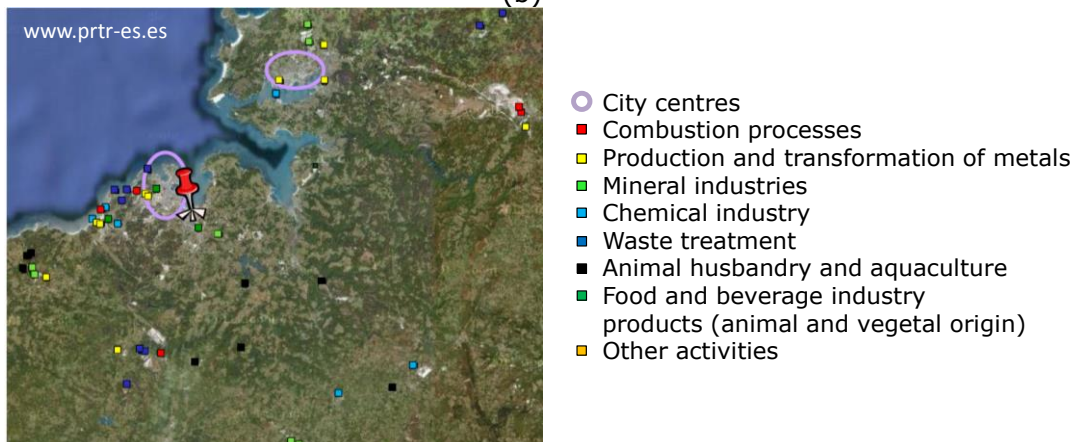


Figure 67. (a) High volume sampler in the sampling site. (b) Map of the sampling site and the surrounding possible sources.

Climate of zone is humid oceanic, with low thermal oscillation and abundant rainfall throughout the whole year. In general, winds are weaker during the night than during the day, with maximum values around noon. The prevailing winds are from the north in summer and south in winter [Gómez-Carracedo *et al.*, 2015; Moreda-Piñeiro *et al.*, 2015].

8.2.2. CHARACTERIZATION OF PARTICULATE MATTER

The carbonaceous fraction determination of PM₁₀ was performed by using the thermal-optical method developed by the University of Aveiro [Castro *et al.*, 1999; Pio *et al.*, 2011]. This method allows the quantification of organic and elemental carbon by using a system which comprises a quartz tube with two heating zones, a pulsed laser and a non-dispersive infrared (NDIR) CO₂ analyser. The system is shown in Figure 68. To carry out the measurements, two circles ($\phi = 9$ mm) of the filter sample were placed inside a quartz tube, one of them placed vertically to make the laser beam pass through it.

The sample was placed in the first heating zone, which at the beginning had a nitrogen atmosphere. In this zone, the organic fraction of particles was vaporized by heating to 600°C. Next, the elemental carbon was determined by heating to 850°C and introducing a 4% oxygen in the atmosphere of this first zone. The second heating zone, filled with cupric oxide, was maintained at 700°C under an atmosphere with 4% oxygen during the entire analysis process in order to ensure the total oxidation of the volatilized carbon to CO₂. This CO₂ was continuously quantified by the NDIR analyzer.

To distinguish between EC and the contribution of pyrolysis of OC, the laser was employed. At the beginning of the analysis, transmittance decreased when the OC (non absorbent) pyrolyzed to EC (black carbon). In the second step, when the transmittance reached the initial value it was considered that non-pyrolyzed EC began to vaporize. This methodology has been tested with the NIST (National Institute of Standards and Technology) 8785 filter standard and in an intercomparison experiment with real aerosol samples [Schmid *et al.*, 2001; Pio *et al.*, 2011].

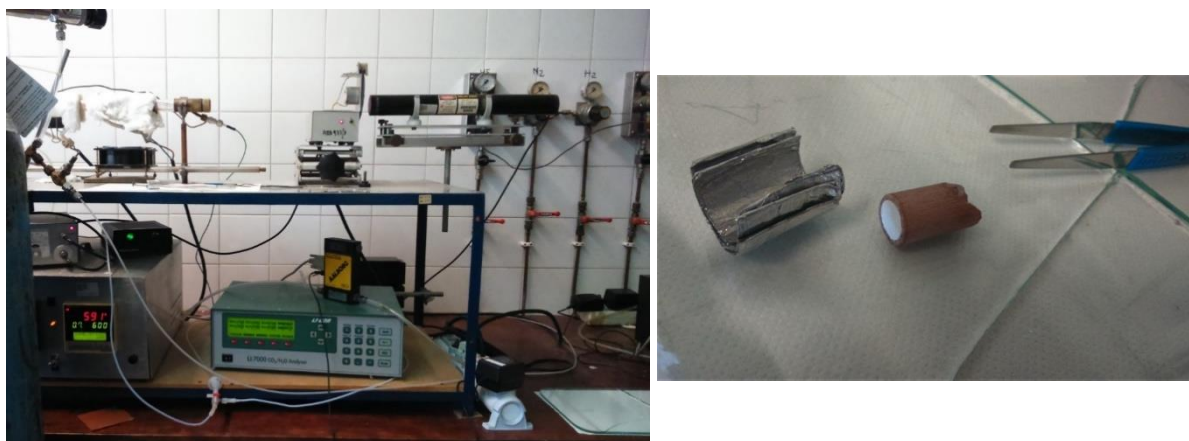


Figure 68. Thermal-optical system for the determination of OC and EC and detail of the quartz tube with the vertical punch of sample.

For WSOC determination, depending on the sample, 4 circles ($\phi = 9$ mm) or 2 circles ($\phi = 19$ mm) were extracted in US with 10 mL of ultrapure water during 20 minutes. Extracts were filtered through syringe filters of PVDF 0.2 μm (Whatman, Maidstone, UK) or 0.45 μm (Millipore, Darmstadt, Germany) previously to carbon measure using a TOC-VCPH (Shimadzu, Kyoto, Japan) or a TOC 5000A (Shimadzu, Kyoto, Japan).

For the determination of anions and cations, 6 circles ($\phi = 7$ mm) of each sample were extracted with 3 mL of Milli-Q water in US during 15 min. Poured supernatant was analyzed by capillary zone electrophoresis (CZE) using a HP ^{3D}CE (Agilent, Palo Alto, CA, USA) with a contactless conductivity detector (TraceDec, IST, Strasshof, Austria). From a single extract, anions and cations were analyzed in two separated runs, injecting the sample from a different end of the capillary for each analysis. In both cases the background electrolyte (BGE) was formed by 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) 50 mM, histidine 50 mM and 18-crown-6 ether 2 mM [Blanco Heras *et al.*, 2012].

Elemental analysis (C, N, S and H) was carried out on a circle ($\phi = 17$ mm) of the filter with a ThermoQuest Flash EA 1112. The sample is accurately weighed in a tin capsule and analyzed by flash combustion in a quartz tube filled with WO_3 and Cu, maintained at 1020 °C. After the combustion of the sample, the generated gases are transported by a stream of helium through WO_3 , where the oxidation is completed, and later through Cu, where the oxides of nitrogen are reduced to N_2 , the oxides of sulfur to SO_2 , and excess oxygen is retained. Subsequently the generated gas mixture (N_2 , CO_2 , H_2O and SO_2) passes to a column where the gases are chromatographically separated and finally determined in a thermal conductivity detector.

Carbon and nitrogen isotopes analyses were performed using a stable Isotope Ratio Mass Spectrometer (IRMS) calibrated by international certified reference standards (NBS-22, IAEA-CH-6 and USGS 24). The filters were analysed with an elemental analyzer FlashEA 1112 connected to the stable isotope ratio mass spectrometer Thermo Finnigan Delta Plus through a ConFlo II interface. Two small discs ($\phi = 9$ mm) were placed into the tin capsule and combusted in the oxidation furnace at the temperature of the 1020°C in excess of oxygen. Later this gas was transferred into the reduction furnace (650°C) and separated by a GC column (40°C). Acetanilide was used as laboratory standard and the references were VPDB (*Vienna Pee Dee Belemnite*) for $\delta^{13}\text{C}$ and air for $\delta^{15}\text{N}$.

For metals determination, 8 portions of filter sample (4×11 mm + 4×7 mm) were digested with 2.5 mL nitric acid 69% (Merck, Darmstadt, Germany) and 5 mL hydrofluoric acid 48% (J.T. Baker, Phillipsburg, USA) at 90°C all night. Afterwards the mixture was evaporated at 230°C, adding 2.5 mL of perchloric acid 70% (Merck, Darmstadt, Germany) followed by 1 mL of nitric acid. After total dryness, the solid residue was dissolved in 1.25 mL of nitric acid and made up to 25 mL with Milli-Q water. The analytical determination was carried out using a high resolution (magnetic sector field) ICP-MS Element 2/XR Thermo Finnigan [Moreda-Piñeiro *et al.*, 2014].

8.2.3. NUMBER OF PARTICLES, ATMOSPHERIC GASES AND METEOROLOGICAL PARAMETERS

Data of number of particles were continuously measured in the sampling site by a Scanning Mobility Particle Sizer (SMPS) model 3936 (TSI, Shoreview, MN, USA) during the first sampling campaign (spring, April-June 2014). Particles were classified by an electrostatic classifier TSI 3080 using a differential mobility analyzer TSI 3081. Concentrations were measured with a water condensation particle counter (TSI 3785). Despite the measurements were continuously recorded, in this Thesis only the daily total number of particles of each mode is considered. During the same period, data of pollutant gases (CO, O₃ and SO₂) were also recorded. Due to the absence of complete data and their interest for interpretation, the daily mean values for SO₂ concentrations recorded in Riazor station (A Coruña city) were considered too. These data were consulted in <http://www.meteogalicia.gal/web/index.action>. Meteorological parameters (wind speed and direction, precipitation, solar irradiation, temperature and pressure) were also recorded in the sampling site during the four sampling campaigns.

8.2.4. CALCULATIONS, STATISTICAL ANALYSES AND RECEPTOR MODELING

Backward trajectories, used to estimate the origin of the air masses reaching the sampling point, were calculated by using NOAA's (National Oceanic and Atmospheric Administration) HYSPLIT model [Stein *et al.*, 2015]. The calculation was performed at three different heights (750, 1500 and 2500 m) during the 5 days prior to sampling. The concentrations of some species were calculated from others by following these formulas: $Al_2O_3 = Al / 0.53$; $SiO_2 = 3 \times Al_2O_3$ and $CO_3^{2-} = 1.5 \times Ca + 2.5 \times Mg$. Sea salt contribution to some metals was calculated as follows: $ssNa = Na - 0.348 \times Al$, $ssMg = 0.119 \times ssNa$, $ssK = 0.037 \times ssNa$, $ssCa = 0.038 \times ssNa$ and $ssSO_4^{2-} = 0.25 \times Na^+$. Finally, the secondary inorganic aerosol was calculated as the sum of $nssSO_4^{2-}$ (non-sea salt) + NO_3^- + NH_4^+ , the marine aerosol as the sum of Cl^- + $ssSO_4^{2-}$ + $ssNa$ + $ssMg$ + ssK + $ssCa$ and the crustal contribution as the sum of Al_2O_3 + SiO_2 + $nssCa$ + $nssMg$ + CO_3^{2-} + $1,42 \times Fe$ + $1,2 \times nssK$ + $1,94 \times Ti$ [Querol *et al.*, 2001; Amato *et al.*, 2016a]. Statistical analyses (ANOVA, averages comparison and correlations calculation) were performed with IBM SPSS Statistics 23 software. Source apportionment was performed with EPA PMF 5.0 (*Positive Matrix Factorization* Receptor Model).

8.3. RESULTS AND DISCUSSION

8.3.1. CHARACTERIZATION OF THE MAJOR COMPONENTS OF PM₁₀ AND THEIR INTERRELATIONSHIPS

In this section, the values obtained for PM₁₀ concentrations and the characterized components (OC, EC, WSOC, N, S, major ions and trace metals) are presented and discussed. The interrelationships between these components and other data such as number of submicron particles, isotopic composition and meteorological parameters, are also explored.

• **PM₁₀, carbonaceous fraction, N and S and their interrelationships**

Likewise, their temporal profile (on a weekly basis) in the studied period is depicted in Fig. 69. The mean values and ranges for PM₁₀, carbonaceous fractions and elemental N and S are shown in Table 29. In all seasons, the mean PM₁₀ concentrations were lower than those recorded at the same sampling site from 2003 to 2010 (13-18 µg/m³) and in Spanish rural background areas from 1999 to 2005 (14-22 µg/m³) [Juncal Bello, 2012; Gómez-Carracedo *et al.*, 2015; Alves *et al.*, 2010]. Levels in autumn were lower than in any other season (p = 0.011). Besides, in summer, the upper limit of the variability range was higher due to a single value (35 µg/m³) recorded in September 3rd, 2014, which corresponded to a day with dominant regional backward trajectory. Seasonal variations were found either for elemental nitrogen and sulfur, or for the carbonaceous fraction. For nitrogen and elemental sulfur, the concentration levels in winter (although higher than in autumn) were significantly lower than those in spring and summer.

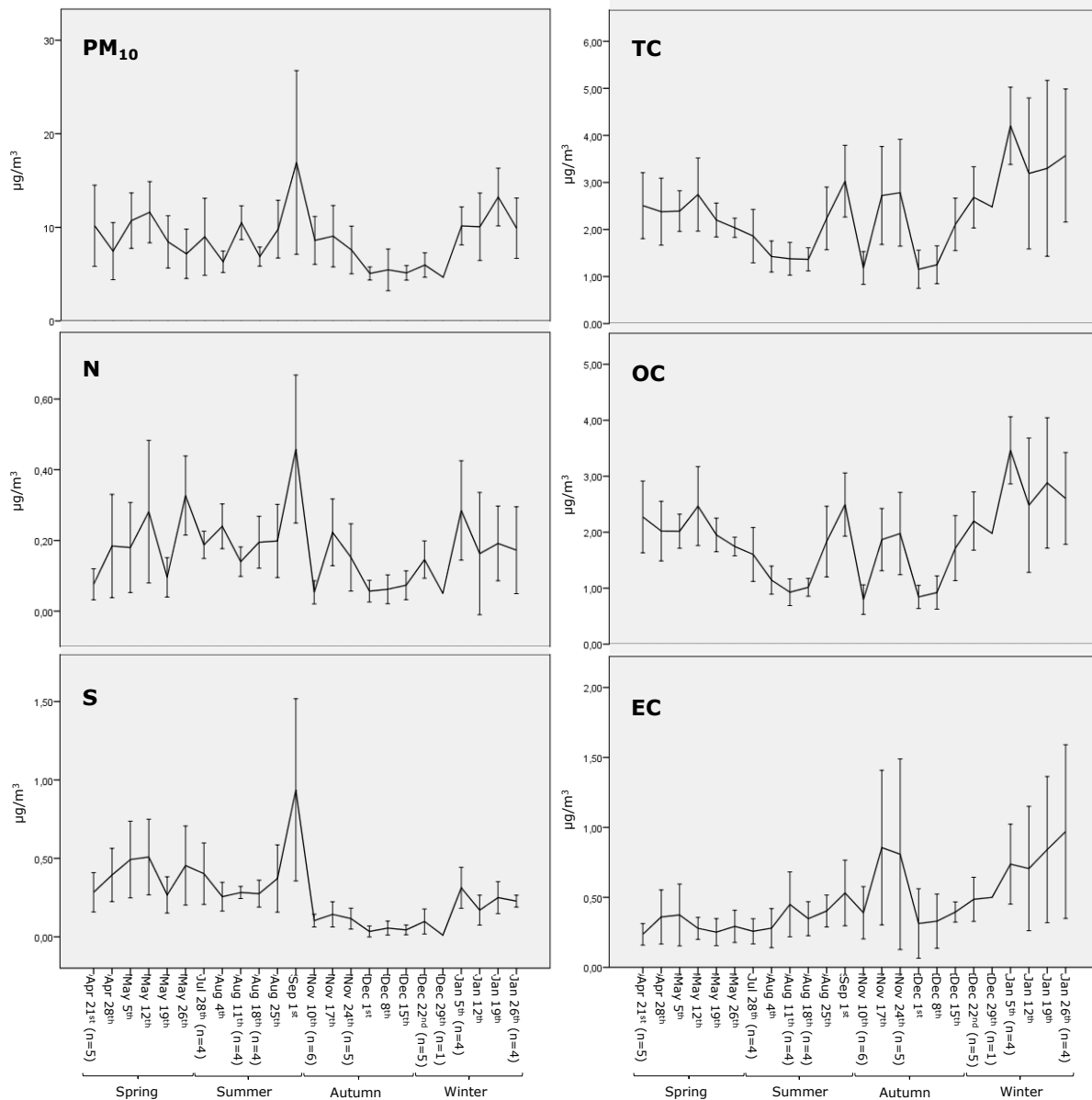


Figure 69. Temporal profiles (on a weekly basis) for total PM₁₀, carbonaceous fractions and total nitrogen and sulfur concentrations in PM₁₀. Error bars = ±SD.

Table 29. Average concentrations \pm Standard deviation (range in brackets) of different parameters of the carbonaceous and elemental analyses of PM₁₀ samples of the studied suburban area, distributed by seasons.

	PM ₁₀ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	OC ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	EC ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	OC/EC	TC ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	%TC/PM ₁₀	WSOC ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	%WSOC/OC	N ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	S ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
Spring (n=40)	9 \pm 3 (4-16)	2.07 \pm 0.50 (1.39-3.43)	0.30 \pm 0.14 (0.13-0.80)	7.8 \pm 2.8 (2.7-14.2)	2.37 \pm 0.57 (1.64-3.82)	29 \pm 12 (11-65)	0.33 \pm 0.16 (0.10-0.78)	16 \pm 7 (5-32)	0.20 \pm 0.15 (0.03-0.68)	0.41 \pm 0.21 (0.07-1.02)
Summer (n=33)	10 \pm 6 (5-35)	1.59 \pm 0.71 (0.66-3.51)	0.39 \pm 0.18 (0.17-0.94)	4.6 \pm 1.9 (1.3-8.8)	1.98 \pm 0.82 (0.96-4.45)	21 \pm 8 (9-44)	0.72 \pm 0.36 (0.25-2.12)	52 \pm 27 (13-118)	0.25 \pm 0.16 (0.03-0.74)	0.45 \pm 0.38 (0.15-1.60)
Autumn (n=36)	7 \pm 3 (2-14)	1.32 \pm 0.69 (0.38-2.81)	0.53 \pm 0.44 (0.06-1.90)	3.6 \pm 2.6 (1.0-12.4)	1.84 \pm 1.01 (0.73-4.54)	27 \pm 16 (6-86)	0.73 \pm 0.33 (0.24-1.54)	61 \pm 23 (11-116)	0.11 \pm 0.09 (0.00-0.33)	0.08 \pm 0.07 (0.00-0.25)
Winter (n=31)	9 \pm 4 (4-18)	2.57 \pm 0.96 (0.84-5.05)	0.70 \pm 0.41 (0.13-1.83)	4.2 \pm 1.2 (2.0-6.3)	3.19 \pm 1.37 (0.75-6.53)	38 \pm 14 (4-61)	1.05 \pm 0.77 (0.18-4.14)	41 \pm 20 (19-98)	0.17 \pm 0.12 (0.00-0.54)	0.19 \pm 0.12 (0.00-0.47)
Warm period (n=73)	10 \pm 5 (4-35)	1.85 \pm 0.65 (0.66-3.51)	0.34 \pm 0.17 (0.13-0.94)	6.3 \pm 2.9 (1.3-14.2)	2.19 \pm 0.72 (0.96-4.45)	26 \pm 11 (9-65)	0.51 \pm 0.33 (0.10-2.12)	33 \pm 26 (5-118)	0.22 \pm 0.15 (0.03-0.74)	0.43 \pm 0.30 (0.07-1.60)
Cold period (n=67)	8 \pm 3 (2-18)	1.91 \pm 1.04 (0.38-5.05)	0.61 \pm 0.43 (0.06-1.90)	3.9 \pm 2.1 (1.0-12.4)	2.49 \pm 1.37 (0.73-6.53)	32 \pm 16 (4-86)	0.88 \pm 0.59 (0.18-4.14)	51 \pm 24 (11-116)	0.14 \pm 0.11 (0.00-0.54)	0.13 \pm 0.11 (0.00-0.47)
Total (n=140)	9 \pm 4 (2-35)	1.88 \pm 0.85 (0.38-5.05)	0.46 \pm 0.35 (0.06-1.90)	5.2 \pm 2.8 (1.0-14.2)	2.33 \pm 1.08 (0.73-6.53)	29 \pm 14 (4-86)	0.69 \pm 0.51 (0.10-4.14)	41 \pm 26 (5-118)	0.18 \pm 0.14 (0.00-0.74)	0.29 \pm 0.27 (0.00-1.60)

In contrast, total carbon showed an inverse trend, with the highest concentrations measured during the cold period. For these parameters, in summer the upper limit also corresponded to the day of the regional backward trajectory and its consecutive days. Total carbon represented a higher mass rate of PM₁₀ in winter (38% on average) and showed a high variability in all seasons (especially in autumn). When looking in more detail at weekly temporal variations, the highest TC and OC values were recorded in the first week of January and matched relative maximum levels of nitrogen and sulfur profiles. A maximum value for all the carbon fractions, concomitant with spikes for N and S, was noticed in the second half of November. Nevertheless, no significant peak for PM₁₀ was observed during those weeks. This maximum value coincided with the wind direction from urban and industrial areas, along with an African dust outbreak. On the contrary, the main maximum value for PM₁₀, in September, seemed to be reflected in carbon (TC and OC), nitrogen and sulfur levels. Temporal variation profiles for elemental sulfur and gaseous SO₂ seem similar, but one week delayed for the latter (Fig. 70a). Comparing means for both S and SO₂ for each backward trajectory (Fig. 70b), it seems that air masses from Europe led to some of the highest levels for both parameters, whilst some of the lowest means matched air masses from the Mediterranean.

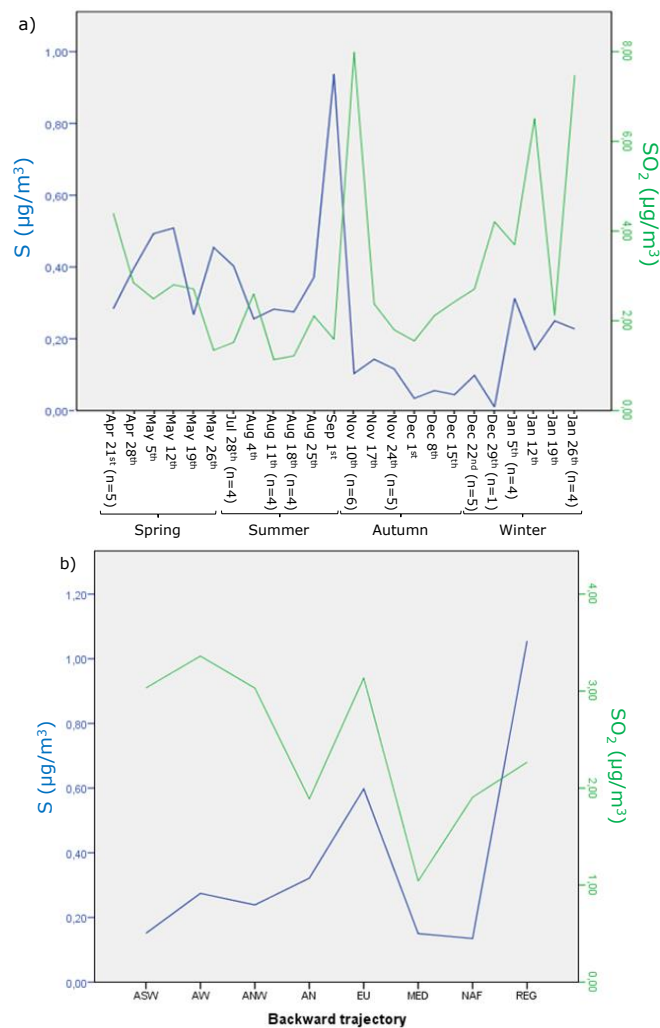


Figure 70. a) Temporal variation (on a weekly basis) for total sulfur in PM₁₀ and gaseous SO₂ (Riazor station); b) Relationship between backward trajectories and S and SO₂.

Concerning the components of TC, elemental carbon also showed the highest values in winter, possibly due to a higher activity of fossil combustion processes due to a high demand of energy in this period (see Table 29 and Fig. 69). OC had a similar trend to that of TC: levels in winter and spring were higher than in summer-autumn. As OC is the main fraction of TC, it is reasonable to believe that OC variations dominate the TC trend. OC/EC ratios showed a high variability and were higher in the warm period, due to the lower levels of EC, and especially in spring, when OC concentrations were among the highest. The high contribution of biogenic sources in this period of growing vegetation may explain these results, as well as the higher photochemical formation of SOA during spring and summer. In contrast, OC/EC ratios between 1 and 3 were frequent in autumn, as the lowest OC/EC ratios were gathered in November and December (and August 12-14th). These unusually low OC/EC ratios for a suburban area may be related to a low photochemical activity during that period and limited ageing of the aerosol, which reduce the contribution of SOA. Local emissions were probably dominant during this period, including traffic, domestic heating and stubble burning. Considering all the samples analyzed, 89% of them had OC/EC ratios over 2, whereas 75% presented OC/EC values over 3. This implies a limited contribution of fossil-fuel combustion, which would have led to OC/EC ratios near 1. Therefore, most of the organic carbon must be the result of other factors such as biomass burning, biogenic contribution and/or presence of secondary aerosol [Pio *et al.*, 2011]. In the literature, 2 to 5 ratios were described for urban background sites [Custódio *et al.*, 2016].

The mean levels found for carbonaceous fractions of PM₁₀ were in the ranges reported in the literature [Querol *et al.*, 2013] for Spanish rural areas (TC, 1.8-2.6 µg/m³), urban background (OC, 1.8-4.5 µg/m³) or between both (EC, 0.2-0.3 µg/m³ for rural areas and 0.6-0.9 µg/m³ for urban background), as expected for a suburban area. The EC mean concentration (0.46 µg/m³) was very similar to the reported concentration for a suburban area of Athens (Greece) (0.4 µg/m³ [Amato *et al.*, 2016b]) and a little lower than that described for a suburban area in Aveiro (Portugal) (0.68 µg/m³ [Pegas *et al.*, 2012]). Examining the results according to wind predominant directions, 82% of the samples corresponded to days with winds blowing from the West and South. For these directions, the mean values were in the same ranges as the entire dataset. Despite the small number of days with winds that blew predominantly from the NNE (n=3), ENE (n=2) and ESE (n=8), differences were observed. When the predominant direction was NNE, the highest levels of OC and TC were observed (3.0 and 3.7 µg/m³, respectively).

For this direction, where a power plant is located, all the four parameters (OC, EC, TC and OC/EC) lied in the urban/suburban background ranges reported by Querol *et al.* (2013) for Spanish small-medium cities. On the contrary, for the ESE direction, OC, EC and TC had the lowest mean values (1.0, 0.3 and 1.3 µg/m³, respectively), within the reported ranges for remote areas (rural areas in the case of EC). For the predominant ENE direction, the highest mean value for EC was observed (1.2 µg/m³) and, therefore, the lowest OC/EC ratio (1.8) was obtained. Querol *et al.* (2013) reported relatively high levels of EC for the background atmosphere of the small city of Melilla, due to the influence of

shipping emissions. Maritime traffic could be a possible explanation for the higher levels of EC with the ENE wind direction, corresponding to the "Ria de Betanzos" (which is similar to an estuary). TC had an excellent correlation with OC (Fig. 71a), with no seasonal variations. As expected, after the results obtained for the OC/EC ratio, the correlation between TC and EC presented differences between seasons in both intensity (higher correlation in the cold period) and slope (Fig. 71b).

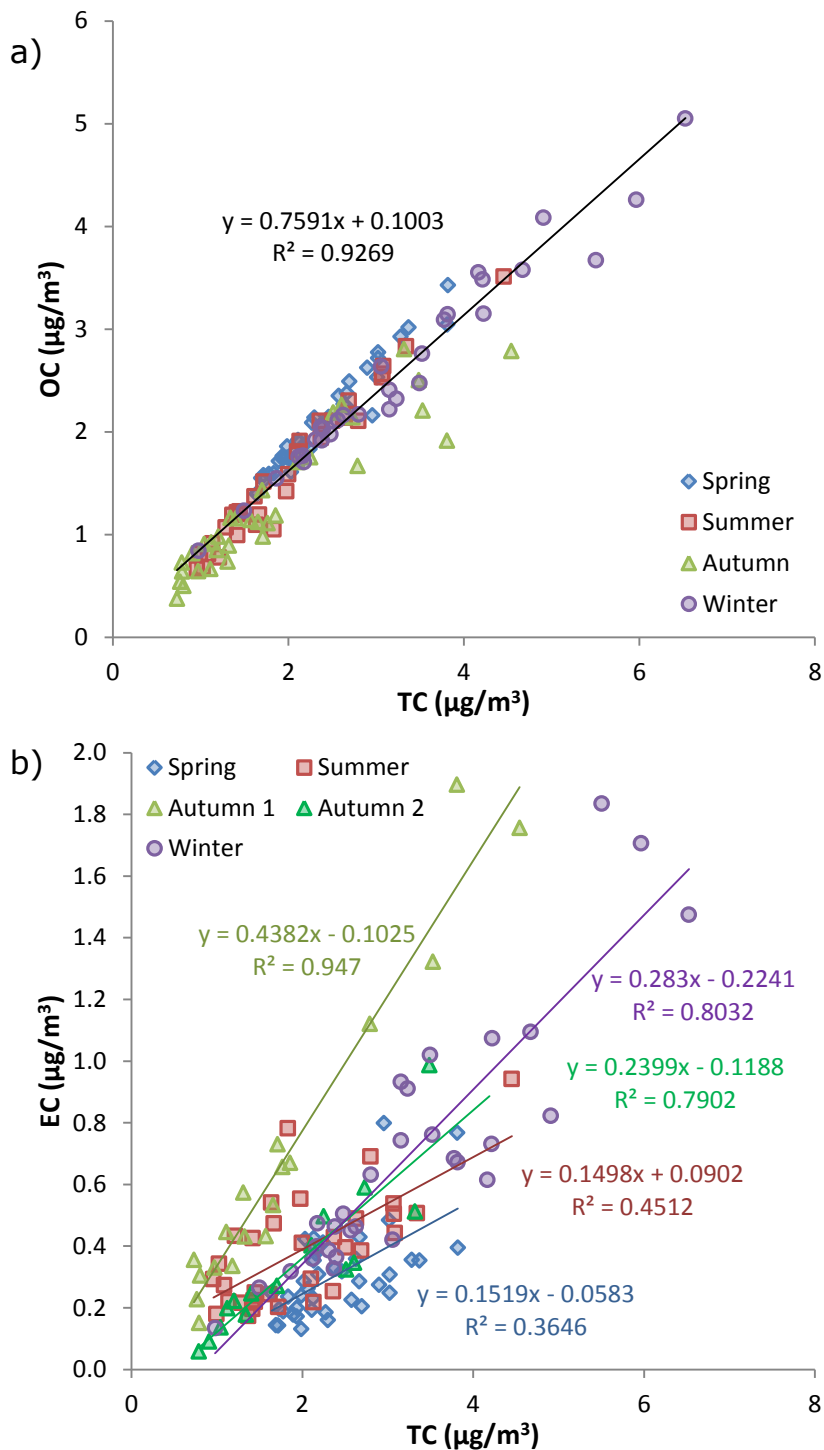


Figure 71. Correlation between: a) TC and OC; b) TC and EC.

The relationship between the carbonaceous components, OC and EC, was explored by plotting the results from each season (Fig. 72). Taking into account the influence of traffic and biomass burning, Querol *et al.* (2013) established correlations between these two parameters by fitting them to a potential equation. In the current study, using this type of fitting, a good correlation was observed only in winter (Fig. 72a). On the other hand, if the line representing $(OC/EC)_{min}$ was drawn considering the points in the lower edge, in spring the fit line would not pass through the origin, indicating the presence of a source emitting OC without EC [Pio *et al.*, 2011]. For the plot corresponding to the other seasons, $(OC/EC)_{min}$ had an intercept close to zero and slopes which varied from 1 (autumn) to 2 (winter). VOCs from biogenic sources or primary anthropogenic emissions can be oxidized and condensate on the particulate matter increasing the OC/EC ratio. Furthermore, the plot OC/EC versus EC could be fitted to different potential equations in spring, autumn and winter. In this type of graph, Querol *et al.* (2013) observed that the highest slope part is related to rural sites, while traffic sites are situated in the lowest slope area. In this study, the carbonaceous fraction in spring showed a behavior more similar to a rural site, while in winter and autumn it was more influenced by traffic emissions (Fig. 72b).

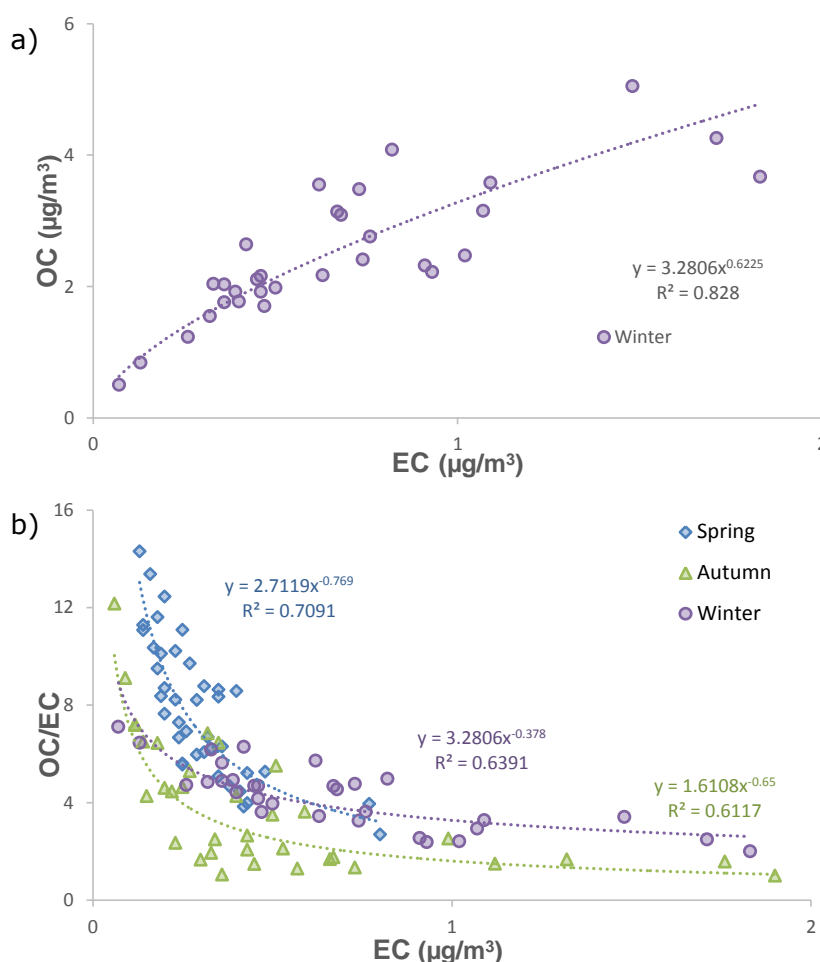


Figure 72. Correlation and regression equations between: a) OC and EC; b) OC/ EC ratios and EC levels.

Traffic should also be an important source for the sampling site in summer (because of the surrounding beaches), but no correlations were found for this season, which could be explained by the contribution of another source, not considered in this fitting. If the values corresponding to a dominant regional backward trajectory and wind direction from the SSE and SSW (with high values only for OC) were removed, a weak to moderate correlation would be observed in summer ($r^2 = 0.33$, $n=16$). Agricultural biomass burning takes place in autumn and winter, while wildfire episodes occur in summer.

WSOC is a mixture of soluble and oxidized organic compounds with contributions of anthropogenic sources and volatile compounds of biogenic origin, as well as the oxidation compounds produced in the atmosphere. The WSOC concentration and its rate of OC were lower in spring ($0.33 \mu\text{g}/\text{m}^3$ and 16%) than in the other seasons, although high OC values were found during this season.

An increase of primary OC in spring could explain the low WSOC, since this fraction increases with aerosol ageing [Jafrezo *et al.*, 2005]. Some hydrophobic compounds from vegetation have low solubility and could not be found in WSOC, despite the fact that they increase OC values. In summer and autumn, similar mean values (around $0.7 \mu\text{g}/\text{m}^3$) and rates of OC greater than 50% were found. The highest concentration was recorded in winter, accounting for around 40% of the OC mass.

Total carbon showed correlation with elemental and water soluble organic carbon fractions, but with seasonal variability. Excellent correlations were observed in winter (Table S1, see *pag.* 265-269), while weaker correlations were recorded in summer (especially between TC and WSOC). Total nitrogen (TN) correlated with carbon (TC, EC and WSOC) in all seasons, except with EC in summer. Once again, the highest correlations were found in winter (Table S1, see *pag.* 265-269). Better correlations of WSOC and N were noticed in autumn and winter ($r = 0.7$ and 0.8 , respectively). This fact may suggest the presence of nitrogen groups in WSOC during this period.

Total sulfur presented strong correlations with nitrogen in all seasons, and also when the entire dataset, including data collected from all seasons, was considered. On the contrary, it presented poorer correlations with carbon (Table S1, see *pag.* 265-269). Taking into account all the data, it only correlated slightly with TC. Total sulfur did not show any significant correlation with EC or TC in autumn, and neither with TC nor WSOC in spring. Total sulfur also presented correlation with PM_{10} concentrations (Fig. 73), moderate in spring and autumn, and strong in winter and particularly in summer.

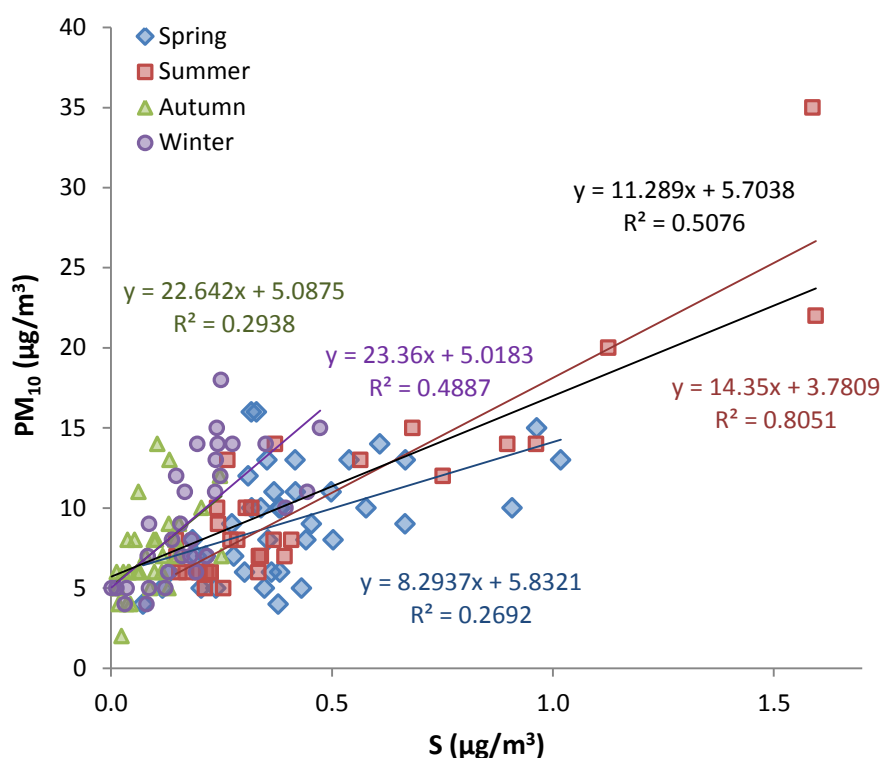


Figure 73. Correlation between S and PM₁₀.

• Major ions and their interrelationships with meteorological parameters

Table 30 shows the data for the major ions (mean values, standard deviations and ranges for each season). Sulfate was dominant, followed by chloride and sodium, while Mg²⁺ and K⁺ had the lowest levels. Similar relative trends had been previously found for ions in PM₁₀ at this sampling site [Blanco Heras, 2009], despite the fact that the concentrations of the anions and cations were higher in 2004-2005 (0.14-3.6 µg/m³) than in this study. As the total PM₁₀ levels had also decreased over these years, it is reasonable to presume that all the components had lower concentrations. Seasonal variations were observed in anions and cations. For sulfate and ammonium, levels were higher in the warm season, as recorded for PM₁₀. This trend was already observed for total N and S. The higher levels of sulfate in the warm season should be linked to a higher photochemical formation from SO₂, favored by solar radiation and temperature [Blanco Heras, 2009]. In turn, chloride and calcium presented higher levels in winter and spring than in summer and autumn, following the same trend as OC and TC. For most cations and sulfate, the lowest concentration was found in autumn. This is particularly evident in the case of sodium.

Given that the sampling site is on the Atlantic coast, the contribution of sea salt to aerosol mass is relevant [Camacho-Jiménez *et al.*, 2013]. Sodium is the marker of this influence, since chloride can be also produced by industrial sources and participates in reactions in the atmosphere, being removed in gas phase as HCl_(g). The bulk sea water weight concentration ratio is Cl⁻ = 1.8Na⁺ [Almeida *et al.*, 2005]. An excellent correlation

between the two ions was observed in winter ($r^2 = 0.97$) with a relation $\text{Cl}^- = 1.79\text{Na}^+ - 0.41$. In autumn and spring, the slope and determination coefficient were lower (1.4 and 0.89 and 1.43 and 0.78, respectively). In summer, the slope decreased to 0.93 ($r^2 = 0.83$), but the values dominated by regional backward trajectory should be removed from the plot. These values corresponded to high sodium and low chloride levels.

The sea salt levels (sum of $\text{ssNa} + \text{Cl}^- + \text{ssMg} + \text{ssK} + \text{ssCa} + \text{ssSO}_4^{2-}$) were between 0.034 and 14.9 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, with a high variability (mean value \pm SD = $2.21 \pm 2.48 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Sea salt contributed from 0.6 to 84.5% to PM_{10} (mean 19.1%). Despite the fact that the mean concentration was lower than that reported by Amato *et al.* (2016b) for an Atlantic site (Porto, Portugal, 4.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), the contribution to the PM_{10} load was higher (13% at Porto).

Concerning secondary inorganic aerosol (SIA), ammonium sulfate appears to be formed in all seasons, as suggested by the good correlation between the two ions, which is better during summer and spring ($r = 0.66$ and 0.58 , respectively) than in autumn and winter ($r = 0.51$ and 0.45 , respectively). Sodium nitrate was formed in all seasons, except in autumn ($r = 0.71$ in summer, 0.66 in spring, 0.52 in winter). Sodium sulfate and potassium nitrate were found only in summer ($r = 0.45$ and 0.46 , respectively). Potassium sulfate was formed in all seasons, except in spring. Potassium correlated moderately with sodium in summer (marine origin) and with ammonium in autumn and winter. Sodium sulfate could be formed by the reaction of excess sulfate with sea salt.

• Trace metals and their correlations

Several metals (Al, As, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, K, La, Mg, Mn, Na, Pb, Rb, Sb, Se, Sn, Sr, Ti, V and Zn) were determined in the PM_{10} filters. Their concentrations are showed in Table 31. Despite the fact that data on metals were mainly used for the PMF study (section 8.3.2), their temporal trends and correlations were explored too. Sodium, calcium, aluminium and magnesium were the major metals found. These results are consistent with the expected high marine contribution, while Al may be of crustal origin [Moreda-Piñeiro *et al.*, 2015]. All the analyzed metals showed seasonal trends, with significant differences between seasons. For most of them, the highest mean value was found in spring. Some of the metals, such as cadmium and aluminium, had higher levels in the warm period (spring and summer) than in the cold period (autumn and winter). On the other hand, another group of metals (As, Co, La, Mn, Pb, Rb, Sn, Sr, Ti, V, Fe, K, Mg, Na) showed higher values in winter and spring than in summer and autumn. This last trend had already been observed for OC, TC, Cl^- and Ca^{2+} , suggesting that the sources for all these components could be similar. The lowest values were observed in summer or autumn for most metals. Summer values were clearly lower than those found in the other seasons for cesium and antimony, while selenium is the only metal whose mean value in the cold period was significantly higher than in the warm period. As selenium could be quantified only in 20 samples, this last result must be taken with caution.

Table 30. Average concentrations ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) \pm Standard deviation (range in brackets) of the major ions in PM_{10} samples of the studied suburban area, distributed by seasons.

	Cl⁻	SO₄²⁻ (total)	ssSO₄²⁻	nssSO₄²⁻	NO₃⁻	NH₄⁺	K⁺	Na⁺	Ca²⁺	Mg²⁺
Spring (n=40)	1.26 \pm 1.20 (0.19-5.47)	1.78 \pm 0.72 (0.59-3.67)	0.28 \pm 0.19 (0.05-0.87)	1.50 \pm 0.71 (0.52-3.36)	0.72 \pm 0.36 (0.24-1.87)	0.24 \pm 0.17 (0.03-0.63)	0.14 \pm 0.28 (0.05-1.87)	1.13 \pm 0.74 (0.19-3.47)	0.37 \pm 0.87 (0.05-4.36)	0.10 \pm 0.07 (0.02-0.39)
Summer (n=33)	0.60 \pm 0.68 (0.11-2.79)	1.89 \pm 1.29 (0.70-5.76)	0.28 \pm 0.20 (0.06-0.81)	1.62 \pm 1.19 (0.52-5.05)	0.52 \pm 0.32 (0.05-1.39)	0.34 \pm 0.25 (0.05-1.05)	0.09 \pm 0.04 (0.05-0.28)	1.10 \pm 0.78 (0.26-3.23)	0.15 \pm 0.08 (0.06-0.46)	0.09 \pm 0.07 (0.02-0.31)
Autumn (n=36)	0.90 \pm 0.62 (0.13-2.95)	0.63 \pm 0.26 (0.20-1.25)	0.18 \pm 0.10 (0.03-0.50)	0.45 \pm 0.24 (0.16-1.17)	0.64 \pm 0.24 (0.15-1.19)	0.10 \pm 0.06 (0.02-0.30)	0.06 \pm 0.03 (0.02-0.18)	0.72 \pm 0.42 (0.12-1.98)	0.18 \pm 0.06 (0.06-0.41)	0.07 \pm 0.03 (0.02-0.16)
Winter (n=31)	1.52 \pm 2.23 (0.01-9.05)	1.07 \pm 0.64 (0.23-2.87)	0.26 \pm 0.31 (0.01-1.29)	0.81 \pm 0.54 (0.12-2.45)	0.57 \pm 0.35 (0.05-1.39)	0.18 \pm 0.12 (0.06-0.55)	0.13 \pm 0.07 (0.03-0.27)	1.05 \pm 1.22 (0.05-5.14)	0.32 \pm 0.18 (0.07-0.88)	0.11 \pm 0.10 (0.01-0.40)
Warm period (n=73)	0.96 \pm 1.05 (0.11-5.47)	1.83 \pm 1.01 (0.59-5.76)	0.28 \pm 0.19 (0.05-0.87)	1.55 \pm 0.95 (0.52-5.05)	0.63 \pm 0.35 (0.05-1.87)	0.28 \pm 0.22 (0.03-1.05)	0.12 \pm 0.21 (0.05-1.87)	1.12 \pm 0.76 (0.19-3.47)	0.27 \pm 0.65 (0.05-4.36)	0.10 \pm 0.07 (0.02-0.39)
Cold period (n=67)	1.18 \pm 1.59 (0.01-9.05)	0.84 \pm 0.52 (0.20-2.87)	0.22 \pm 0.22 (0.01-1.29)	0.62 \pm 0.44 (0.12-2.45)	0.61 \pm 0.29 (0.05-1.39)	0.13 \pm 0.10 (0.02-0.55)	0.09 \pm 0.06 (0.02-0.27)	0.87 \pm 0.89 (0.05-5.14)	0.25 \pm 0.15 (0.06-0.88)	0.09 \pm 0.08 (0.01-0.40)
Total (n=140)	1.07 \pm 1.33 (0.01-9.05)	1.36 \pm 0.95 (0.20-5.76)	0.25 \pm 0.21 (0.01-1.29)	1.11 \pm 0.88 (0.12-5.05)	0.62 \pm 0.33 (0.05-1.87)	0.21 \pm 0.18 (0.02-1.05)	0.10 \pm 0.16 (0.02-1.87)	1.00 \pm 0.83 (0.05-5.14)	0.26 \pm 0.48 (0.05-4.36)	0.09 \pm 0.07 (0.01-0.40)

Table 31. Average concentrations (ng/m^3) \pm Standard deviation (range in brackets) of trace metals in PM_{10} samples of the studied suburban area, distributed by seasons (continues).

	As	Cd	Co	Cr	Cs	Cu	La	Mn	Pb
Spring (n=40)	0.284 \pm 0.063 (0.142-0.409)	0.299 \pm 0.080 (0.198-0.497)	0.113 \pm 0.039 (0.053-0.213)	8.476 \pm 3.640 (3.949-19.001)	0.039 \pm 0.015 (0.025-0.072)	22.115 \pm 11.341 (8.144-48.718)	0.512 \pm 0.190 (0.307-1.293)	4.295 \pm 1.272 (2.034-8.097)	3.360 \pm 1.220 (1.739-7.356)
Summer (n=33)	0.066 \pm 0.027 (0.032-0.167)	0.094 \pm 0.014 (0.077-0.136)	0.038 \pm 0.016 (0.023-0.103)	2.460 \pm 0.137 (2.078-2.822)	0.011 \pm 0.006 (0.006-0.027)	4.569 \pm 6.861 (1.262-31.127)	0.128 \pm 0.059 (0.074-0.283)	1.127 \pm 0.433 (0.613-3.017)	1.302 \pm 1.184 (0.362-5.775)
Autumn (n=36)	0.184 \pm 0.099 (0.097-0.520)	0.043 \pm 0.045 (0.009-0.171)	0.035 \pm 0.030 (0.001-0.115)	2.308 \pm 1.614 (0.486-6.910)	0.045 \pm 0.020 (0.009-0.083)	5.425 \pm 3.792 (0.355-18.128)	0.364 \pm 0.147 (0.291-0.863)	1.183 \pm 0.869 (0.110-3.778)	2.482 \pm 3.016 (0.186-15.191)
Winter (n=31)	0.260 \pm 0.160 (0.103-0.846)	0.072 \pm 0.076 (0.016-0.307)	0.057 \pm 0.048 (0.012-0.193)	2.118 \pm 1.439 (0.398-5.786)	0.048 \pm 0.031 (0.001-0.121)	4.910 \pm 6.326 (0.058-28.541)	0.413 \pm 0.202 (0.300-1.022)	1.707 \pm 1.416 (0.116-7.519)	4.968 \pm 5.968 (0.251-24.364)
Warm period (n=73)	0.184 \pm 0.120 (0.032-0.409)	0.206 \pm 0.118 (0.077-0.497)	0.078 \pm 0.049 (0.023-0.213)	5.756 \pm 4.034 (2.078-19.001)	0.024 \pm 0.018 (0.006-0.072)	14.183 \pm 12.958 (1.262-48.718)	0.338 \pm 0.241 (0.074-1.293)	2.863 \pm 1.866 (0.613-8.097)	2.429 \pm 1.579 (0.362-7.356)
Cold period (n=67)	0.221 \pm 0.137 (0.097-0.846)	0.059 \pm 0.064 (0.009-0.307)	0.045 \pm 0.040 (0.001-0.193)	2.215 \pm 1.519 (0.398-6.910)	0.047 \pm 0.026 (0.001-0.121)	5.206 \pm 4.982 (0.058-28.541)	0.389 \pm 0.175 (0.291-1.022)	1.417 \pm 1.166 (0.110-7.519)	3.629 \pm 4.747 (0.186-24.364)
Total (n=140)	0.201 \pm 0.129 (0.032-0.846)	0.166 \pm 0.125 (0.009-0.497)	0.063 \pm 0.048 (0.001-0.213)	4.234 \pm 3.648 (0.398-19.001)	0.040 \pm 0.026 (0.001-0.121)	10.366 \pm 11.235 (0.058-48.718)	0.352 \pm 0.225 (0.074-1.293)	2.182 \pm 1.729 (0.110-8.097)	2.994 \pm 3.493 (0.186-24.364)

Table 31. Average concentrations (ng/m³) ± Standard deviation (range in brackets) of trace metals in PM₁₀ samples of the studied suburban area, distributed by seasons (continues).

	Rb	Sb	Se	Sn	Sr	Ti	V	Zn
Spring (n=40)	0.327±0.127 (0.095-0.659)	0.375±0.077 (0.242-0.569)	0.702±0.209 (0.501-1.048)	0.841±0.182 (0.482-1.262)	1.573±0.638 (0.491-3.453)	16.428±3.853 (11.275-30.218)	2.275±1.536 (0.572-8.993)	85.991±54.353 (31.114-282.909)
Summer (n=33)	0.096±0.044 (0.043-0.283)	0.090±0.030 (0.061-0.188)	0.192±0.074 (0.140-0.277)	0.312±0.135 (0.180-0.784)	0.506±0.170 (0.316-1.062)	3.031±0.841 (2.123-6.562)	0.846±0.594 (0.312-3.405)	18.637±7.560 (10.961-43.898)
Autumn (n=36)	0.156±0.147 (0.033-0.773)	0.368±0.150 (0.236-0.718)	1.717±0.559 (1.122-2.516)	0.602±0.345 (0.110-1.459)	0.639±0.407 (0.005-1.650)	2.051±2.024 (0.049-9.688)	1.839±0.606 (1.121-2.759)	21.655±25.165 (0.192-126.236)
Winter (n=31)	0.344±0.254 (0.011-0.875)	0.448±0.217 (0.247-1.034)	1.931±1.055 (1.051-4.202)	0.740±0.560 (0.176-2.933)	0.932±0.697 (0.105-2.831)	4.021±8.955 (0.134-46.549)	2.152±1.393 (1.013-5.793)	17.632±14.386 (1.429-54.235)
Warm period (n=73)	0.222±0.151 (0.043-0.659)	0.254±0.154 (0.061-0.569)	0.511±0.310 (0.140-1.048)	0.602±0.311 (0.180-1.262)	1.090±0.721 (0.316-3.453)	10.372±7.309 (2.123-30.218)	1.629±1.395 (0.312-8.993)	55.543±52.583 (10.961-282.909)
Cold period (n=67)	0.243±0.223 (0.011-0.875)	0.414±0.194 (0.236-1.034)	1.842±0.856 (1.051-4.202)	0.663±0.455 (0.110-2.933)	0.772±0.572 (0.005-2.831)	2.900±6.086 (0.049-46.549)	2.025±1.134 (1.013-5.793)	19.680±20.504 (0.192-126.236)
Total (n=140)	0.232±0.189 (0.011-0.875)	0.314±0.186 (0.061-1.034)	1.309±0.953 (0.140-4.202)	0.631±0.385 (0.110-2.933)	0.941±0.672 (0.005-3.453)	7.064±7.727 (0.049-46.549)	1.736±1.336 (0.312-8.993)	40.133±45.431 (0.192-282.909)

Table 31. Average concentrations ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) \pm Standard deviation (range in brackets) of trace metals in PM_{10} samples of the studied suburban area, distributed by seasons.

	Al	Ca	Fe	K	Mg	Na
Spring (n=40)	0.327 \pm 0.070 (0.189-0.440)	0.842 \pm 0.433 (0.373-2.272)	0.156 \pm 0.050 (0.074-0.262)	0.135 \pm 0.044 (0.052-0.231)	0.194 \pm 0.072 (0.084-0.421)	1.202 \pm 0.621 (0.410-3.211)
Summer (n=33)	0.090 \pm 0.015 (0.071-0.158)	0.122 \pm 0.036 (0.070-0.193)	0.041 \pm 0.016 (0.023-0.114)	0.035 \pm 0.010 (0.021-0.071)	0.042 \pm 0.018 (0.023-0.095)	0.273 \pm 0.149 (0.092-0.636)
Autumn (n=36)	0.041 \pm 0.035 (0.003-0.161)	0.167 \pm 0.234 (0.006-0.898)	0.050 \pm 0.049 (0.012-0.233)	0.073 \pm 0.051 (0.022-0.298)	0.081 \pm 0.046 (0.002-0.233)	0.604 \pm 0.406 (0.004-1.943)
Winter (n=31)	0.049 \pm 0.074 (0.001-0.390)	0.191 \pm 0.225 (0.004-1.065)	0.069 \pm 0.073 (0.002-0.400)	0.117 \pm 0.047 (0.037-0.211)	0.109 \pm 0.100 (0.008-0.438)	0.822 \pm 0.916 (0.018-3.830)
Warm period (n=73)	0.220 \pm 0.130 (0.071-0.440)	0.516 \pm 0.482 (0.070-2.272)	0.104 \pm 0.069 (0.023-0.262)	0.090 \pm 0.060 (0.021-0.231)	0.125 \pm 0.093 (0.023-0.421)	0.782 \pm 0.660 (0.092-3.211)
Cold period (n=67)	0.044 \pm 0.056 (0.001-0.390)	0.180 \pm 0.226 (0.004-1.065)	0.059 \pm 0.061 (0.002-0.400)	0.093 \pm 0.053 (0.022-0.298)	0.094 \pm 0.076 (0.002-0.438)	0.703 \pm 0.690 (0.004-3.830)
Total (n=140)	0.144 \pm 0.136 (0.001-0.440)	0.395 \pm 0.438 (0.004-2.272)	0.083 \pm 0.069 (0.002-0.400)	0.091 \pm 0.057 (0.021-0.298)	0.110 \pm 0.087 (0.002-0.438)	0.745 \pm 0.673 (0.004-3.830)

Regarding correlations between metals, every metal correlated positively with almost all the others. By seasons, in spring and summer the same trend was observed, with medium to high positive correlation between almost all metals. In contrast, in autumn and winter a fewer number of significant correlations was found. In addition, in autumn a negative correlation between chromium and sodium ($r = -0.5$) was observed (Table S2, see pag. 270-274).

Most metals correlated with both OC and TC in spring, and they also had negative correlation with WSOC (Table S2, see pag. 270-274). In contrast, fewer correlations were observed in the other seasons, and the correlation between some metals and WSOC was positive in these cases. In addition, in the cold period (both autumn and winter), elemental carbon usually correlated with the metals that had correlation with the other carbonaceous fractions. This trend seems reasonable as EC, OC and TC are strongly linked in the cold period.

A more detailed discussion about groups of related metals and about the other relationships observed with correlations will follow below as part of PMF analysis in section 8.3.2.

• Carbon and nitrogen isotopes of PM₁₀ and their interrelations with WSOC, major ions and meteorological parameters

Isotopic results for carbon and nitrogen are included in Table 32. As mentioned above, negative values of isotopic composition are obtained when the sample contains lighter isotopes than the standard. In the case of carbon, $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDV}}$ values were in the range from -25.4 to -34.3‰ ($n=140$) with a mean value of -26.7 ± 0.8 ‰ and two outliers of -34.3 and -28.3‰. These values had a smaller proportion of the heaviest isotope than those found by Mkoma *et al.* (2014) in Tanzanian samples, dominated by biomass burning of C4 plants (-24.4 to -22.4‰) or by Kunwar *et al.* (2016) in Okinawa, influenced by long-range transported pollutants (-24.2 to -21.6‰). The mean value is within the interval found by Widory *et al.* (2004) in Paris for urban ambient and background sites (-26.7 to -25.7‰). The vegetation may be related to the obtained low $\delta^{13}\text{C}$, as a similar value (-27.3‰) was reported by Turekian *et al.* (1998) for *Eucalyptus* burning. *Eucalyptus* is the dominant C3 vegetative species around the sampling site.

Concerning the seasonal variation, $\delta^{13}\text{C}$ values were in a very narrow range, except in spring, when the lowest values for all the four seasons (containing the lighter isotope in total carbon) were found (-34.3 and -28.3‰). For $\delta^{13}\text{C} = -34.3$ ‰ (April 23rd), the precipitation value was the highest observed in spring (13.4 L/m²). Therefore, a possible scavenging could cause the $\delta^{13}\text{C}$ depletion. Emissions of primary organic carbon from plants or insects can also cause depletion of $\delta^{13}\text{C}$ in spring [Górka *et al.*, 2008]. Besides, Fisseha *et al.* (2009) reported lower values for secondary organic carbon resulting from the ozonolysis of β -pinene. In spring, the range without these two values was from -27.6 to -25.4‰.

Table 32. Average concentrations \pm Standard deviation (range in brackets) of the results of isotopic analyses of PM₁₀ samples of the studied suburban area, distributed by seasons.

	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
Spring (n=40)	-27.0 \pm 1.3 (-34.3--26.1)	8.9 \pm 4.1 (2.8-16.6)
Summer (n=33)	-26.4 \pm 0.4 (-27.3--25.4)	7.5 \pm 5.6 (0.0-20.0)
Autumn (n=36)	-26.5 \pm 0.4 (-27.3--25.5)	1.2 \pm 2.4 (-4.7-8.5)
Winter (n=31)	-26.7 \pm 0.3 (-27.3--25.9)	6.1 \pm 5.3 (-2.8-19.4)
Warm period (n=73)	-26.8 \pm 1.0 (-34.3--25.4)	8.2 \pm 4.9 (0.0-20.0)
Cold period (n=67)	-26.6 \pm 0.4 (-27.3--25.5)	3.5 \pm 4.7 (-4.7-19.4)
Total (n=140)	-26.7 \pm 0.8 (-34.3--25.4)	6.0 \pm 5.3 (-4.7-20.0)

The $\delta^{15}\text{N}$ values were in the range from -4.7 to 20‰ (n=140), averaging 6.0 \pm 5.3‰. These values are similar to those obtained by Yeatman *et al.* (2001) in Weybourne (United Kingdom) for nitrate ($\delta^{15}\text{NO}_3^-$), 7 \pm 6‰ (-6 to +19‰), although slightly lower (less enrichment in ^{15}N) and with higher variability than those reported by Widory (2007) for PM₁₀ in Paris, France (5.3 to 16.1, with a mean value of 10.7 \pm 3.1‰) and Górká *et al.* (2012) in Wrocław, Poland (5.0-13.7‰, with a mean value of 9.9 \pm 2.0‰). The high variability in $\delta^{15}\text{N}$ values suggests the presence of different sources of nitrogen. Some seasonal differences were found. The most positive values (enriched ^{15}N) were observed in the warm period (especially in spring) and negative values (depleted ^{15}N) in the cold period. In autumn, a narrower range (-4.7 to 8.5‰, with a mean value of 1.2 \pm 2.4‰) than in other seasons may suggest that less sources were contributing. Besides, the total nitrogen concentration measured as isotopic N and elemental N had a higher concentration in the warm period (Table 29). Although a mixture of sources (diesel vehicles, heating, etc.) appears to contribute to nitrogen levels, fuel-oil combustion for heating with more negative values (-19.4 to 2.9‰ [Widory, 2007]) may explain the $\delta^{15}\text{N}$ depletion during the cold period. This trend was also observed by Widory (2007) in Paris.

In all samples, nitrogen concentrations in PM₁₀ (as mass %) correlated with $\delta^{15}\text{N}$ ($r = 0.67$). An increase of nitrogen caused an enrichment of ^{15}N (but more intense in spring and winter). Moreover, good correlations were found between $\delta^{15}\text{N}$ and ammonium for all the seasons ($r = 0.7$). This fact is justified by several authors [Pavuluri *et al.*, 2010; Mkoma *et al.*, 2014] due to the reaction of NH_3 with acids, leading to gas-particulate conversion between NH_3 and NH_4^+ (enriched in ^{15}N). In this dataset, both NH_4^+ and $\delta^{15}\text{N}$ correlated positively with non-marine sulfate, especially in the warm period ($r = 0.6$). Therefore, one of the species formed has to be $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Concerning the other species containing nitrogen, nitrate correlated negatively with $\delta^{15}\text{N}$ in spring and winter ($r = -0.48$ and -0.41 ,

respectively). In this case, it seems to indicate that nitrate formation caused depletion of ^{15}N . NO_x from diesel vehicles with a range of negative values (-13 to -2‰) could be the source of nitrate in particulate matter. Nitrate had a low and negative correlation with ammonium in spring and winter (the highest Pearson's coefficient value (-0.37) was in spring), suggesting different sources. However, nitrate showed a good and positive correlation with sodium, marine sulfate and chloride ($r = 0.6-0.7$) in the warm period and winter. The reaction of nitric acid with sea salt can form sodium nitrate with loss of HCl [Pey *et al.*, 2009]. To reinforce this hypothesis, $\delta^{15}\text{N}$ also correlated negatively with sodium (a tracer of primary marine contribution) in all the seasons (weakly in summer). Thus, both species, nitrate and ammonium, were mainly found as ammonium sulfate and sodium nitrate in all seasons, except for autumn (when only ammonium sulfate was recorded). In summer, the correlation coefficient also indicated the presence of potassium nitrate.

In winter, WSOC, a tracer of atmospheric oxidation of organic compounds, correlated positively with $\delta^{15}\text{N}$ ($r = 0.48$) and negatively with $\delta^{13}\text{C}$ ($r = -0.41$). EC (a tracer of incomplete combustion) did not correlate with any of them. No correlations between $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ were found, except for the cold period (autumn and winter, $r = -0.56$), suggesting the input from different sources.

Comparing means for each backward trajectory, only nitrogen (both TN and $\delta^{15}\text{N}$) showed significant differences between backward trajectories. Regional backward trajectories led to the highest levels for both nitrogen ($0.52 \pm 0.32 \mu\text{g}/\text{m}^3$) and $\delta^{15}\text{N}$ ($13.2 \pm 3.4\text{‰}$), whereas the mean value for European backward trajectory ($13.2 \pm 3.4\text{‰}$) was also significantly higher than most of the TN means for the Atlantic backward trajectories ($0.57 \pm 0.37 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Only one sample was associated with a Mediterranean backward trajectory, so the averaging was not possible. It should be noted that this sample had the second lowest value for $\delta^{15}\text{N}$ (-3.0‰).

• Analysis of phthalates by IT-SPME in selected samples

A more detailed characterization of a few selected samples was performed, by determining the concentrations of phthalates in WSOC by means of an optimized IT-SPME method, presented in chapters 5 and 6. Fourteen PM_{10} samples were selected, taking into account their values for several parameters determined during characterization, with the goal of having many different sample profiles represented. Samples with particularly high and low values for the total PM_{10} concentration and the carbonaceous fraction were selected, including those with the highest and lowest WSOC concentration and the values of %WSOC/OC among the lowest and highest. In addition, some markers were considered to select samples with a high contribution from different sources, such as biomass burning (high value of K^+), maritime traffic (V), sea salt (Na^+) and fossil-fuel combustion (EC and low OC/EC). The presence of samples from each of the four sampling campaigns (therefore, from different seasons) and also of samples representing rare-event backward trajectories (European, Regional, African) was ensured in the final selection.

As previously mentioned in chapter 6, the levels of phthalates in particulate matter range from 0.001 to 1748 ng/m³ in the literature. Due to their limited solubility in water, lower levels are expected in water soluble fraction, but the presence of phthalates in WSOC is also presumed. Chang-Graham *et al.* (2011) suggested DEP as a tentative assignment for a peak observed in the MS analysis of WSOC collected by PILS (particle-into-liquid-sampler) for biomass burning aerosols.

Only DEP, DBP and DEHP were detected in the 14 analyzed aqueous extracts. The obtained concentrations of these phthalates, along with the parameters considered during the selection of samples are shown in Table 33. Despite having a very low solubility in water (%R = 31% for this compound in the aqueous extraction), DEHP was detected in all fourteen samples, and it was over the limit of quantitation for all of them, except for one. In any case, it was below the reporting limit for almost all samples, and therefore only an estimate of its concentration could be provided. DEP was detected in 13 out of 14 analyzed samples, while DBP (sum of di-n-butyl- and diisobutyl-phthalates) was the major compound (accounting for 58-88% of the three detected phthalates), except for sample 12, for which the estimate of DEHP was slightly higher than the DBP concentration. The sum of phthalates (Σ PAEs) was between 8 and 53 ng/m³, accounting for 0.3-23.4% of the WSOC.

As a reduced number of samples is considered, this topic is only roughly discussed. The highest level of phthalates was found in sample 1, for which a significant contribution of biomass burning (highest K⁺ concentration) was expected. On the other hand, the highest percentage of phthalates in WSOC corresponded to sample 2. The exact percentage could not be calculated because WSOC had a very low concentration for this sample, below limit of detection. Nevertheless, it had a relatively high concentration of phthalates, especially DBP, thus there would be also a high %PAEs/WSOC. This refers to the sample with the highest vanadium concentration, therefore a possible maritime traffic contribution was considered. For samples 3, 4 and 5, phthalates also contributed to a large extent to WSOC. Sample 5, with a low total concentration of PM₁₀, had the highest concentration for DEP. This phthalate was also found with a relatively high concentration in sample 4, with a very low %WSOC/OC, while sample 3, with European backward trajectory and possible maritime traffic contribution (a high level of V), had the highest DBP concentration.

The samples collected during the cold period seemed to have the lowest concentrations of phthalates, and with lower contributions to WSOC. For the 8 samples collected in the cold period, a mean of 23 ng/m³ was obtained for the concentration of the sum of phthalates (1.4% of WSOC), whereas in the warm period (n=6), the mean concentration for Σ PAEs was 40 ng/m³ (almost twice as high), 9.9% contributing to WSOC (more than 7 times higher than in the cold period). Sample 10, with a high concentration for DBP despite having been collected during the cold period, was the exception. This sample had a high carbonaceous content. Despite the fact that in spring the samples with high levels of vanadium had also high levels of phthalates, samples 13-14 (both collected in January) presented high values for V and relatively low levels of phthalates.

Table 33. Obtained concentrations for PM₁₀, carbonaceous fraction, Na⁺, K⁺, V and phthalates in the 14 selected samples.

Code	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Month	Apr	May	May	May	May	Sep	Nov	Nov	Nov	Jan	Jan	Jan	Jan	Jan
Back traj.	ANW	AW	EU	ANW	AW	REG	ASW	NAF	ASW	AW	ANW	ANW	ANW	AW
PM ₁₀	11	15	13	10	5	35	14	12	4	12	14	13	15	14
EC	0.14	0.8	0.27	0.19	0.43	0.94	1.76	1.32	1.9	1.09	1.48	1.71	0.73	1.83
OC	1.58	2.16	2.62	1.92	1.71	3.51	2.79	2.21	1.91	3.58	5.05	4.26	3.48	3.67
OC/EC	11.1	2.7	9.6	9.9	4.0	3.7	1.6	1.7	1.0	3.3	3.4	2.5	4.8	2.0
TC	1.72	2.96	2.9	2.11	2.13	4.45	4.54	3.53	3.81	4.67	6.53	5.97	4.21	5.5
WSOC	0.45	<LOD	0.55	0.1	0.27	2.12	1.52	1.54	0.65	1.18	4.14	2.09	0.82	1.36
%WSOC/ OC	29	-	21	5	16	60	55	70	34	33	82	49	23	37
K ⁺	1.87	0.13	0.12	0.10	0.13	0.28	0.18	0.14	0.10	0.23	0.27	0.24	0.24	0.20
Na ⁺	2.12	1.26	1.00	2.15	0.29	3.23	0.78	0.27	0.22	0.67	0.35	0.50	2.09	0.78
V	1.42	8.99	6.36	1.40	3.56	3.41	2.17	2.48	<LOD	1.98	1.63	1.13	5.79	4.57
DEP	10.96	3.46	5.18	12.12	15.51	0.72	3.14	3.21	7.25	6.97	<MDL	2.09	7.39	5.40
DBP	39.02	38.41	42.20	19.98	27.71	8.37	16.15	14.03	20.34	39.07	16.61	2.66	9.81	12.07
DEHP	2.90*	1.71*	2.07*	2.36*	2.42*	5.40	2.08*	<LOQ	1.51*	1.79*	3.05*	3.24*	3.91*	2.26*
ΣPAEs	52.87	43.58	49.45	34.46	45.63	14.49	21.37	17.23	29.09	47.83	19.66	7.99	21.10	19.73
%DEP/ WSOC	1.6	-	0.6	7.9	3.7	0.0	0.1	0.1	0.7	0.4	-	0.1	0.6	0.3
%DBP/ WSOC	6.0	-	5.3	13.8	7.1	0.3	0.7	0.6	2.2	2.3	0.28	0.1	0.8	0.6
%DEHP/ WSOC	0.5	-	0.3	1.7	0.7	0.2	0.1	-	0.2	0.1	0.05	0.1	0.4	0.1
%PAEs/ WSOC	8.0	-	6.2	23.4	11.5	0.5	1.0	0.8	3.1	2.8	0.33	0.3	1.8	1.0

Values highlighted in green are among the highest for the parameter; Values highlighted in red are among the lowest for the parameter.

*Estimated value (<Reporting level); MDL: Method detection limit; LOQ: Limit of quantitation.

The samples with expected high contributions of fossil-fuel combustion (high EC, low OC/EC ratio) had relatively low levels of phthalates (samples 7 and 9). Sample 8, with a North African backward trajectory, was the only one with DEHP below LOQ, whereas sample 6, with the highest PM₁₀ and Na⁺ concentrations and regional backward trajectory, was the only sample where DEHP is over RL. In contrast, it had a very low concentration of DEP and quite a low concentration of DBP, which led to a relatively low contribution of phthalates to WSOC. Due to the Na⁺ concentration and regional influence of the coastal sampling site, a significant marine contribution was expected in this sample.

Sample 11, with the highest concentrations of WSOC, OC and TC, and also with a very high contribution of WSOC to OC (>80%, suggesting a high presence of SOA), was the only sample in which DEP was not detected. It had relatively low levels of phthalates and with a low contribution to WSOC. The target phthalates may not have a significant presence in SOA, and therefore when the secondary aerosol is significant, the contribution of phthalates to WSOC is lower. Sample 12, also with a high TC value, was the only sample in which DBP was not the major phthalate, and it had a low DEP level too. The sum of phthalates was the lowest and led to a very low contribution of phthalates to WSOC (0.3%).

In summary, as expected due to their solubility, the levels of phthalates found in WSOC (8-53 ng/m³) were slightly lower than those found in the organic extract of PM (26-60 ng/m³ for suburban area, see chapter 6). DBP (sum of di-n-butyl- and diisobutyl-phthalates) was the major compound, followed by DEP. These two and DEHP were the only compounds detected in WSOC. Due to the limited number of samples analyzed, and to the fact that only an approximation to the predominant sources was performed, no exhaustive conclusions can be drawn. In any case, it seems that the highest levels of phthalates are related to biomass burning. In contrast, fossil-fuel combustion and sea salt led to lower levels of phthalates, and so do the air masses coming from North Africa. Samples with a possible contribution from maritime traffic have high levels of phthalates in WSOC, at least in the warm period. The period (warm/cold) also seems to affect phthalate levels. On the other hand, phthalates do not seem to contribute very much to SOA.

• **Sub-micron particles and their interrelationships with PM₁₀ components and meteorological parameters**

Sub-micron particles data was recorded from April to June 2014. The mean values for the number of nanoparticles in spring (n=35) were 1507, 2019 and 547 cm⁻³ for nucleation, Aitken and accumulation modes, respectively. The temporal profiles of the three modes were quite similar (Fig. 74). The number of accumulation particles remained low almost every day, with maximum values less pronounced than in the other modes. Main maximum values were found around April 29-30th, May 5-8th (with a relative minimum on May 7th) and May 14-17th. From May 30th until the last day of the sampling campaign (June 1st), the lowest number of particles was obtained.

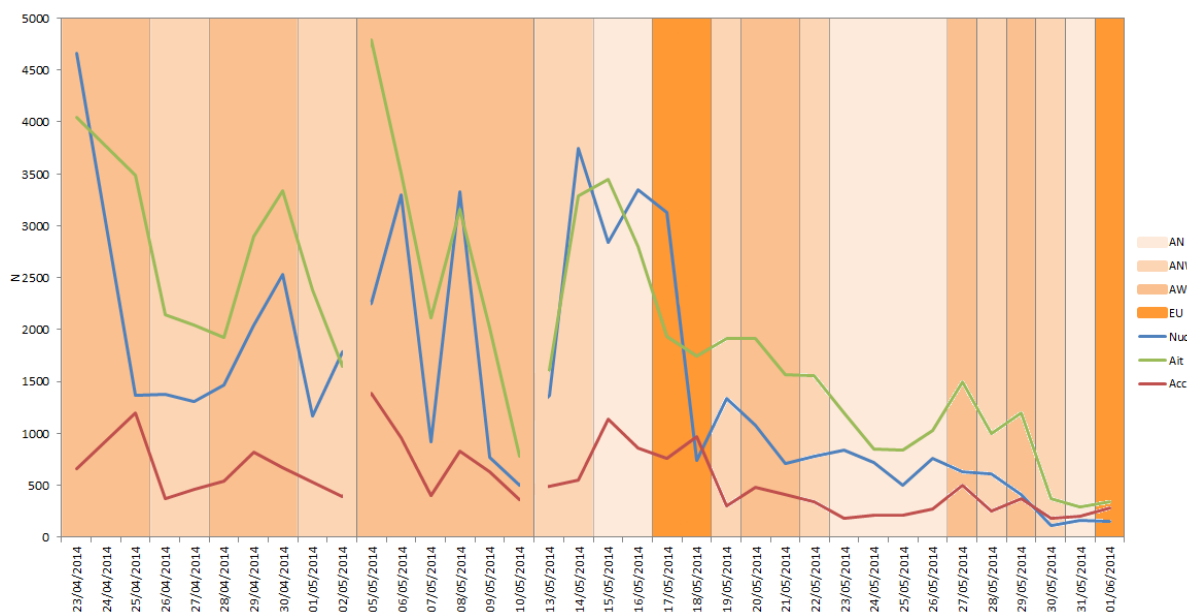


Figure 74. Temporal variation (on a daily basis) for the number of particles of nucleation, Aitken and accumulation modes during the first sampling campaign (in spring).

During this period (first campaign), most air mass backward trajectories corresponded to the Atlantic Ocean (Fig. 75): West (15), Northwest (10) or North (7) Atlantic. It had a European backward trajectory from the continent for three days only. No significant (95%) differences were found between means for each backward trajectory and any size range, although for Aitken mode differences were significant at a significance level of 0.10 ($p = 0.081$).

For this mode, the Atlantic-West backward trajectory led to the highest mean (2549 cm^{-3}), whereas the lowest mean for Aitken corresponded to air masses from Europe (1339 cm^{-3}). For the latter backward trajectory, Aitken and nucleation had the same mean, whereas for other air mass paths, Aitken was the most abundant mode. Aitken was the mode with the highest number of particles in almost all days (29 out of 35), whereas accumulation mode was the one with the smallest number of particles in 31 days.

Two of the cases for which nucleation (instead of accumulation) had the lowest N value, coincided with two of the three European backward trajectory days. This backward trajectory implies long-distance transport, during which the accumulation processes occur, increasing the accumulation fraction [Gietl and Klemm, 2009].

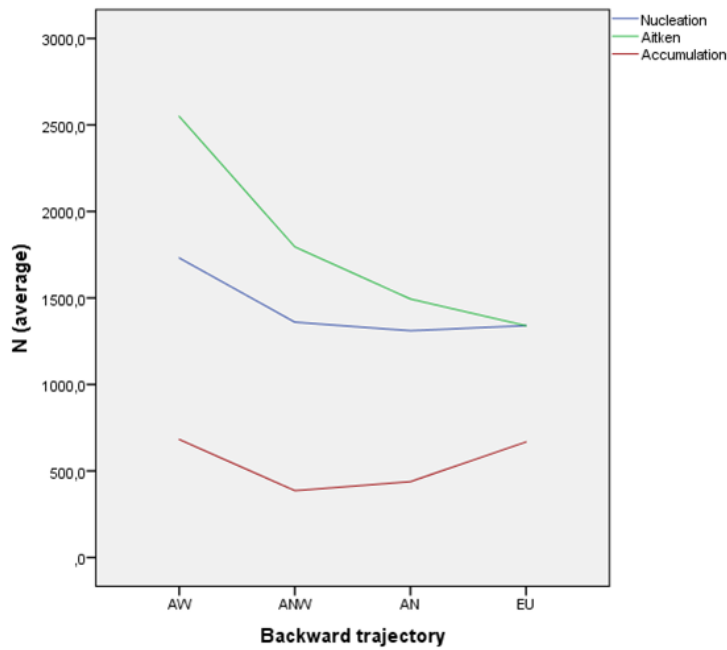


Figure 75. Relationship between the number of particles (nucleation, Aitken and accumulation modes) and backward trajectories.

Contributions of each mode to the total number of particles in terms of percentage showed opposite profiles for nucleation and Aitken modes, which are dominant (Fig. 76). Accumulation mode contributed only between 7 and 20% in most cases. Only on May 18th (European backward trajectory) and the last three days of the sampling campaign (including again one with European backward trajectory) it contributed up to 36% of the total number of nanoparticles. As commented before, particles in accumulation mode can suffer long-range transport and an increase of accumulation rate was observed after backward trajectories from Europe.

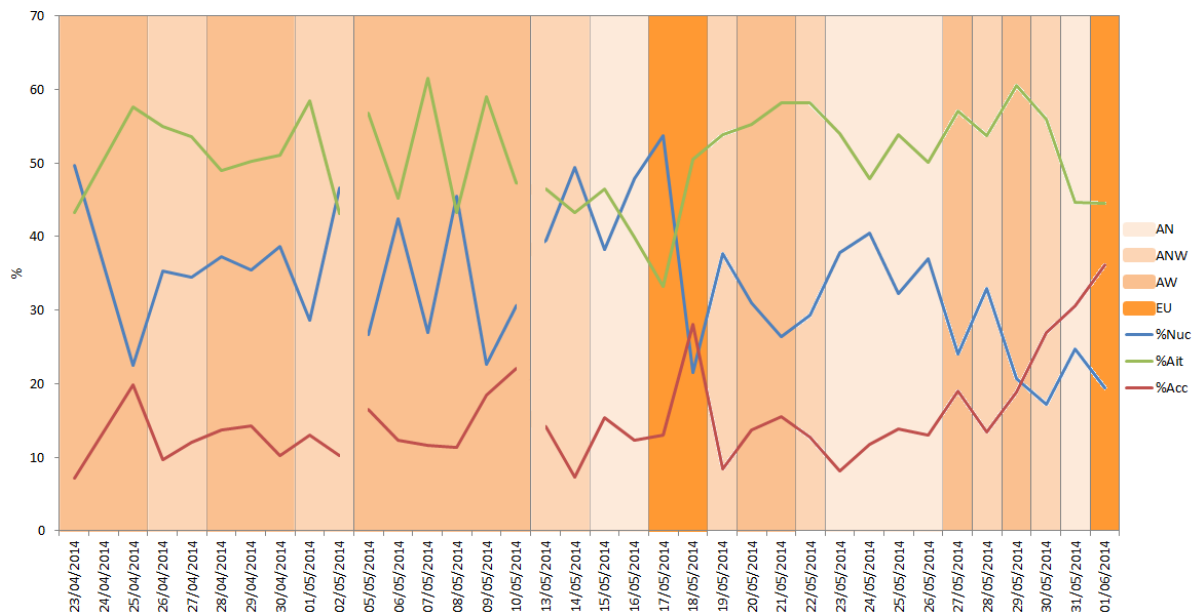


Figure 76. Temporal variation (on a daily basis) for the percentage of nucleation, Aitken and accumulation modes during the first sampling campaign (in spring).

For nanoparticles, a correlation between the different modes (nucleation, Aitken and accumulation) was found, especially strong between Aitken and the other two fractions (Table 34a). Strong correlations were found between the total number of nanoparticles (sum of the three modes) and each fraction, especially at the smallest size ranges (Pearson's coefficients of 0.934, 0.960 and 0.800 with nucleation, Aitken and accumulation, respectively, with $p < 0.001$). The nucleation mode does not encompass primary exhaust emissions [Kumar *et al.*, 2010]. Therefore, a high correlation between Aitken with nucleation ($r = 0.81$) indicates that in Aitken mode, the contribution of nucleation was more important than primary sources. A lower correlation between nucleation and accumulation ($r = 0.59$) suggests a higher contribution of primary sources in accumulation mode.

Significant correlations between %Nucleation and both %Aitken ($r = -0.723$, $p < 0.001$) and %Accumulation ($r = -0.720$, $p < 0.001$) were recorded. Rates of Aitken- and accumulation-mode particles did not correlate between them. The total number of nanoparticles showed positive correlation with the nucleation rate ($r = 0.577$, $p < 0.001$) and negative correlation with the other two fractions ($r = -0.354$, $p = 0.037$ with %Aitken and -0.480 , $p = 0.004$ with %Accumulation).

The interrelations of the three modes and their rates with carbonaceous fractions, nitrogen, sulfur and ions measured in PM₁₀ were studied. Vanadium concentrations in PM₁₀ were also included in the table of correlations to support some of the results. The three modes correlated with carbonaceous fractions (Table 34b). All the nanoparticle fractions (nucleation, Aitken and accumulation) correlated with TC, OC, EC and WSOC. The temporal profile of elemental carbon (black carbon) was quite similar to the Aitken mode profile (Fig. 77). Until May 20th the maximum values seemed to be more pronounced for EC than in the case of N(Aitken). The isotopic $\delta^{13}\text{C}$ also correlated with the two lower fractions of nanoparticles, but in these cases it was a negative correlation.

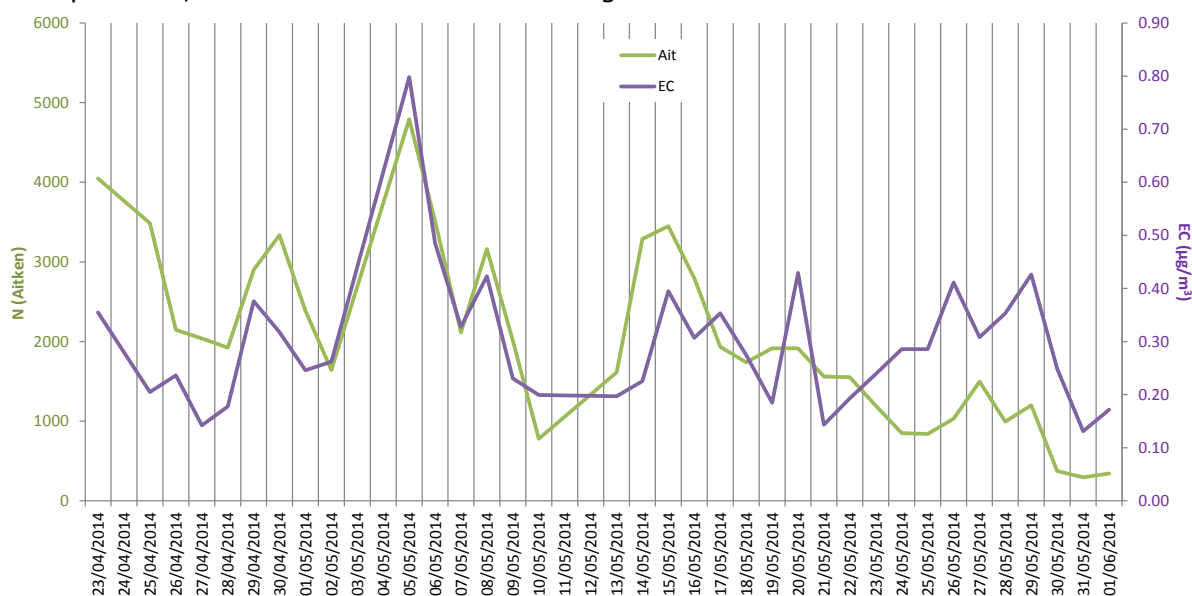


Figure 77. Temporal variation (on a daily basis) for the number of particles of Aitken mode (left axis) and EC in PM₁₀ (right axis) during the first sampling campaign (in spring).

Table 34. Correlations for nanoparticles with a) gases, metals and meteorological parameters, and b) PM₁₀, carbonaceous fractions, N, S and major ions.

a)

	Nuc	Ait	Acc	Nt	%Nuc	%Ait	%Acc	SO ₂	CO	O ₃	Wind dir.	Humidity	Solar radiation	Prec.	T (°C)	V	Fe
Nuc	1	.806**	.589**	.934**	.782**	-.586**	-.543**	-.744**	-.040	-.051	.310	-.435*	.192	.297	.414*	.000	.233
Ait		1	.834**	.960**	.389*	-.105	-.457**	-.561*	-.060	-.082	.290	-.111	-.131	.241	.235	.299	.005
Acc			1	.800**	.137	-.160	-.038	-.585*	.149	-.107	.331	-.151	-.048	.033	.401*	.464**	.145
Nt				1	.577**	-.354*	-.480**	-.674**	-.028	-.073	.325	-.280	.025	.259	.359	.198	.134
%Nuc					1	-.723**	-.720**	-.528*	-.057	.196	.203	-.607**	.324	.180	.285	-.332	.233
%Ait						1	.041	.783**	-.461	-.124	-.233	.612**	-.552**	-.039	-.467**	.196	-.383*
%Acc							1	.025	.427	-.140	-.064	.276	.087	-.229	.056	.283	.047

b)

	PM ₁₀	OC	EC	TC	WSOC	δ ¹³ C	δ ¹⁵ N	N	S	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	ssSO ₄ ²⁻	nssSO ₄ ²⁻	NH ₄ ⁺	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
Nuc	.336*	.604**	.368*	.632**	.392*	-.610**	-.001	-.08	.146	.073	.242	0.209	.158	.173	-.01	.000	.158	0	0.11
Ait	0.248	.500**	.537**	.578**	.524**	-.427*	-.04	-.09	.138	.016	.241	.224	.075	.209	.021	.035	.075	0.04	0
Acc	0.253	.580**	.542**	.651**	.650**	-.218	.182	0.28	.363*	-.260	.075	.425*	-.138	.469**	.340*	-.03	-.138	0.02	-.01
Nt	0.311	.599**	.496**	.658**	.507*	-.521**	0.003	-.04	.182	.009	.239	.260	.094	.241	.006	.012	.094	-.0	0.09
%Nuc	0.326	.415*	.125	.402*	0	-.384*	-.027	-.31	-.092	.292	.305	-.03	.320	-.113	-.399*	.029	.320	-.01	0.21
%Ait	-.369*	-.460**	.004	-.414*	-.018	0	-.151	-.022	-.351*	.046	-.035	-.347*	-.013	-.320	-.013	.064	-.013	0.2	-.026
%Acc	-.100	-.14	-.184	-.17	-.15	.243	.545**	.671**	.486**	-.469**	-.406*	.393*	-.328	.486**	.710**	-.106	-.328	-.0	-.03

**Correlation is significant at a significance level of 0.01 (bilateral), * Correlation is significant at a significance level of 0.05 (bilateral).
Nuc: Nucleation mode; Ait: Airken mode; Acc: Accumulation mode; Wind dir.: Wind direction; Prec.: Precipitation.

**Correlation is significant at a significance level of 0.01 (bilateral), * Correlation is significant at a significance level of 0.05 (bilateral).
Nuc: Nucleation mode; Ait: Airken mode; Acc: Accumulation mode.

When relationships were studied based on wind directions, the correlation for Aitken and accumulation with EC was maintained for all directions. In contrast, nucleation correlated with EC only for the SSE ($r = 0.74$) and SSW ($r = 0.66$) wind directions, while for the WSW there was no significant correlation ($r = 0.12$). Correlations with vanadium followed the same pattern ($r = 0.32$ for the SSE, $r = 0.30$ for the SSW and $r = 0.01$ for the WSW), which may suggest that EC and V were emitted together, probably from a power plant and/or a solid waste incinerator (both in the SSW direction). These emissions may include several precursors that finally were converted into nucleation particles. Both power generation and incineration had been reported as sources of vanadium in ultrafine particles [Sanderson *et al.*, 2014].

On the contrary, no correlation was found between nitrogen (TN or $\delta^{15}\text{N}$) and no nanoparticle mode. For sulfur, only the accumulation fraction showed significant correlation with total sulfur, total sulfate and non-sea salt sulfate, while sea salt sulfate did not correlate with nanoparticles.

No contribution of sea salt in nanoparticles was observed, as there was no correlation of any fraction with tracers such as Na^+ , Cl^- or ssSO_4^{2-} (while accumulation presented correlation with nssSO_4^{2-}). This result was expected, as sea salt usually contributes to the coarse fraction of particulate matter [Guevara, 2016]. Correlation of accumulation mode with nssSO_4^{2-} (mostly secondary sulfate) can be explained by the relation of secondary aerosol with accumulation particles, as both are formed with aerosol ageing.

Concentrations of gaseous SO_2 showed negative correlation with all the modes, especially with nucleation ($r = -0.744$, with -0.561 and -0.585 for Aitken and accumulation, respectively), and with the total number of particles ($r = -0.674$). This is related to the fact that SO_2 is converted to particle as sulfuric acid, decreasing its concentrations in gas phase and increasing the nucleation mode. The negative correlation for other modes is due to the conversion of finer particles originated from SO_2 to Aitken or accumulation modes. Regarding the correlation with the rates of each size range, a negative correlation was maintained with nucleation ($r = -0.528$), while for the Aitken rate a highly positive correlation ($r = 0.783$) was found. The accumulation rate did not show any significant correlation with SO_2 concentration. Finally, the particles resulting from gas-particle conversion of SO_2 caused a rate increase of Aitken mode (positive correlation). Besides, the nucleation mode had a positive correlation with non-sea salt sulfate, which could be part of its composition (Table 34b).

CO concentrations correlated negatively with %Aitken ($r = -0.461$) and positively with %Accumulation ($r = 0.427$), but once again with a significance level of only 0.10 (because there are data of CO for 18 days only).

Correlations between nanoparticles and meteorological parameters were explored. Mean temperature showed correlation with nucleation, accumulation and the total number of particles ($r = 0.414$, 0.401 and 0.359 , respectively). It did not correlate with N(Aitken), but it did with the rate of Aitken, obtaining a negative correlation ($r = -0.467$), whereas neither nucleation, nor accumulation rates correlated with temperature.

A negative correlation (-0.552 , $p = 0.002$) was found between the rate of Aitken particles and solar radiation. Solar radiation had a lower, less significant and positive correlation (0.324 with $p = 0.081$) with the nucleation rate. On the contrary, humidity had a positive correlation with the rate of Aitken (0.612 , $p < 0.001$) and a negative correlation with the nucleation rate (-0.607 , $p < 0.001$). Neither solar radiation, nor humidity correlated with the accumulation rate. Therefore, an increase of humidity and decrease of solar radiation favored the conversion of nucleation in Aitken mode by coagulation. It is known that nucleation can be produced by photochemical mechanisms.

Regarding correlations with number of particles, only the nucleation mode had a negative correlation with humidity (-0.435 , $p = 0.016$). Nucleation, accumulation and the total number of particles correlated slightly (about 0.3 at a significance level of 0.10) with wind direction. Although the differences between mean values for each direction were not significant (because of the small amount of data), it was clear that the two points with the WNW ($300-310^\circ$) wind direction led to the highest mean for N of all modes. This direction corresponds to the near medium-sized city of A Coruña. In addition, the relative weight of nucleation mode in total N was clearly increased with this wind direction (equalizing the contribution of the Aitken mode to the total), while the contribution of the other two fractions decreased. No significant correlations were found between other meteorological parameters (wind speed, ozone concentrations and precipitation) with any nanoparticle size range or their rate.

8.3.2. SOURCE APPORTIONMENT

This section focuses on the source apportionment. Starting from data for all the determined components (values, interrelationships and trends) a discussion is performed in order to identify possible sources. Next, a positive factorization model is used to complete the apportionment.

• Identification of sources

The previously commented contribution of diverse seasonal WSOC sources is reinforced by different correlations with the major cations (potassium, ammonium and sulfate). In summer, WSOC correlated with marine sulfate ($r = 0.47$) and sodium ($r = 0.47$), which suggested that a part of WSOC was formed from marine organic aerosol [Ceburnis *et al.*, 2011]. WSOC correlated with EC (around 0.6 , Table S1, *see pag. 265-269*), a tracer of incomplete combustion of fossil-fuels and brake wear [Querol *et al.*, 2013], indicating the input of this anthropogenic sources. Except for spring, WSOC correlated with K, showing the influence of biomass combustion or use of residential wood burning.

Despite the fact that potassium may be also of marine origin, correlations with ssK and nssK were analyzed to verify if combustion was the main source. Low correlations were found between marine K and WSOC, whereas WSOC correlated moderately with nssK ($r = 0.5-0.7$ in summer, autumn and winter).

Furthermore, its correlation with non-marine sulfate showed the contribution of WSOC to secondary aerosol. In winter, correlations with ammonium, enrichment in ^{15}N and depletion in ^{13}C indicate a strong contribution of secondary processes (Table S1, see pag. 265-269).

In general, opposite trends were observed for OC/EC ratio and rate of soluble organic carbon (Fig. 78). Higher OC/EC ratios may be related to a high contribution of biogenic sources, which explain the highest values found in spring. On the other hand, %WSOC/OC is linked to aerosol ageing, with increasing values as secondary organic aerosol (SOA) content increases. Therefore, it makes sense that in spring, with higher contributions from primary biogenic sources, the share of SOA (%WSOC) had less importance (i.e. lower levels). On the contrary, when the biogenic contribution is low, most of the organic aerosol mass is SOA, leading to high %WSOC.

The low presence of SOA in spring was also supported by the $\delta^{13}\text{C}$ data, which are also related to aerosol photochemical ageing. SOA is enriched in the heavier isotope and, therefore, higher $\delta^{13}\text{C}$ values have been found for oxidized aerosol [Prada-Rodríguez *et al.*, 2014; Kunwar *et al.*, 2016; Fisseha *et al.*, 2009]. In spring, $\delta^{13}\text{C}$ values were significantly lower than in the other seasons, indicating less presence of SOA.

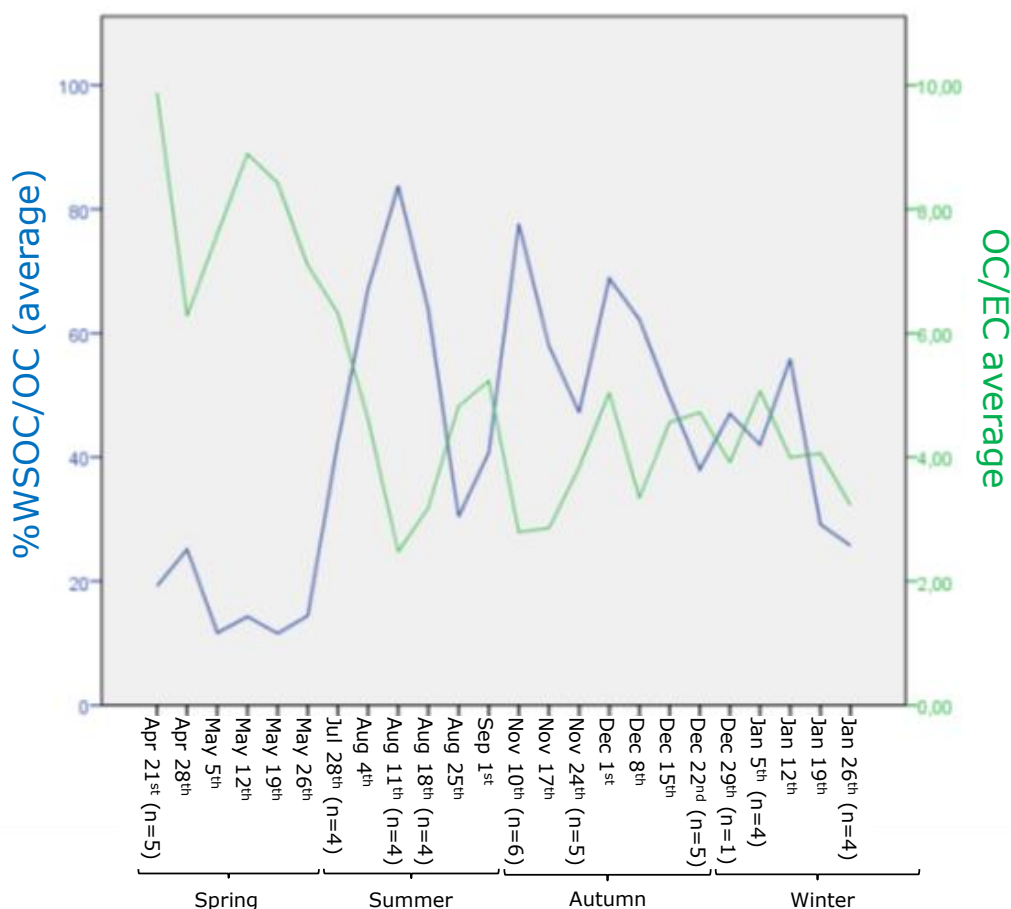


Figure 78. Temporal variation (on a weekly basis) of the WSOC/OC percentages and OC/EC ratios.

$\delta^{13}\text{C}$ values also agree with the low presence of carbonate, as high values (-15 to -18‰) have been associated with this carbonaceous constituent [Kunwar *et al.*, 2016] and, in this case, values were significantly lower. Plotting $\delta^{13}\text{C}$ vs %C was used for source apportionment [Widory *et al.*, 2004]. This diagram (Fig. 79) shows that diesel was the main source, although in many samples, it was mixed with domestic fuel oil. These samples were gathered in summer, whereas the results with the most negative values (indicating less presence of SOA) were gathered in spring, when the high biogenic input reduces the secondary contribution to total aerosol.

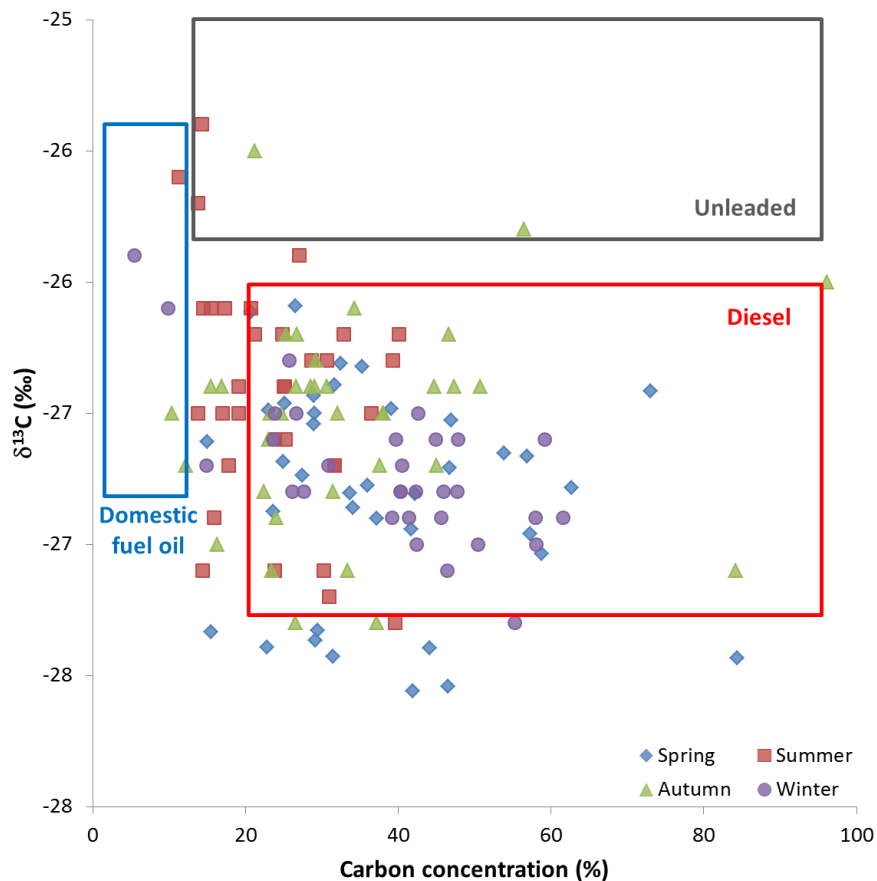


Figure 79. Tracing of sources by stable carbon isotopes.

Plotting $\delta^{13}\text{C}$ vs $\delta^{15}\text{N}$ (Fig. 80), similar results were observed, but new information on biogenic sources and agricultural activities was obtained. Most samples seem to have a strong contribution from fuel-oil and diesel combustion, especially in autumn (97% of the samples collected in autumn had values corresponding to these sources). Therefore, despite taking into account nitrogen, fuel-oil seems to have a higher weight than diesel, domestic fuel burning still seems to be the main source in the sampling area. In this diagram, the contribution of biomass (both natural emissions from the vegetation and biomass burning) is included. Several samples, mainly from spring and summer, but also from winter, had high vegetation contribution. This source could be observed for 26-36% of the samples gathered in spring, summer and winter. In addition, in spring, most samples were around the limit values of biomass, which suggests a strong contribution of vegetation in this period, even when mixed with other sources.

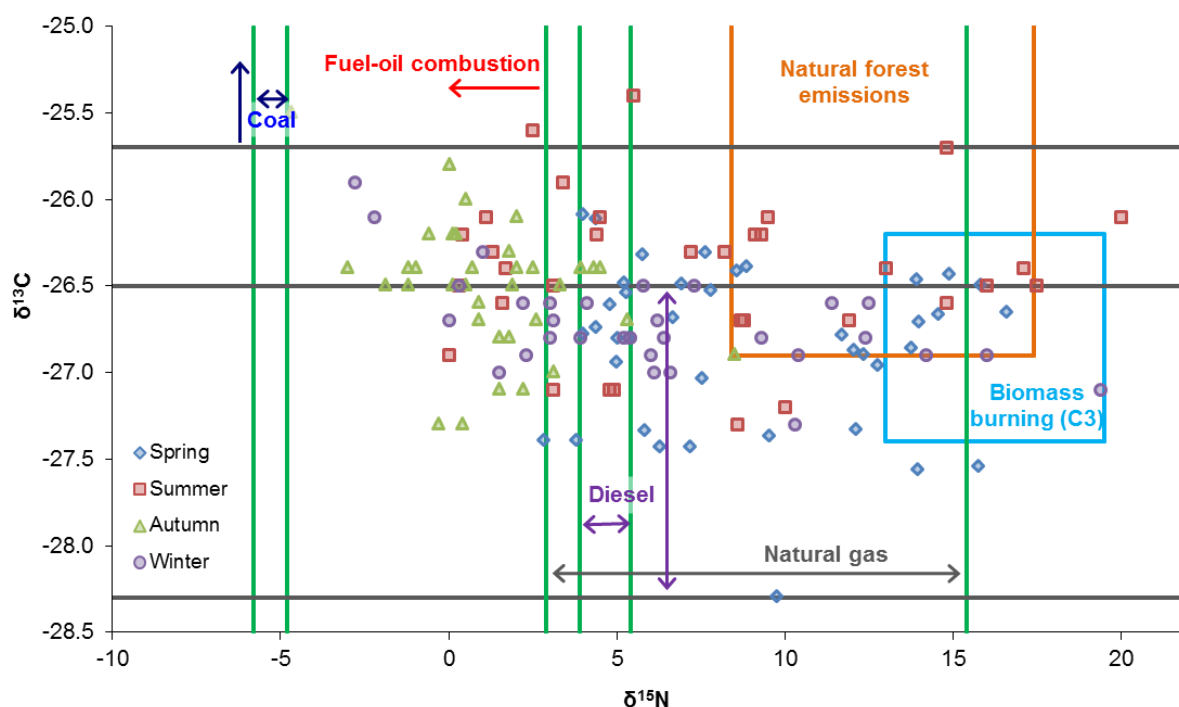


Figure 80. Tracing of sources by plotting $\delta^{13}\text{C}$ versus $\delta^{15}\text{N}$ with signed level of potential sources. Data of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ adapted from Górká et al., 2008 (coal); Górká et al., 2012 (diesel); Martinelli et al., 2002 (natural forest); Turekian et al., 1998 (biomass burning); Widory et al., 2004 (gasoline) and Widory, 2007 (natural gas, coal, gasoline, diesel, fuel oil).

• Source apportionment by **Positive Matrix Factorization (PMF)**

In order to confirm the identification of sources and to note the contribution of each of them to PM_{10} , the *Positive Matrix Factorization* model was applied. For a PMF analysis, the input concentrations below limit of detection were approximated by $\text{LOD}/2$, while uncertainties of all data were calculated according to Polissar et al. (1996). This method and a similar variation have been reported as valid methods for the calculation of uncertainties for PMF and they are widely used for this purpose [Reff et al., 2007].

The ultimate input species were the following: PM_{10} (as the total variable; it has an average of 76.5% of the mass characterized), OC, EC, As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Pb, Rb, Sb, Sn, Sr, Ti, V, Zn, Al, Ca, Fe, K, Mg, Na, Cl^- , NO_3^- , NH_4^+ , S and CO_3^{2-} . All of them were considered strong species in the model, except for PM_{10} (as the total variable); carbonate, which is a calculated species (with higher uncertainty); and copper, which distorted the results by mixing factors, unless it was considered a weak species. The other determined metals (Cs, La and Se) were dismissed in the model as they had a lot of values below LOD (up to 86% for Se) and poor S/N values. An extra modeling uncertainty of 9% was applied. Constraints related to the ion balance were added to the PMF model in order to eventually obtain a better and more realistic solution.

Results were explored by analyzing Q values, distribution of residuals, G-space plots, observed/predicted scatter plots and observed/predicted time series. Robust solutions were obtained, with similar results when applying small changes to the model. Finally, the best obtained solution involved 6 factors: sulfate, nitrate, sea salt, combustion, mineral and industrial. The profiles of the factors, their temporal series and their contribution to PM₁₀ are presented in Fig. 81-83. The biogenic contribution to PM₁₀, previously identified from isotopic data, could not be obtained as a separate factor, probably due to the absence of specific markers between the input species.

The secondary aerosol had a major contribution to PM₁₀, with two factors (ammonium sulfate and nitrate) that contributed together to almost half of the characterized mass of PM. Sea salt was also of great importance, contributing with 22.5% to the total PM₁₀. As significant concentrations of sulfate and nitrate were present in this factor, an aged sea salt factor, also containing secondary aerosol, was taken into account. Sea salt contributed to PM₁₀ to a larger extent in winter and spring (with a particularly low contribution in summer), while the sulfate factor played a greater part in the warm period (spring and summer). Nitrate weight seemed to be more constant during the sampling period, with similar contributions in all seasons.

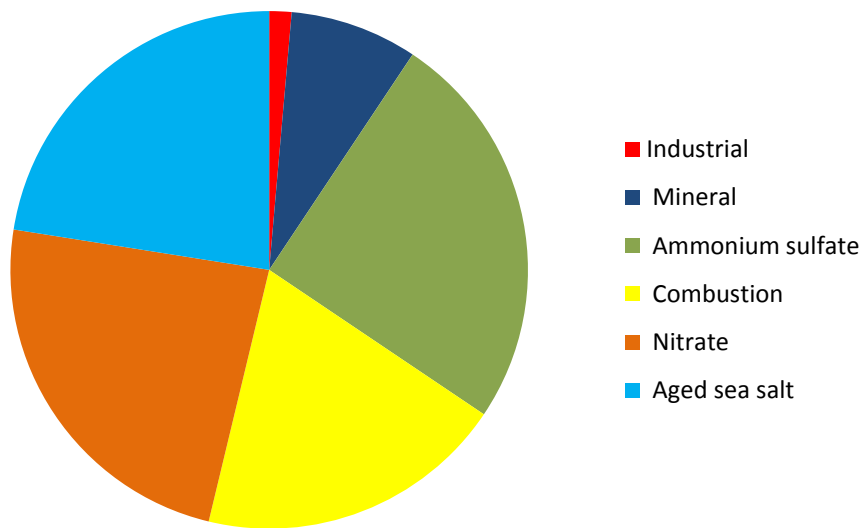


Figure 81. Contribution of each factor to PM₁₀.

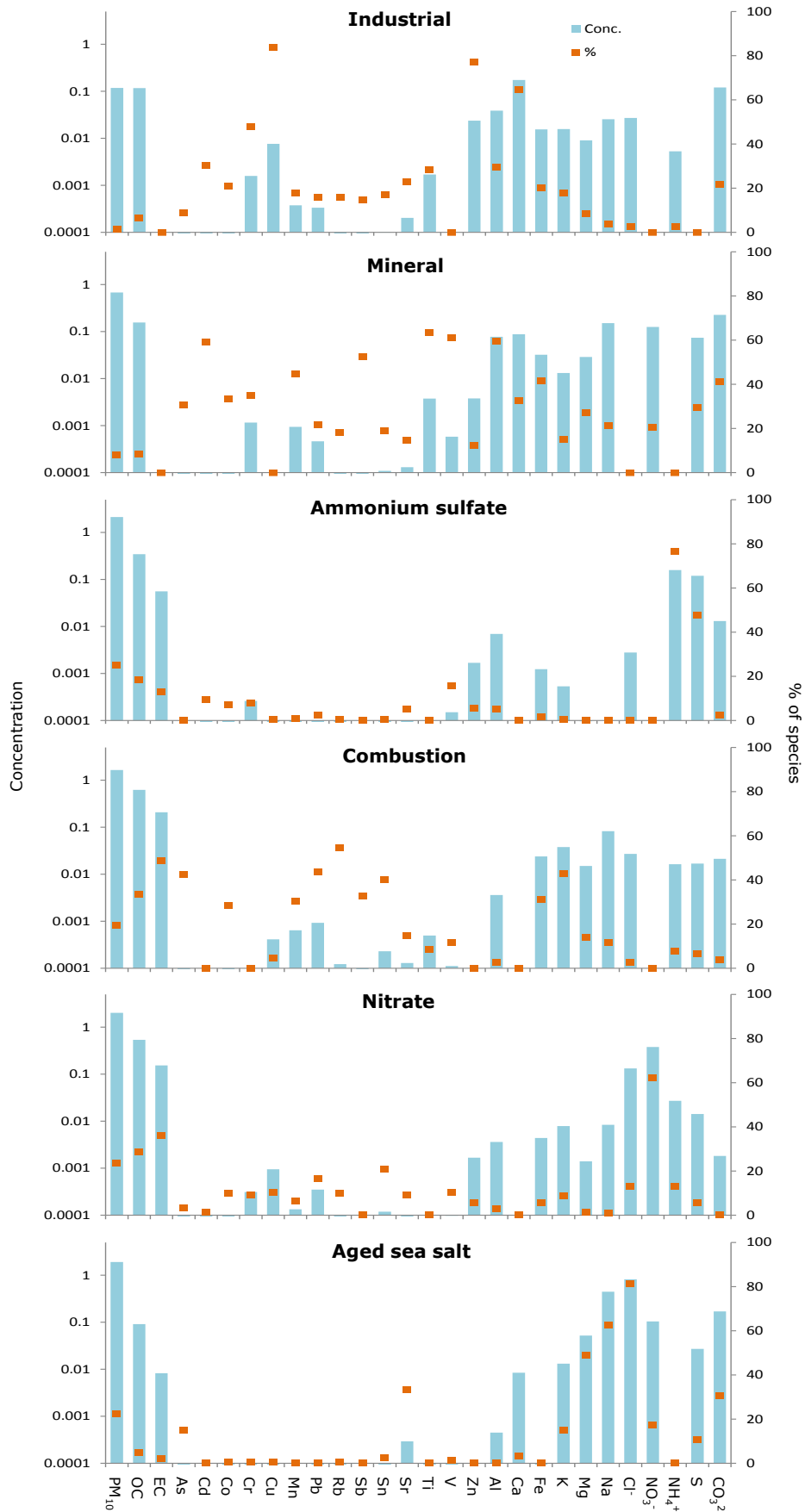


Figure 82. Factor profiles obtained for the PMF model.

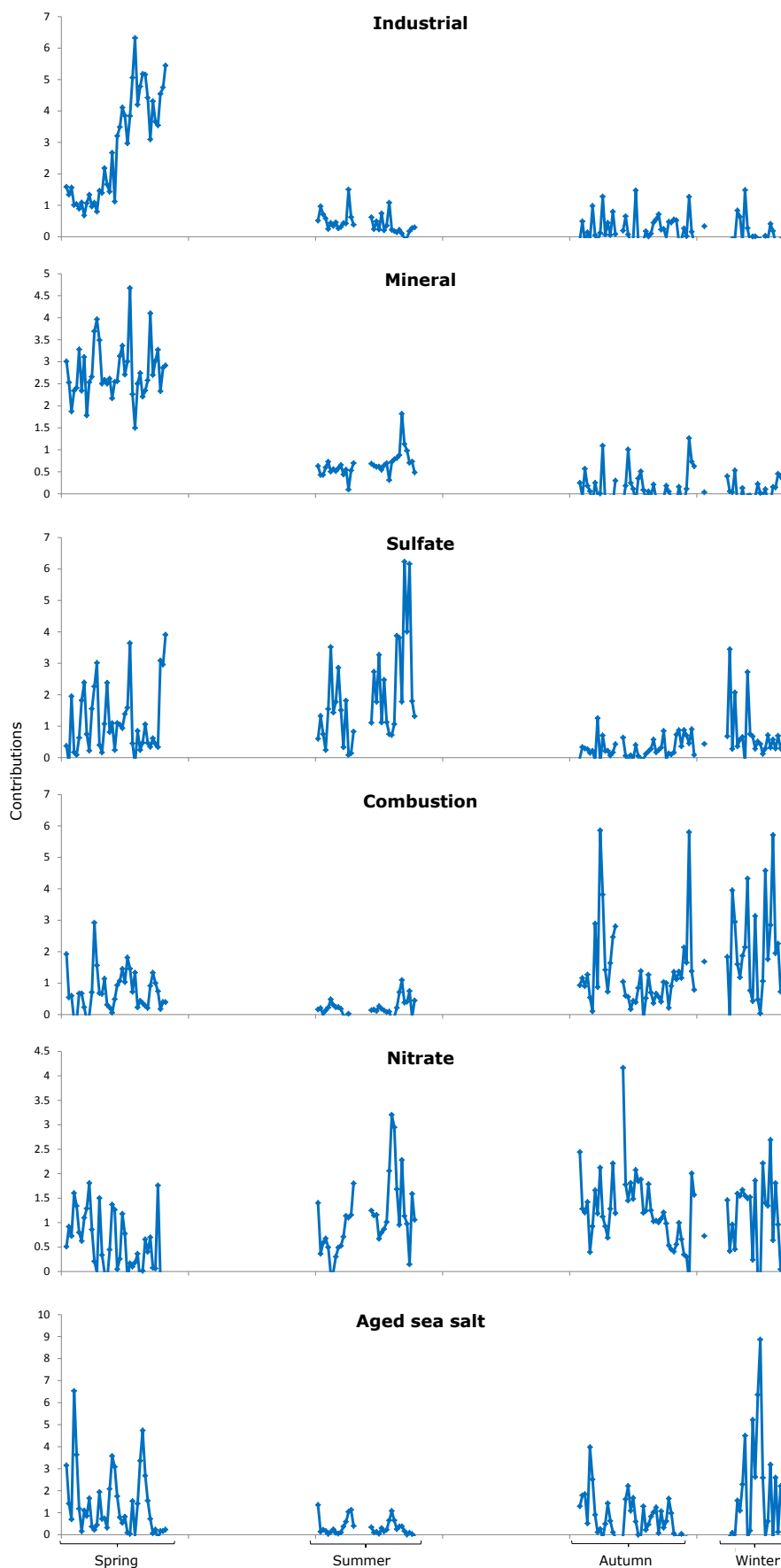


Figure 83. Temporal variation according to the contribution of each factor.

Another main factor (accounting for 19.3% of total PM₁₀) was identified as fossil-fuel combustion. This was a challenging factor, with high concentrations of OC, EC and sodium, along with other species such as Cl⁻, K, Fe and Mg. It was characterized by a lot of species (Rb, EC, K, Pb, Sn, As, Fe, Sb, OC, Mn and Co) and it seemed to be a mixture of sources. The high levels of OC and EC, which were also markers of the factor, suggested combustion as a source. Despite the fact that some of the markers could be related to industrial sources too, the fossil-fuel combustion must be the origin of this factor. Due to the high importance of this factor in PM₁₀, the fact that another industrial factor had been identified, and considering the characteristics of the sampling site, this factor was assigned to combustion sources. Some of the markers (OC, EC, Fe, Mg, K, Pb) are associated with traffic, including non-exhaust emissions (Sn, Fe and Sb are markers for brake wear) [Sanderson *et al.*, 2014]. Arsenic and rubidium, which usually have crustal origin, could be also related to traffic (road dust).

Nevertheless, traffic in the sampling site is increased in summer due to the beaches in the area, and this factor had its highest concentrations during the cold period, with low levels in summer. For this reason, fossil-fuel combustion in the cold period (which had already been identified with isotopic data) seemed to be the main origin of this factor, although traffic may have contributed too.

Besides, the high levels of potassium suggested a possible contribution of biomass burning. Therefore, this factor is probably a mix of combustion sources, dominated by domestic fossil-fuel combustion, but with the contribution of traffic and biomass burning. These sources could not be split by increasing the number of factors in the model.

The last two factors had a low contribution to PM₁₀. One of them had been identified as a mineral, since it was characterized by aluminium, titanium, vanadium and cadmium, with high concentrations of calcium and carbonate. The importance of this factor is higher in the warm period, especially in spring. The last factor had a very low weight in total PM₁₀, also with a higher contribution during spring. This factor was characterized by copper, zinc and calcium, with relatively important concentrations of OC, carbonate, chloride, ammonium and several metals (Ca, Al, Zn, Fe, K, Na, Mg, Cu).

Taking into account this profile and its very limited contribution to total PM₁₀, this factor was identified as an industrial source. The power plant and/or the solid waste incinerator that were previously identified as possible sources of contamination of the sampling site could be related to this factor. To reinforce this possibility, they are placed to the South of the sampling site and most of the predominant winds from the South were recorded in spring and summer, when the weight of this factor is higher (although very limited in any case).

Estimation of random and rotational errors with bootstrap and displacement methods, and the combination BS-DISP was performed. No swaps between factors were produced neither during the application of displacement nor during that of BS-DISP. In general, for the percentage values of each species, narrow ranges for most species were obtained in all factors, although the least important in PM₁₀ (mineral and industrial) had

slightly wider ranges. Regarding the concentrations of each species in each factor, wider ranges were obtained (Fig. 84), but the main species of each factor usually fell in the middle of the ranges, with no significant over- or underestimations. In general, ions had the widest ranges in most factors with all the error estimation methods.

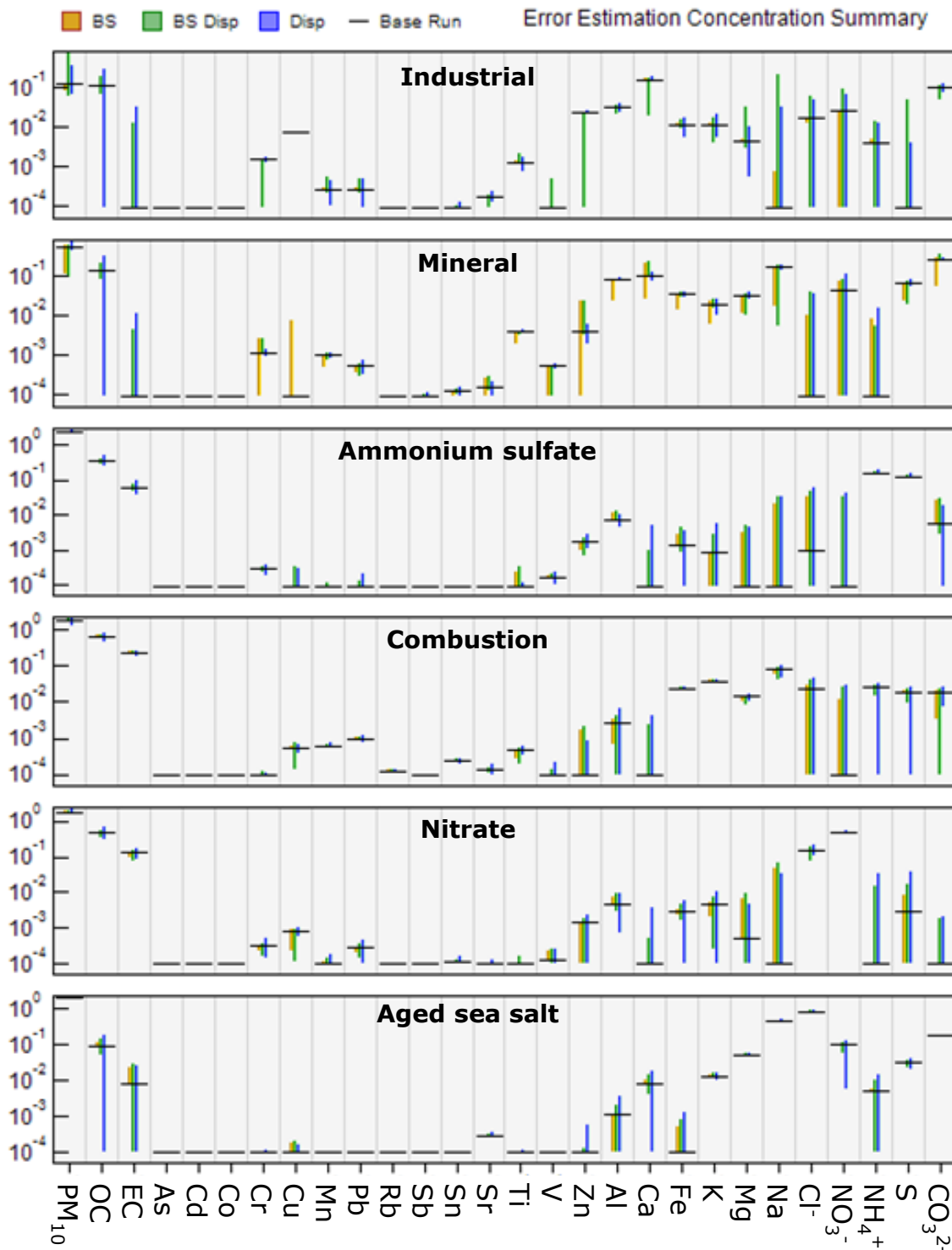


Figure 84. Error estimation summary of PMF results in the concentration of every species in each factor.

A possible underestimation of the counter-ions in the sulfate and particularly in the nitrate factors was suggested by error estimation, but this issue was corrected with the constraints. Besides, some possible variations that do not affect the assignment of sources could be observed. Some species (EC, Na, S, V and Mg) may be underestimated in the industrial factor. A higher presence of EC and V would agree with the industrial activities proposed as origin (power plant and incinerator). In the same factor, some species could be overestimated in the final solution. In the mineral factor, a slightly underestimation of calcium (in any case with a relatively narrow range) could have been performed, while vanadium could have been slightly overestimated.

8.4. CONCLUSIONS

For the characterization of 140 daily PM₁₀ samples collected from April 2014 to January 2015 in a suburban area of Northwestern Spain, several components, including carbonaceous fraction, stable isotopes, major ions and trace metals were determined, and meteorological and sub-micron particles data were also considered.

Total PM₁₀ levels were lower than in previous years, with a mean value of 9 µg/m³. Seasonal variations were observed for different parameters, with the highest levels of carbonaceous matter in winter, whereas nitrogen (and NH₄⁺) and sulfur (and SO₄²⁻) presented more significant concentrations in the warm period, as observed for PM₁₀. Some metals also presented higher levels in spring and summer. On the contrary, most metals and calcium and chloride ions followed the same trend as OC and TC, with higher concentrations in winter-spring. OC was the main component of the carbonaceous fraction in PM, controlling the temporal profile and presenting a very high correlation with TC, while the correlation between EC and TC showed seasonal variation in both slope and intensity. The correlations between OC and EC fit to a potential equation only in winter, whereas OC/EC vs EC plot also presented seasonal variations, in spring behaving as a rural site and with traffic influence in autumn and winter. In summer, additional sources were present, as the plot did not fit to a potential equation.

Metals correlated positively between them in the warm period, but fewer correlations were present in autumn and winter. Most metals showed positive correlation with OC and TC in spring, and negative with WSOC, with fewer correlations during the other seasons.

Two main contributions to PM₁₀ at the sampling site were sea salt and secondary aerosol. Because of the location of the sampling site, there is an expectable high marine contribution from the Atlantic Ocean, and a good correlation between Na⁺ and Cl⁻ was found, especially in winter. Sea salt levels contributed up to 84.5% to PM₁₀ (19.1% on average), the contribution being even a little more significant than that recently reported for Porto (Portugal), also with a high Atlantic influence. The great importance of secondary aerosol was suggested by the high percentage of WSOC (related to aerosol ageing) in OC (mean around 40%) and relatively high concentrations of SIA ions. The SIA species identified by correlations were: ammonium sulfate (all seasons), sodium nitrate (except in autumn) and potassium sulfate (except in spring), along with Na₂SO₄ and KNO₃ in

summer. In spring, due to the higher input of biogenic OC, the contribution of SOA was more limited, as observed in the WSOC and $\delta^{13}\text{C}$ values.

A mean value of $-26.7 \pm 0.8\text{‰}$ for $\delta^{13}\text{C}$ was obtained, with a very narrow range of variation. It was a relatively low value that could be linked to the vegetation (*Eucalyptus*) present in the surrounding area of the sampling site. For $\delta^{15}\text{N}$, a mean value of $6.0 \pm 5.3\text{‰}$ and a higher variation were found, suggesting the presence of different sources contributing to the total nitrogen.

Phthalates were analyzed by IT-SPME in fourteen selected samples with different profiles. They were determined in WSOC, and therefore the obtained levels ($8\text{--}53 \text{ ng/m}^3$) were a little lower than those obtained for organic extracts of PM from a suburban area. Only DBP (sum of di-n-butyl- and diisobutyl-phthalates), DEP and DEHP were detected in WSOC, with DBP being the major compound. Higher concentrations of phthalates were found in the warm period than in the cold period.

The highest numbers of particles were observed for the Aitken mode, whilst the accumulation mode corresponded to the lowest numbers in most days. Accumulation seemed to increase with long-range transport in days with dominant European backward trajectories. In addition to strong correlations between them, nanoparticle modes showed a correlation with all the carbonaceous fractions and some meteorological parameters related to their formation. The different correlations found with EC and V, according to the wind directions, suggested that the power plant and/or the solid waste incinerator located in the SSW direction were possible sources when the wind blows from that direction. Another medium-range possible source suggested by the correlations between nanoparticles was the city of A Coruña, which produced an increased number of particles (especially of nucleation mode) with the WNW wind direction.

Exploring the possible sources in more detail, the values of $\delta^{13}\text{C}$ suggested a high contribution of vegetation in spring, while $\delta^{15}\text{N}$ data indicated a significant input from domestic heating during the cold period and the importance of nitrate with marine origin. From the plots of isotopic results, the combustion sources (fuel oil and diesel) seemed to be of high importance in the cold period, probably due to domestic heating, and primary biogenic input was suggested as a probable source during spring. OC/EC ratios and WSOC values agreed with this conclusion. The application of the PMF model led to the identification of 6 factors, assigned as ammonium sulfate, nitrate, aged sea salt, fossil-fuel combustion, mineral and industrial. The high importance of the secondary aerosol (with two factors accounting for 49% of PM_{10}) and the clear marine influence (with the sea salt factor contributing 22.5%) was confirmed. In addition, the fossil-fuel combustion (already identified with isotopic data), which may be of domestic origin with a possible additional contribution from traffic and biomass burning, accounted for 19.3% of total PM_{10} , with a higher level in the cold period. Mineral and industrial factors had a lower weight over total PM.

8.5. REFERENCES

- Almeida S. M., Pio C. A., Freitas M. C., Reis M. A., Trancoso M. A. Source apportionment of fine and coarse particulate matter in a sub-urban area at the Western European Coast. *Atmospheric Environment*, 39 (2005) 3127–3138.
- Alves C. A., Gonçalves C., Mirante F., Nunes T., Evtuygina M., Sánchez De La Campa A., Rocha A. C., Correia Marques M. Organic speciation of atmospheric particles in Alvão Natural Park (Portugal). *Environmental Monitoring and Assessment*, 168(1-4) (2010) 321–337.
- Amato F., Alastuey A., Karanasiou A., Lucarelli F., Nava S., Calzolari G., Severi M., Becagli S., Gianelle V. L., Colombi C., Alves C., Custódio D., Nunes T., Cerqueira M., Pio C., Eleftheriadis K., Diapouli E., Reche C., Minguillón M. C., Manousakas M.-I., Magoos T., Vratolis S., Harrison R. M., Querol X. AIRUSE-LIFE+: a harmonized PM speciation and source apportionment in five southern European cities. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 16 (2016a) 3289–3309.
- Amato F., Lucarelli F., Nava S., Calzolari G., Karanasiou A., Colombi C., Gianelle V. L., Alves C., Custódio D., Eleftheriadis K., Diapouli E., Reche C., Alastuey A., Minguillón M. C., Severi M., Becagli S., Nunes T., Cerqueira M., Pio C., Manousakas M., Magoos T., Vratolis S., Harrison R. M., Querol X. Case Studies of Source Apportionment and Suggested Measures at Southern European Cities. *Issues in Environmental Science and Technology No. 42. Airborne particulate matter: Sources, Atmospheric Processes and Health*, Eds. Hester R. E., Harrison R. M., Querol X. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2016b.
- Blanco Heras G. A. *Determinación de aniones, cationes y ácidos orgánicos en material particulado atmosférico mediante electroforesis capilar*. PhD Thesis, Departamento de Química Analítica, Universidade da Coruña (2009).
- Blanco Heras G., Turnes-Carou I., Muniategui Lorenzo S., López-Mahía P., Prada Rodríguez D. Fast simultaneous analysis of major anionic and cationic compounds in atmospheric particulate matter by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Meeting: XII Scientific Meeting of the Spanish society of Chromatography and Related Techniques. Tarragona, November 14th-16th, 2012*. Book of abstracts. ISBN: 978-84-616-1017-4
- Camacho-Jiménez A. Piñeiro-Iglesias M., Prieto-Blanco M. C., López-Mahía P., Muniategui-Lorenzo S., Prada-Rodríguez D. Seasonal evolution of the PM₁₀ major components at urban sites in Galicia. *XVIII Meeting of the Spanish Royal Society of Analytical Chemistry*, 2013.
- Castro L. M., Pio C. A., Harrison R. M., Smith D. J. T. Carbonaceous aerosol in urban and rural European atmospheres: Estimation of secondary organic carbon concentrations. *Atmospheric Environment*, 33(17) (1999) 2771–2781.
- Ceburnis D., Garbaras A., Szidat S., Rinaldi M., Fahrni S., Perron N., Wacker L., Leinert S., Remeikis V., Facchini M. C., Prevot A. S. H., Jennings S. G., Ramonet M., O'Dow C. D. Quantification of the carbonaceous matter origin in submicron marine aerosol by ¹³C and ¹⁴C isotope analysis. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 11 (2011) 8593–8606.

- Chang-Graham A. L., Profeta L. T. M., Johnson T. J., Yokelson R. J., Laskin A., Laskin J. Case Study of Water-Soluble Metal Containing Organic Constituents of Biomass Burning Aerosol. *Environmental Science & Technology*, 45 (2011) 1257–1263.
- Custódio D., Cerqueira M., Alves C., Nunes T., Pio C., Esteves V., Frosini D., Lucarelli F., Querol X.. A one-year record of carbonaceous components and major ions in aerosols from an urban kerbside location in Oporto, Portugal. *Science of the Total Environment*, 562 (2016) 822–833.
- Dusek U., Meusinger C., Oyama B., Ramon W., de Wilde P. A., Holzinger R., Röckmann T. A thermal desorption system for measuring $\delta^{13}\text{C}$ ratios on organic aerosol. *Journal of Aerosol Science*, 66 (2013) 72–82.
- European Norm EN-12341:2014. *Ambient air. Standard gravimetric measurement method for the determination of the PM_{10} or $\text{PM}_{2.5}$ mass concentration of suspended particulate matter.*
- Fisseha, R., Spahn, H., Wegener, R., Hohaus, T., Brasse, G., Wissel, H., Tillmann R., Wahner A., Koppmann R., Kiendler-Scharr A. Stable carbon isotope composition of secondary organic aerosol from β -pinene oxidation. *Journal of Geophysical Research Atmospheres*, 114 (2009) D02304, doi:10.1029/2008JD011326.
- Gietl J. K., Klemm O. Source Identification of Size-Segregated Aerosol in Münster, Germany, by Factor Analysis. *Aerosol Science and Technology*, 43(8) (2009) 828–837.
- Gómez-Carracedo M. P., Andrade J. M., Ballabio D., Prada-Rodríguez D., Muniategui-Lorenzo S., Consonni V., Piñeiro-Iglesias M., López-Mahía P. Impact of medium-distance pollution sources in a Galician suburban site (NW Iberian peninsula). *Science of the Total Environment*, 512-513 (2015) 114–124.
- Gómez-Moreno F. J., Pujadas M., Plaza J., Rodríguez-Maroto J. J., Martínez-Lozano P., Artíñano B. Influence of seasonal factors on the atmospheric particle number concentration and size distribution in Madrid. *Atmospheric Environment*, 45 (2011) 3169–3180.
- Górka, M., Zwolińska E., Malkiewicz M., Lewicka-Szczebak D., Jędrysek M. O. Carbon and nitrogen isotope analyses coupled with palynological data of PM_{10} in Wrocław city (SW Poland) – assessment of anthropogenic impact. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 48(2) (2012) 327–344.
- Górka M., Jędrysek, M. O. $\delta^{13}\text{C}$ of organic atmospheric dust deposited in Wrocław (SW Poland): Critical remarks on the passive method. *Geological Quarterly*, 52(2) (2008) 115–126.
- Guevara, M. Emissions of Primary Particulate Matter. *Issues in Environmental Science and Technology No. 42. Airborne particulate matter: Sources, Atmospheric Processes and Health*, Eds. Hester R. E., Harrison R. M., Querol X. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2016.
- Hopke, 2016. Case studies of Source Apportionment from North America. *Issues in Environmental Science and Technology No. 42. Airborne particulate matter: Sources, Atmospheric Processes and Health*, Eds. Hester R. E., Harrison R. M., Querol X. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2016.

- Jaffrezo J.-L., Aymoz G., Delaval C., Cozic J. Seasonal variations of the water soluble organic carbon mass fraction of aerosol in two valleys of the French Alps. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 5 (2005) 2809–2821.
- Juncal Bello V. *Determinación de compuestos orgánicos volátiles precursores de ozono y otros contaminantes atmosféricos en un área suburbana de A Coruña*. PhD Thesis, Departamento de Química Analítica, Universidade da Coruña (2012).
- Jung J., Kawamura K. Springtime carbon emission episodes at the Gosan background site revealed by total carbon, stable carbon isotopic composition, and thermal characteristics of carbonaceous particles *Atmospheric Chemistry and Physics*, 11 (2011) 10911–10928.
- Kumar P., Robins A., Vardoulakis S., Britter R. A review of the characteristics of nanoparticles in the urban atmosphere and the prospects for developing regulatory controls. *Atmospheric Environment*, 44 (2010) 50357–5052.
- Kunwar B., Kawamura K., Zhu C. Stable carbon and nitrogen isotopic compositions of ambient aerosols collected from Okinawa Island in the western North Pacific Rim, an outflow region of Asian dusts and pollutants. *Atmospheric Environment*, 131 (2016) 2437–253.
- López-Veneroni D. The stable carbon isotope composition of PM_{2.5} and PM₁₀ in Mexico City Metropolitan Area air, *Atmospheric Environment*, 43 (2009) 44917–44502.
- Martinelli L. A., Camargo P. B., Lara L. B. L. S., Victoria R. L., Artaxo P. Stable carbon and nitrogen isotopic composition of bulk aerosol particles in a C4 plant landscape of southeast Brazil. *Atmospheric Environment*, 36 (2002) 2427–2432.
- Mašalaitė A., Garbaras A., Remeikis V. Stable isotopes in environmental investigations. *Lithuanian Journal of Physics*, 52(3) (2012) 261–268.
- Masiol M., Hopke P. K., Felton H. D., Frank B. P., Rattigan O. V., Wurth M. J., LaDuke G. H. Analysis of major air pollutants and submicron particles in New York City and Long Island. *Atmospheric Environment*, 148 (2017) 203–214.
- Meteogalicia. Consellería de Medio Ambiente e Ordenación do Territorio. Xunta de Galicia. <http://www.meteogalicia.gal/web/index.action> (fecha última de acceso 01/03/2017)
- Mkoma S. L., Kawamura K., Tachibana E., Fu P. Stable carbon and nitrogen isotopic compositions of tropical atmospheric aerosols: sources and contribution from burning of C3 and C4 plants to organic aerosols. *Tellus B*, 66 (2014) 20176 pp. 14.
- Moreda-Piñeiro J., Turnes-Carou I., Alonso-Rodríguez E., Moscoso-Pérez C., Blanco-Heras G., López-Mahía P., Muniategui-Lorenzo S., Prada-Rodríguez D. The Influence of Oceanic Air Masses on Concentration of Major Ions and Trace Metals in PM_{2.5} Fraction at a Coastal European Suburban Site. *Water, Air, and Soil Pollution*, 226(1) (2015) 2240 pp. 15.

- Moreda-Piñeiro J., Alonso-Rodríguez E., Moscoso-Pérez C., Blanco-Heras G., Turnes-Carou I., López-Mahía P., Muniategui-Lorenzo S., Prada-Rodríguez D. Influence of marine, terrestrial and anthropogenic sources on ionic and metallic composition of rainwater at a suburban site (northwest coast of Spain). *Atmospheric Environment*, 48 (2014) 30–38.
- Paatero P., Tapper U. Analysis of different modes of factor analysis as least squares fit problems. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 18 (1993) 183–194.
- Pavuluri C. M., Kawamura K., Tachibana E. Swaminathan T. Elevated nitrogen isotope ratios of tropical Indian aerosols from Chennai: implication for the origins of aerosol nitrogen in South and Southeast Asia. *Atmospheric Environment*, 44 (2010) 3597–3604.
- Pegas P. N., Nunes T., Alves C. A., Silva J. R., Vieira S. L. A., Caseiro A., Pio C. A. Indoor and outdoor characterisation of organic and inorganic compounds in city centre and suburban elementary schools of Aveiro, Portugal. *Atmospheric Environment*, 46 (2012) 80–89.
- Pey J., Querol X., Alastuey A. Variations of levels and composition of PM₁₀ and PM_{2.5} at an insular site in the Western Mediterranean. *Atmospheric Research*, 94 (2009) 285–299.
- Pio C., Cerqueira M., Harrison R. M., Nunes T., Mirante F., Alves C., Oliveira C., Sanchez de la Campa A., Artíñano B., Matos M. OC/EC ratio observations in Europe: Re-thinking the approach for apportionment between primary and secondary organic carbon. *Atmospheric Environment*, 45(34) (2011) 6121–6132.
- Polissar A. V., Hopke P. K., Malm W. C., Sisler J. The ratio of aerosol optical absorption coefficients to sulfur concentrations, as an indicator of smoke from forest fires when sampling in polar regions. *Atmospheric Environment*, 30(7) (1996) 1147–1157.
- Prada-Rodríguez D., Gallego-Fernández N., Piñeiro-Iglesias M., Muniategui-Lorenzo S., Macho-Eiras M. L., López-Mahía P. *Stable carbon isotopic ratios of a rural aerosol at the centre of Galicia (Spain)*. Paper presented at the 1st International Conference on Atmospheric Dust - DUST2014. *ProScience*, 1 (2014) 196–200.
- Querol X., Alastuey A., Rodríguez S., Plana F., Mantilla E., Ruiz C.R. Monitoring of PM₁₀ and PM_{2.5} around primary particulate anthropogenic emission sources. *Atmospheric Environment*, 35 (2001) 845–858.
- Querol X., Alastuey A., Viana M., Moreno T., Reche C., Minguillón M. C., Ripoll A., Pandolfi M., Amato F., Karanasiou A., Pérez N., Pey J., Cusack M., Vázquez R., Plana F., Dall'Osto M., de la Rosa J., Sánchez de la Campa A., Fernández-Camacho R., Rodríguez S., Pio C., Alados-Arboledas L., Titos G., Artíñano B., Salvador P., García Dos Santos S., Fernández Patier R. Variability of carbonaceous aerosols in remote, rural, urban and industrial environments in Spain: Implications for air quality policy. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 13(13) (2013) 6185–6206.
- Querol X., Alastuey A., Moreno T., Viana M. M., Castillo S., Pey J., Rodríguez S., Artíñano B., Salvador P., Sánchez M., García Dos Santos S., Herce Garraleta M. D., Fernandez-Patier R., Moreno-Grau S., Negral L., Minguillón M. C., Monfort E., Sanz M. J., Palomo-Marín R., Pinilla-Gil E., Cuevas

- E., de la Rosa J., Sánchez de la Campa A. Spatial and temporal variations in airborne particulate matter (PM₁₀ and PM_{2.5}) across Spain 1999–2005. *Atmospheric Environment*, 42 (2008) 3964–3979.
- Reff A., Eberly S. H., Bhave P. V. Receptor Modeling of Ambient Particulate Matter Data Using Positive Matrix Factorization: Review of Existing Methods. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 57 (2007) 146–154.
- Sanderson P., Delgado-Saborit J. M., Harrison R. M. A review of chemical and physical characterisation of atmospheric metallic nanoparticles. *Atmospheric Environment*, 94 (2014) 353–365.
- Schmid H., Laskus L., Jürgen Abraham H., Baltensperger U., Lavanchy V., Bizjak M., Burba P., Cachier H., Crow D., Chow J., Gnauk T., Even A. Results of the 'carbon conference' international aerosol carbon round robin test stage I. *Atmospheric Environment*, 35(12) (2001) 2111–2121.
- Stein A. F., Draxler R. R., Rolph G. D., Stunder B. J. B., Cohen M. D., Ngan F. NOAA's HYSPLIT atmospheric transport and dispersion modeling system. *Bulletin of the American Meteorological Society*, 96 (2015) 2059–2077, <http://dx.doi.org/10.1175/BAMS-D-14-00110.1>
- Turekian V. C., Macko S., Ballentine D., Swap R. J., Garstang M. Causes of bulk carbon and nitrogen isotopic fractionations in the products of vegetation burns: laboratory studies. *Chemical Geology*, 152 (1998) 181–192.
- Widory D. Nitrogen isotopes: Tracers of origin and processes affecting PM₁₀ in the atmosphere of Paris. *Atmospheric Environment*, 41 (2007) 2382–2390.
- Widory D., Roy S., Le Moullec Y., Goupil G., Cocherie A., Guerrot C. The origin of atmospheric particles in Paris: A view through carbon and lead isotopes. *Atmospheric Environment*, 38(7) (2004) 953–961.
- Yeatman S. G., Spokes L. J., Dennis P. F., Jickells T. D. Comparisons of aerosol nitrogen isotopic composition at two polluted coastal sites. *Atmospheric Environment*, 35 (2001) 1307–1320.
- Zong Z., Wang X., Tian C., Chen Y., Han G., Li J., Zhang G. Source and formation characteristics of water-soluble organic carbon in the anthropogenic-influenced Yellow River Delta, North China. *Atmospheric Environment*, 144 (2016) 124–132.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Correlation matrices for PM₁₀, carbonaceous fractions, N, S and major ions, split by seasons (continues).

		Spring																	
	PM ₁₀	OC	EC	TC	WSOC	δ ¹³ C	δ ¹⁵ N	N	S	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	ssSO ₄ ²⁻	nssSO ₄ ²⁻	NH ₄ ⁺	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
PM ₁₀	1	.289	.222	.308	.081	-.177	-.135	.156	.548**	.395*	.322*	.578**	.589**	.430**	.043	.114	.589**	-.051	.478**
OC		1	.401*	.973**	.635**	-.396*	.103	.343*	.246	-.183	.031	.240	-.069	.261	.145	-.114	-.069	.081	-.027
EC			1	.601**	.553**	-.103	.320*	.383*	.371*	-.336*	-.075	.375*	-.178	.424**	.092	-.154	-.178	-.106	-.269
TC				1	.679**	-.374*	.171	.397*	.311	-.245	.005	.307	-.106	.337*	.152	-.138	-.106	.044	-.092
WSOC					1	-.094	.280	.336*	.209	-.256	.151	.265	-.171	.315	.155	.148	-.171	-.018	-.031
δ ¹³ C						1	-.048	.016	.019	-.089	-.048	.078	-.120	.110	.088	.021	-.120	.022	-.051
δ ¹⁵ N							1	.778**	.517**	-.673**	-.481**	.409**	-.508**	.545**	.637**	-.095	-.508**	-.260	-.489**
N								1	.754**	-.588**	-.314*	.648**	-.332*	.740**	.682**	-.170	-.332*	-.163	-.364*
S									1	-.243	-.106	.939**	.112	.918**	.609**	-.011	.112	-.181	.013
Cl ⁻										1	.693**	-.144	.886**	-.376*	-.469**	.303	.886**	.078	.804**
NO ₃ ⁻											1	.030	.657**	-.141	-.368*	.278	.657**	.021	.607**
SO ₄ ²⁻												1	.161	.967**	.514**	.007	.161	-.144	.069
ssSO ₄ ²⁻													1	-.098	-.256	.269	1.000**	-.209	.755**
nssSO ₄ ²⁻														1	.585**	-.063	-.098	-.091	-.126
NH ₄ ⁺															1	-.173	-.256	-.187	-.314*
K ⁺																1	.269	.031	.686**
Na ⁺																	1	-.209	.755**
Ca ²⁺																		1	.254
Mg ²⁺																			1

**Correlation is significant at a significance level of 0.01 (bilateral), * Correlation is significant at a significance level of 0.05 (bilateral).

Table S1. Correlation matrices for PM₁₀, carbonaceous fractions, N, S and major ions, split by seasons (continues).

		Summer																	
	PM ₁₀	OC	EC	TC	WSOC	δ ¹³ C	δ ¹⁵ N	N	S	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	ssSO ₄ ²⁻	nssSO ₄ ²⁻	NH ₄ ⁺	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
PM ₁₀	1	.628**	.662**	.692**	.748**	.383*	.257	.591**	.895**	.257	.575**	.885**	.819**	.824**	.280	.822**	.819**	.903**	.882**
OC		1	.521**	.982**	.273	.204	.350*	.519**	.565**	.023	.470**	.582**	.383*	.568**	.248	.722**	.383*	.543**	.441*
EC			1	.674**	.580**	.116	.182	.298	.489**	.155	.499**	.510**	.472**	.475**	.140	.633**	.472**	.617**	.535**
TC				1	.366*	.202	.344	.516**	.599**	.054	.519**	.619**	.437*	.598**	.247	.766**	.437*	.608**	.501**
WSOC					1	.252	.280	.437*	.702**	-.132	.217	.701**	.469**	.682**	.196	.671**	.469**	.682**	.544**
δ ¹³ C						1	.014	.392*	.375*	.276	.251	.325	.475**	.273	.118	.222	.475**	.372*	.458**
δ ¹⁵ N							1	.764**	.554**	-.530**	-.133	.583**	-.178	.661**	.817**	.290	-.178	.153	-.071
N								1	.817**	-.260	.084	.814**	.224	.845**	.845**	.511**	.224	.469**	.308
S									1	-.038	.367*	.992**	.600**	.976**	.587**	.701**	.600**	.797**	.685**
Cl ⁻										1	.548**	-.079	.723**	-.205	-.437*	.078	.723**	.260	.640**
NO ₃ ⁻											1	.354*	.729**	.264	-.076	.463**	.729**	.557**	.744**
SO ₄ ²⁻												1	.565**	.991**	.600**	.711**	.565**	.781**	.659**
ssSO ₄ ²⁻													1	.447**	-.092	.578**	1.000**	.785**	.987**
nssSO ₄ ²⁻														1	.665**	.676**	.447**	.717**	.551**
NH ₄ ⁺															1	.213	-.092	.280	-.003
K ⁺																1	.578**	.722**	.642**
Na ⁺																	1	.785**	.987**
Ca ²⁺																		1	.830**
Mg ²⁺																			1

**Correlation is significant at a significance level of 0.01 (bilateral), * Correlation is significant at a significance level of 0.05 (bilateral).

Table S1. Correlation matrices for PM₁₀, carbonaceous fractions, N, S and major ions, split by seasons (continues).

		Autumn																	
	PM ₁₀	OC	EC	TC	WSOC	δ ¹³ C	δ ¹⁵ N	N	S	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	ssSO ₄ ²⁻	nssSO ₄ ²⁻	NH ₄ ⁺	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
PM ₁₀	1	.239	.410*	.340	.636**	-.289	.073	.557**	.609**	.355*	.265	.674**	.542**	.486**	.066	.649**	.542**	.132	.527**
OC		1	.583**	.936**	.495**	-.286	.243	.668**	.205	-.478**	-.107	.181	-.378*	.356*	.273	.683**	-.378*	-.132	-.260
EC			1	.832**	.592*	-.437*	.388*	.580**	.153	-.309	.382*	.204	-.277	.337	.572**	.803*	-.277	.014	-.248
TC				1	.595**	-.385*	.326	.714**	.207	-.462**	.092	.213	-.379*	.391*	.436*	.814**	-.379*	-.085	-.286
WSOC					1	-.166	.238	.720**	.398*	-.145	.223	.465**	-.007	.502**	.288	.621**	-.007	-.032	-.015
δ ¹³ C						1	-.366*	-.115	-.253	-.116	-.448**	-.366*	-.114	-.343*	-.304	-.405*	-.114	-.193	-.218
δ ¹⁵ N							1	.442*	.371*	-.577**	-.100	.305	-.499**	.540**	.714**	.377*	-.499**	-.217	-.475**
N								1	.617**	-.391*	.098	.652**	-.150	.782**	.400*	.728**	-.150	-.185	-.155
S									1	.080	.087	.931**	.294	.874**	.323	.403*	.294	.099	.296
Cl ⁻										1	.219	.154	.943**	-.249	-.408*	-.160	.943**	.371*	.922**
NO ₃ ⁻											1	.192	.245	.099	.230	.170	.245	.232	.174
SO ₄ ²⁻												1	.368*	.913**	.270	.469**	.368*	.158	.390*
ssSO ₄ ²⁻													1	-.044	-.394*	-.039	1.000**	.351*	.956**
nssSO ₄ ²⁻														1	.463**	.521**	-.044	.016	-.001
NH ₄ ⁺															1	.478**	-.394*	.079	-.378*
K ⁺																1	-.039	.069	.021
Na ⁺																	1	.351*	.956**
Ca ²⁺																		1	.452**
Mg ²⁺																			1

**Correlation is significant at a significance level of 0.01 (bilateral), * Correlation is significant at a significance level of 0.05 (bilateral).

Table S1. Correlation matrices for PM₁₀, carbonaceous fractions, N, S and major ions, split by seasons (continues).

		Winter																	
	PM ₁₀	OC	EC	TC	WSOC	δ ¹³ C	δ ¹⁵ N	N	S	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	ssSO ₄ ²⁻	nssSO ₄ ²⁻	NH ₄ ⁺	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
PM ₁₀	1	.498**	.579**	.340	.230	.438*	-.206	.455*	.720**	.655**	.456**	.651**	.714**	.365*	.059	.810**	.714**	.328	.715**
OC		1	.796**	.982**	.733**	-.361	.524**	.922**	.645**	-.360	-.036	.293	-.282	.465**	.644**	.790**	-.282	-.354	-.232
EC			1	.897**	.554**	-.175	.163	.686**	.426*	-.164	.042	.168	-.059	.221	.298	.754**	-.059	-.212	.000
TC				1	.719**	-.432*	.493**	.890**	.536**	-.438*	-.054	.180	-.371*	.421*	.583**	.720**	-.371*	-.394*	-.309
WSOC					1	-.415*	.478**	.778**	.387*	-.299	-.205	.241	-.294	.450*	.786**	.582**	-.294	-.237	-.226
δ ¹³ C						1	-.572**	-.382*	.058	.751**	.466**	.312	.730**	-.044	-.453*	.005	.730**	.457**	.695**
δ ¹⁵ N							1	.681**	.322	-.624**	-.411*	-.045	-.654**	.316	.760**	.130	-.654**	-.590**	-.647**
N								1	.703**	-.361	-.070	.350	-.300	.539**	.799**	.742**	-.300	-.378*	-.250
S									1	.209	.233	.684**	.269	.654**	.465**	.791**	.269	.135	.272
Cl ⁻										1	.483**	.518**	.988**	.051	-.402*	.207	.988**	.677**	.966**
NO ₃ ⁻											1	.643**	.519**	.465**	-.283	.224	.519**	.312	.593**
SO ₄ ²⁻												1	.532**	.879**	.187	.581**	.532**	.505**	.611**
ssSO ₄ ²⁻													1	.063	-.408*	.282	1.000**	.696**	.973**
nssSO ₄ ²⁻														1	.450*	.526**	.063	.202	.171
NH ₄ ⁺															1	.400*	-.408*	-.388*	-.369*
K ⁺																1	.282	.067	.325
Na ⁺																	1	.696**	.973**
Ca ²⁺																		1	.716**
Mg ²⁺																			1

**Correlation is significant at a significance level of 0.01 (bilateral), * Correlation is significant at a significance level of 0.05 (bilateral).

Table S1. Correlation matrices for PM₁₀, carbonaceous fractions, N, S and major ions, split by seasons.

	Total																		
	PM ₁₀	OC	EC	TC	WSOC	δ ¹³ C	δ ¹⁵ N	N	S	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	ssSO ₄ ²⁻	nssSO ₄ ²⁻	NH ₄ ⁺	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
PM ₁₀	1	.408**	.309**	.389**	.318**	.005	.166	.478**	.723**	.361**	.362**	.737**	.672**	.635**	.264**	.247**	.672**	.069	.662**
OC		1	.542**	.963**	.472**	-.237**	.404**	.478**	.289**	-.112	.073	.289**	-.024	.316**	.221**	.205*	-.024	.088	.073
EC			1	.749**	.621**	-.044	.053	.273**	-.001	-.129	.095	-.009	-.091	.010	.035	.097	-.091	-.040	-.018
TC				1	.574**	-.210*	.349**	.465**	.227**	-.175*	.080	.219*	-.097	.258**	.193*	.187*	-.097	.048	.004
WSOC					1	.036	.125	.369**	.098	-.193*	-.091	.108	-.111	.143	.182*	.119	-.111	-.040	-.012
δ ¹³ C						1	-.177*	.052	.034	.014	-.055	.041	.059	.030	.034	-.040	.059	-.021	.063
δ ¹⁵ N							1	.714**	.592**	-.421**	-.224**	.541**	-.269**	.645**	.733**	.108	-.269**	-.086	-.247**
N								1	.739**	-.384**	-.126	.685**	-.051	.750**	.768**	.056	-.051	-.100	-.060
S									1	-.056	.120	.958**	.347**	.949**	.658**	.158	.347**	-.006	.313**
Cl ⁻										1	.489**	.063	.867**	-.135	-.332**	.204*	.867**	.182*	.834**
NO ₃ ⁻											1	.223**	.534**	.115	-.199*	.231**	.534**	.098	.548**
SO ₄ ²⁻												1	.422**	.977**	.617**	.178*	.422**	.039	.409**
ssSO ₄ ²⁻													1	.219**	-.108	.228**	1.000**	.043	.913**
nssSO ₄ ²⁻														1	.689**	.138	.219**	.032	.226**
NH ₄ ⁺															1	.006	-.108	-.100	-.119
K ⁺																1	.228**	.076	.464**
Na ⁺																	1	.043	.913**
Ca ²⁺																		1	.276**
Mg ²⁺																			1

**Correlation is significant at a significance level of 0.01 (bilateral), * Correlation is significant at a significance level of 0.05 (bilateral).

Table S2. Correlation matrices for metals with other parameters, split by seasons (continues).

Spring																														
As	Cd	Co	Cr	Cs	Cu	La	Mn	Pb	Rb	Sb	Se	Sn	Sr	Ti	V	Zn	Al	Ca	Fe	K	Mg	Na	PM ₁₀	OC	EC	TC	WSOC	N	S	
1	.846**	.808**	.744**	.843**	.586**	.874**	.863**	.607**	.824**	.899**	.868**	.832**	.697**	.878**	.578**	.613**	.894**	.734**	.845**	.860**	.805**	.711**	.064	.499**	-.045	.438**	-.430**	-.066	.071	
	1	.872**	.858**	.853**	.676**	.660**	.897**	.743**	.866**	.868**	.850**	.860**	.702**	.899**	.509**	.764**	.918**	.818**	.869**	.906**	.719**	.602**	-.018	.375**	-.101	.318**	-.464**	.020	.053	
		1	.841**	.796**	.596**	.675**	.837**	.634**	.820**	.791**	.895**	.768**	.651**	.845**	.548**	.721**	.870**	.730**	.848**	.835**	.640**	.532**	.112	.372**	-.039	.326**	-.332**	.118	.223	
			1	.593**	.673**	.589**	.720**	.511**	.705**	.700**	.760**	.695**	.681**	.833**	.356**	.775**	.852**	.815**	.765**	.798**	.620**	.527**	-.136	.206	-.258*	.125	-.510**	-.045	-.043	
				1	.709**	.661**	.916**	.780**	.880**	.884**	.772	.850**	.664**	.790**	.413	.630**	.783**	.709**	.869**	.819**	.693**	.585**	.036	.588**	.137	.544**	-.140	.067	-.051	
					1	.642**	.649**	.577**	.568**	.594**	.852**	.730**	.643**	.736**	.271*	.712**	.739**	.720**	.690**	.629**	.612	.527**	-.011	.227	-.289*	.186	-.523**	-.115	.000	
						1	.642**	.392**	.563**	.728**	.792**	.669**	.572**	.702**	.488**	.392**	.717**	.517**	.636**	.647**	.728**	.671**	-.041	.359**	-.160	.285*	-.408**	-.217	-.017	
							1	.756**	.948**	.914**	.888**	.895**	.698**	.898**	.520**	.704**	.946**	.815**	.972**	.895**	.694**	.559**	.118	.573**	-.012	.512**	-.342**	.113	.166	
								1	.715**	.723**	.709**	.728**	.441**	.660**	.455**	.566**	.691**	.566**	.701**	.670**	.453**	.339**	.030	.426**	-.063	.368**	-.297*	.199	.160	
									1	.866**	.872**	.876**	.694**	.854**	.516**	.706**	.898**	.812**	.926**	.925**	.645**	.520**	.157	.563**	.049	.517**	-.287*	.180	.194	
										1	.799**	.900**	.689**	.882**	.528**	.652**	.908**	.752**	.884**	.850**	.718**	.588**	-.084	.454**	-.115	.381**	-.409**	-.026	-.018	
											1	.911**	.785**	.936**	.413	.920**	.950**	.928**	.934**	.968**	.721*	.595	-.445	.122	-.636	-.103	-.856	.183	-.371	
												1	.661**	.861**	.479**	.671**	.886**	.775**	.874**	.853**	.679**	.559**	.065	.545**	-.057	.476**	-.393**	.015	.088	
													1	.765**	.365**	.613**	.761**	.727**	.679**	.823**	.865**	.818**	.159	.333**	-.191	.254*	-.465**	-.175	.025	
														1	.481**	.803**	.963**	.840**	.905**	.899**	.768**	.650**	-.009	.431**	-.195	.341**	-.508**	-.008	.050	
															1	.247*	.497**	.273*	.489**	.444**	.379**	.319**	.253*	.310**	.272*	.343**	-.123	.338**	.438**	
																1	.787**	.860**	.742**	.788**	.513**	.404**	-.069	.229	-.234*	.150	-.455**	.103	.033	
																	1	.876**	.961**	.941**	.758**	.630**	.010	.436**	-.168	.352**	-.502**	-.004	.054	
																		1	.838**	.857**	.639**	.517**	-.064	.329**	-.210	.246*	-.483**	-.061	-.063	
																			1	.879**	.671**	.531**	.108	.524**	-.039	.461**	-.366**	.098	.153	
																				1	.809**	.717**	.093	.454**	-.107	.382**	-.444**	.018	.075	
																					1	.981**	.188	.334**	-.231*	.246**	-.481**	-.275**	.027	
																						1	.235*	.259*	-.235*	.177	-.441**	-.316**	.024	
																							1	.408**	.309**	.389**	.318**	.478**	.723**	
																								1	.542**	.472**	.478**	.289**		
																									1	.621**	.273**	-.001		
																										1	.574**	.465**	.227**	
																											1	.369**	.098	
																												1	.739**	
																													1	.739**

**Correlation is significant at a significance level of 0.01(bilateral), *Correlation is significant at a significance level of 0.05 (bilateral).

Table S2. Correlation matrices for metals with other parameters. split by seasons (continues).

Summer																														
	As	Cd	Co	Cr	Cs	Cu	La	Mn	Pb	Rb	Sb	Se	Sn	Sr	Ti	V	Zn	Al	Ca	Fe	K	Mg	Na	PM ₁₀	OC	EC	TC	WSOC	N	S
As	1	.842**	.875**	.827**	.767**	.474**	.752**	.888**	.414*	.869**	.853**	.965	.588**	.771**	.866**	.702**	.786**	.886**	.784**	.880**	.896**	.759**	.630**	.387**	.489**	-.177	.466**	.141	.556**	.503**
Cd		1	.888**	.971**	.815**	.600**	.652**	.863**	.481**	.799**	.886**	.963	.615**	.817**	.969**	.504**	.956**	.970**	.958**	.858**	.950**	.826**	.721**	.163	.117	-.046	.093	-.063	.354*	.331
Co			1	.857**	.689*	.469**	.652**	.960**	.435*	.920**	.863**	.985	.595**	.853**	.917**	.776**	.825**	.937**	.841**	.960**	.921**	.837**	.720**	.432*	.309	.168	.308	.160	.542**	.585**
Cr				1	.734**	.631**	.813**	.882**	.459**	.740**	.882**	.963	.581**	.798**	.981**	.426*	.983**	.964**	.980**	.805**	.945**	.800**	.695**	.032	.047	-.163	.005	-.191	.324	.233
Cs					1	.158	.776**	.734**	-.128	.811**	.807**	.933	.603*	.586*	.663*	.683*	.302	.728**	.388	.816**	.719**	.520	.429	.727**	.526	.663*	.585*	.867**	.080	.523
Cu						1	.415*	.460**	.374*	.382*	.686**	.859	.807**	.661**	.604**	.156	.709**	.595**	.688**	.458**	.605**	.598**	.572**	-.018	-.033	-.127	-.056	-.183	.048	.031
La							1	.644**	.221	.595**	.854**	.991	.421*	.571**	.655**	.541**	.622**	.672**	.620**	.667**	.614**	.493**	.375*	.206	.265	.017	.234	.106	.391*	.338
Mn								1	.442**	.946**	.851**	.950	.601**	.836**	.894**	.758**	.782**	.923**	.792**	.901**	.806**	.680**	.491**	.404*	.211	.401**	.241	.560**	.625**	
Pb									1	.299	.455*	.989*	.346*	.423*	.464**	.235	.448**	.457**	.405*	.366*	.426*	.441**	.373*	.091	.171	-.161	.113	-.057	.210	.194
Rb										1	.766**	.926	.572**	.807**	.825**	.777**	.709**	.859**	.735**	.953**	.886**	.786**	.676**	.570**	.472**	.309	.481**	.295	.537**	.660**
Sb											1	.934	.632**	.784**	.903**	.593**	.876**	.906**	.867**	.860**	.864**	.754**	.642**	.182	.150	-.037	.123	.047	.370	.319
Se												1	.743	.972	.937	.996	.991	.922	.919	.915	.946	.948	.937	.885	.895	.880	.894	.781	.739	.824
Sn													1	.836**	.599**	.410*	.610**	.624**	.630**	.631**	.683**	.766**	.780**	.385*	.315	.184	.315	.078	.245	.361*
Sr														1	.840**	.647**	.796**	.864**	.836**	.870**	.896**	.930**	.500**	.321	.172	.319	.085	.394*	.537**	
Ti															1	.534**	.963**	.994**	.965**	.888**	.967**	.830**	.744**	.163	.157	-.088	.118	-.104	.410*	.364*
V																1	.382*	.597**	.411*	.794**	.595**	.641**	.566**	.782**	.493**	.424*	.525**	.533**	.694**	.815**
Zn																	1	.945**	.989**	.773**	.924**	.794**	.696**	-.005	.001	-.215	-.046	-.232	.253	.184
Al																		1	.951**	.920**	.973**	.855**	.741**	.246	.205	-.027	.173	-.029	.446**	.426*
Ca																			1	.798**	.938**	.833**	.746**	.052	.017	-.167	-.021	-.208	.251	.221
Fe																				1	.903**	.834**	.724**	.542**	.412*	.269	.420*	.260	.555**	.658**
K																					1	.898**	.808**	.303	.266	.044	.242	-.031	.436**	.440**
Mg																						1	.975**	.509**	.272	.136	.268	.091	.370*	.530**
Na																							1	.516**	.216	.138	.220	.079	.278	.487**
PM ₁₀																								1	.628**	.649**	.692**	.727**	.563**	.876**
OC																									1	.501**	.980**	.255	.506**	.561**
EC																										1	.662**	.600**	.217	.428*
TC																											1	.357*	.489**	.585**
WSOC																												1	.331	.618**
N																													1	.824**
S																														1

**Correlation is significant at a significance level of 0.01 (bilateral). *Correlation is significant at a significance level of 0.05 (bilateral).

Table S2. Correlation matrices for metals with other parameters, split by seasons (continues).

Autumn																													
As	Cd	Co	Cr	Cs	Cu	La	Mn	Pb	Rb	Sb	Se	Sn	Sr	Ti	V	Zn	Al	Ca	Fe	K	Mg	Na	PM ₁₀	OC	EC	TC	WSOC	N	S
1	.486	.760**	-.259	-.237	.243	.124	.730**	.776**	.817**	.814**	1.000**	.661**	.093	.323	.637**	.110	.233	.089	.773**	.780**	.059	.153	.726**	.587**	.881**	.763**	.750**	.88**	.429*
Cd	1	.539	.263	.104	.586*	.763	.542	.791**	.308	.350	.515	.409	.891**	.629	.219	.105	.154	.386	.257	.244	.274	.450	.386	.257	.244	.274	.450	.386	.629*
Co		1	-.070	.039	.300	-.238	.778**	.615**	.693**	.602*	-.110	.534**	.093	.473**	.834**	.198	.405*	-.028	.514**	.541**	-.038	-.056	.481**	.623**	.537**	.658**	.582**	.739**	.401*
Cr			1	.622**	.014	-.251	-.019	-.084	-.082	-.026	.341	.074	-.340	.184	-.389	-.129	.161	-.120	-.113	-.198	-.369	-.506**	-.233	.044	-.228	-.073	-.125	-.224	.180
Cs				1	-.035	-.296	.048	-.130	-.032	-.069	.586	.073	-.063	.152	-.317	-.130	.084	-.386	-.235	-.120	-.077	-.201	-.063	.041	-.182	-.052	-.032	-.044	.123
Cu					1	.263	.284	.279	.060	.116	.816	.108	.167	.172	.117	.078	.150	-.190	.217	-.009	.112	-.002	.255	.088	.141	.123	.226	.114	.147
La						1	-.280	.000	-.171	-.038	-.069	.304	-.199	.182	-.064	-.118	-.230	-.162	-.144	.430	.398	.153	-.296	-.135	-.253	-.218	-.133	.259	
Mn							1	.692**	.828**	.701**	.269	.596**	.164	.560**	.228	.173	.443*	.115	.741**	.702**	-.076	-.057	.540**	.578**	.684**	.693**	.579**	.684**	.360*
Pb								1	.691**	.809**	-.279	.587**	-.078	.448**	.336	.087	.237	.175	.628**	.565**	-.257	-.227	.409*	.579**	.681**	.692**	.499**	.628**	.351*
Rb									1	.858**	.476	.605**	-.073	.448**	.358	.304	.355	-.157	.839**	.783**	-.199	.001	.695**	.753**	.814**	.860**	.650**	.819**	.469
Sb										1	.000	.452	.618	-.952	-.263	-.952	-.263	.063	-.400	.210	.011	.587	.452	.020	.201	.131	.184	.438	
Se											1	.083	.242	.370	.148	.106	.067	.498**	.571**	-.046	-.022	.449**	.521**	.605**	.617**	.524**	.493**	.306	
Sn												1	.372*	-.466	.260	.487**	.129	.189	.171	.864**	.726**	.541**	-.207	.019	-.143	.152	-.092	.164	
Sr													1	.262	-.151	.922**	-.188	.447**	.375*	.118	-.014	.367*	.289	.126	.250	.364*	.348	.324	
Ti														1	.262	-.151	.922**	-.188	.447**	.375*	.118	-.014	.367*	.289	.126	.250	.364*	.348	.324
V															1	.153	.302	-.060	.333	.372	-.328	-.103	.438	.807**	.383	.672*	.662*	.731*	.489
Zn																1	-.142	.885**	.009	.076	.032	-.050	.112	-.006	.184	.078	.309	.171	.149
Al																	1	-.166	.602**	.223	.223	-.006	.331	.140	.170	.166	.224	.280	.419*
Ca																		1	.081	.050	-.126	-.157	-.087	.136	.286	.208	.148	.122	-.584*
Fe																			1	.531**	-.221	-.199	.357*	.544**	.863**	.749**	.464**	.490**	.219
K																				1	.106	.275	.618**	.527**	.637**	.635**	.686**	.593**	.293
Mg																					1	.936**	.577**	-.345*	-.262	-.351*	.073	-.131	.288
Na																						1	.600**	-.287	-.174	-.273	.114	-.080	.244
PM ₁₀																							1	.239	.410*	.340	.636**	.557**	.609**
OC																								1	.583**	.936**	.495**	.668**	.205
EC																									1	.832**	.592**	.580**	.153
TC																										1	.595**	.714**	.207
WSOC																											1	.398*	
N																												1	.677**
S																													1

**Correlation is significant at a significance level of 0.01 (bilateral), *Correlation is significant at a significance level of 0.05 (bilateral).

Table S2. Correlation matrices for metals with other parameters, split by seasons (continues).

Winter																														
As	Cd	Co	Cr	Cs	Cu	La	Mn	Pb	Rb	Sb	Se	Sn	Sr	Ti	V	Zn	Al	Ca	Fe	K	Mg	Na	PM ₁₀	OC	EC	TC	WSOC	N	S	
1	.645*	0.251	0.024	.393*	0.0161	-0.271	0.135	-0.142	.538**	.433	-.052	.119	-.133	-.029	.100	.022	.047	.070	.178	.513**	-.183	-.211	.051	.339	.471*	.427*	.371*	.285	.036	
	1	-.119	-.172	-.092	-.259	-.184	.115	.148	.521*	.332	.577	.143	-.326	-.100	-.362	-.121	-.140	-.321	.114	.490	-.292	-.246	.297	.611*	.569*	.628*	.564*	.501	.270	
		1	.368	.709**	.580**	.407	.723**	.171	.650**	.583**	-.179	.527**	.448*	.528**	.708**	.167	.548**	.677**	.699**	.559**	.175	.001	.376*	.547**	.392*	.519**	.213	.488**	.572**	
			1	.514**	-.010	.212	.641**	-.047	.368	.314	-.332	.430*	.250	.560**	-.245	-.020	.637**	.621**	.604**	.251	-.132	-.319	-.071	.238	.129	.211	.222	2.2	-.002	
				1	.395	.019	.522**	-.165	.640**	.316	-.693	.368*	.134	.302	.629**	.068	.316	.443*	.449*	.454*	-.044	-.158	.187	.516**	.417*	.487**	.270	.444*	.350	
					1	.117	.304	.143	.253	.082	.190	.241	.482*	.168	.658*	.256	.118	.369	.273	.234	.482*	.378	.440*	.231	.048	.181	.038	.179	.456*	
						1	.187	.733**	-.081	.509	-.404	.209	.248	.367	-.218	.056	.495	.386	.241	-.162	.067	-.033	-.310	-.164	-.219	-.190	-.180	-.220	-.036	
							1	-.067	.772**	.786**	-.125	.777**	.449*	.821**	.094	.002	.779**	.684**	.945**	.680**	-.034	-.034	.608**	.434*	.576**	.397*	.549**	.296		
								1	-.031	.196	-.139	-.142	.161	-.065	-.179	.223	.033	.062	-.005	-.086	.238	.271	.149	.092	-.010	.065	.066	.142	.376*	
									1	.786**	-.372	.591**	.032	.402*	.251	.042	.376	.320	.704**	.861**	-.232	-.338	3.15	.836**	.734**	.851**	.619**	.752**	.468**	
										1	-.811	.675**	.398	.531*	-.012	-.064	.548*	.589*	.782**	.807**	.077	-.143	.463*	.787**	.656**	.787**	.747**	.790**	.443*	
											1	.512	1	.428*	.852**	-.173	.142	.431	-.011	-.359	-.035	-.046	-.044	-.054	-.169	-.085	-.032	-.239	-.295	
												1	.428*	.852**	-.023	-.050	.787**	.667**	.838**	.557**	.032	-.194	.226	.473**	.364	.456*	.324	.498**	.186	
													1	.572**	.196	-.004	.585**	.479*	.350	.253	.840**	.709**	.564**	-.070	-.079	-.237	-.147	-.060	.334	
														1	-.029	-.034	.960**	.868**	.895**	.333	.034	-.246	.125	.146	.003	.105	.098	.133	-.087	
															1	.212	-.098	.446	.100	.111	.365	.314	.417	.240	.183	.235	-.070	.229	.558*	
																1	.015	.261	.117	.119	.045	.038	.060	-.097	.122	.023	-.173	-.108	.032	
																	1	.918**	.845**	.323	.064	-.237	-.147	.119	-.062	.064	.165	.121	-.069	
																		1	.772**	.281	.025	-.184	-.212	.049	-.065	.034	.065	.105	-.091	
																			1	.638**	1	.005	.010	.583**	.730**	.733**	.728**	.352	.457**	.180
																				1	.973**	.723**	-.232	-.070	-.345	-.246	-.253	.348		
																					1	.722**	-.292	-.087	-.381*	-.298	-.306	.347		
																						1	.498**	.579**	.340	.230	.455*	.720**	.645**	
																							1	.796**	.982**	.733**	.922**	.645**		
																								1	.897**	.554**	.686**	.426*		
																									1	.719**	.890**	.536**		
																										1	.778**	.387*		
																											1	.703**		

**Correlation is significant at a significance level of 0.01 (bilateral). *Correlation is significant at a significance level of 0.05 (bilateral).

Table S2. Correlation matrices for metals with other parameters, split by seasons.

		Total																													
	As	Cd	Co	Cr	Cs	Cu	La	Mn	Pb	Rb	Sb	Se	Sn	Sr	Ti	V	Zn	Al	Ca	Fe	K	Mg	Na	PM ₁₀	OC	EC	TC	WSOC	N	S	
As	1	.518**	.558**	.318**	.361**	.301**	.648**	.530**	.275**	.719**	.765**	0.1673	.534**	.358**	.386**	.470**	.317**	.376**	.430**	.536**	.753**	.389**	.312**	.147	.489**	.426**	.520**	.197*	.110	.006	
Cd		1	.676**	.826**	-.073	.654**	.476**	.772**	.060	.382**	.261*	-.355	.372**	.577**	.740**	.324**	.719**	.881**	.740**	.675**	.542**	.586**	.435**	.056	.156	-.248*	.043	-.327**	.114	.256*	
Co			1	.711**	.324**	.599**	.553**	.831**	.315**	.661**	.522**	-.471*	.557**	.594**	.761**	.579**	.625**	.765**	.700**	.795**	.678**	.508**	.343**	.287**	.432**	.090	.369**	-.082	.351**	.404**	
Cr				1	.145	.676**	.445**	.708**	.068	.332**	.232*	-.319	.354**	.585**	.769**	.226*	.743**	.845**	.802**	.656**	.485**	.513**	.349**	-.013	.087	-.292**	-.030	-.381**	.109	.226*	
Cs					1	.171	.307*	.204	-.010	.438**	.505**	.097	.361**	.100	.129	.341*	-.007	.102	.117	.172	.304**	.048	.1039	-.113	.277*	.238*	.287**	.192	-.088	-.244*	
Cu						1	.430**	.644**	.257**	.288**	.208*	-.095	.381**	.623**	.659**	.227*	.708**	.722**	.714**	.601**	.419**	.603**	.479**	.124	.118	-.246**	.009	-.374**	.043	.229**	
La							1	.500**	.356**	.348**	.530**	.380	.463**	.495**	.515**	.412**	.299**	.512**	.426**	.492**	.479**	.615**	.540**	-.053	.213*	-.060	.146	-.192	-.220**	-.049	
Mn								1	.258**	.708**	.582**	-.439	.646**	.646**	.870**	.412**	.651**	.874**	.788**	.934**	.727**	.535**	.328**	.261**	.473**	.052	.388**	-.108	.338**	.372**	
Pb									1	.337**	.558**	.022	.267**	.178**	.122	.211*	.115	.119	.120	.307**	.320**	.173*	.177*	.116	.337**	.280**	.356**	.195*	.161	.052	
Rb										1	.832**	-.248	.694**	.363**	.495**	.427**	.331**	.397**	.502**	.521**	.707**	.858**	.227**	.111	.280**	.739**	.521**	.753**	.379**	.387**	.172*
Sb											1	.104	.790**	.350**	.407**	.395**	.205*	.252*	.422**	.643**	.781**	.312**	.223*	.063	.623**	.528**	.658**	.397**	.127	-.146	
Se												1	.116	-.253	-.415	-.104	-.369	-.493*	-.248	-.329	-.232	-.203	.184	-.471*	-.167	-.071	-.161	-.074	-.499*	-.620**	
Sn													1	.433**	.619**	.325**	.343**	.449**	.509**	.700**	.671**	.320**	.180*	.158	.499**	.342**	.504**	.170*	.172*	.042	
Sr														1	.694**	.290**	.526**	.688**	.631**	.588**	.590**	.861**	.756**	.333**	.167	.148	.052	-.265**	-.039	.189*	
Ti															1	.304**	.668**	.923**	.788**	.854**	.572**	.563**	.338**	.094	.261**	.132	-.287**	.190*	.290**		
V																1	.167	.318**	.239**	.380**	.400**	.328**	.289**	.274**	.328**	.246*	.335**	.058	.326**	.345**	
Zn																	1	.735**	.853**	.597**	.514**	.431**	.283**	.032	.073	-.193*	.002	-.332**	.183*	.216*	
Al																		1	.841**	.841**	.841**	.523**	.419**	.143	.194*	-.289**	.061	-.372**	.215*	.377**	
Ca																			1	.766**	.647**	.487**	.295**	-.025	.224*	-.201*	.122	-.406**	.085	.115	
Fe																				1	.702**	.411**	.205*	.211*	.458**	.168*	.428**	-.056	.301**	.303**	
K																					1	.538**	.455**	.287**	.569**	.361**	.555**	.158	.211*	.108	
Mg																						1	.961**	.389**	.096	-.202*	-.033	-.307**	-.157	.165	
Na																							1	.413**	.025	-.153	-.078	-.267**	-.223**	.102	
PM ₁₀																								1	.408**	.309**	.389**	.318**	.478**	.723**	
OC																									1	.542**	.963**	.472**	.478**	.289**	
EC																										1	.749**	.621**	.273**	-.001	
TC																											1	.574**	.465**	.227**	
WSOC																												1	.369**	.098	
N																													1	.739**	
S																														1	

**Correlation is significant at a significance level of 0.01 (bilateral), * Correlation is significant at a significance level of 0.05 (bilateral).

CAPÍTULO 9. CONCLUSIONES/CONCLUSIÓN/CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

Las conclusiones generales que se derivan de esta Tesis Doctoral, dirigida al uso de la microextracci3n en fase s3lida *in-tube* para el an3lisis de compuestos org3nicos en matrices atmosf3ricas y a la caracterizaci3n de material particulado atmosf3rico, se exponen a continuaci3n:

1. Cumpliendo con uno de los objetivos planteados al inicio de este trabajo, se ha llevado a cabo un estudio de alcance acerca de la IT-SPME, analizando de forma cr3tica sus fortalezas y debilidades, as3 como cu3les son las configuraciones, acoplamientos y modalidades m3s consolidadas en la t3cnica, el efecto de las diferentes variables en la optimizaci3n y los campos de aplicaci3n m3s explotados durante los 3ltimos a3os.

La configuraci3n m3s consolidada es la de la modalidad de extracci3n 3nica con una sola v3lvula, aunque el modo de ciclos tambi3n est3 bastante extendido, sobre todo en el campo cl3nico. Tambi3n se emplean configuraciones con dos v3lvulas para problem3ticas espec3ficas (bajo volumen de muestra, acoplamientos o extracciones complejas). Las columnas capilares comerciales de GC proporcionan muy buena reproducibilidad, siendo muy adecuadas para la implementaci3n de la IT-SPME en m3todos de rutina. Adem3s, en los 3ltimos a3os se ha desarrollado un gran n3mero de nuevos capilares y fases (monol3ticos, MIP, RAM, nanop3rculas) que mejoran la selectividad, biocompatibilidad, eficiencia de extracci3n y estabilidad de los capilares comerciales. Tambi3n se han introducido nuevos acoplamientos (UHPLC) y nuevas variantes de IT-SPME (magn3tica, controlada electroqu3micamente, con control de temperatura), que mejoran la eficiencia de la extracci3n.

En la optimizaci3n de IT-SPME, de entre los numerosos par3metros que influyen, los m3s cr3ticos son el tipo de capilar y la fase extractante, aunque para algunos analitos tambi3n pueden ser muy relevantes otros par3metros relacionados con la muestra como el pH o la adici3n de modificadores o agentes de par i3nico.

La IT-SPME se ha aplicado en los campos ambiental, cl3nico y alimentario, as3 como en prote3mica. Puede emplearse en el an3lisis de muestras l3quidas o extractos de muestras s3lidas, si bien en estas 3ltimas debe combinarse con otras t3cnicas de extracci3n. Aunque la IT-SPME ha demostrado su aplicabilidad a m3ltiples matrices medioambientales, no est3 particularmente explotado su uso en el an3lisis de matrices atmosf3ricas. Sin embargo, sus caracter3sticas la hacen adecuada para este tipo de muestras.

2. La microextracci3n en fase s3lida *in-tube* se ha aplicado a la determinaci3n de tres grupos de contaminantes de gran inter3s (hidrocarburos arom3ticos polic3clicos, ftalatos y aminas alif3ticas) en matrices atmosf3ricas (agua de lluvia y material particulado atmosf3rico, PM). Los m3todos hacen uso de IT-SPME acoplada *on-line* con HPLC. La configuraci3n usada por primera vez en la bibliograf3a, con el capilar de extracci3n en una v3lvula externa, permite alternar de forma sencilla entre el montaje con IT-SPME y el cromat3grafo de l3quidos convencional, aumentando la versatilidad del HPLC.

Se ha desarrollado y validado un m3todo para la determinaci3n de 15 HAP en muestras acuosas ambientales. A diferencia de los m3todos previos para el an3lisis de HAP mediante IT-SPME, que requerían analizar por separado los compuestos m3s ligeros y los m3s pesados, en el m3todo propuesto se lleva a cabo la determinaci3n de los 15 analitos en un 3nico an3lisis tras encontrar unas buenas condiciones de compromiso para todos ellos (15% de tetrahidrofurano como modificador). Los resultados de la validaci3n del m3todo incluyen buenos valores de l3mites de detecci3n y cuantificaci3n, precisi3n inter-día y recuperaciones analíticas. Tambi3n se ha descartado la presencia de efectos memoria y los blancos de procedimiento, controlados diariamente, se han mantenido bajos y estables. Adem3s, se ha optimizado la separaci3n simult3nea de 16 HAP y 6 ftalatos, que permite el *screening* de estos 3ltimos.

El m3todo propuesto se ha empleado en un estudio cin3tico de la estabilidad de los HAP en agua de lluvia, en el que se comprueba que el 15% de tetrahidrofurano que actúa como modificador en la extracci3n tambi3n puede funcionar como conservante de los HAP en la matriz de agua de lluvia durante su conservaci3n a 4°C.

3. Se ha optimizado la separaci3n de 6 ftalatos en un tiempo relativamente corto (11 y 14 min) con dos columnas diferentes (monolítica C₁₈ y empaquetada de cianopropilo) y gradientes ACN/H₂O. La columna monolítica proporciona resultados ligeramente mejores y una presi3n de trabajo m3s baja. Tambi3n se ha realizado un estudio comparativo entre capilares, eligiendo para la determinaci3n de estos compuestos en agua de lluvia un capilar PLOT Rt[®]-S-BOND y un 40% de metanol como modificador, que permiten alcanzar unas buenas condiciones de compromiso para los seis analitos.

Se ha llevado a cabo un estudio sobre las posibles fuentes de ftalatos en los blancos de procedimiento, lo que ha permitido minimizar y mantener relativamente controlados los blancos, uno de los problemas habituales en la determinaci3n de estos compuestos ubicuos. Se ha asegurado la fiabilidad de los resultados obtenidos mediante el c3lculo de l3mites de detecci3n del m3todo (MDL), en lugar de los l3mites instrumentales que se suelen emplear, y el uso de los niveles para informar (RL) para tener en consideraci3n los blancos.

4. Ambos m3todos (HAP y ftalatos) reducen considerablemente el n3mero de etapas de tratamiento de muestra (tienen una 3nica etapa adem3s de la filtraci3n previa), el volumen requerido tanto de muestra como de disolventes org3nicos y el tiempo de an3lisis, gracias al acoplamiento *on-line* IT-SPME-HPLC. De esta forma, mejoran considerablemente muchas limitaciones de m3todos previos para la determinaci3n de estos analitos a nivel traza y ultratrazas en agua de lluvia, que incluyen m3ltiples y tediosas etapas (algunas como la evaporaci3n con riesgo de p3rdida de los analitos vol3tiles), largos tiempos de an3lisis, vol3menes altos de muestra y elevado consumo de disolventes org3nicos.

5. Aunque tienen potencial para extender su aplicaci3n a otras matrices ambientales (y el m3todo de HAP se ha aplicado a muestras puntuales de r3o, lago y fuente, y el de ftalatos al extracto acuoso del PM), los m3todos propuestos est3n enfocados a su aplicaci3n al

agua de lluvia. Sus caracteristicas los hacen id3neos para analizar muestras de periodos cortos. En las muestras analizadas se ha observado para ambos grupos de analitos el efecto lavado y la diluci3n de muestra cuando los vol3menes de agua de lluvia recogidos son elevados. Por sus caracteristicas, ambos m3todos son muy adecuados para su aplicaci3n en estudios medioambientales con an3lisis de muestras diarias, de eventos concretos e incluso de fracciones de evento. Este tipo de muestras pueden aportar una informaci3n medioambiental de gran inter3s, como la detecci3n de eventos de m3xima contaminaci3n, los procesos de lavado desde el aerosol atmosf3rico, las variaciones temporales y espaciales de los contaminantes y/o su relaci3n con variables meteorol3gicas y de la matriz de estudio, como la temperatura o la lluvia acumulada.

6. Se ha desarrollado y validado un m3todo sencillo (con 3 etapas: extracci3n US, filtraci3n e IT-SPME-HPLC-DAD) y r3pido (aproximadamente 45 min para todo el procedimiento, incluyendo la separaci3n cromatogr3fica de 15 analitos en solo 13 min) para determinar 15 ftalatos en material particulado atmosf3rico. Se emplea TEA para la formaci3n de interacciones de tipo par i3nico, tanto en la etapa de IT-SPME como en la separaci3n cromatogr3fica, mejorando la eficiencia de extracci3n de los compuestos m3s hidrof3licos y la resoluci3n y reproducibilidad de MBP y MEHP en la separaci3n cromatogr3fica. Al igual que los m3todos para agua de lluvia, el m3todo propuesto para la determinaci3n de ftalatos en PM presenta las ventajas inherentes a la t3cnica miniaturizada empleada (IT-SPME) y a su acoplamiento *on-line* con HPLC. Se analiza un n3mero elevado de compuestos, incluyendo los ftalatos m3s utilizados y por primera vez en material particulado atmosf3rico dos productos de degradaci3n: MBP y MEHP. Estos metabolitos (de DBP y DEHP respectivamente) no se han detectado en las 12 muestras de diferentes tipolog3as (urbana, tr3fico y suburbana) analizadas, pero no se descarta su presencia en el PM debido al reducido n3mero de muestras y a que la hidr3lisis de DEHP adsorbido sobre part3culas est3 documentada. Su determinaci3n se considera de gran inter3s para poder comprender los procesos de degradaci3n de los ftalatos en la atm3sfera y/o el reparto de esos mono3steres entre distintos compartimentos atmosf3ricos. En las muestras analizadas tan solo se detectaron 4 de los 15 analitos (DEP, DBP, DiBP y DEHP), siendo el DiBP el mayoritario en casi todas las muestras.

7. Asimismo se ha optimizado la separaci3n y derivatizaci3n en el interior del capilar de 5 aminas alif3ticas de cadena corta a partir de unas condiciones previas para la determinaci3n de DMA en modo de ciclos. La separaci3n de los 5 derivados se ha logrado en solo 7,5 min, mientras que la derivatizaci3n combinada con IT-SPME en modo en v3lvula (introduciendo los distintos reactivos de forma secuencial) parece funcionar tan bien como en el modo de ciclos. Los l3mites de detecci3n estimados son prometedores y tienen potencial de mejora mediante el uso de detecci3n de fluorescencia, siendo adecuados para matrices atmosf3ricas.

8. Por 3ltimo, se ha llevado a cabo una caracterizaci3n exhaustiva de 140 muestras de PM₁₀ recogidas durante un a3o, analizando la fracci3n carbonosa (incluyendo el carbono org3nico soluble), los iones mayoritarios, los metales traza, la composici3n elemental y las relaciones de is3topos estables. Esos resultados se han combinado con los datos de

parámetros meteorológicos y de nanopartículas para realizar una identificaci3n de fuentes, que posteriormente se completa con un estudio de contribuci3n de fuentes mediante factorizaci3n de matriz positiva (PMF). Se han analizado tambi3n los ftalatos en WSOC de muestras seleccionadas de distintas características, obteniendo concentraciones entre 8 y 53 ng/m³ para la suma de los ftalatos encontrados (DBP+DiBP, DEP y DEHP) y niveles m3s altos en el periodo c3lido.

Tanto las concentraciones como las correlaciones entre parámetros presentan variaciones estacionales, indicando la probable presencia de fuentes diferentes o con distinta contribuci3n al PM seg3n la estaci3n. Los resultados de PMF permiten identificar 6 factores: sulfato de amonio, nitrato, sal marina envejecida, combusti3n, mineral e industrial. Las fuentes principales son el aerosol secundario (con dos factores que contribuyen un 49% al PM₁₀) y la sal marina (que a su vez est3 envejecida, conteniendo m3s aerosol secundario, y que contribuye un 22,5% al PM₁₀). Los datos de WSOC, relacionado con el envejecimiento del aerosol, corroboran la elevada presencia de SOA (con una contribuci3n al OC de alrededor de un 40% de media), mientras que las correlaciones entre iones permiten identificar, adem3s del sulfato de amonio, otras especies presentes en el SIA: NaNO₃, K₂SO₄, Na₂SO₄ y KNO₃. Los datos de $\delta^{15}\text{N}$ corroboran la relaci3n entre el nitrato y la sal marina.

Las relaciones de is3topos estables de carbono y nitr3geno, junto a las variaciones de OC/EC y WSOC, llevan a localizar la mayor importancia de fuentes de combusti3n durante el periodo frío, permitiendo identificar esas fuentes como di3sel y fueloil, probablemente debidas en gran medida a las calefacciones dom3sticas. Por tanto, es probable que esta sea la contribuci3n mayoritaria del factor de combusti3n (que contribuye un 19,3% al PM₁₀), aunque las especies presentes en el factor parecen sugerir tambi3n una posible contribuci3n de tr3fico y quema de biomasa al mismo. A pesar de haberse identificado la presencia de un importante aporte biog3nico en primavera a partir de los is3topos y la contribuci3n del WSOC al OC, esta contribuci3n no se ha localizado en el estudio con PMF, probablemente debido a la ausencia de trazadores adecuados.

Los otros dos factores, mineral e industrial, tienen poco peso sobre el total del PM₁₀. Las nanopartículas, dominadas por la moda Aitken, llevan a identificar, gracias a sus correlaciones con otros parámetros, la influencia de la central t3rmica y/o la incineradora en la direcci3n SSW y de la ciudad de A Coruña (WNW) cuando el viento predominante procede de esas direcciones. Estas fuentes podrían ser las responsables del factor industrial en el PMF.

CONCLUSIÓNS

As conclusións xerais que se derivan desta Tese Doutoral, dirixida ao uso da microextracción en fase sólida *in-tube* para a análise de compostos orgánicos en matrices atmosféricas e á caracterización de material particulado atmosférico, expóñense a continuación:

1. Cumprindo cun dos obxectivos expostos ao comezo deste traballo, levouse a cabo un estudo de alcance acerca da IT-SPME, analizando de forma crítica as súas fortalezas e debilidades, así como cales son as configuracións, acoplamentos e modalidades máis consolidadas na técnica, o efecto das diferentes variables na optimización e os campos de aplicación máis explotados durante os últimos anos.

A configuración máis consolidada é a da modalidade de extracción única cunha soa válvula, aínda que o modo de ciclos tamén está bastante estendido, sobre todo no campo clínico. Tamén se empregan configuracións con dúas válvulas para problemáticas específicas (baixo volume de mostra, acoplamentos ou extraccións complexas). As columnas capilares comerciais de GC proporcionan moi boa reproducibilidade, sendo moi adecuadas para a implementación da IT-SPME en métodos de rutina. Ademais, nos últimos anos desenvolveuse un gran número de novos capilares e fases (monolíticos, MIP, RAM, nanopartículas) que melloran a selectividade, biocompatibilidade, eficiencia de extracción e estabilidade dos capilares comerciais. Tamén se introduciron novos axustes (UHPLC) e novas variantes de IT-SPME (magnética, controlada electroquimicamente, con control de temperatura), que melloran a eficiencia da extracción.

Na optimización de IT-SPME, de entre os numerosos parámetros que inflúen, os máis críticos son o tipo de capilar e a fase extractante, aínda que para algúns analitos tamén poden ser moi relevantes outros parámetros relacionados coa mostra como o pH ou a adición de modificadores ou axentes de par iónico.

A IT-SPME aplicouse nos campos ambiental, clínico e alimentario, así como en proteómica. Pode empregarse na análise de mostras líquidas ou extractos de mostras sólidas, aínda que nestas últimas debe combinarse con outras técnicas de extracción. Aínda que a IT-SPME demostrou a súa aplicabilidade a múltiples matrices ambientais, non está particularmente explotado o seu uso na análise de matrices atmosféricas. Con todo, as súas características fana adecuada para este tipo de mostras.

2. A microextracción en fase sólida *in-tube* aplicouse á determinación de tres grupos de contaminantes de grande interese (hidrocarburos aromáticos policíclicos, ftalatos e aminas alifáticas) en matrices atmosféricas (auga de choiva e material particulado atmosférico, PM). Os métodos fan uso de IT-SPME acoplada *on-line* con HPLC. A configuración usada por primeira vez na bibliografía, co capilar de extracción nunha válvula externa, permite alternar de forma sinxela entre a montaxe con IT-SPME e o cromatógrafo de líquidos convencional, aumentando a versatilidade do HPLC.

Desenvolveuse e validouse un método para a determinación de 15 HAP en mostras acuosas ambientais. A diferenza dos métodos previos para a análise de HAP mediante IT-

SPME, que requirían analizar por separado os compostos máis lixeiros e os máis pesados, no método proposto lévase a cabo a determinación dos 15 analitos nunha única análise tras atopar unhas boas condicións de compromiso para todos eles (15% de tetrahidrofurano como modificador). Os resultados da validación do método inclúen bos valores de límites de detección e cuantificación, precisión inter-día e recuperacións analíticas. Tamén se descartou a presenza de efectos memoria e os brancos de procedemento, controlados diariamente, mantivéronse baixos e estables. Ademais, optimizouse a separación simultánea de 16 HAP e 6 ftalatos, que permite o *screening* destes últimos.

O método proposto empregouse nun estudo cinético da estabilidade dos HAP en auga de choiva, no que se comproba que o 15% de tetrahidrofurano que actúa como modificador na extracción tamén pode funcionar como conservante dos HAP na matriz de auga de choiva durante a súa conservación a 4°C.

3. Optimizouse a separación de 6 ftalatos nun tempo relativamente curto (11 e 14 min) con dúas columnas diferentes (monolítica C₁₈ e empaketada de cianopropilo) e gradientes ACN/H₂O. A columna monolítica proporciona resultados lixeiramente mellores e unha presión de traballo máis baixa. Tamén se realizou un estudo comparativo entre capilares, elixindo para a determinación destes compostos en auga de choiva un capilar PLOT Rt[®]-S-BOND e un 40% de metanol como modificador, que permiten alcanzar unhas boas condicións de compromiso para os seis analitos.

Levou a cabo un estudo sobre as posibles fontes de ftalatos nos brancos de procedemento, o que permitiu minimizar e manter relativamente controlados os brancos, un dos problemas habituais na determinación destes compostos ubicuos. Asegurouse a fiabilidade dos resultados obtidos mediante o cálculo de límites de detección do método (MDL), en lugar dos límites instrumentais que se adoitan empregar, e o uso dos niveis para informar (RL) para ter en consideración os brancos.

4. Ambos os métodos (HAP e ftalatos) reducen considerablemente o número de etapas de tratamento de mostra (teñen unha única etapa ademais da filtración previa), o volume requirido tanto de mostra coma de disolventes orgánicos e o tempo de análise, grazas ao acoplamento *on-line* IT-SPME-HPLC. Desta forma, melloran considerablemente moitas limitacións de métodos previos para a determinación destes analitos a nivel traza e ultratraza en auga de choiva, que inclúen múltiples e tediosas etapas (algunhas como a evaporación con risco de perda dos analitos volátiles), longos tempos de análise, volumes altos de mostra e elevado consumo de disolventes orgánicos.

5. Aínda que teñen potencial para estender a súa aplicación a outras matrices ambientais (e o método de HAP aplicouse a mostras puntuais de río, lago e fonte, e o de ftalatos ao extracto acuoso do PM), os métodos propostos están enfocados á súa aplicación á auga de choiva. As súas características fanos idóneos para analizar mostras de períodos curtos. Nas mostras analizadas observouse para ambos os grupos de analitos o efecto lavado e a dilución de mostra cando os volumes de auga de choiva recollidos son elevados. Polas súas características, ambos os métodos son moi adecuados para a súa aplicación en

estudos ambientais con análises de mostras diarias, de eventos concretos e mesmo de fraccións de evento. Este tipo de mostras poden achegar unha información ambiental de grande interese, como a detección de eventos de máxima contaminación, os procesos de lavado desde o aerosol atmosférico, as variacións temporais e espaciais dos contaminantes e/ou a súa relación con variables meteorolóxicas e da matriz de estudo, como a temperatura ou a choiva acumulada.

6. Desenvolveuse e validouse un método sinxelo (con 3 etapas: extracción US, filtración e IT-SPME-HPLC-DAD) e rápido (aproximadamente 45 min para todo o procedemento, incluíndo a separación cromatográfica de 15 analitos en só 13 min) para determinar 15 ftalatos en material particulado atmosférico. Emprégase TEA para a formación de interaccións de tipo par iónico, tanto na etapa de IT-SPME coma na separación cromatográfica, mellorando a eficiencia de extracción dos compostos máis hidrofílicos e a resolución e reproducibilidade de MBP e MEHP na separación cromatográfica. Do mesmo xeito que os métodos para auga de choiva, o método proposto para a determinación de ftalatos en PM presenta as vantaxes inherentes á técnica miniaturizada empregada (IT-SPME) e ao seu acoplamento *on-line* con HPLC. Analízase un número elevado de compostos, incluíndo os ftalatos máis utilizados e por primeira vez en material particulado atmosférico dous produtos de degradación: MBP e MEHP. Estes metabolitos (de DBP e DEHP respectivamente) non se detectaron nas 12 mostras de diferentes tipoloxías (urbana, tráfico e suburbana) analizadas, pero non se descarta a súa presenza no PM debido ao reducido número de mostras e a que a hidrólisis de DEHP adsorbido sobre partículas está documentada. A súa determinación considérase de grande interese para poder comprender os procesos de degradación dos ftalatos na atmosfera e/ou a repartición deses monoésteres entre distintos compartimentos atmosféricos. Nas mostras analizadas tan só se detectaron 4 dos 15 analitos (DEP, DBP, DiBP e DEHP), sendo o DiBP o maioritario en case todas as mostras.

7. Así mesmo optimizouse a separación e derivatización no interior do capilar de 5 aminas alifáticas de cadea curta a partir dunhas condicións previas para a determinación de DMA en modo de ciclos. A separación dos 5 derivados logrouse en só 7,5 min, mentres que a derivatización combinada con IT-SPME en modo en válvula (introducindo os distintos reactivos de forma secuencial) parece funcionar tan ben coma no modo de ciclos. Os límites de detección estimados son prometedores e teñen potencial de mellora mediante o uso de detección de fluorescencia, sendo adecuados para matrices atmosféricas.

8. Por último, levouse a cabo unha caracterización exhaustiva de 140 mostras de PM₁₀ recollidas durante un ano, analizando a fracción carbonosa (incluíndo o carbono orgánico soluble), os ións maioritarios, os metais traza, a composición elemental e as relacións de isótopos estables. Eses resultados combináronse cos datos de parámetros meteorolóxicos e de nanopartículas para realizar unha identificación de fontes, que posteriormente se completa cun estudo de contribución de fontes mediante factorización de matriz positiva (PMF). Analizáronse tamén os ftalatos en WSOC de mostras seleccionadas de distintas características, obtendo concentracións entre 8 e 53 ng/m³ para a suma dos ftalatos atopados (DBP+DiBP, DEP e DEHP) e niveis máis altos no período cálido.

Tanto as concentracións coma as correlacións entre parámetros presentan variacións estacionais, indicando a probable presenza de fontes diferentes ou con distinta contribución ao PM segundo a estación. Os resultados de PMF permiten identificar 6 factores: sulfato de amonio, nitrato, sal mariño envellecido, combustión, mineral e industrial. As fontes principais son o aerosol secundario (con dous factores que contribúen un 49% ao PM₁₀) e o sal mariño (que á súa vez está envellecido, contendo máis aerosol secundario, e que contribúe un 22,5% ao PM₁₀). Os datos de WSOC, relacionado co envellecemento do aerosol, corroboran a elevada presenza de SOA (cunha contribución ao OC de ao redor dun 40% de media), mentres que as correlacións entre ións permiten identificar, ademais do sulfato de amonio, outras especies presentes no SIA: NaNO₃, K₂SO₄, Na₂SO₄ e KNO₃. Os datos de $\delta^{15}\text{N}$ corroboran a relación entre o nitrato e o sal mariño.

As relacións de isótopos estables de carbono e nitróxeno, xunto ás variacións de OC/EC e WSOC, levan a localizar a maior importancia de fontes de combustión durante o período frío, permitindo identificar esas fontes como diésel e fueloil, probablemente debidas en gran medida ás calefaccións domésticas. Por tanto, é probable que esta sexa a contribución maioritaria do factor de combustión (que contribúe un 19,3% ao PM₁₀), aínda que as especies presentes no factor parecen suxerir tamén unha posible contribución de tráfico e queima de biomasa ao mesmo. A pesar de identificarse a presenza dunha importante achega bioxénica na primavera a partir dos isótopos e a contribución do WSOC ao OC, esta contribución non se localizou no estudo con PMF, probablemente debido á ausencia de trazadores adecuados.

Os outros dous factores, mineral e industrial, teñen pouco peso sobre o total do PM₁₀. As nanopartículas, dominadas pola moda Aitken, levan a identificar, grazas ás súas correlacións con outros parámetros, a influencia da central térmica e/ou a incineradora na dirección SSW e da cidade da Coruña (WNW) cando o vento predominante procede desas direccións. Estas fontes poderían ser as responsables do factor industrial no PMF.

CONCLUSIONS

The general conclusions derived from this PhD Thesis, focused on the use of in-tube solid phase microextraction for the analysis of organic compounds in atmospheric matrices and on the characterization of atmospheric particulate matter, are presented below:

1. In order to achieve one of the aims set at the beginning, a scoping review on IT-SPME has been carried out, by analyzing its strenghts and weaknesses, as well as the most consolidated configurations, couplings and modes, the effects of the different variables on the optimization and moreover, the most important fields of application during the last years.

The most consolidated configuration is flow-through mode with a single valve, although the draw/eject cycle mode is also quite widespread, especially in the clinical fields. Configurations using two valves are also used for specific issues (low sample volume, complex couplings or extractions). GC commercial capillary columns provide good reproducibility, being very suitable for the implementation of IT-SPME in routine methods. In addition, in the last years a large number of new capillaries and phases (monolithic, MIP, RAM, nanoparticles) have been developed. These capillaries improve the selectivity, biocompatibility, extraction efficiency and stability of commercial capillaries. New couplings (UHPLC) and new performances of IT-SPME (magnetic, electrochemically controlled, with a temperature-controlling device) were also introduced for improving the extraction efficiency.

Several parameters affect IT-SPME optimization, being the capillary type and the extractive phase the most critical, although for some analytes other parameters related to the sample, such as pH or the addition of modifiers or ion-pair agents, can be also very significant.

The IT-SPME has been applied in the environmental, clinical and food fields, as well as in proteomics. It can be used in the analysis of liquid samples or extracts of solid samples, although in the latter it has to be combined with other extraction techniques. Although the viability of IT-SPME for different environmental matrices has been proved, its use in the analysis of atmospheric matrices is not very widespread. However, its characteristics make IT-SPME very suitable for this type of samples.

2. In-tube solid phase microextraction has been applied to determine three groups of pollutants of a great interest (polycyclic aromatic hydrocarbons, phthalates and aliphatic amines) in atmospheric matrices (rainwater and atmospheric particulate matter, PM). The methods use IT-SPME coupled to on-line to HPLC. The selected configuration, used for the first time in the literature, has the extraction capillary in an external valve and allows to easily switch between the IT-SPME configuration and a conventional configuration of the liquid chromatograph using the autosampler, increasing the versatility of the HPLC.

A method for the determination of 15 PAHs in environmental aqueous samples has been developed and validated. Differently from the previous methods for PAHs analysis through IT-SPME, which require separate analysis of the lightest and heaviest compounds,

in the proposed method the determination of the 15 analytes is carried out in a single analysis reaching satisfactory conditions for all the detected compounds (15% tetrahydrofuran as modifier). The results of the method validation include good detection and quantification limits, inter-day precision and analytical recoveries. The presence of memory-effect has also been discarded and procedural blanks, daily verified, were low and stable. In addition, the simultaneous separation of 16 PAHs and 6 phthalates, which allows the screening of the latter, has been optimized.

The proposed method has been used in a kinetic study on the stability of PAHs in rainwater, which shows that 15% of tetrahydrofuran, which acts as modifier in the extraction, can also work as a preservative for PAHs in the rainwater during its conservation at 4°C.

3. The separation of 6 phthalates in a relatively short time (11 and 14 min) with two different columns (monolithic C₁₈ and packed cyanopropyl) and ACN/H₂O gradients has been optimized. The monolithic column provides slightly better results and a lower working system pressure. A comparative study between capillaries has also been carried out and a PLOT Rt[®]-S-BOND capillary and 40% methanol as modifier were selected for the determination of these compounds in rainwater. These conditions allow a good compromise for the six analytes.

A study about the possible sources of phthalates in the procedural blanks has been carried out, allowing to minimize and to maintain controlled the blanks, one of the usual problems in the determination of these ubiquitous compounds. The reliability of the results was assured by calculating method detection limits (MDL), instead of the instrumental limits commonly used, and by using reporting levels (RL) to take blanks into account.

4. Both methods (for PAHs and phthalates) significantly reduce the step number during the sample treatment (with a single step in addition to the previous filtration), the required volume of both sample and organic solvents, and the analysis time, due to the on-line coupling IT-SPME-HPLC. In this way, they improve many limitations of previous methods for the determination of these analytes at trace and ultratrace levels in rainwater, such as multiple and tedious steps (such as evaporation, with a risk of volatile analytes loss), long analysis time, high sample volumes and high consumption of organic solvents.

5. The proposed methods are focused on their application to rainwater, although they can be potentially extended to other environmental matrices (method for PAHs has been applied to river, lake and spring water samples, whereas method for phthalates to aqueous extracts of PM). The characteristics of proposed methods make them suitable for analyzing samples collected during short time periods. In the analyzed samples the washing effect and the sample dilution were observed for both groups of analytes when the collected rainwater volumes are high. Due to their characteristics, both methods are especially suitable for analysis of daily samples, single events or even fractions of an event in environmental studies. This type of samples can provide very interesting environmental information, such as the detection of events of maximum contamination, washing processes from the atmospheric aerosol, temporal and spatial variations of pollutants

and/or their relationship with meteorological variables, such as temperature or total precipitation.

6. A simple (3 steps: US extraction, filtration and IT-SPME-HPLC-DAD) and fast (approximately 45 min for the whole procedure, including the chromatographic separation of 15 analytes in only 13 min) method for the determination of 15 phthalates in atmospheric particulate matter has been developed. TEA is used for creating ion-pair-like interactions, both in the IT-SPME step and in the chromatographic separation, improving the extraction efficiency of the most hydrophilic compounds and the resolution and reproducibility of MBP and MEHP in the chromatographic separation. As the methods for rainwater, the proposed method for the determination of phthalates in PM presents the advantages of both the miniaturized technique (IT-SPME) and the on-line coupling to HPLC. A large number of compounds, including the most widely used phthalate compounds and for the first time in atmospheric particulate matter, two degradation products as MBP and MEHP, has been analyzed. These metabolites (from DBP and DEHP, respectively) were not detected in the 12 analysed samples of different typologies (urban, traffic and suburban), but their presence in the PM cannot be discarded due to the low sample number and to the fact that the hydrolysis of DEHP adsorbed on particles is well documented. Their determination is of a great interest to understand the degradation of phthalates in atmosphere and/or the distribution of these monoesters between different atmospheric compartments. In the analyzed samples, among 15 analytes only 4 (DEP, DBP, DiBP and DEHP) were detected, with DiBP showing the higher content in almost all the samples.

7. Moreover, the separation and derivatization inside the capillary of 5 short chain aliphatic amines were also optimized. To this aim, previous conditions set up for the determination of DMA using draw/eject cycles mode were improved. The separation of the 5 derivatives has been achieved in only 7.5 min, while derivatization combined with IT-SPME in in-valve mode (introducing the reactants sequentially) seems to work as satisfactorily as in the cycles mode. The estimated detection limits, suitable for atmospheric matrices, are promising and can be improved by using fluorescence detection.

8. Finally, an exhaustive characterization of 140 PM₁₀ samples collected over one year has been carried out, and the carbonaceous fraction (including the water soluble organic carbon, WSOC), the major ions, the trace metals, the elemental composition and the stable isotopes ratios were analysed. These results have been combined with meteorological parameters and nanoparticle data to perform a source identification, completed by a source apportionment study using positive matrix factorization (PMF). The phthalates in WSOC were also analyzed for samples of different characteristics, obtaining concentrations of total phthalates (DBP+DiBP, DEP and DEHP) from 8 to 53 ng/m³ and higher levels during the warm period.

Both the concentrations and the correlations between parameters show seasonal variations, indicating the probable presence of different sources or a different contribution to the PM according to the season. The results of PMF allow to identify 6 factors: ammonium sulfate, nitrate, aged sea salt, combustion, mineral and industrial. The main

sources are the secondary aerosol (with two factors contributing for 49% to PM_{10}) and sea salt (which in turn is aged, containing more secondary aerosol, and which contributes for 22.5% to PM_{10}). The WSOC data, related to aerosol ageing, confirm the high SOA presence (contributing to OC about for 40% on average), while the correlations between ions allow to identify in SIA other species, $NaNO_3$, K_2SO_4 , Na_2SO_4 and KNO_3 , in addition to ammonium sulfate. The $\delta^{15}N$ data confirm the relationship between nitrate and sea salt.

The stable carbon and nitrogen isotopic ratios, the OC/EC variations and WSOC, highlight the combustion as the main sources during the cold period. These sources can be identified as diesel and fuel oil combustions, probably due to domestic heating. Therefore, this is likely the major contribution of the combustion factor (contributing for 19.3% to PM_{10}), although the species present in this factor also suggest a possible contribution of traffic and biomass burning. Despite the presence of a significant biogenic input in spring identified by the isotopic ratios and the WSOC contribution to OC, this contribution has not been found in the PMF study, probably due to the absence of suitable tracers.

The other two factors, mineral and industrial, have a low weight over total PM_{10} . The nanoparticles, dominated by the Aitken mode, permit to identify, by means of their correlations with other parameters, the influence of sources: the power station and/or the incinerator in the SSW direction and of the city of A Coruña (WNW) when the wind blows from those directions. These sources could be related to the industrial factor in the PMF.

ANEXO I

Strengths and weaknesses of in-tube solid-phase
microextraction: A scoping review.

Analytica Chimica Acta 906 (2016) 41–57.



Review

Strengths and weaknesses of in-tube solid-phase microextraction: A scoping review



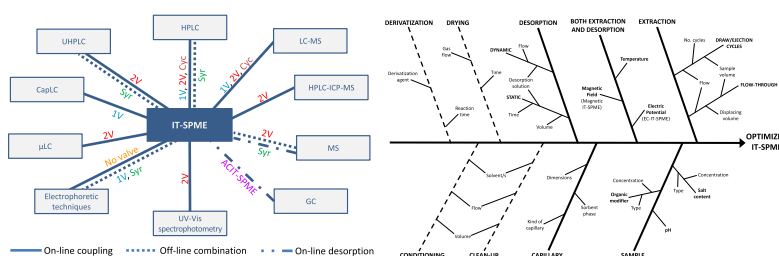
M. Fernández-Amado, M.C. Prieto-Blanco*, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez

Grupo QANAP, Instituto Universitario de Medio Ambiente (IUMA), Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA), Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidade da Coruña, Campus de A Coruña, 15071 A Coruña, Spain

HIGHLIGHTS

- A scoping review was carried out, which assesses the strengths and weaknesses of IT-SPME during the period 2009–2015.
- Optimization parameters are discussed, with special emphasis on the most decisive ones.
- New couplings, performances and capillaries as strength elements.
- Benefits and drawbacks of the extraction modes and configurations.
- IT-SPME applicability to different matrices and analytes.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 September 2015
 Received in revised form
 30 November 2015
 Accepted 11 December 2015
 Available online 17 December 2015

Keywords:

In-tube SPME
 IT-SPME
 Biomolecules
 In-tube SPME couplings
 In-tube SPME performances
 In-tube SPME parameters
 Environmental analysis
 Biomedical analysis
 Food analysis

ABSTRACT

In-tube solid-phase microextraction (in-tube SPME or IT-SPME) is a sample preparation technique which has demonstrated over time its ability to couple with liquid chromatography (LC), as well as its advantages as a miniaturized technique. However, the in-tube SPME perspectives in the forthcoming years depend on solutions that can be brought to the environmental, industrial, food and biomedical analysis. The purpose of this scoping review is to examine the strengths and weaknesses of this technique during the period 2009 to 2015 in order to identify research gaps that should be addressed in the future, as well as the tendencies that are meant to strengthen the technique.

In terms of methodological aspects, this scoping review shows the in-tube SPME strengths in the coupling with LC (LC-mass spectrometry, capillary LC, ultra-high-pressure LC), in the new performances (magnetic IT-SPME and electrochemically controlled in-tube SPME) and in the wide range of development of coatings and capillaries. Concerning the applicability, most in-tube SPME studies (around 80%) carry out environmental and biomedical analyses, a lower number food analyses and few industrial analyses. Some promising studies in proteomics have been performed. The review makes a critical description of parameters used in the optimization of in-tube SPME methods, highlighting the importance of some of them (i.e. type of capillary coatings). Commercial capillaries in environmental analysis and laboratory-prepared capillaries in biomedical analysis have been employed with good results. The most consolidated configuration is in-valve mode, however the cycle mode configuration is frequently chosen for biomedical analysis. This scoping review revealed that some aspects such as the combination

* Corresponding author. Departamento Química Analítica, Universidade da Coruña, Campus da Zapateira sn, 15071 A Coruña, Spain.

E-mail address: mcprieto@udc.es (M.C. Prieto-Blanco).

of in-tube SPME with other sample treatment techniques for the analysis of solid samples should be developed in depth in the near future.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Current state-of-the-art of in-tube SPME	42
2. Identifying relevant studies (2009–2015): scoping results	43
3. Strengths and weaknesses: configurations, parameters and applicability	43
3.1. Extraction modes and different configurations in in-tube SPME	43
3.2. Parameters for the optimization of an in-tube SPME method	47
3.2.1. Extracting phase and donor phase	47
3.2.2. Steps of the in-tube SPME process	47
3.3. Applicability to different kinds of matrices and analytes	51
4. Reinforcing strengths: new couplings, performances and capillaries	52
4.1. New couplings	52
4.2. New performances	52
4.3. New capillary coatings and type of capillaries	53
5. Conclusions and future trends	54
Acknowledgments	54
References	54

1. Current state-of-the-art of in-tube SPME

A wide range of sample preparation techniques has been developed in order to minimize the problems found in multi-step procedures using classic techniques (mainly, solid-phase extraction [SPE] and liquid–liquid extraction [LLE]). The common feature of these alternative techniques is the miniaturization referred to as a decrease in both size of the extractant phase and in sample volume with respect to classic techniques. As a result, an approach to green analytical methods (lower waste, lower consumption of toxic reagents and energy) is carried out [1]. Other relevant characteristics of some miniaturized techniques are: the reduction in steps of sample preparation, the automation and the coupling with chromatographic techniques.

However, miniaturized techniques have not completely replaced classic techniques, especially in the standardized and routine methods. In addition, there has been an uneven development in the application of the miniaturized techniques proposed over time. In-tube solid-phase microextraction (in-tube SPME or IT-SPME), also called capillary microextraction, is one of the techniques which has maintained a steady development since its introduction in 1997 by Eisert and Pawliszyn [2].

In the most recent literature, in-tube SPME has been classified along with syringe SPME and in-tip SPME, into a group of techniques whose diffusion of analyte is performed by flow-through [3,4]. This group is opposed to another one in which the diffusion is facilitated by stirring: (in-fiber) SPME, stir-bar sorptive extraction [SBSE] and thin-film microextraction [TFME]. The latter is also considered a group of static techniques and the in-tube SPME group includes dynamic techniques [5] in reference to similar classification criterion. In most cases, main techniques of each group (in-tube SPME and in-fiber SPME) can be considered complementary techniques according to the coupling with chromatography techniques. The advantages presented by the coupling of in-fiber SPME with gas chromatography are well-known, compared to the longer duration of the desorption process when the coupling is performed with liquid chromatography [6,7]. However, the coupling of in-tube SPME with LC can be performed in several variants with short

desorption intervals. The coupling with LC is also an advantage with respect to other techniques of diffusion by flow-through. A different variant (open tubular trapping, OTT) is considered when in-tube SPME is coupled with GC. On the other hand, in-tube SPME along with in-fiber, membrane, planar-SPME and SBSE is a miniaturized technique in which sol–gel microextraction media can be used [3].

Kataoka et al. reviewed until 2009 [7] the developments and applications of the capillary microextraction techniques, with special emphasis on in-tube SPME. Moliner et al. [1] studied the coupling of in-tube SPME with miniaturized chromatographic systems and the preparation of new capillary coatings. In this review, the main purpose is to examine the strengths and weaknesses of in-tube SPME in terms of extraction modes and configurations, use of parameters for optimization and new couplings and performances, covering the period from 2009 to 2015. The ability of in-tube SPME methods to solve problems in environmental, industrial, food and biomedical analyses for the period 2009 to 2015 is examined in a transversal way. Following the framework of scoping studies [8], three research questions are posed: (1) which are the consolidated configurations, couplings and performances during the 2009–2015 period? (2) what are the most relevant parameters in optimized in-tube SPME methods during the 2009–2015 period? and (3) how is the application of in-tube SPME methods diversified to the environmental, industrial, food and clinical fields during the 2009–2015 period? Identifying relevant studies, as well as summarizing and reporting the corresponding results are shown in the following sections.

In summary, compared with other papers [1,4,5,9–11], the proposed review examines not only the in-tube SPME advances but also their strengths and weaknesses. The used methodology based on scoping studies allows completing the assessment with quantitative data. Moreover, unlike previous reviews [4,5,9–11], all application fields (biomedical, environmental and food) are covered.

2. Identifying relevant studies (2009–2015): scoping results

Since the introduction of in-tube SPME and up until 2014, 241 results can be found using as search terms “in-tube solid phase microextraction” in Scopus, Caplus and Medline databases. Fig. 1 shows that the number of publications related to in-tube SPME has been increasing with time, reaching its maximum value in the last triennium (2012–2014).

This review focuses on the past 6 years (January 2009–January 2015), a period which included almost half (49%) of the reported in-tube SPME publications since the introduction of the technique. Corresponding to this period, 119 references are found, including research articles (96), reviews (19) and patents (4). Most reviews are not specific to the in-tube SPME technique, but they are focused on different applications or they are reviews on microextraction, sorbent extraction and green techniques. The presence of in-tube solid phase microextraction among the selected techniques in numerous reviews of different fields indicates the importance of this sample treatment over the past years.

Two data categories were identified from the literature selection [8]: a general classification performed according to the application fields (Tables 1–3) and another specific classification according to key terms (matrix, target compounds, type of capillary, determination technique and information about desorption, coupling and automation). In this way, the information designated to answer the research questions can be extracted more easily.

Regarding the applications, a compilation of almost all the reported in-tube SPME applications over the past 6 years has been carried out. In the target years, the most important applications are in the environmental field (accounting for 38.6% of all applications), closely followed by biomedical applications (37.3%). In-tube SPME applications to food analysis (21.7%) have also been reported in the recent years, whereas only two works analyzed industrial samples [12,13] (Fig. 1). Six references [14–19] are included in two different fields. Differences between fields of application have been found with regard to the combination of in-tube SPME and instrumental techniques (liquid chromatography and others). In the food field, the combination with mainly electrophoretic techniques and mass spectrometry represents 39% of the references, whereas for other fields are in the range of 15–22%. Capillary liquid chromatography (CapLC) is used in 44% of the references in the environmental field but its presence is scarce in other study fields (biomedical or food). The common point is the combination of in-tube SPME and HPLC (ranging from 28% to 45% of the total references) (Fig. 2).

A significant number of authors have contributed to the in-tube SPME development [12–91] and several research centers are responsible for a large part of in-tube SPME studies. Shujitsu University (Japan) has produced 27.8%, 22.6% and 6.2% of the selected references in food, biomedical and environmental fields, respectively (Tables 1–3). The references from the Wuhan University (China) represented 27.8%, 29% and 15.6% of the above-mentioned fields. The references from the Valencia University (Spain) represent 56.2% of the total amount in the environmental field (15.6% in collaboration with A Coruña University, Spain). Other centers, such as São Paulo University (Brazil), produced 19.4% of the selected studies in the biomedical field.

3. Strengths and weaknesses: configurations, parameters and applicability

Different modes of extraction, which imply different configurations, can be used in in-tube SPME. This fact demonstrates the versatility of the technique and can be interpreted as an in-tube SPME strength. However, if the use of different configurations persists over time, without clear differences among them, new users may be confused regarding the necessary instrumentation for the in-tube SPME implementation.

For the method optimization, the most significant parameters are examined in order to obtain the results in line with the objectives; in addition, suitable robustness and flexibility of the method are analyzed for its further application. The use of numerous variables (including some typical SPME variables) is a strength of the technique, because it has the chance of facing different problems. However, if there are a large number of variables to optimize in each method, the process can be very complex.

3.1. Extraction modes and different configurations in in-tube SPME

Since the beginning of the in-tube SPME, there have been two modes of extraction. In one of them, the sample passes continuously through the capillary, once and only in one direction (flow-through mode) and, in the other, the sample is repeatedly aspirated/dispensed (draw/eject cycle mode). The first mode can be carried out with both manual and automatic sample introduction, whereas the cycle mode is automated, but a programmable auto-sampler with a metering pump (only in some commercial brands) is necessary. As shown in Fig. 3, 29.3% of the studies use the cycle mode, 28% the manual flow-through mode and 30.7% the

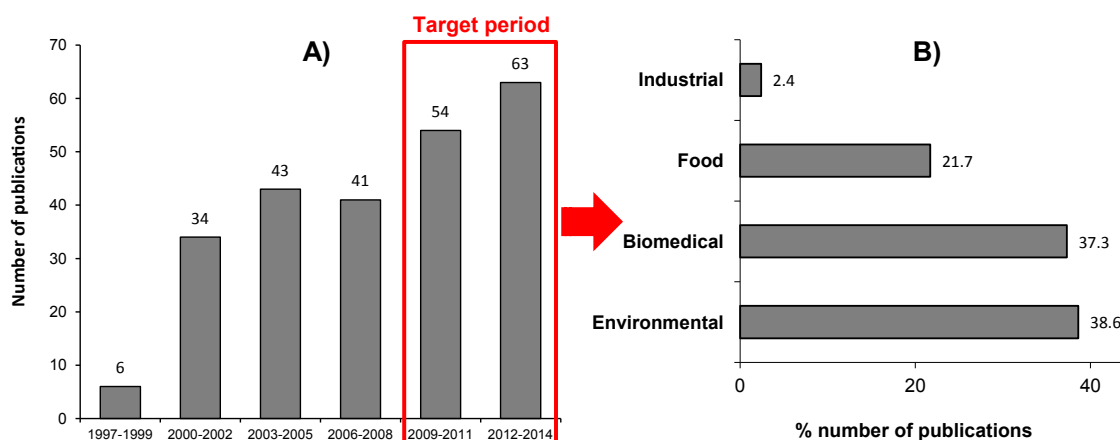


Fig. 1. A) Number of publications related with in-tube SPME since the introduction of the technique until 2014, organized in triennial periods. B) Relative production of publications on in-tube SPME applications since 2009, by application field.

Table 1
Summary of the applications of IT-SPME methods in environmental and industrial analysis (January 2009–January 2015).

Matrix	Analyte/s	Technique	Capillary	On- line	Automation	Desorption	Analytical parameters (ng/mL)		Ref.
							Lineal range	LOD	
Water	Acetylsalicylic acid Acetaminophen Atenolol Diclofenac Ibuprofen	CapLC	Magnetic nanoparticles (homemade)	Yes	No	Dynamic (mobile phase)	n.p.	5 2.5 5 1.7 2	[45]
Water	Aliphatic amines	HPLC	TRB-5	Yes	No	Dynamic (mobile phase)	Up to 2500 (UV) 6–500 (FLD)	15–200 (UV) 0.1–0.4 (FLD)	[49]
Water	C ₁₂ -BAK	CapLC (TiO ₂ column)	TRB-35	Yes	No	Dynamic (mobile phase)	1.5–300	0.5	[36]
Water	Endocrine disruptors PAHs	HPLC-UV	Nanoparticles (homemade)	Yes	Yes	Dynamic (mobile phase)	n.p.	0.42–0.78 0.034–0.19	[60]
Water	Ketoprofen Fenbufen Ibuprofen	LC-MS	Monolithic (homemade)	Yes	Yes	Dynamic (mobile phase)	2–200 1–200 2–200	0.46 0.20 0.57	[15] ^a
Water	Oseltamivir and oseltamivir carboxylate	LC-MS/MS	CP-Pora PLOT amine	Yes	Cycles	Dynamic (mobile phase)	0.001–0.500	(0.078 –0.16) × 10 ⁻³	[62]
Water	PAHs	GC	Quartz liner filled with several capillaries (homemade)	No	No	Thermal	0.01–100	(0.8 –1.7) × 10 ⁻³	[43]
Water	Pesticides, hydrocarbons, phthalates and phenols	CapLC-DAD	Commercial GC column	Yes	No	Dynamic (mobile phase)	1–100	0.008–0.2	[59]
Environmental aqueous samples	Estrogens	HPLC-DAD and HPLC-FLD	Supel-Q PLOT and Carboxen 1006 PLOT	Yes	Cycles		n.p.	0.04–0.63 (UV) 0.005–0.03 (FLD)	[61]
Lake water	Triazines	DART-MS	Carbon-nanotubes-incorporated polymer monolith (homemade)			Dynamic (elution solvent)	n.p.	0.02–0.14	[16] ^b
River water	Triazines	CapLC-DAD	Magnetic nanoparticles (homemade)	Yes	No	Dynamic (mobile phase)	3–40	0.3–0.4	[54]
River, coastal and waste water	DEHP, Chlorfenvinphos Chlorpyrifos Trifluralin Diuron Terbutylazine Atrazine, Isoproturon Simazine	UPLC-MS/MS	TRB-5	Yes	No	Dynamic (elution solvent)	0.25–25 0.025–2.5	0.025 0.025 0.1 0.025 0.1 2.5	[27]
River, sea and drinking water	Diclofenac	HPLC-UV	PPY (homemade)	Yes	Yes	Static	0.5–1000	0.1	[14] ^a
Sea and transition water	Phthalates	CapLC-DAD	TRB-5	Yes	No	Dynamic (mobile phase)	Up to 50.0 (up to 25.0 for DEP)	0.005–1.5	[50]
Sea and transition water	Triazines and degradation products	CapLC-DAD	TRB-5	Yes	No	Dynamic (mobile phase)	Up to 50.0	0.02–0.10	[51]
Sea and waste water	Chlorophyll <i>a</i>	CapLC-DAD	TRB-5	Yes	No	Dynamic (mobile phase)	0.1–1	0.05	[52]
Sea and waste water	EDCs	HPLC-DAD/FLD	Supel-Q PLOT	Yes	No	Static (micellar)	0.1–1000	0.03–1.95 (UV) 0.02–0.14 (FLD)	[20]
Surface water and waste water	Perfluorooctanoic acid Perfluorooctane sulfonate	LC-MS	CP-Pora PLOT amine	Yes	Cycles	Dynamic (mobile phase)	0.05–5	1.5 × 10 ⁻³ 3.2 × 10 ⁻³	[37]
Tap and river water	Triazines	HPLC-UV	Sol–gel based sorbent with 3TMSPA (homemade)	Yes	Yes	Dynamic (mobile phase)	30–1000	10	[53]
Tap water, lake water and soil	PAHs	HPLC-FLD	Multilayer-assembled graphene microtube (homemade)	Yes	Yes	Dynamic (mobile phase)	(0.3 –200) × 10 ⁻³	(0.05 –0.1) × 10 ⁻³	[55]
Tap, sea, river and waste water	Chlorobenzenes Nitrochlorobenzenes	GC-ECD	Quartz liner filled with several capillaries (homemade)	No	No	Thermal	0.003–19.2	0.00041 –0.047	[44]
Tap, well and waste water	4-nitrophenol	HPLC-UV	MIP (homemade)	No	Semiautomatic		1–10,000	0.33	[22]
Waste water	Organophosphorous compounds	CapLC-DAD	Magnetic nanoparticles (homemade)	Yes	No	Dynamic (mobile phase)	n.p.	0.050–0.100	[56]
Waste water	Cholesterol Coprostanol	CapLC-DAD	TRB-5	Yes	No	Dynamic (mobile phase)	5–125 40–5000	1.2 10	[58]
Waste water	Triazines Organophosphorous Phenylureas Trifluralin DEHP	CapLC	TRB-5	Yes	No	Dynamic (mobile phase)	Up to 10.0	0.005–0.050	[57]
Coastal sediments	DEHP	CapLC-DAD	TRB-5	Yes	No	Dynamic (mobile phase)	n.p.	8 (90 µg/kg)	[34]

Table 1 (continued)

Matrix	Analyte/s	Technique	Capillary	On- line	Automation	Desorption	Analytical parameters (ng/mL)		Ref.
							Lineal range	LOD	
Soil and dust	PAHs	HPLC-UV/FLD	Stainless steel loop	Yes	Yes	Dynamic (mobile phase)	0.0005–0.500 0.002–1.000	0.0002–0.002	[32]
Aqueous extract of PM ₁₀	Carbonyl compounds	CapLC	TRB-5	Yes	No	Dynamic (mobile phase)	0.09–40	0.030–0.198	[47]
PM _{2.5} and PM ₁₀	Carbonyl compounds	CapLC-MS	TRB-35	Yes	No	Dynamic (mobile phase)	0.0031–2.322	0.0009 –0.0082	[48]
Pollen, flower and seed samples	24-epibrassinolide	UPLC-UV/FLD	Monolithic MIP (homemade)	Yes		Dynamic (derivatization solution)	0.003–5.000	0.0007	[28]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	28-epihomobrassinolide	LC-MS	Poly(MAA-co-EDMA) monolith (homemade)	Yes	Yes	Dynamic (mobile phase)	0.005–0.500	0.0020	[23]
Bivalves	DEHP	CapLC	TRB-5	Yes	No	Dynamic (mobile phase)	Up to 200	10 (170 µg/kg)	[33]
Industrial samples and washes waters ^c	BAK (4 homologues)	CapLC-DAD-MS (CN column)	TRB-35	Yes	No	Dynamic (mobile phase)	0.2–5.4	0.1	[13]
Industrial cationic polymers ^c	Ethylenediamine	HPLC-FLD	TRB-5	Yes	No	Dynamic (mobile phase)	70–2000	20	[12]

n.p.: Not provided.

^a It also appears in Table 2.

^b It also appears in Table 3.

^c Industrial samples.

automated flow-through mode. Although several reasons related to the available instrumentation or the analytical problem can influence the selection of the extraction mode, most flow-through mode studies may be explained because this mode provides good extraction efficiency in a short period of time. In summary, the flow-through mode (manual and automated) represents 68.7% of the total articles versus 29.3% of the cycle mode. For the latter, 65% of the applications are in the clinical field. Some authors [3] include the long duration of the extraction of cycle mode as an in-tube SPME weakness. However, because of the automation, this mode can work over long periods of time (even at night) without requiring the analyst's attention.

Among the proposed developments, a different way to perform extraction requires passing the sample through just once and in one direction (such as flow-through mode), but instead of passing it continuously, small volumes of sample ("cycles") are repeatedly introduced into the capillary, keeping it still for a while between cycles [20]. Another possibility to carry out in-tube SPME is to place the extraction capillary in a syringe, usually replacing the needle [16,21]. The capillary can also be connected to the needle via a Teflon sheath [22].

There are several different configurations to carry out the two main extraction modes (Fig. 4A, B). For the flow-through mode, the most common one involves replacing the loop of a six-port valve with the extraction capillary (also called in-valve mode). The sample volume of milliliters is passed through the capillary. In the draw/eject cycle mode, the capillary is placed between the injection needle and the metering pump, usually maintaining the loop in the autosampler device in order to protect the metering pump.

Some configurations also use two six-port valves in extraction by flow-through mode, in both automatic and manual modes (Fig. 4C). In the first valve the sample is injected into the loop while the extraction capillary is placed in the second valve [19,21,23–25]. The sample is driven from the loop to the capillary by a carrier solution using an auxiliary pump. The time and the flow-rate of the pump are optimized to carry out the extraction. In some cases, the carrier solution is a buffer [23,24] or mixtures of water/organic solvent, which improve the extraction. The sample volume is limited by the loop volume, even very small volumes are being used

(3 µL) [25]. This configuration of the two six-port valves has also been applied to off-line extraction and further MALDI-TOF-MS analysis [19,21]. Sometimes, one of the valves is not a six-port one. A ten-port valve has been used as the second valve, supporting not only the extraction capillary, but also a loop where the eluent solution is introduced prior to desorption [26]. Another option is the use of two valves with the capillary placed in the first valve and the loop in the second valve. In this way, the capillary does not have to support high pressures [27,28] (Fig. 4D). A configuration with the capillary in an eight-way valve placed before the six-port one containing the loop has been proposed to carry out parallel extractions using two hollow fibers. These fibers are employed instead of capillaries to perform an in-tube hollow fiber-solid phase microextraction [29]. In this last case, the time of analysis is significantly reduced (almost by half). In summary, the two valve configuration seems to be the selected option in case any limitations such as sample size, special conditions at extraction (use of buffer or solvents) or special conditions at coupling (high pressures) are found.

The configuration of two valves has been applied using draw/eject cycle mode in order to solve a common problem of the sample dilution by mixing it with the mobile phase in the system tubing during the extraction. Yang et al. [30,31] have placed a switching valve with an auxiliary pump between the metering pump and the capillary, which allows performing a washing step between the extraction and the desorption steps (Fig. 4B). This strategy is similar to passing a displacing volume in the flow-through mode, where a volume of solvent (usually water) flushes the capillary after the extraction, replacing the liquid sample remaining in the capillary, avoiding its entering into the chromatographic column.

In the "syringe configuration", which is between in-tube and in-needle SPME approaches, usually the sample is passed through just once and in one direction (one way push), but cycles can also be performed [92]. In this case, a double capillary is used (two concentric capillaries replace the needle of an HPLC syringe). For extraction, the syringe is repeatedly filled with the sample and emptied, and desorption is carried out by filling the capillary with acetonitrile, which is directly injected into HPLC.

Table 2
Summary of the applications of IT-SPME methods in biomedical analysis (January 2009–January 2015).

Matrix	Analyte/s	Technique	Capillary	On-line	Automation	Desorption	Analytical parameters (ng/mL)		Ref.
							Lineal range	LOD	
Saliva	Cortisol DHEA	LC-MS/MS	Supel-Q PLOT	Yes	Cycles	Dynamic (mobile phase)	0.005–1.0 0.05–1.0	0.0009 0.013	[82]
Saliva	Testosterone	LC-MS/MS	Supel-Q PLOT	Yes	Cycles	Dynamic (mobile phase)	0.002 –0.50	0.0003 0.0011	[40]
Urine and saliva	Cortisol DHEA Nicotine, cotinine and related alkaloids	LC-MS	CP-Pora PLOT amine	Yes	Cycles	Dynamic (mobile phase)	0.02–5.0 0.10–25.0	0.0011 0.0089	[81]
Urine	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine	CE-ECD	Monolithic MIP (homemade)	No	Yes	Dynamic (elution solvent)	2.83–425	0.74	[79]
Urine	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine	HPLC-UV	Monolithic MIP (homemade)	No	Yes	Dynamic (elution solvent)	2.83 –1500	0.91	[46]
Urine	Anabolic steroids	LC-MS	Supel-Q PLOT	Yes	Cycles	Dynamic (mobile phase)	0.5–20	0.009 –0.182	[80]
Urine	Diclofenac	HPLC-UV	PPY (homemade)	Yes	Yes	Static	0.5–1000	0.1	[14] ^a
Urine	Dopamine	LC-ESI-MS/MS	Boronate affinity capillary (homemade)	Yes	Yes	Dynamic (mobile phase)	5–10000	1.2	[77]
Urine	Doxepin, clozapine, imipramine	HPLC	Monolithic (homemade)	Yes	Yes	Dynamic (mobile phase)	Up to 5000	12.5 –71.5	[76]
Urine	Heterocyclic amines	LC-MS/MS	Supel-Q PLOT	Yes	Cycles	Dynamic (mobile phase)	0.010 –2.000	0.0017 –0.0041	[39]
Urine	Naproxen	HPLC-UV	PPY (homemade)	Yes	Yes	Static	0.5–1000	0.07	[78]
Urine	Several arsenic species	IP-RP-HPLC-ICP-MS	MPTS–AAPTSP/PS immobilized hollow fiber (homemade)	Yes	Yes	Dynamic (elution solvent)	Up to 1000	0.017 –0.053	[29]
Plasma	Antidepressants	LC-MS	Monolithic (homemade)	Yes	Yes	Dynamic (mobile phase)	1–500	0.07 –2.95	[68]
Urine								0.06 –2.84	
Plasma	Abused drugs	UPLC-MS/MS	DB 1701	No		Dynamic (elution solvent)	n.p.	<25	[75]
Plasma	Butyrophenone derivatives	LC-MS/MS	DB-17	Yes	Cycles	Dynamic (mobile phase)	Up to 500	0.03–0.2	[74]
Plasma	Fluoroquinolones	HPLC-UV	Poly(MAA-co-EGDMA) monolith		Yes	Dynamic (mobile phase)	n.p.	1.1–2.6	[73]
Plasma	Fluoxetine and norfluoxetine	HPLC-FLD	PPY (homemade)	Yes	Cycles	Static	Up to 700	5.0	[71]
Plasma	Interferon α_{2a}	HPLC-FLD	RAM (BSA-coated silica) capillary (homemade)	Yes	Cycles	Dynamic (mobile phase)	0.06 –3.0 MIU/ mL	0.06 (LOQ)	[66]
Plasma	Interferon α_{2a}	HPLC-FLD	Immunoaffinity capillary (homemade)	Yes	Cycles	Dynamic (mobile phase)	0.006 –3.0 MIU/ mL	0.006 (LOQ)	[70]
Plasma	Interferon α_{2a}	HPLC-FLD	MIP (homemade)	Yes	Cycles	Dynamic (mobile phase)	8–300	8.0 (LOQ)	[67]
Plasma	Ketoprofen Fenbufen Ibuprofen	LC-MS	Monolithic (homemade)	Yes	Yes	Dynamic (mobile phase)	10–1000 10–1000 20–1000	2.63 2.01 4.77	[15] ^a
Plasma	Lidocaine and MEGX	HPLC	Fused silica capillary coated with OV-1701 (homemade)	Yes	Cycles	Dynamic (mobile phase)	50–5000	15–20	[65]
Plasma	Naproxen	HPLC-UV	PPY tube (0.7 mm i.d.) saturated with <i>n</i> -octanol (homemade)	No	Cycles	Cycles	0.9–450	0.54	[72]
Plasma	Rifampicin	HPLC-UV	Polyethylene glycol	Yes	Cycles	Dynamic (mobile phase)	100 –100,000	100 (LOQ)	[64]
Rabbit plasma	Drugs	CE (sweeping)	Commercial capillary	Yes	Yes	Dynamic (elution solvent)	10–500	1.62 –24.0	[63]

Table 2 (continued)

Matrix	Analyte/s	Technique	Capillary	On-line	Automation	Desorption	Analytical parameters (ng/mL)		Ref.
							Lineal range	LOD	
Rat plasma	Protoberberine alkaloids	HPLC-UV	Monolithic (homemade)	Yes	Yes	Dynamic (mobile phase)	0.05–50	0.01	[69]
Serum	Glycoproteins	SDS-PAGE	Monolithic MIP (homemade)	No	Yes	Dynamic (elution solvent)	n.p.	n.p.	[83]
Serum	Lysozyme	SDS-PAGE	Monolithic MIP (homemade)	No	Yes	Dynamic (elution solvent)	n.p.	n.p.	[18] ^b
Serum and digestion mixture of phosphopeptides + BSA	Phosphopeptides	MALDI-MS	Monolithic (homemade)	No	Semiautomatic	Dynamic (elution solvent)	n.p.	10–50 fmol	[19] ^b
Hair	Heterocyclic amines	LC-MS/MS	Supel-Q PLOT	Yes	Cycles	Dynamic (mobile phase)	0.010–2.000	0.00010–0.00079	[38]
Crude drugs	PAHs	HPLC-FLD	CP-Sil 19CB	Yes	Cycles	Dynamic (mobile phase)	0.05–2.0	0.00032–0.00463	[17] ^b

n.p.: Not provided.

^a It also appears in Table 1.

^b It also appears in Table 3.

3.2. Parameters for the optimization of an in-tube SPME method

The most significant parameters that should be selected, monitored and/or optimized are discussed below, and represented in an Ishikawa diagram [93] in Fig. 5.

3.2.1. Extracting phase and donor phase

The efficiency of extraction of a compound is related to the partition relation between the extracting phase and the sample (considered donor phase), and to the linear velocity of fluid through the capillary [2]. Regarding the parameters related to extracting phase, those directly related to the nature of the phase (polydimethylsiloxane), polypyrrole, etc.) have been included, as well as to the format of the capillary (open-tubular, packed, monolithic) and its geometric characteristics (length, internal diameter and film thickness). A specific phase is selected depending on the interactions that it can form with the analytes, and it will be decisive in selectivity. In addition, the stability of the union between the sorbent coating and the capillary tube should also be considered as sorbent stripping could cause bad reproducibility [32]. Capillary columns are usually stable for the most common HPLC mobile phases, but even the ones with chemically bonded or cross-linked liquid phases, very stable in organic solvents and water, can be deteriorated in strong acid or alkali media [7]. The capillary dimensions affect the amount of sample that can be loaded and also the speed of the extraction and desorption processes. Increasing capillary dimensions and/or film thickness, in addition to allow the extraction of larger amounts of analytes, can affect the sample bandwidth, causing peak broadening and tailing [7]. This effect is more significant in the coupling to miniaturized chromatographic systems, in which the dimensions of the analytical column are similar to those of the extraction capillary. In addition, different formats of capillary can be used, affecting the efficiency because of differences in surface area, back-pressure or sorbent/sample ratio. If good reproducibility is a priority for routine analysis, commercial capillaries (mainly open-tubular ones) can be chosen. When a specific phase is necessary (i.e. biomolecules), a homemade capillary (mainly monolithic) is synthesized. From the scoping results

(Fig. 2B) it is observed that the commercial capillaries are employed in 44% of the references, followed by the monolithic capillaries (24.7%).

Besides, some parameters related to the donor phase can affect the extraction efficiency. They may be specific to a sample (content of salts or organic solvent and pH) and have to be controlled if they affect the reproducibility. But they can be modified to achieve an improvement of the analytical performance. The analytes can be dissolved in organic solvent from an earlier stage of extraction of the solid sample [33,34] or organic solvent (modifier) can be added to modify the extractive behavior of the analytes in an aqueous sample. Its effect depends on the type of modifier and its concentration in the aqueous sample, and it may also vary for each of the analytes tested [35]. The organic solvent can improve the interaction between the sample and the sorbent phase, but it can also increase the solubility of analytes in the sample, thus the percentage that provides the best efficiency should be chosen. Regarding salt content, generally salts increase the extraction efficiency, but they may block the capillary if they are too concentrated, so their concentration should be carefully controlled. Their effect depends not only on the ionic strength achieved, but also on the type of ions in the salt, which, depending on their concentration, can compete with the analyte for the sites of extracting phase [14]. The use of the ion-pair technique for both in-tube extraction and capillary chromatographic separation allows concentrating a cationic surfactant [36]. Finally, pH affects especially acidic and basic compounds, and those which are susceptible to ionization [14]. When selecting pH, the stability of the compounds and the capillary under the selected conditions should be considered.

3.2.2. Steps of the in-tube SPME process

In relation to the main steps of in-tube SPME, extraction and desorption, a lot of parameters can be evaluated. Regarding the extraction, depending on the particular needs and the available instrumentation, a decision between draw/eject cycle mode and flow-through mode should be made. In both modes, the sample volume and the introduction flow (aspirating/releasing flow in the case of cycles) can be optimized. When optimizing the flow, a

Table 3
Summary of the applications of IT-SPME methods in food analysis (January 2009–January 2015).

Matrix	Analyte/s	Technique	Capillary	On-line	Automation	Desorption	Analytical parameters (ng/mL)		Ref.
							Lineal range	LOD	
Coca-Cola and sprite	Acidic food additives	HPLC-UV	Ionic liquid-modified organic-polymer monolith (homemade)	No	Semiautomatic	Dynamic (elution solvent)	Up to 625	1.2–13.5	[85]
Cola	Bisphenol A	CE (stacking and sweeping)	Monolithic capillary (homemade)	No	Yes	Dynamic (elution solvent)	5–200	1.8	[84]
Water (contained in baby bottles)	Bisphenol A	UV-Vis Spectrophotometry	CPANI inside a silico-steel tube (homemade)	Yes	Yes	Dynamic (elution solvent)	(0.023–22.8) × 10 ³	4.6	[26]
Orange juice	Triazines	DART-MS	Carbon-nanotubes-incorporated polymer monolith (homemade)			Dynamic (elution solvent)	n.p.	0.02–0.14	[16] ^a
Milk	Synthetical estrogens	HPLC	Modified silica nanoparticle-deposited capillary (homemade)	Yes	Yes	Dynamic (mobile phase)	Up to 200 ng/g	1.2–2.2 ng/g	[86]
Nonfat milk	Phosphopeptides	MALDI-TOF	Nanoparticles-IMAC-Zr ⁴⁺ capillary (homemade)	No		Dynamic (elution solvent)	n.p.	50 fmol	[21]
Nonfat milk and egg white	Phosphopeptides	MALDI-MS	Monolithic (homemade)	No	Semiautomatic	Dynamic (elution solvent)	n.p.	10–50 fmol	[19] ^b
Egg Milk	Quinolone antibacterials	LC-MS	Monolithic (homemade)	Yes	No	Dynamic (mobile phase)	Up to 200 ng/g	0.3–1.2 ng/g	[24]
Chicken								0.2–3.0 ng/g	
Fish								0.2–0.7 ng/g	
Egg white	Lysozyme	SDS-PAGE	Monolithic MIP (homemade)	No	Yes	Dynamic (elution solvent)	n.p.	n.p.	[18] ^b
Egg white	Ovalbumin	pCEC (as CapLC)	Monolithic (homemade)	No	Yes	Dynamic (elution solvent)	n.p.	n.p.	[89]
Fruit juice and dried fruit samples	Patulin	LC-MS	Carboxen 1006 PLOT	Yes	Cycles	Dynamic (mobile phase)	0.5–20	0.0235	[42]
Nuts, cereals, dried fruits and spices	Aflatoxins	LC-MS	Supel-Q PLOT	Yes	Cycles	Dynamic (mobile phase)	0.05–2.0	0.0021–0.0028	[41]
Nuts and grain samples	Ochratoxins	LC-MS	Carboxen 1006 PLOT	Yes	Cycles	Dynamic (mobile phase)	0.5–20	0.089–0.092	[87]
Corn	β-carotene	micro-LC	Monolithic silica-ODS capillary	Yes	Yes	Dynamic (mobile phase)	n.p.	7–20	[25]
Corns	Fat-soluble vitamins and β-carotene	CapLC	Monolithic silica-ODS capillary	Yes	Yes	Dynamic (mobile phase)	n.p.	1.9–173	[88]
Tea products and dried food samples	PAHs	HPLC-FLD	CP-Sil 19CB	Yes	Cycles	Dynamic (mobile phase)	0.05–2.0	0.00032–0.00463	[35]
Tea products	PAHs	HPLC-FLD	CP-Sil 19CB	Yes	Cycles	Dynamic (mobile phase)	0.05–2.0	0.00032–0.00463	[17] ^a
Animal-producing food samples	Antibiotic drugs	HPLC	MIP-fiber-in-tube (homemade)	Yes	Yes	Static	0.2–20	0.016–0.11	[90]

n.p.: Not provided.

^a It also appears in Table 1.

^b It also appears in Table 2.

balance between efficiency and time should be achieved. The volume of sample has special relevance in flow-through mode because higher volumes are used (milliliters instead of microliters). Larger volumes lead to higher amounts of analyte extracted (until the saturation of the sorbent phase), but they also imply more sample consumption, longer time of analysis (for the same introduction flow) and more interferences in the capillary in case of dirty samples.

In addition to these parameters, in flow-through mode, the volume of solvent (usually water) used to displace the liquid sample remaining in the capillary (when there is no clean-up step) should be set, whereas in the cycle mode, the number of cycles has to be determined. Increasing the number of draw/eject cycles, the efficiency increases, as does the extraction time and peak broadening. Although the optimum value for each parameter should be optimized, using a GC capillary column (60 cm × 0.32 mm i.d.),

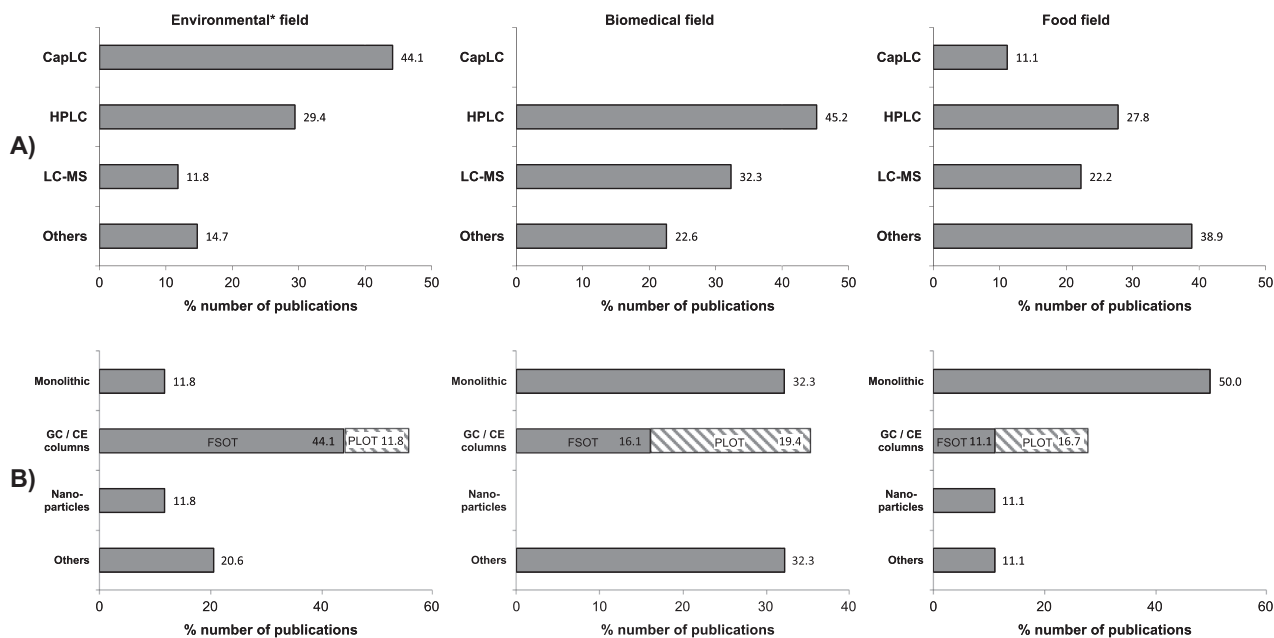


Fig. 2. Relative production of publications on A) combination of in-tube SPME with several instrumental techniques B) use of different types of capillaries, by application field. *The two publications of industrial application have been included into environmental field, considering that the analyzed matrices are used in water treatment.

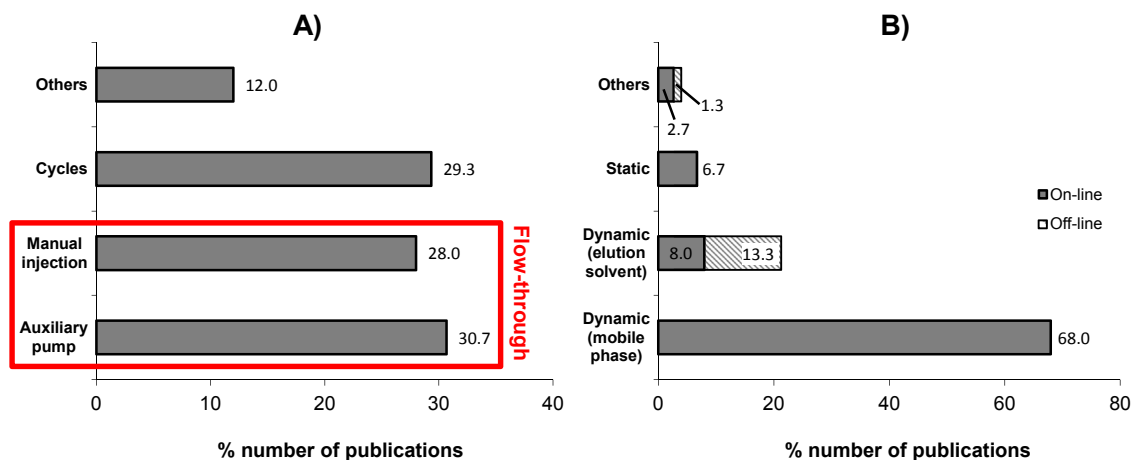


Fig. 3. Relative production of publications on A) different extraction modes B) different desorption variants.

20–30 repeated draw/eject cycles of 40 μL of sample at a flow rate of 150–200 $\mu\text{L}/\text{min}$ has been a good solution for different applications [35,37–42]. In flow-through mode, the displacing volume may help in the desorption process especially with analytes of surfactant character [12,13]. In this case, the composition of the displacing solvent should be optimized.

The desorption of the target compounds can be carried out in two different ways: static (6.7% of studies) (with a desorption solvent or even with a micellar media [20]) or dynamic (usually by passing through the mobile phase). The latter is the most common (68.0% of studies) and it is normally chosen, except when it is not effective enough due to a strong retention of analytes in the extracting phase. If the mobile phase is not the desorption solution, the composition of the desorption solution has to be determined. In addition, in dynamic mode the flow should be set, whereas in static mode the volume of desorption solution and the time during which

the desorption solution remains in the capillary should be optimized. When in-tube SPME is coupled to gas chromatography, a thermal desorption can also be used [43,44]. Desorption can be performed off-line as well (14.6% of references), but this strategy loses some advantages of the technique, as not all the extracted analytes are introduced in the determination system, whereby a new step is introduced and automation is not achieved (Fig. 3B).

In the recent variants of in-tube SPME, new parameters are introduced: in magnetic IT-SPME, the intensity of the magnetic field (B) applied during extraction (during desorption, the same intensity in reverse is applied) is a main parameter, and the magnetic coil length has also an influence over performance [45]. On the other hand, in electrochemically controlled in-tube SPME, the electric potentials applied during both extraction and desorption have to be evaluated [14]. If a temperature-controlling device is introduced on the capillary, the temperature affects the partition

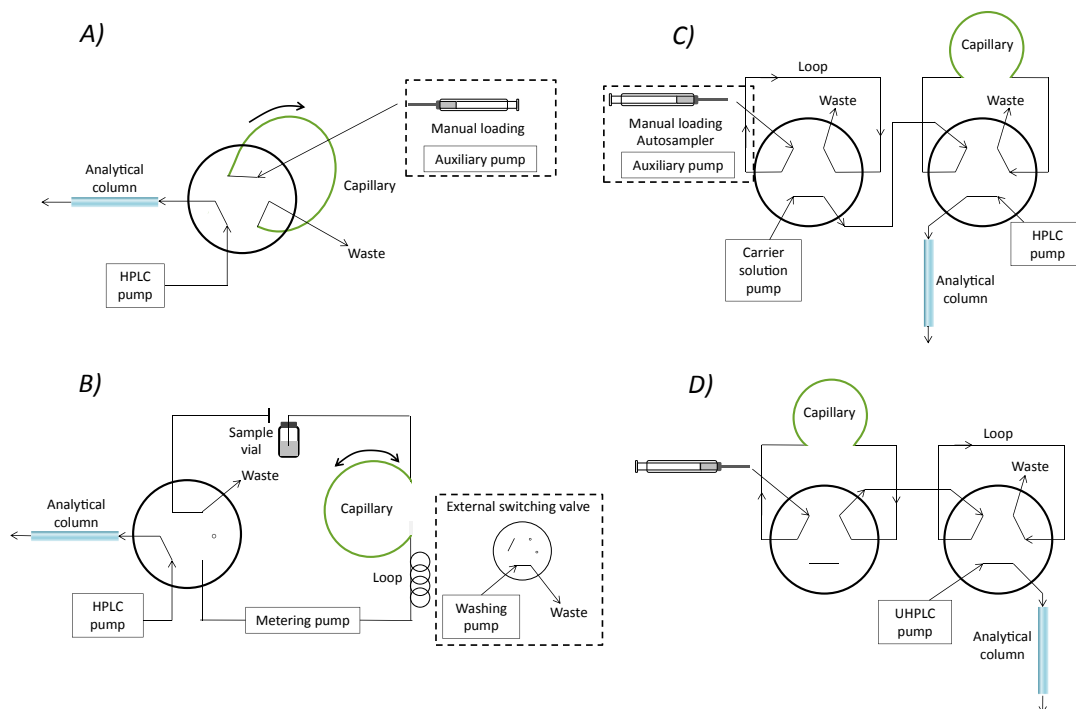


Fig. 4. Main in-tube SPME configurations, in load position. A) Flow-through mode (one valve); B) Draw/ejection cycles mode; C) Flow-through mode with two valves; D) Two valves configuration for UHPLC coupling. Dashed square indicates in B) an optional additional switching valve and in A), C) different variants of sample introduction.

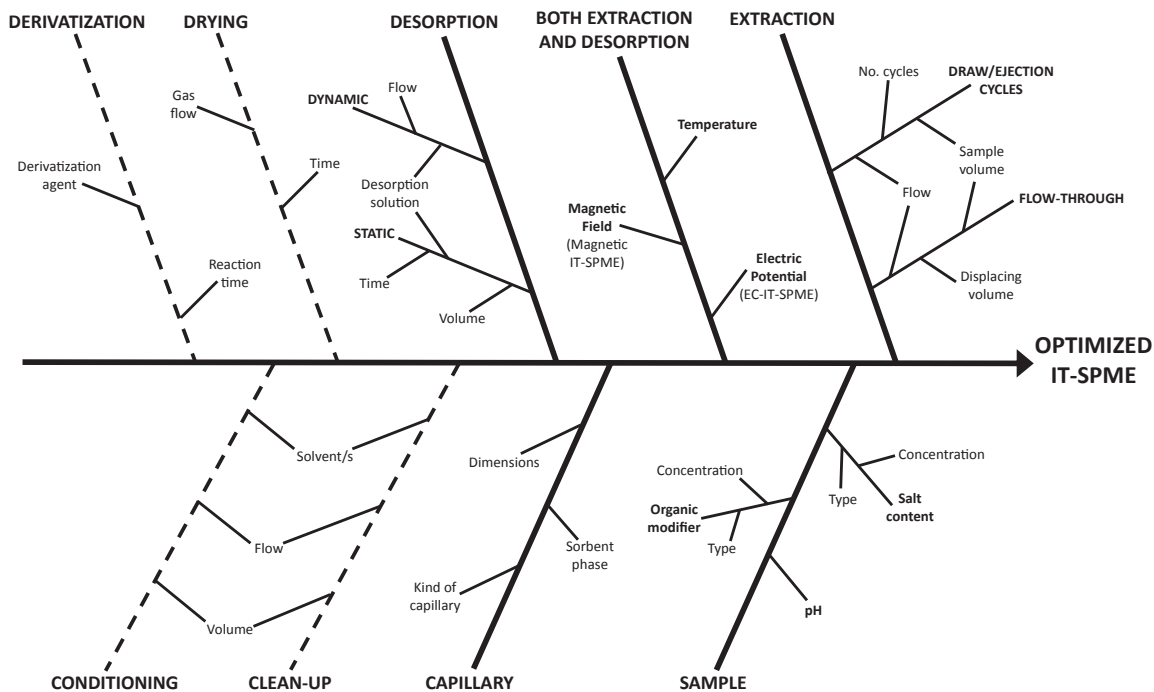


Fig. 5. Ishikawa diagram with the main parameters that can affect in-tube SPME. Dashed lines indicate optional steps.

coefficients of analytes and the release of the compounds from the sorbent. Yang et al. [31] have tested temperatures between 0 and 100 °C.

There are more steps that can be accomplished in in-tube SPME. A conditioning is used to activate the sorbent phase with a solvent, prior to the extraction. The clean-up using a solvent may be

necessary to eliminate interferences of the matrix or excess of reagents that may have been retained in the capillary along with the analytes. This step is performed between extraction and desorption. The step of purging or drying involves a gas flow passing through the capillary to eliminate the liquid sample, just before the desorption step [28,46]. If the conditioning and/or clean-up are

carried out, the solvent or mix of solvents used should be optimized, as well as the volume and the introduction flow. During the drying step, the gas flow and the time spent to perform this step should be evaluated.

A step of derivatization combined with microextraction may be necessary to increase the sensitivity or selectivity or to improve the extractive behavior or chromatographic separation. Although some studies on derivatization have been reported before 2009, few studies (6%) have been found over the past years. The derivatization can be performed off-line [12,47,48] or on-line, inside the capillary. In these cases, there are two possibilities: analyte extraction followed by derivatization or simultaneous extraction and derivatization [49]. In the first one, analytes are extracted by passing the sample through the capillary and then the derivatization agent is passed to desorb the target compounds and react with them [28]. In the second option, the derivatization agent is loaded into the capillary followed by the sample, and the mix is left for a certain amount of time inside the capillary to react and form the derivatives [49]. A derivatization reaction by cycles (derivatizing agent/sample) was tested [47]. When a derivatization reaction is conducted, the type of derivatizing agent, the excess of reagent, pH medium, buffer concentration and the time of the reaction can be optimized. In addition, the efficiency of the different processes (off-line or on-line) or combinations (extraction + derivatization or simultaneous extraction/derivatization) should be evaluated.

In summary, the most influential parameters are the type of capillary and its coating, but depending on the requirements of analysis, other parameters related with the donor phase can be crucial. For the determination of polar compounds, surfactants or mixtures of compounds with different hydrophobicity, the use of the organic solvent–water mixtures, ion-pair agents and adjustment of pH may be necessary. In the cycle mode, some variables optimized (number of cycles, flow-rate and sample volume) for various applications are in a narrow range of values, which simplifies the method optimization.

3.3. Applicability to different kinds of matrices and analytes

Application to various analytes and matrices with different degree of complexity is collected in Tables 1–3. Unlike other miniaturized techniques (i.e. in-fiber SPME), only filtered liquid samples (if they contained particles) can be processed by in-tube SPME. For solid matrices, in-tube SPME should be combined with other classic or miniaturized techniques in order to obtain a liquid extract. For liquid matrices and mainly in environmental analysis, simplified procedures (some consisting of a single step) and low sample volume versus high volume and multi-step procedures are some of the in-tube SPME strengths.

In the environmental applications (Table 1), the main matrices studied are liquid, especially environmental waters [14–16,20,22,27,36,37,44,45,49–62], including seawater [14,20,44,50–52], coastal water [27], transition water [50,51], river water [14,27,44,53,54], lake water [16,55], tap water [22,44,53,55], well [22] and waste waters [20,22,27,37,44,52,56–58]. However, they have also been applied to extracts of solid samples like soil [32,55], dust [32], particulate matter [47,48], sediments [34], bivalves [33], plants [23], flowers, seed and pollen [28]. In these cases, in-tube SPME was combined with different treatment techniques (ultrasound extraction (USE) [47,48], microwave-assisted extraction (MAE) [28] and matrix solid-phase dispersion (MSPD) [33,34]). If an aqueous extract is obtained, two techniques can be easily combined, whereas when dealing with an organic extract (in analysis of sediments and bivalves), mixtures of organic solvent and water are successfully processed by in-tube SPME. For the analysis of plants and soils [23,32], multi-stages treatments including SPE

and evaporation are necessary.

The target analytes range from hydrophobic compounds to polar compounds and surfactants, such as polycyclic aromatic hydrocarbons, pesticides (organophosphorus compounds, triazines and degradation products, phenylureas, trifluralin), endocrine disruptor compounds (phthalates, phenols), carbonyl compounds, aliphatic amines, halogeno benzenes, drugs and metabolites, some biomolecules (hormones, sterols, chlorophyll) and quaternary ammonium compounds (QAC) surfactants. Some of them, such as QAC surfactants are a challenge for all treatment techniques [94]. Therefore, when they are analyzed by in-tube SPME, it is important to consider not only the clean-up using glassware material, but also their solution chemistry (micelles, behavior in presence of ions and organic solvent, etc.).

In biomedical applications (Table 2), plasma [15,63–75] and urine [14,29,39,46,68,76–81] are the predominant matrices. Nevertheless, in-tube SPME methods applied to other biological matrices such as saliva [40,81,82], serum [18,19,83] or hair [38] have been reported. Drugs, metabolites and biomolecules such as hormones, glycoproteins, phosphopeptides and enzymes are the most studied compounds in biological matrices, but in-tube SPME methods for the analysis of PAHs, heterocyclic amines and abused drugs have also been published. Although organic compounds predominate as target analytes, in-tube SPME can be applied to inorganic and organometallic compounds too. In 2012, an in-tube hollow fiber-solid phase microextraction method that analyzed 6 arsenic species (arsenite (As(III)), arsenate (As(V)), monomethylarsonic acid, dimethylarsenic acid, arsenobetaine and arsenocholine) was reported [29]. It used laboratory-prepared hollow fibers (instead of capillaries) to extract and concentrate the arsenic species, and then ion-pair reversed phase HPLC coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) to separate and determine them.

Regarding food analysis (Table 3), there is more variety in the studied matrices than in any other field. This analysis includes beverages (soft-drinks [84,85], water [26], juice [16,42], tea [17,35] and milk [19,21,24,86]) and solid food (nuts [41,87], cereals [25,41,87,88], dried fruits [35,41,42], egg [18,19,24,89] and animal-producing food [24,90]). The objectives in this application field are the determination of toxic residual products originated from the production of vegetable and animal food (50% of references), products directly related to food security (mycotoxins) (16.7%) and compounds from their composition (vitamins, carotenoids and proteins) (22.2%). Biomolecules predominate in the reported analytes, that include drugs, food additives, pigments, proteins, phosphopeptides, enzymes, mycotoxins, vitamins and ubiquitous pollutants such as PAHs, triazines and bisphenol A. Similarly to the other application fields, several papers reported the preparation of capillaries for the in-tube SPME application in food matrices. Previous to in-tube SPME, solid samples are treated with classic processes (extraction by ultrasonication [25], enzymatic treatment [19], saponification [25]). In most cases, there are multi-stages processes including centrifugation, washing, filtration, drying and redissolution. Some of these treatments are required in order to eliminate fats or proteins [42,53,54].

The in-tube SPME use for enrichment of phospholipids deserves special mention. The study of phosphorylation of proteins involved in cellular processes requires the characterization of the phosphopeptides obtained from enzymatic digestion. To this purpose, MS is a suitable technique after performing the enrichment and purification of phosphopeptides. In-tube SPME competes with other methods (immunoprecipitation or chemical modification) using metal oxide affinity chromatography (MOAC) materials [19] and metal-ion affinity chromatography (IMAC) material [21] into the capillary, obtaining selective extractions in a short period of

time. Similarly, in glycoproteomics, the enrichment of glycoproteins from unfractionated protein mixtures is performed using boronate affinity chromatography (BAC) materials [89] as capillary in the in-tube SPME system.

4. Reinforcing strengths: new couplings, performances and capillaries

In the target period, some of in-tube SPME strengths, such as automation, are reinforced with new couplings (UHPLC), as well as with the consolidation of existing ones (coupling to capillary liquid chromatography). On the other hand, an improvement in extraction efficiency is addressed, which involves an increase of sensitivity and decrease of extraction time. Two approaches (new performances and new capillary coatings) have provided solutions to this topic. Specific problems such as those pointed out by Queiroz and Melo [9] in biological matrices are solved by some new capillaries coatings. Thus, with respect to other organic compounds which coelute or remain adsorbed onto the analytical column, an improved selectivity of the analytes and a reduction of the matrix effects are required. Mechanical stability, low backpressures, and resistance to different matrices are sought characteristics in the preparation of new coatings.

4.1. New couplings

The easy coupling of in-tube SPME with liquid chromatography has always been one of its main strengths. Nevertheless, this technique can be combined, either on-line or off-line, to other separation and determination techniques, such as capillary electrophoresis (CE) [79,84], conventional electrophoresis [18,83], gas chromatography [43,44], mass spectrometry [16,19,21] or UV–Visible spectrophotometry [26]. On-line coupling to CE has been performed using only one capillary for both the in-tube microextraction and the electrophoretic analysis [63]. Couplings with UV and MS have been tested in recent years and they are an example of the versatility of technique for the coupling with instrumental techniques (Fig. 6).

Over the past years, in addition to coupling to HPLC (35.1% of the studied references) and LC–MS (23.4%), the number of works which use in-tube SPME coupled to miniaturized chromatographic systems has been increased (22.1%). Micro-liquid chromatography [25] and capillary liquid chromatography [13,33,34,36,45,47,48,50–52,54,56–59,88,89] combined with in-tube SPME allow a drastic reduction of the solvent consumption and an increasing sensitivity. The extraction capillary and analytical column have similar dimensions (length and inner diameter) and coupling is easily achieved. On the contrary, coupling in-tube SPME to UHPLC (ultra-high performance liquid chromatography) presents a higher complexity. The extraction capillaries do not support the high pressures used in UHPLC, and consequently the coupling cannot be performed directly. To solve this problem, two strategies have been successfully proposed: the two valves configuration [27] and the introduction of an FSS interface that also prevents peak broadening [28]. In the former case, the option used is the one in which the capillary is placed in the first valve. The analytes are desorbed with a low volume of solvent, moving the analytes to a steel loop placed in the second valve. This valve is the one that controls the passing of the mobile phase to transfer the target compounds to the chromatographic column. With this configuration, the capillary never has to support the high pressures of the UHPLC.

The second proposed strategy also uses two six-port valves (and additionally a three-port switch valve before the chromatographic column to avoid its contamination while washing the rest of the

system). Extraction and desorption are performed like in the first proposal. The main difference is that instead of introducing analytes (in the proposed case, derivatives of the analytes, as they are desorbed with a derivatization solution and react with it inside the loop) directly in the analytical column from this loop, a fractioned sampling and stacking (FSS) process is carried out. The FSS process consists in repeatedly switching the second six-port valve (where the loop with desorbed derivatives inside is) from load to inject and vice versa. Derivatives are in a strong solvent, which causes peak broadening due to the eluotropic effect. The FSS process inserts narrow bands of the initial mobile phase (with a higher concentration of water and therefore significantly weaker) inside the strong solvent, reducing peak broadening.

4.2. New performances

One of the in-tube SPME weaknesses is low extraction efficiency; typical efficiencies between 10 and 30% are reported in the literature. This does not mean that low sensitivity is obtained, since concentration levels of parts per billion and trillion are detected in many cases. However, chance for in-tube SPME improvement is given as a result of this weakness. New approaches have emerged seeking improving of the extraction and desorption efficiency. In this way, magnetic IT-SPME, electrochemically controlled in-tube SPME and a temperature-controlling device have been recently introduced.

Campíns-Falcó et al. developed a new approach, magnetic in-tube solid phase microextraction, which exploits the possibilities of magnetic nanoparticles introducing a magnetic field independent of chemical variables [45,91]. The extraction capillary is coated with a magnetic adsorbent phase (Fe_3O_4 nanoparticles supported on SiO_2) that interacts with an external magnetic field. The superparamagnetic nanoparticles are magnetized when a magnetic field is applied, affecting the partitioning of the analytes between the liquid sample and the solid phase. The diamagnetic analytes are trapped in the area where the magnetic forces are minimum, as they are repelled by them. A large increase in absolute efficiencies (within the range 60–100%) is achieved by applying a magnetic field [45,54,56].

Using conducting polymers and applying an electric field, Ahmadi et al. proposed electrochemically controlled in-tube solid phase microextraction (EC in-tube SPME) [14]. This proposal combines SPME with electrochemistry in order to increase

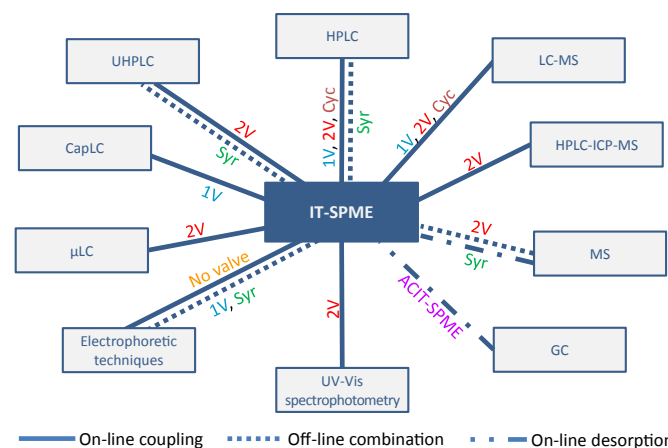


Fig. 6. Couplings and combinations of in-tube SPME with different instrumental techniques. The configurations used are also included in each combination and coupling. Flow-through mode 1V = one valve, 2V = two valves. Cyc = Draw/ejection cycles mode. ACIT = array capillary in-tube. Syr = Syringe configuration.

sensitivity and reduce analysis time by using the extraction capillary (whose charge can be electrochemically controlled) as an electrode. The polypyrrole coating the capillary is oxidized when a positive potential is applied, getting positive charge and retaining the anionic analytes with a high affinity. By applying a negative potential, the charge is neutralized and analytes are released. A 14-times better sensitivity than a conventional in-tube SPME analysis is achieved when the potentials are applied.

Optimization of the temperature of the capillary during extraction and desorption, by the use of a thermoelectric-based temperature controlling system, is another recent proposal conducted by Yang et al. [31]. The extraction efficiency is improved when it is carried out at a low temperature (10 °C), whereas a high temperature (70 °C) during desorption reduces peak broadening. In-tube SPME with controlled temperature achieves limits of detection and quantitation three times lower than those obtained at ambient temperature.

Another variant of in-tube SPME recently introduced is array capillary in-tube solid phase microextraction (ACIT-SPME) combined with GC-FID [43,44], in which the extraction device is a quartz liner with a bundle of capillary tubes inside, with both internal and external surfaces coated with the solid phase. This implies a large extraction surface in contact with the sample, improving mass transfer (and so providing fast extraction and desorption). The off-line extraction is carried out passing by gravity the sample through the capillaries, subsequent centrifugation and desorption into GC system. Large volumes of sample (250–350 mL) are used and low limits of detection and quantitation are obtained.

4.3. New capillary coatings and type of capillaries

The research over new capillary coatings is one of the more promising aspects in the in-tube SPME development. This may be due to the fact that the “in-tube” format facilitates the essay with several coatings and that the application of some of them, such as nanomaterials, is continuously developing.

The most common capillaries are open-tubular ones, in which the sorbent coats the inner surface of the tube. Commercially available capillaries can be used –usually a section of a gas chromatography capillary column. FSOT (fused silica open tubular) columns (in 61.8% of references) with modified polysiloxane coating are the most employed. However, PLOT (Porous Layer Open Tubular) columns, with a larger surface area leading to greater amounts of target compounds extracted, represent 38.2% of the total applications. Instead of using a commercial capillary, the extraction tube can also be prepared in the laboratory [65] using different methods (sol–gel, liquid phase deposition, electrodeposition, etc.). With regard to other types of capillaries, such as packed capillaries and their variants (wire-in-tube [95], fiber-in-tube and sorbent packed-in-tube), they are uncommon. Only a few publications use fiber-in-tube [90] or sorbent packed-in-tube capillaries [66,67] in recent years.

As the new capillary coatings have been recently reviewed in depth by Moliner-Martínez et al. (2015) [1] (mainly in environmental samples) and Queiroz and Melo (2014) [9] (in biological samples), this review is focused on examining the relevance of different types of capillaries (monolithic capillaries, molecular imprinted polymers in monolithic and non-monolithic capillaries, restricted access materials, nanoparticle-deposited capillaries) in the last few years.

Considering the results of the scoping study, it can be observed that monolithic capillaries have consolidated their presence (24.7%) in the in-tube SPME publications in the studied period, with a higher incidence in biomedical and food field (32% and 50%, respectively) than in the environmental field (12%). They provide

better extraction efficiency and lower pressures, allowing the use of higher flows. Commercially available monoliths can be used as extraction capillaries [25,88], but usually the monolithic capillary is prepared in the laboratory and combined with molecular imprinted polymers (MIPs) or nanotubes (see Tables 1–3 and Fig. 2B).

MIPs, with highly selective binding sites, are mostly used in the analysis of biomolecules in the clinical field. Many in-tube SPME methods with MIP monolithic capillaries for the analysis of several analytes have been reported (hormones [28], glycoproteins [83], enzymes [18] and metabolites [46,79]). Non-monolithic MIP capillaries have also been used in in-tube SPME [22], including packed capillaries with MIP fibers [90] and MIP particles [67]. In addition, other kinds of capillaries for the concentration of biomolecules have been reported: restricted access materials (RAM), boronate affinity and immunoaffinity capillaries. RAM capillaries [66] allow the direct analysis of biological samples because they exclude macromolecules, avoiding their interference in the analysis. Immunoaffinity in-tube SPME [70] is based on a molecular recognition mechanism, and it provides a high selectivity as highly specific antibodies are used as extraction phase, whereas boronate affinity capillary [77] is used for the specific capture and isolation of cis-diol-containing molecules.

A typical sorbent in SPE and SPME, polypyrrole (PPY), is used for the preparation of PPY coated capillaries [14,71,78] or modified capillaries (n-octanol saturated PPY tube) [72].

Other new coatings representing the new trends are nanoparticle capillaries, which have a high specific surface area. Nanoparticle-deposited capillaries have proved to provide higher extraction capacity than bare and silica-coated capillaries with the same sorbent phase [60]. Silica supported Fe₃O₄ nanoparticles as magnetic adsorptive phase are used in magnetic IT-SPME [45,54,56]. Moreover, other nanoparticle capillaries have been used [21,60], including a temperature-response one [86]. The affinity of this SiO₂ nanoparticle-deposited capillary modified with an intelligent polymer changes with temperature, allowing it to switch between hydrophilic and hydrophobic properties.

In addition to all the above-mentioned trends, other approaches have been reported in the customization of capillary tubes. Thus, multilayer graphene has been successfully employed as capillary coating for in-tube SPME [55], as well as a polyaniline, polyethylene glycol and polydimethylsiloxane composite [26] and a sol–gel based sorbent with 3-(trimethoxysilyl)propylamine prepared by using diazonium salts [53]. Another recent approach has used a hollow fiber instead of the extraction capillary [29].

A new and simple proposal carried out by Zhang et al. (2014) [32] is the modification-free bare stainless steel loop acting as extraction capillary. An improvement in the stability of the system, especially under high pressure and flows, and a simpler configuration can be obtained. These authors reported high enrichment factors for six PAHs and a good analytical performance in their application to environmental samples.

Finally, a brief comparison of the characteristics of the type of capillaries and coatings can be performed. One of the advantages of commercial capillaries is their availability in different polarities, film thickness and porosity. Moreover their good repeatability, reusability and stability for mixtures of organic solvents and water are further examples of their remarkable characteristics. But due to their low sample loading capacity, a higher volume of sample or number of cycles are necessary to obtain good enrichment factors. They show a low selectivity and are not biocompatible. RAM and monolithic phases are materials compatible with biological samples which minimize the treatments prior to extraction. RAM have disadvantages owing to a limited loading speed. Due to their high permeability, the monolithic phases allow high flow-rate. They also have a good stability under extreme pH conditions and organic

solvents, but a control of pore structure is necessary. Their robustness evaluated as column-to-column reproducibility (lower than 10%) was good both for monolithic and monolithic MIP capillaries [15,18,23,67,68,76,83,84,89]. Besides, many of developed monolithic capillaries were reused for the extraction between 50 and 100 times [15,23,46,68,76].

Polypyrrole, a selective material, has a better extraction efficiency than conventional capillaries since different types of interactions can be established with the analytes. Similarly to conventional columns, polypyrrole presents low sample loading capacity. Other materials such as nanoparticles show a better enrichment factor than conventional columns. In a case in which their magnetic properties were used, increase of the absolute extraction recoveries was achieved. However, the deposition of nanoparticles and their chemical modification must provide a good reproducibility between capillaries in order to assure their suitability. In a few articles, a column-to-column reproducibility less than 15% was given [45,60] and many capillaries were reused over 200 times [45,54,86].

5. Conclusions and future trends

From this scoping review, it can be concluded that the consolidated configuration is in-valve mode associated with the extraction mode called flow-through. However, the configuration associated with the cycle extraction is chosen more frequently in biomedical applications. On the other hand, the two-valve configuration is more versatile when limitations in sample size, complex extractions or high-pressures are presented. New approaches on the extraction mode and configuration are still to be proposed.

Although a large number of parameters can be selected for the optimization of the in-tube SPME method, most influential parameters are the types of capillaries and their coatings. The commercial GC columns and monolithic capillaries have been successfully used in most studies. The excellent behavior of commercial capillaries, with assured reproducibility, offers good prospects for the in-tube SPME implementation in routine methods. The dynamic desorption using mobile phase when in-tube SPME is coupled to LC was the chosen parameter in most of the studies.

In-tube SPME is still suitable for the environmental analysis and has increased its presence in biomedical analysis with respect to previous periods. Despite its potential, however, very few applications are found in the industrial analysis. Its application should be emphasized in proteomics for the characterization by MALDI-TOF-MS. One of its weak points is the fact that it requires the combination with other techniques for the treatment of solid samples. Although a good compatibility of in-tube SPME with organic and aqueous extracts and an easy combination with techniques such as MSPD, MAE and USE have been tested, further research on complex matrices is needed, especially in food analysis.

One of the in-tube SPME strengths, automation, has been reinforced over the period 2009 to 2015. The scoping review shows an increase in the coupling with chromatographic miniaturized systems (CapLC) representing a similar percentage (around 20%) to that of the coupling with LC-MS. The coupling with UHPLC, a system with high pressures, has also been achieved. New approaches, such as temperature or electrochemically controlled systems have been developed to improve the efficiency of the extraction. From the combination of nanomaterials and in-tube SPME a new alternative has emerged, magnetic IT-SPME, which enhances the absolute efficiencies to values within the range 60–100%. The implementation of these new performances should be followed in the coming years. Furthermore, in-tube SPME ability to hyphenate is worth noting, not only with several chromatographic systems, but also with other instrumental techniques such

as MS or UV-spectrometry (see Fig. 6).

The largest and most effective efforts may have been made in the preparation of new coatings and capillaries. Monolithic capillaries prepared in the laboratory, combined with MIP, RAM or nanoparticle capillaries, have particularly reduced the matrix effect in biological matrices [9]. In general, they have increased the selectivity, the sensitivity and the mechanical stability. For the development of new coating materials, their characteristics related to selectivity, biocompatibility, extraction efficiency, and stability should be considered. The biomedical and food applications are those which have employed the new coatings the most.

In view of the balance between its strengths and weaknesses discussed in the current scoping review, a steady development of in-tube SPME is plausible for the coming years. A large number of research groups working on in-tube SPME contributed to a greater diffusion of this technique. New ways in proteomics, capillary coatings, application fields, and combination with other techniques are possibilities opening up for the future research.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Spanish Ministry of Science and Innovation (Research Grant, CGL2010-18145), and the Galician Government (Xunta de Galicia; Research Grants 10MSD164019 PR and GRC2013-047 Programa de Consolidación y Estructuración de Unidades de Investigación Competitivas [Consolidation and Structuring of Competitive Research Unit] co-financed by the EU-ERDF Program). M.F.A. acknowledges the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport for an FPU (AP2012-5486).

References

- [1] Y. Moliner-Martínez, R. Herráez-Hernández, J. Verdú-Andrés, C. Molins-Legua, P. Campíns-Falcó, Recent advances of in-tube solid-phase microextraction, *TrAC – Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 205–213.
- [2] R. Eisert, J. Pawliszyn, Automated in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3140–3147.
- [3] A. Kabir, K.G. Furton, A. Malik, Innovations in sol-gel microextraction phases for solvent-free sample preparation in analytical chemistry, *TrAC – Trends Anal. Chem.* 45 (2013) 197–218.
- [4] H. Kataoka, Current developments and future trends in solid-phase microextraction techniques for pharmaceutical and biomedical analyses, *Anal. Sci.* 27 (2011) 893–905.
- [5] M.E. Torres-Padrón, C. Afonso-Olivares, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, Microextraction techniques coupled to liquid chromatography with mass spectrometry for the determination of organic micropollutants in environmental water samples, *Molecules* 19 (2014) 10320–10349.
- [6] H.L. Lord, Strategies for interfacing solid-phase microextraction with liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 2–13.
- [7] H. Kataoka, A. Ishizaki, Y. Nonaka, K. Saito, Developments and applications of capillary microextraction techniques: a review, *Anal. Chim. Acta* 655 (2009) 8–29.
- [8] H. Arksey, L. O'Malley, Scoping studies: towards a methodological framework, *Int. J. Soc. Res. Methodol. Theory Pract.* 8 (2005) 19–32.
- [9] M.E.C. Queiroz, L.P. Melo, Selective capillary coating materials for in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography to determine drugs and biomarkers in biological samples: a review, *Anal. Chim. Acta* 826 (2014) 1–11.
- [10] H. Kataoka, SPME techniques for biomedical analysis, *Bioanalysis* 7 (2015) 2135–2144.
- [11] H. Kataoka, K. Saito, Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2011) 926–950.
- [12] M.C. Prieto-Blanco, P. López-Mahía, P. Campíns-Falcó, In-tube solid-phase microextraction and liquid chromatography using a monolithic column for the selective determination of residual ethylenediamine in industrial cationic polymers, *Anal. Chem.* 81 (14) (2009) 5827–5832.
- [13] M.C. Prieto-Blanco, Y. Moliner-Martínez, P. Campíns-Falcó, Combining poly(-dimethyldiphenylsiloxane) and nitrile phases for improving the separation and quantitation of benzalkonium chloride homologues: in-tube solid phase microextraction–capillary liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry for analyzing industrial samples, *J. Chromatogr. A* 1297 (2013) 226–230.
- [14] S.H. Ahmadi, A. Manbohi, K.T. Heydar, Electrochemically controlled in-tube solid phase microextraction, *Anal. Chim. Acta* 853 (2015) 335–341.

- [15] Q. Yu, X. Wang, Q. Ma, B. Yuan, H. He, Y. Feng, Automated analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in human plasma and water samples by in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry based on a poly(4-vinylpyridine-coethylene dimethacrylate) monolith, *Anal. Methods* 4 (2012) 1538–1545.
- [16] X. Wang, X. Li, Z. Li, Y. Zhang, Y. Bai, H. Liu, Online coupling of in-tube solid-phase microextraction with direct analysis in real time mass spectrometry for rapid determination of triazine herbicides in water using carbon-nanotubes-incorporated polymer monolith, *Anal. Chem.* 86 (2014) 4739–4747.
- [17] A. Ishizaki, K. Saito, H. Kataoka, Analysis of contaminant polycyclic aromatic hydrocarbons in tea products and crude drugs, *Anal. Methods* 3 (2011) 299–305.
- [18] Z. Lin, Y. Lin, X. Sun, H. Yang, L. Zhang, G. Chen, One-pot preparation of a molecularly imprinted hybrid monolithic capillary column for selective recognition and capture of lysozyme, *J. Chromatogr. A* 1284 (2013) 8–16.
- [19] S.-T. Wang, M.-Y. Wang, X. Su, B.-F. Yuan, Y.-Q. Feng, Facile preparation of SiO₂/TiO₂ composite monolithic capillary column and its application in enrichment of phosphopeptides, *Anal. Chem.* 84 (2012) 7763–7770.
- [20] J. Aufartová, M.E. Torres-Padrón, Z. Sosa-Ferrera, L. Nováková, P. Solich, J.J. Santana-Rodríguez, Development of a novel in-tube solid phase microextraction based on micellar desorption followed by LC-DAD-FD for the determination of some endocrine disruptor compounds in environmental liquid samples, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 37 (2014) 1654–1672.
- [21] J.-H. Wu, Y. Zhao, T. Li, C. Xu, K. Xiao, Y.-Q. Feng, L. Guo, The use of liquid phase deposition prepared phosphate grafted silica nanoparticle-deposited capillaries in the enrichment of phosphopeptides, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 1806–1815.
- [22] M. Zarejousheghani, M. Möder, H. Borsdorf, A new strategy for synthesis of an in-tube molecularly imprinted polymer-solid phase microextraction device: Selective off-line extraction of 4-nitrophenol as an example of priority pollutants from environmental water samples, *Anal. Chim. Acta* 798 (2013) 48–55.
- [23] X. Wang, Q. Ma, M. Li, C. Chang, Y. Bai, Y. Feng, H. Liu, Automated and sensitive analysis of 28-epihomobrassinolide in *Arabidopsis thaliana* by on-line polymer monolith microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1317 (2013) 121–128.
- [24] M.-M. Zheng, G.-D. Ruan, Y.-Q. Feng, Evaluating polymer monolith in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry for reliable quantification and confirmation of quinolone antibacterials in edible animal food, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7510–7519.
- [25] S. Zhang, L. Jia, S. Wang, Determination of β -carotene in corn by in-tube SPME coupled to micro-LC, *Chromatographia* 72 (2010) 1231–1233.
- [26] S. Poorahong, C. Thammakhet, P. Thavarungkul, P. Kanatharana, Online in-tube microextraction coupled with UV-Vis spectrophotometer for bisphenol A detection, *J. Environ. Sci. Health A* 48 (2013) 242–250.
- [27] A. Masiá, Y. Moliner-Martínez, M. Muñoz-Ortuño, Y. Pico, P. Campíns-Falcó, Multiresidue analysis of organic pollutants by in-tube solid phase microextraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1306 (2013) 1–11.
- [28] J. Pan, Y. Huang, L. Liu, Y. Hu, G. Li, A novel fractionized sampling and stacking strategy for online hyphenation of solid-phase-based extraction to ultra-high performance liquid chromatography for ultrasensitive analysis, *J. Chromatogr. A* 1316 (2013) 29–36.
- [29] B. Chen, B. Hu, M. He, X. Mao, W. Zu, Synthesis of mixed coating with multi-functional groups for in-tube hollow fiber solid phase microextraction-high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry speciation of arsenic in human urine, *J. Chromatogr. A* 1227 (2012) 19–28.
- [30] Y. Yang, H. Lord, J. Pawliszyn, A new strategy to eliminate sample mixing during in-tube solid phase microextraction, *J. Chromatogr. A* 1318 (2013) 12–21.
- [31] Y. Yang, A. Rodríguez-Lafuente, J. Pawliszyn, Thermoelectric-based temperature controlling system for in-tube solid-phase microextraction, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 1617–1621.
- [32] W. Zhang, Z. Zhang, J. Meng, W. Zhou, Z. Chen, Adsorptive behavior and solid-phase microextraction of bare stainless steel sample loop in high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1365 (2014) 19–28.
- [33] M. Muñoz-Ortuño, Y. Moliner-Martínez, S. Cogollos-Costa, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, A miniaturized method for estimating di(2-ethylhexyl) phthalate in bivalves as bioindicators, *J. Chromatogr. A* 1260 (2012) 169–173.
- [34] M. Muñoz-Ortuño, A. Argente-García, Y. Moliner-Martínez, J. Verdú-Andrés, R. Herráez-Hernández, M.T. Picher, P. Campíns-Falcó, A cost-effective method for estimating di(2-ethylhexyl)phthalate in coastal sediments, *J. Chromatogr. A* 1324 (2014) 57–62.
- [35] A. Ishizaki, K. Saito, N. Hanioka, S. Narimatsu, H. Kataoka, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 5555–5563.
- [36] M.C. Prieto-Blanco, Y. Moliner-Martínez, P. López-Mahía, P. Campíns-Falcó, Ion-pair in-tube solid-phase microextraction and capillary liquid chromatography using a titania-based column: application to the specific lauralconium chloride determination in water, *J. Chromatogr. A* 1248 (2012) 55–59.
- [37] K. Saito, E. Uemura, A. Ishizaki, H. Kataoka, Determination of perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 658 (2010) 141–146.
- [38] H. Kataoka, T. Inoue, K. Saito, H. Kato, K. Masuda, Analysis of heterocyclic amines in hair by on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 786 (2013) 54–60.
- [39] H. Kataoka, T. Inoue, N. Ikekita, K. Saito, Development of exposure assessment method based on the analysis of urinary heterocyclic amines as biomarkers by on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 2171–2178.
- [40] H. Kataoka, K. Ehara, R. Yasuhara, K. Saito, Simultaneous determination of testosterone, cortisol, and dehydroepiandrosterone in saliva by stable isotope dilution on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 331–340.
- [41] Y. Nonaka, K. Saito, N. Hanioka, S. Narimatsu, H. Kataoka, Determination of aflatoxins in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4416–4422.
- [42] H. Kataoka, M. Itano, A. Ishizaki, K. Saito, Determination of patulin in fruit juice and dried fruit samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3746–3750.
- [43] X. Yan, D. Wu, H. Peng, K. Ding, C. Duan, Y. Guan, Array capillary in-tube solid-phase microextraction: a rapid preparation technique for water samples, *J. Chromatogr. A* 1244 (2012) 69–76.
- [44] X. Yan, D. Wu, H. Meng, L. Hao, K. Ding, Y. Guan, Further investigation of array capillary in-tube solid-phase microextraction of trace organic pollutants in water samples, *Anal. Methods* 6 (2014) 750–757.
- [45] Y. Moliner-Martínez, H. Prima-García, A. Ribera, E. Coronado, P. Campíns-Falcó, Magnetic in-tube solid phase microextraction, *Anal. Chem.* 84 (2012) 7233–7240.
- [46] S.-W. Zhang, J. Xing, L.-S. Cai, C.-Y. Wu, Molecularly imprinted monolith in-tube solid-phase microextraction coupled with HPLC/UV detection for determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in urine, *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 479–487.
- [47] M.C. Prieto-Blanco, P. López-Mahía, P. Campíns-Falcó, On-line analysis of carbonyl compounds with derivatization in aqueous extracts of atmospheric particulate PM₁₀ by in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4834–4839.
- [48] M.C. Prieto-Blanco, Y. Moliner-Martínez, P. López-Mahía, P. Campíns-Falcó, Determination of carbonyl compounds in particulate matter PM_{2.5} by in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography/mass spectrometry, *Talanta* 115 (2013) 876–880.
- [49] P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández, J. Verdú-Andrés, C. Cháfer-Pericás, On-line determination of aliphatic amines in water using in-tube solid-phase microextraction-assisted derivatization in in-valve mode for processing large sample volumes in LC, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 557–565.
- [50] N. Jornet-Martínez, M. Muñoz-Ortuño, Y. Moliner-Martínez, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, On-line in-tube solid phase microextraction-capillary liquid chromatography method for monitoring degradation products of di-(2-ethylhexyl) phthalate in waters, *J. Chromatogr. A* 1347 (2014) 157–160.
- [51] Y. Moliner-Martínez, P. Serra-Mora, J. Verdú-Andrés, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, Analysis of polar triazines and degradation products in waters by in-tube solid-phase microextraction and capillary chromatography: an environmentally friendly method, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 1485–1497.
- [52] Y. Vitta, Y. Moliner-Martínez, P. Campíns-Falcó, A.F. Cuervo, An in-tube SPME device for the selective determination of chlorophyll a in aquatic systems, *Talanta* 82 (2010) 952–956.
- [53] H. Bagheri, P. Bayat, H. Piri-Moghadam, Grafting the sol-gel based sorbents by diazonium salts: a novel approach toward unbreakable capillary microextraction, *J. Chromatogr. A* 1318 (2013) 58–64.
- [54] R.A. González-Fuenzalida, Y. Moliner-Martínez, H. Prima-García, A. Ribera, P. Campíns-Falcó, R.J. Zaragoza, Evaluation of superparamagnetic silica nanoparticles for extraction of triazines in magnetic in-tube solid phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography, *Nanomaterials* 4 (2014) 242–255.
- [55] W. Zhang, J. Zhang, T. Bao, W. Zhou, J. Meng, Z. Chen, Universal multilayer assemblies of graphene in chemically resistant microtubes for microextraction, *Anal. Chem.* 85 (2013) 6846–6854.
- [56] Y. Moliner-Martínez, Y. Vitta, H. Prima-García, R.A. González-Fuenzalida, A. Ribera, P. Campíns-Falcó, E. Coronado, Silica supported Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction and magnetic in-tube solid-phase microextraction: application to organophosphorous compounds, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 2211–2215.
- [57] Y. Moliner-Martínez, C. Molins-Legua, J. Verdú-Andrés, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, Advantages of monolithic over particulate columns for multiresidue analysis of organic pollutants by in-tube solid-phase

- microextraction coupled to capillary liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6256–6262.
- [58] Y. Moliner-Martínez, R. Herráez-Hernández, C. Molins-Legua, P. Campins-Falcó, Improving analysis of apolar organic compounds by the use of a capillary titania-based column: application to the direct determination of faecal sterols cholesterol and coprostanol in wastewater samples, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4682–4687.
- [59] P. Campins-Falcó, J. Verdú-Andrés, A. Sevillano-Cabeza, R. Herráez-Hernández, C. Molins-Legua, Y. Moliner-Martínez, In-tube solid-phase microextraction coupled by in valve mode to capillary LC-DAD: improving detectability to multiresidue organic pollutants analysis in several whole waters, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2695–2702.
- [60] T. Li, J. Xu, J.-H. Wu, Y.-Q. Feng, Liquid-phase deposition of silica nanoparticles into a capillary for in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2989–2995.
- [61] J. Aurfartová, M.E. Torres-Padrón, Z. Sosa-Ferrera, P. Solich, J.J. Santana-Rodríguez, Optimization of an in-tube solid phase microextraction method coupled with HPLC for determination of some oestrogens in environmental liquid samples using different capillary columns, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 92 (2012) 382–396.
- [62] H. Kataoka, H. Shiba, K. Saito, Automated analysis of oseltamivir and oseltamivir carboxylate in environmental waters by online in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Methods* 4 (2012) 1513–1518.
- [63] Z. Xia, T. Gan, H. Chen, R. Lv, W. Wei, F. Yang, A new open tubular capillary microextraction and sweeping for the analysis of super low concentration of hydrophobic compounds, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 3221–3230.
- [64] L.P. Melo, R.H.C. Queiroz, M.E.C. Queiroz, Automated determination of rifampicin in plasma samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011) 2454–2458.
- [65] J.A. Caris, B.J.G. Silva, E.C.D. Moisés, V.L. Lanchote, M.E.C. Queiroz, Automated analysis of lidocaine and its metabolite in plasma by in-tube solid-phase microextraction coupled with LC-UV for pharmacokinetic study, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 734–741.
- [66] A.R. Chaves, B.J.G. Silva, F.M. Lanças, M.E.C. Queiroz, Biocompatible in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography–fluorescence detection for determination of interferon α in plasma samples, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 3376–3381.
- [67] A.R. Chaves, M.E. Costa Queiroz, In-tube solid-phase microextraction with molecularly imprinted polymer to determine interferon alpha 2a in plasma sample by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1318 (2013) 43–48.
- [68] M.-M. Zheng, S.-T. Wang, W.-K. Hu, Y.-Q. Feng, In-tube solid-phase microextraction based on hybrid silica monolith coupled to liquid chromatography–mass spectrometry for automated analysis of ten antidepressants in human urine and plasma, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7493–7501.
- [69] W. Zhang, Z. Chen, Mussel inspired polydopamine functionalized poly(ether ether ketone) tube for online solid-phase microextraction–high performance liquid chromatography and its application in analysis of protoberberine alkaloids in rat plasma, *J. Chromatogr. A* 1278 (2013) 29–36.
- [70] A.R. Chaves, M.E.C. Queiroz, Immunoaffinity in-tube solid phase microextraction coupled with liquid chromatography with fluorescence detection for determination of interferon α in plasma samples, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 928 (2013) 37–43.
- [71] B.J. Gonçalves Silva, F.M. Lanças, M.E. Costa Queiroz, Determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma by polypyrrole-coated capillary in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–fluorescence detection, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8590–8597.
- [72] F. Ahmadi, T. Bapirzadeh, High-performance liquid chromatographic determination of naproxen in plasma after extraction by a novel in-tube solid phase-liquid liquid liquid extraction method, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 36 (2013) 1280–1295.
- [73] J.-F. Huang, Y.-Q. Feng, X.-H. Lin, Determination of five fluoroquinolones in human plasma using polymer monolith microextraction coupled to high-performance liquid chromatography, *Chin. Pharm. J.* 44 (2009) 941–945.
- [74] T. Kumazawa, K. Saeki, I. Yanagisawa, S. Uchigasaki, C. Hasegawa, H. Seno, O. Suzuki, K. Sato, Automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with HPLC/MS/MS for the determination of butyrophenone derivatives in human plasma, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 1161–1170.
- [75] Y. Wang, Z. Liu, Determination of 5 new abused drugs in plasma by in tube solid phase microextraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Yiyao Daobao* 33 (2014) 575–578.
- [76] Q. Ma, M. Chen, Z.-G. Shi, Y.-Q. Feng, Preparation of a poly(N-isopropylacrylamide-co-ethylene dimethacrylate) monolithic capillary and its application for in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 2592–2600.
- [77] J. He, Z. Liu, L. Ren, Y. Liu, P. Dou, K. Qian, H.-Y. Chen, On-line coupling of in-tube boronate affinity solid phase microextraction with high performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry for the determination of cis-diol biomolecules, *Talanta* 82 (2010) 270–276.
- [78] S.H. Ahmadi, A. Manbohi, K.T. Heydar, Electrochemically controlled in-tube solid phase microextraction of naproxen from urine samples using an experimental design, *Analyst* 140 (2015) 497–505.
- [79] S.W. Zhang, C.J. Zou, N. Luo, Q.F. Weng, L.S. Cai, C.Y. Wu, J. Xing, Determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by capillary electrophoresis with molecularly imprinted monolith in-tube solid phase microextraction, *Chin. Chem. Lett.* 21 (2010) 85–88.
- [80] K. Saito, K. Yagi, A. Ishizaki, H. Kataoka, Determination of anabolic steroids in human urine by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52 (2010) 727–733.
- [81] H. Kataoka, R. Inoue, K. Yagi, K. Saito, Determination of nicotine, cotinine, and related alkaloids in human urine and saliva by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 108–114.
- [82] R. Yasuhara, K. Ehara, K. Saito, H. Kataoka, Automated analysis of salivary stress-related steroid hormones by online in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Methods* 4 (2012) 3625–3630.
- [83] Z. Lin, J. Wang, X. Tan, L. Sun, R. Yu, H. Yang, G. Chen, Preparation of boronate-functionalized molecularly imprinted monolithic column with polydopamine coating for glycoprotein recognition and enrichment, *J. Chromatogr. A* 1319 (2013) 141–147.
- [84] H. Jiwei, L. Xuegang, C. Yawen, H. Heyou, Hybrid silica polymeric monolith-based in-tube microextraction and CE for determination of bisphenol A in beverages, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 2759–2766.
- [85] T.-T. Wang, Y.-H. Chen, J.-F. Ma, M.-J. Hu, Y. Li, J.-H. Fang, H.-Q. Gao, A novel ionic liquid-modified organic-polymer monolith as the sorbent for in-tube solid-phase microextraction of acidic food additives, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 4955–4963.
- [86] Q. Yu, Q. Ma, Y. Feng, Temperature-response polymer coating for in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography, *Talanta* 84 (2011) 1019–1025.
- [87] K. Saito, R. Ikeuchi, H. Kataoka, Determination of ochratoxins in nuts and grain samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1220 (2012) 1–6.
- [88] H. Xu, L. Jia, Capillary liquid chromatographic analysis of fat-soluble vitamins and β -carotene in combination with in-tube solid-phase microextraction, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 13–16.
- [89] Z.A. Lin, J.L. Pang, Y. Lin, H. Huang, Z.W. Cai, L. Zhang, G.N. Chen, Preparation and evaluation of a phenylboronate affinity monolith for selective capture of glycoproteins by capillary liquid chromatography, *Analyst* 136 (2011) 3281–3288.
- [90] Y. Hu, C. Song, G. Li, Fiber-in-tube solid-phase microextraction with molecularly imprinted coating for sensitive analysis of antibiotic drugs by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1263 (2012) 21–27.
- [91] P. Campis Falco, E. Coronado Miralles, Y. Moliner Martínez, H. Prima Garcia, A. Ribera Hermano, Device and method for magnetic in-tube solid-phase microextraction, Patent WO2013011171. 0124; Patent Application Date: 20120716; Prior. Appl. Date: 20110718, 2013.
- [92] H. Bagheri, A. Salemi, Coupling of a modified in-tube solid phase microextraction technique with high performance liquid chromatography–fluorescence detection for the ultra-trace determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples, *Chromatographia* 59 (2004) 501–505.
- [93] S. Orlandini, S. Pinzauti, S. Furlanetto, Application of quality by design to the development of analytical separation methods, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 443–450.
- [94] E. Boyacı, A. Rodríguez-Lafuente, K. Gorynski, F. Mirnaghi, E.A. Souza-Silva, D. Hein, J. Pawliszyn, Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: comparison for challenging cases, *Anal. Chim. Acta* 873 (2015) 14–30.
- [95] Y. Saito, M. Kawazoe, M. Hayashida, K. Jinno, Direct coupling of microcolumn liquid chromatography with in-tube solid-phase microextraction for the analysis of antidepressant drugs, *Analyst* 125 (2000) 807–809.



MARÍA FERNÁNDEZ-AMADO received her Master Degree in Fundamental Environmental Chemistry in 2012, and currently she is a Ph.D. student at Universidade da Coruña (Spain), developing her thesis in the Analytical Chemistry Department as a FPU fellow. Her research is focused on the development and optimization of miniaturized green preparation techniques (IT-SPME) coupled to HPLC for simple, quick and cheap determination of organic micro-pollutants (at ppb-ppt levels) in atmospheric samples.



MARÍA DEL CARMEN PRIETO-BLANCO She is a contracted professor of the Department of Analytical Chemistry at the University of A Coruña (Spain). Previously, she was Laboratory Manager in surfactants industry and fine chemicals. Her research is focused on developing analytical methods for determining organic compounds in the environment (emerging and persistent pollutants and surfactants), using liquid chromatography in combination with different sample treatment systems. Currently, she works in automated sample preparation techniques coupled to miniaturized chromatographic systems (CapLC), and in the development of in-situ analysis devices. She has published a number of papers in peer-reviewed journals on in-tube solid-phase microextraction (IT-SPME) applied to environmental and industrial analyses.

mental and industrial analyses.



PURIFICACIÓN LÓPEZ MAHÍA Profile URL: <http://www.researcherid.com/rid/L-5638-2014> ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0425-6727> Professor of Analytical Chemistry at the University of A Coruña (UDC) and Head of the Analytical Chemistry Department. She has a wide experience in the determination of priority pollutants in environmental matrices primarily on characterization, monitoring and assessment of air quality: air ambient, rain water and industrial emissions. She has participated in 220 research papers, 19 books/book chapters, 300 congress communications, 70 I + D + i project financed by public funds and contracts/agreements with companies and/or administrations, 19

doctoral theses and in several networks (REDMAAS; EuNetAir). Recently, she has participated in the UE-FP7 Mossclone project focused on the development and implementation of a method to control the air quality by using a devitalized moss clone as passive contaminant sensor. Her research projects also cover the development of sample preparation methods and their applications (air and water quality).



SOLEDAD MUNIATEGUI-LORENZO She is a full Professor in Analytical Chemistry at the University of A Coruña (UDC). She has a broad experience in the development of analytical methodologies for the determination of organic and inorganic compounds in complex matrices. Her research is focused on air quality, water quality and marine environment applying new sampling and sample treatment strategies and determination by mass spectrometry coupled to gas and liquid chromatography (GC–MS, GC–MS/MS, LC–MS/MS) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). She has participated in 220 papers in SCI journals and over 300 reports and communications published in conference proceedings, author of 19 books/chapters and 2 patents, supervised over 16 PhD theses. She

has collaborated in more than 35 R & D projects funded in competitive in regional, national and European levels.



DARIO PRADA RODRÍGUEZ He is professor of Analytical Chemistry at the University of A Coruña (UDC). Director of the Institute of Environment of the UDC. Coordinator of the Research Group of Applied Analytical Chemistry of UDC. He has published 350 research papers and 24 books / book chapters. He has participated in 500 scientific conferences, 50 I + D + i project financed by public funds and 25 contracts / agreements with companies and / or administrations. He has directed 21 doctoral theses. His research interests include the main lines of analytical chemistry with the special attention to the development of the new analytical methodologies for organic and inorganic pollutants to solve environmental problems.

Supplementary material for

A novel and cost-effective method for the determination of fifteen polycyclic aromatic hydrocarbons in low volume rainwater samples

M. Fernández-Amado, M. C. Prieto-Blanco*, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez

Grupo Química Analítica Aplicada (QANAP), Instituto Universitario de Medio Ambiente (IUMA), Centro de Investigacións Científicas Avanzadas (CICA), Departamento de Química Analítica, Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña, Campus de A Coruña, 15071 A Coruña, Spain

* Corresponding author: E-mail address: mcprieto@udc.es (M.C. Prieto-Blanco)

Full postal address: Departamento Química Analítica, Universidade da Coruña, Campus da Zapateira sn 15071 A Coruña, Spain

Captions

Fig. S1. Effect of concentration of IPA, THF (both on the left axis) and ACN (right axis) on the IT-SPME of naphthalene, acenaphthene, fluorene and phenanthrene. Concentration for each PAH with modifier included: 125 ng·L⁻¹ for IPA and THF, 10 ng·L⁻¹ for ACN. IT-SPME conditions: 3mL of PAH solution with the modifier followed by 60 µL of Milli-Q water. Error bars = ±SD.

Fig. S2. Effect of concentration of IPA, THF (both on the left axis) and ACN (right axis) on the IT-SPME of anthracene, fluoranthene, pyrene, and benz[*a*]anthracene. For experimental conditions, see figure S1.

Fig. S3. Effect of concentration of IPA, THF (both on the left axis) and ACN (right axis) on the IT-SPME of chrysene, benzo[*b*]fluoranthene, benzo[*k*]fluoranthene, and benzo[*a*]pyrene. For experimental conditions, see figure S1.

Fig. S4. Effect of concentration of IPA, THF (both on the left axis) and ACN (right axis) on the IT-SPME of dibenz[*a,h*]anthracene, benzo[*ghi*]perylene and indeno[1,2,3-*cd*]pyrene. For experimental conditions, see figure S1.

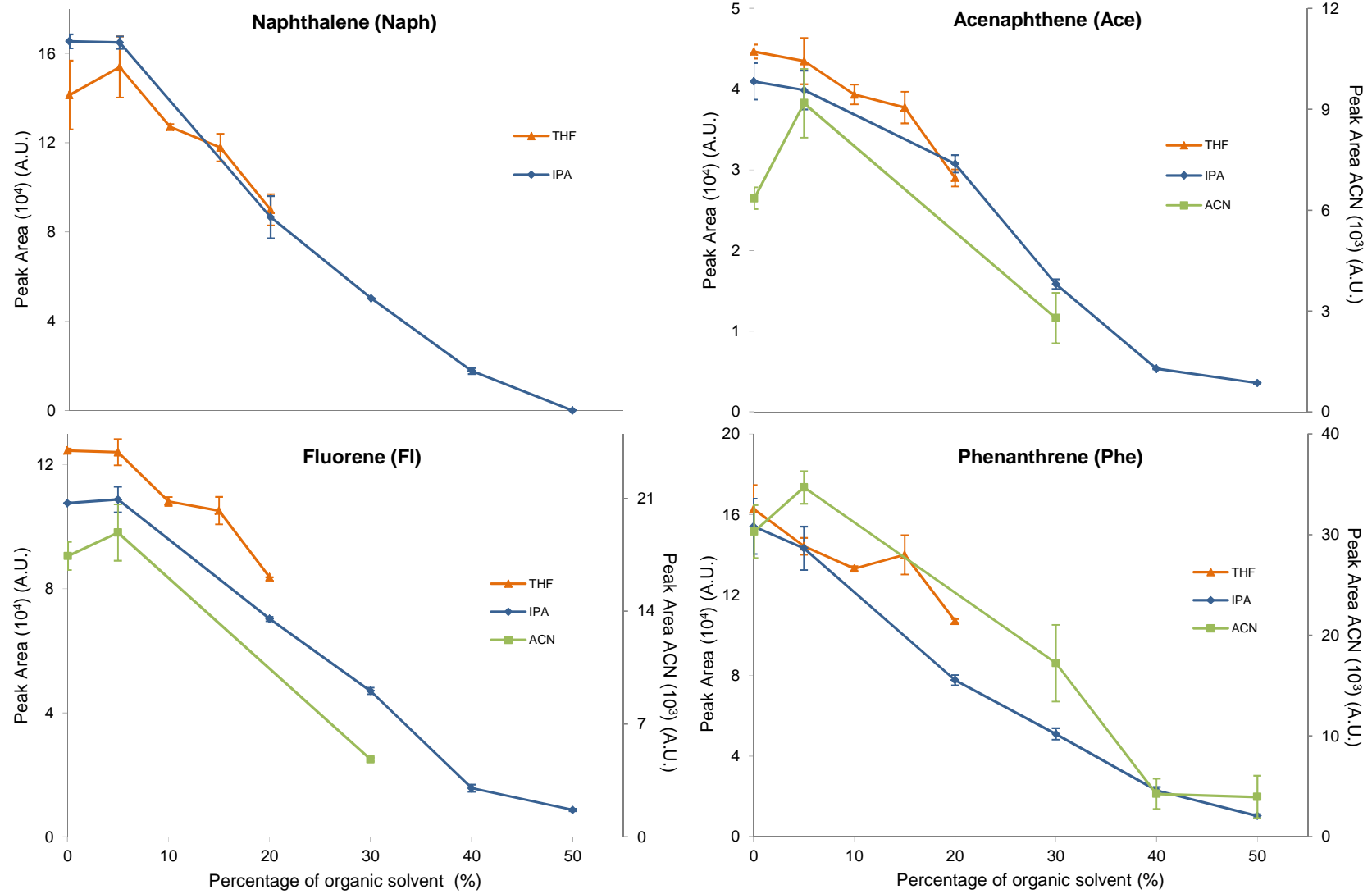


Fig. S1.

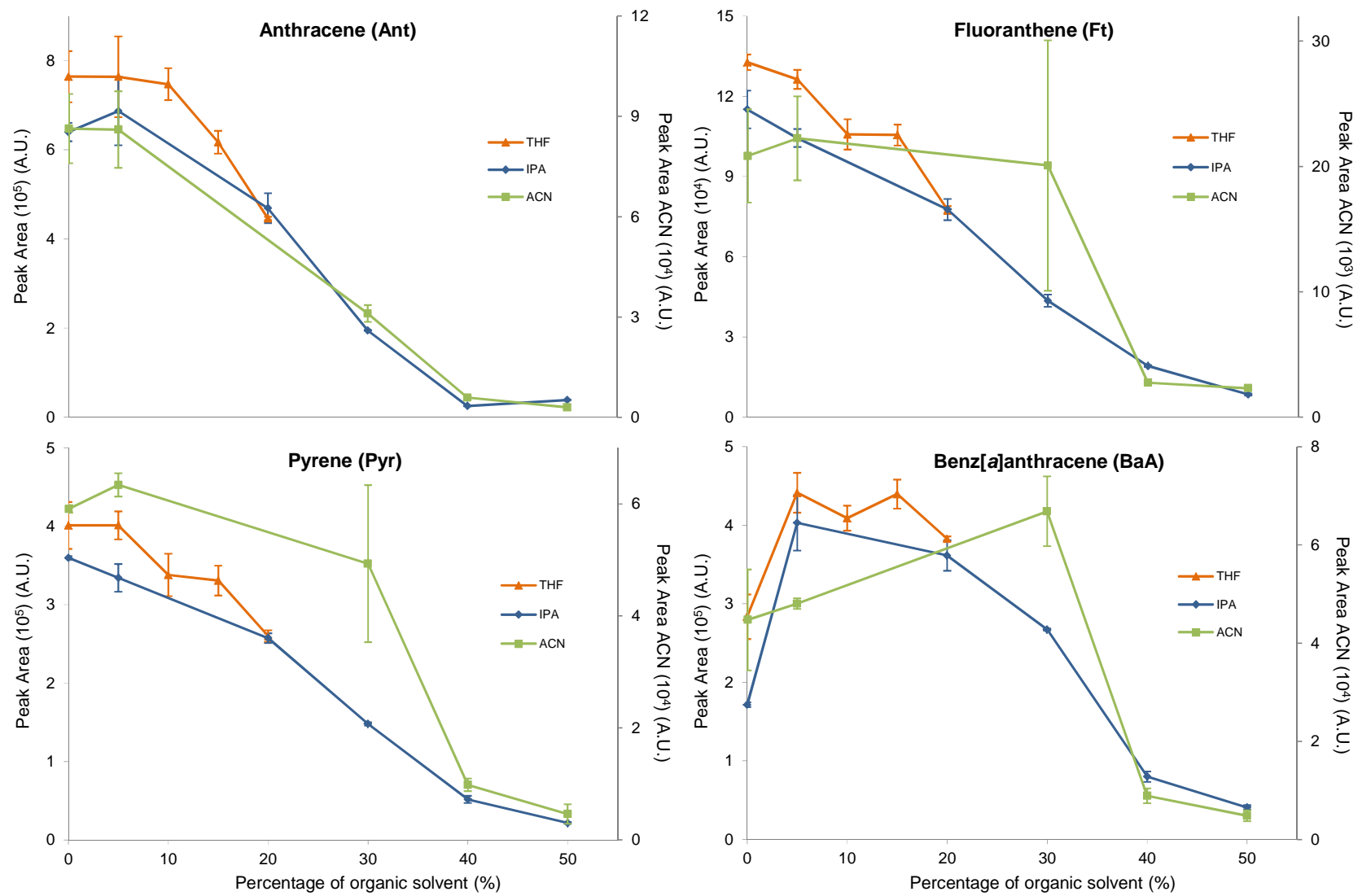


Fig. S2.

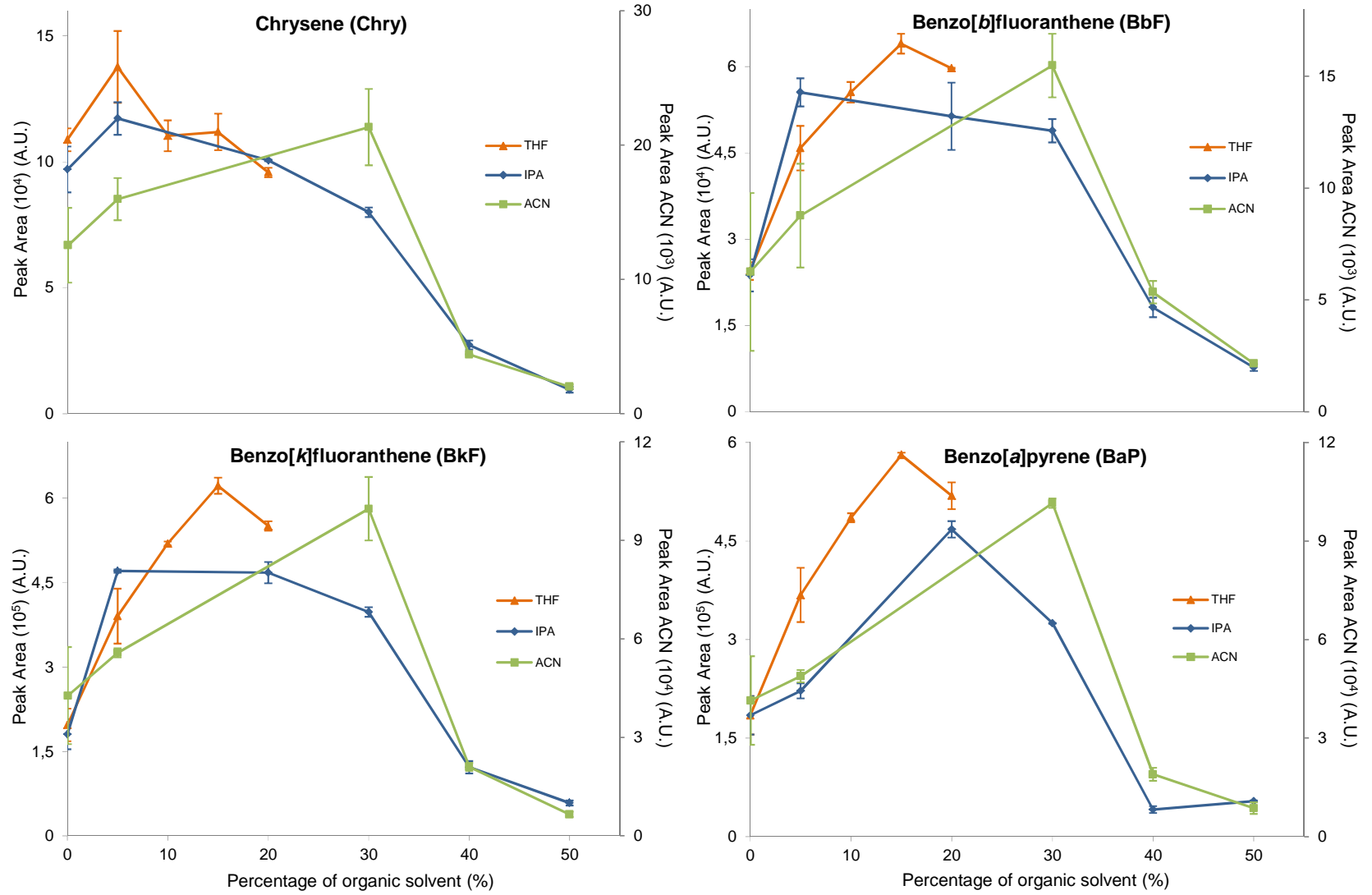


Fig. S3.

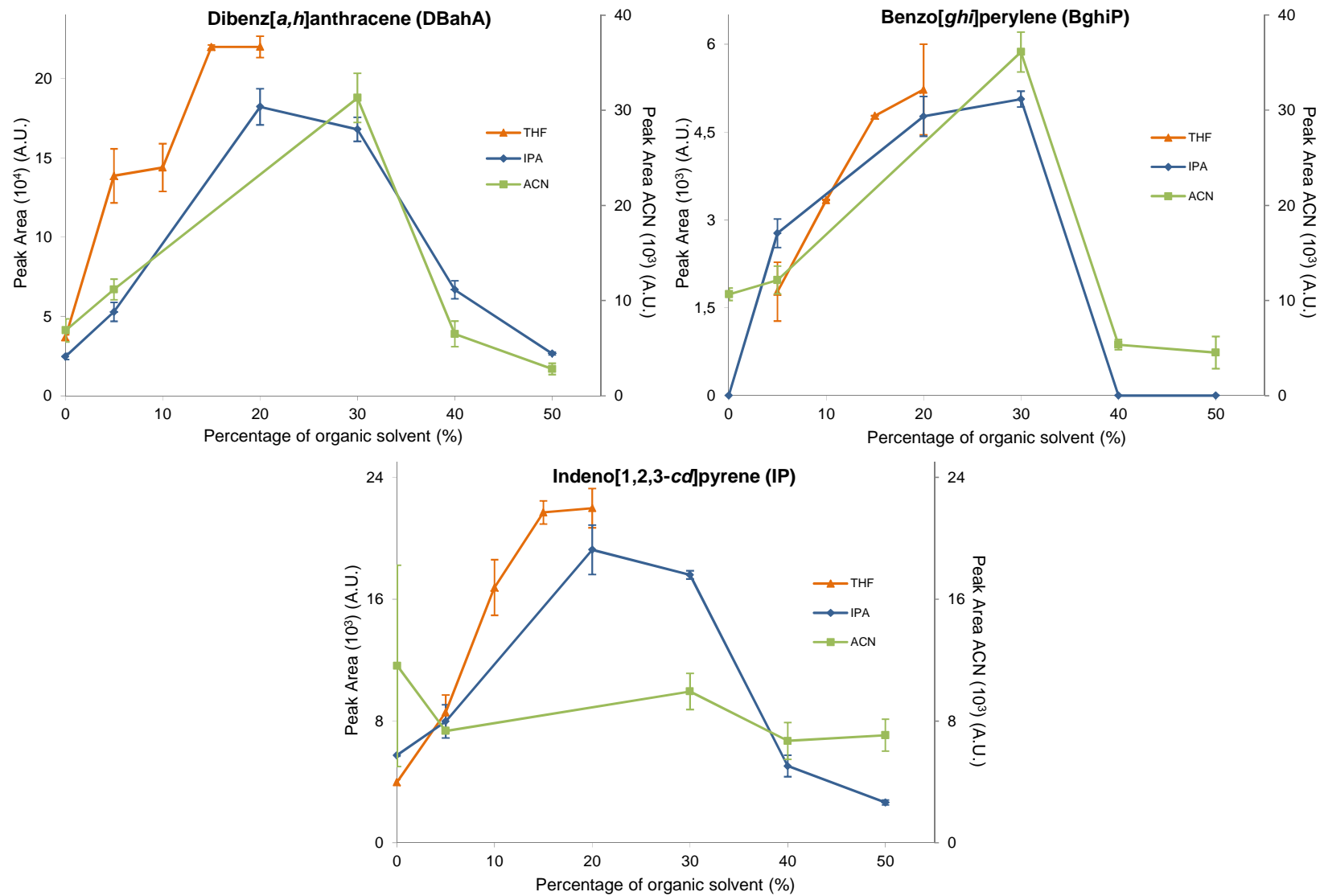


Fig. S4.

ANEXO II

A novel and cost-effective method for the determination of fifteen polycyclic aromatic hydrocarbons in low volume rainwater samples. *Talanta* 155 (2016) 175–184.



A novel and cost-effective method for the determination of fifteen polycyclic aromatic hydrocarbons in low volume rainwater samples



M. Fernández-Amado, M.C. Prieto-Blanco*, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez

Grupo Química Analítica Aplicada (QANAP), Instituto Universitario de Medio Ambiente (IUMA), Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA), Departamento de Química Analítica, Faculdade de Ciências, Universidade da Coruña, Campus de A Coruña, 15071 A Coruña, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 February 2016

Received in revised form

12 April 2016

Accepted 16 April 2016

Available online 19 April 2016

Keywords:

On-Line in-tube solid-phase microextraction-HPLC

Polycyclic aromatic hydrocarbon compounds (PAHs)

Rainwater

Water analysis

ABSTRACT

A novel single-step method was developed for the determination of 15 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at ultratrace levels in rainwater by on-line in-tube solid-phase microextraction (IT-SPME) coupled to high-performance liquid chromatography-photodiode array-fluorescence detection. This paper is focused on a study of the IT-SPME coupling and optimization, its application to rainwater and other environmental waters and the stability of PAH rainwater solutions. In order to solve the different extractive behavior of PAHs, several IT-SPME parameters were optimized, with the type and percentage of organic modifier playing a decisive role. In the kinetic study on stability of PAH solutions, the organic modifier has proven to be effective as a preservative, avoiding the loss of the higher-molecular weight PAHs. The proposed method presents a wide interval of linearity ($10\text{--}1500\text{ ng L}^{-1}$) and a good relative standard deviation between 3.4% and 14.6% for the PAHs analyzed. Detection and quantification limits between 2.3 and 28 ng L^{-1} and 5.7 and 65 ng L^{-1} were obtained respectively, taking into account the values of the procedure blanks. Recoveries for different kinds of real water samples were within the range of 72–110%. Low and medium-molecular weight PAHs predominate in daily and monthly rainwater samples analyzed. In comparison with other methods reported, the proposed method achieves a significant reduction of the sample volume, the organic solvent consumption and time of sample treatment, allowing a cost-effective analysis of environmental waters. The method is especially suitable for samples from the precipitation events of low intensity or short duration for which sample volume is limiting.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are persistent organic pollutants (POPs) containing two or more fused aromatic rings [1]. They are basically generated by incomplete combustion and pyrolysis processes involving hydrocarbons (fossil fuels and wood), either from natural or anthropogenic sources [2,3]. Some of them have genotoxic (carcinogenic, mutagenic, teratogenic) properties [4], due to the interaction between their metabolites and DNA [1,5]. PAHs are widely present in the environment (water, air and soil) at low concentrations. The analysis of PAHs at ultratrace level in environmental matrices usually requires several steps of sample treatment, which can be significant time-consuming processes, and they involve high consumption of organic solvents and losses of analytes [6].

The relevance of rainwater in environmental studies is related to spatial and temporal balances of pollutants and their exchange between different environmental compartments. Particularly, PAHs are incorporated into soil, water systems, biota and food chains by wet deposition. Rainwater scavenges the PAHs present in the atmosphere in vapour and particulate phase. Their incorporation into rainwater depends on several factors, such as temperature or amount of precipitation. For some pollutants, the relationship between their concentration levels and amount of precipitation has been interpreted by hyperbolic and exponential models [7,8]. Thereby, the highest concentration of pollutants is found in the initial precipitation, and the following rainfall (with lower concentration) dilutes the sample. A similar relationship was found between PAHs concentration in particulate and precipitation phases [7]. Furthermore, short-time breaks in rainfall have also an influence on the pollutants levels over a day, and may cause fluctuation of data in long sampling periods. These investigations suggest that smaller sample volumes and a shorter sampling period than those used in classical monitoring can be required. For example, regional differences in pollutants levels

* Correspondence to: Departamento Química Analítica, Universidade da Coruña, Campus da Zapateira sn, 15071A Coruña, Spain.

E-mail address: mcprieto@udc.es (M.C. Prieto-Blanco).

were only observed in the initial rainfall, so large volume samples are not suitable to study them [8]. Furthermore, if the sampling is done in remote areas, the stability of the sample during transport and its conservation has to be controlled. The routine analysis of PAHs in rainwater is usually accomplished using traditional multi-step methods, which typically involve liquid-liquid extraction, purification and evaporation, and a large consumption of solvents and time.

In-tube solid-phase microextraction (IT-SPME) is a sample preparation technique that can be easily coupled on-line to high-performance liquid chromatography (HPLC), combining sample treatment and determination in a single step. Since its introduction, IT-SPME has demonstrated its ability to analyze complex samples in the environmental, clinical and food fields [9–14]. PAHs analysis has been carried out by IT-SPME coupling HPLC with a fluorescence detector [9,11]. However, 15 USEPA priority PAHs could not be determined in a single run due to different behaviors between lower-molecular weight and higher-molecular weight PAHs, doubling sample, reagents and time consumption.

The aim of this work is the development of a novel method for the determination of ultratrace 15 USEPA priority PAHs in environmental waters (particularly in rainwater). For this purpose, a miniaturized extraction technique (IT-SPME) coupled to liquid chromatography with fluorescence detection, which combines extraction, purification and concentration in a single-step, was employed. Evaporation steps are unnecessary. Good concentration factors were achieved by the addition of an appropriate organic modifier which also behaves as a preservative. The sample volume (less than 5 mL), consumption of toxic and expensive organic solvent (0.75 mL) and time of sample treatment (7 min) are significantly reduced with respect to classical methods turning it into a simple, rapid and cost-effective method. Its application to samples collected from short-duration precipitation events is especially suitable due to the low sample volume required and good sensitivity achieved. From a methodological point of view, the used configuration combining a six-port injection valve and autosampler allows a higher throughput of the instrumental laboratory. On the other hand, the stability of PAH aqueous solutions is not good, as noticed during the development of this work. However, to the best of the authors' knowledge very few studies have been carried out on this subject, and none in rainwater. Therefore, this work also presents a novel study about the stability of PAH rainwater solutions. Finally, the single-step method was applied to rainwater samples from a region with abundant rainfall (northwest of the Iberian Peninsula) [15] and several environmental samples (spring, river and lake) from a local area in which there was an open-pit coal mine.

2. Material and methods

2.1. Apparatus

The chromatographic system (Waters, Mildford, MA, USA) consisted of a 2695 Alliance module and two detectors in series: a photodiode array detector, DAD (Waters 996), and a scanning fluorescence detector (Waters 474), with the software Empower 2.0. A six-port injection valve (Rheodyne Model 7725i) was coupled for the IT-SPME procedure.

2.2. Reagents and materials

A PAH Calibration Mix containing naphthalene (Naph), acenaphthene (Ace), fluorene (Fl), phenanthrene (Phe), anthracene (Ant), fluoranthene (Ft), pyrene (Pyr), benz[*a*]anthracene (BaA), chrysene

(Chry), benzo[*b*]fluoranthene (BbF), benzo[*k*]fluoranthene (BkF), benzo[*a*]pyrene (BaP), dibenz[*a,h*]anthracene (DBa,hA), benzo[*ghi*]perylene (Bg,h,iP) and indeno[1,2,3-*cd*]pyrene (IP) ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$ each in acetonitrile) was obtained from Supelco (Bellafonte, USA). Working solutions were prepared from the commercial solution. All solutions were stored at -18°C in amber glass vials (Waters, Mildford, MA, USA, and Supelco, Steinheim, Germany).

All solvents were of Gradient HPLC grade. Acetonitrile (J. T. Baker, Phillipsburg, USA, and Scharlau, Barcelona, Spain), 2-propanol HPLC (Panreac, Barcelona, Spain) and tetrahydrofuran (Merck, Darmstadt, Germany) were filtered through $0.45 \mu\text{m}$ PTFE membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain). Water was Milli-Q quality, filtered through $0.20 \mu\text{m}$ nylon membranes (Millipore, Darmstadt, Germany).

2.3. Sampling and filtration of aqueous samples

Rainwater samples (daily [24 h] and monthly) were collected at two air monitoring stations: at the University Environmental Institute (suburban area in Liáns-Oleiros, A Coruña, Spain), and an industrial area in Arteixo, A Coruña, Spain. All rainwater samples were collected using a silanized glass sampler (DEPOBULK[®], Lab-Service Analytica, Bologna, Italy), they were filtered through pre-calcinated MK360 Munktell quartz filters (4.7 cm diameter) and they were later stored at -18°C until analysis.

The samples of lake water (Lake As Pontes), river water (Eume river) and spring water (Ribeira Nova spring), were collected at As Pontes de García Rodríguez, A Coruña, Spain. There is a thermal power plant near the sampling points. These samples were filtered through Discmic[®]-13HP syringe filters (PTFE, $0.50 \mu\text{m}$, 13 mm) purchased from Advantec MFS (Dublin, CA, USA). After the aqueous sample was filtered, 15% (proportion of the final volume) of tetrahydrofuran was passed through the filter.

2.4. In-tube SPME procedure

For the IT-SPME-HPLC-FLD procedure, the loop of the six-port injection valve was replaced by a 70 cm-long GC capillary column TRB-5 (95% poly(dimethylsiloxane)-5% poly(diphenylsiloxane), 0.32 mm i.d. , $3 \mu\text{m}$ thickness) purchased from Teknokroma (Barcelona, Spain). Capillary connections were facilitated by the use of a 2.5 cm sleeve of 1/16 in. polyether ether ketone (PEEK) tubing at each end of the capillary. In load position, 5 mL of a sample or PAHs solution were passed through the capillary at flow-rate of 0.7 mL min^{-1} , followed by $60 \mu\text{L}$ of Milli-Q water to displace the remaining sample in the capillary. The run is started by programming a sample volume equal to zero for the autosampler. At the time the gradient starts, the valve is rotated to the inject position, and mobile phase passes through the capillary, desorbing analytes.

Between runs, the sample syringe is rinsed with methanol and acetonitrile (filling it twice with each solvent), while the valve and capillary are flushed with 2.5 mL of acetonitrile before loading the next sample.

2.5. Chromatographic conditions

The analytical column was a Waters[®] PAH C18 ($250 \times 4.6 \text{ mm i.d.}$, $5 \mu\text{m}$). The gradient elution mode was used, with an acetonitrile/water mixture (Fig. 1). The column temperature was set to $32 \pm 5^\circ\text{C}$ and fluorescence programmed conditions are shown in Fig. 1. DAD data were recorded between 210 and 400 nm. Under these conditions, the 15 PAHs are detected within 38 min.

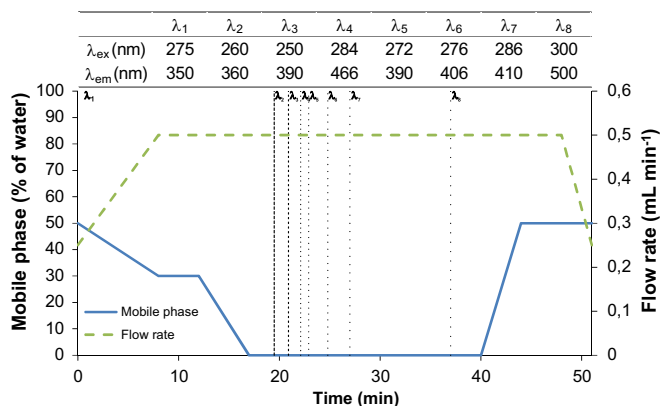


Fig. 1. Elution gradient conditions and fluorescence programmed conditions.

3. Results and discussion

3.1. Selection of IT-SPME configuration

Several configurations for the coupling with the chromatographic system are described in the already large literature on the subject. In automated mode, the extraction capillary is settled in a suitable autosampler (only in certain commercial brands) and the extraction is automatically performed when the sample is repeatedly aspirated/dispensed (draw/ejection cycles mode [11]). The autosampler is modified, although it may return to its original function when the coupling is no longer required. In manual mode, the capillary is settled in a six-port injection valve and the extraction is performed passing the sample manual and continuously through the capillary (just once and in one direction) [9,13]. If the chromatographic system is not provided with an autosampler, no instrument modifications are necessary for this latter option.

In this work, an IT-SPME configuration, modified with respect to those commonly used, was tested. The pump and autosampler of the chromatographic system are placed in a single module, and in addition, the extraction capillary could not be mounted within autosampler. Therefore, the extraction capillary was placed in the manual injection valve and the autosampler was not disconnected from the system, in order to easily switch between the IT-SPME configuration and a conventional configuration using the autosampler (without the six-port injection valve connected) (Fig. 2). Thus, the six-port valve is added or removed according to the configuration required. Repeatedly switching between the two configurations has been easily carried out for over a year. Using the IT-SPME configuration proposed, the chromatographic system can be employed for different applications.

3.2. Evaluation of the modifier and sample volume in the IT-SPME procedure

A capillary coated with 95% poly(dimethylsiloxane)-5% poly(diphenylsiloxane) was used for IT-SPME due to its good results for mixtures of compounds of different hydrophobicity (including PAHs) [9,16]. Selective extraction of PAHs can be favored on coatings containing phenyl group due to π - π interactions [12]. Higher values of length (70 cm), internal diameter (0.32 mm) and thickness (3 μ m) of those used commonly for IT-SPME capillaries were chosen in order to obtain the maximum sensitivity.

The optimization of the percentage of three organic solvents (acetonitrile [ACN], 2-propanol [IPA] and tetrahydrofuran [THF]) in the aqueous sample was performed. It was observed that at low volumes (60 μ L), all 15 PAHs presented the same parabolic profile (peak area vs. percentage of organic solvent), with the maximum peak area for 30–40% acetonitrile (data is not shown). However,

using higher volumes (3 mL), the higher-molecular weight PAHs (from benz[a]anthracene) maintained the parabolic profile, whereas the lower-molecular weight ones (until pyrene) presented lower peak areas when the percentage of acetonitrile was increased, with an optimal percentage of 5% ACN (See Fig. S1–S4 in Supplementary Material). The existence of two different behaviors between the compounds has been reported in the literature [9,11]. No reference about the variation in the profiles with the volume was found.

Similarly as with acetonitrile, if both 2-propanol and tetrahydrofuran were used, the profiles above mentioned are found. The differences between solvents lie in the number of PAHs with each behavior (parabolic profile begins in BaP with IPA and BbF with THF) and in the optimal percentage for the higher-molecular weight ones (30% ACN, 20% IPA, 15% THF). For the lower-molecular weight PAHs a 5% is the optimal percentage for the 3 solvents tested. The tendency is that higher percentages of modifier are necessary to obtain a higher analytical response when the PAH molecular weight is increased.

The three modifiers have been compared in terms of sensitivity and adaptation for a compromise solution. Fig. 3 shows the ratio between the peak area with 5% modifier and with 30%, 20% or 15% (named “optimized percentage”), depending on the modifier. The line set at 1 corresponds to the ideal compromise situation. Differences between percentages did not affect in the same way all the organic solvents. When using acetonitrile very big differences were obtained. Using 2-propanol, 5% IPA was the optimal percentage for almost all the PAHs. However, the ones with optimal percentage 20% IPA are some of the most interesting compounds, especially benzo[a]pyrene, which is commonly used as a marker for all the PAHs [1,9]. Therefore, 20% 2-propanol can be used as a compromise for all 15 PAHs. On the other hand, 15% THF seems to be a very good compromise, since it involves a significant increase in the peak area for the higher-molecular weight PAHs (1.4–2.7 times larger) and just a slightly loss for the lower-molecular weight ones. Besides, the concentration added to the aqueous sample is the smallest of the tested solvents, thus the sample is less diluted.

The differences between modifiers may be explained by the difference in their polarity. Acetonitrile is the most polar (Snyder's index, P' =5.8), whereas 2-propanol (P' =3.9) and tetrahydrofuran (P' =4.0), with a more similar behavior, have a very similar polarity [17]. It seems that the least polar solvents lead to a lower optimized percentage for the higher-molecular weight PAHs and to smaller differences in sensitivity.

The differences in sensitivity of the three solvents are compared in Fig. 4. As the optimized percentage for the higher-molecular weight PAHs is used, in general the lower-molecular weight PAHs present the smallest peak areas. This tendency is very pronounced in the case of acetonitrile, as expected from the previous results. 15% tetrahydrofuran provides the best performance.

The sample volume passed through the capillary was also optimized. As adsorption may be the extraction mechanism, it is expected that peak areas will increase with sample volume until saturation of the sorbent. This behavior was observed for some PAHs analyzed using this technique [9]. Under optimized conditions (15% THF), the saturation of the sorbent was not achieved in the studied range. For all target PAHs except naphthalene peak areas were linearly proportional to the volume of sample. Naphthalene presented a decrease in slope from 1 mL. Volumes larger than 5 mL were not tested because the sample was passed through the capillary manually. Using 30% acetonitrile, all the PAHs presented decreases in slope within a range up to 3 mL.

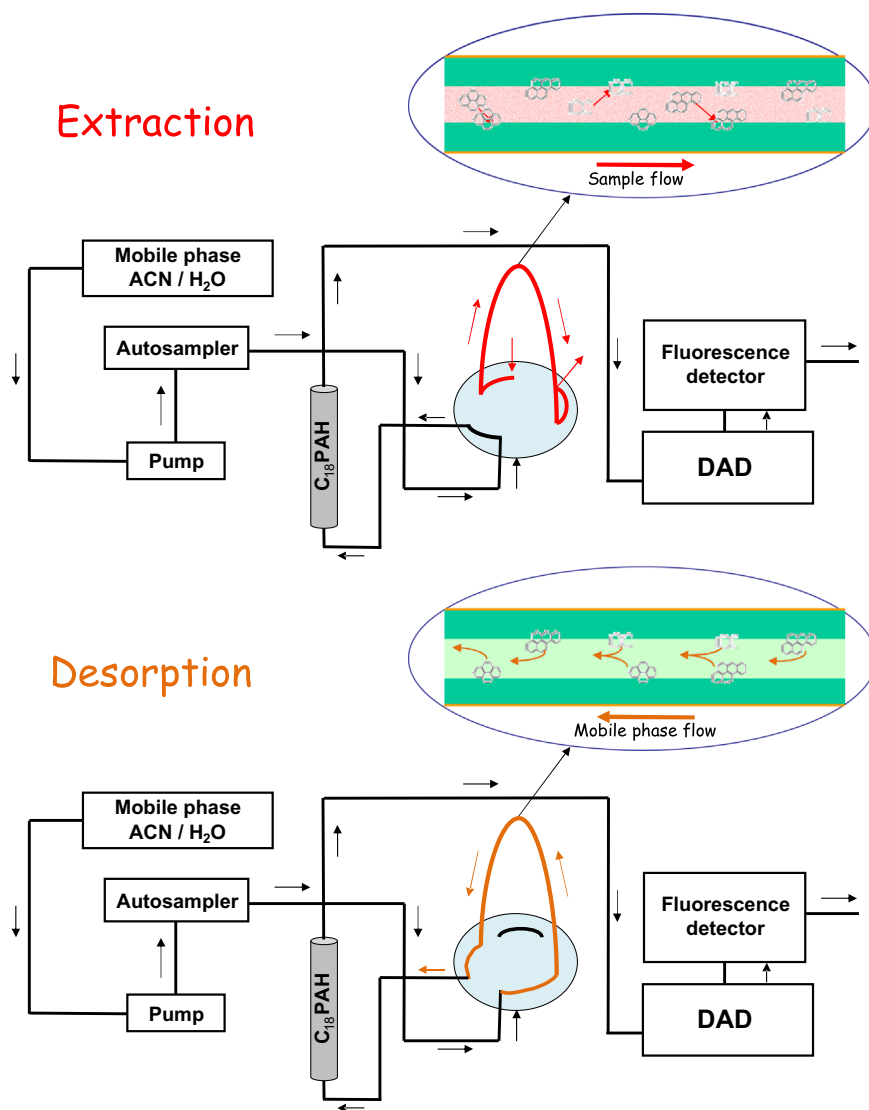


Fig. 2. Diagram of the system configuration.

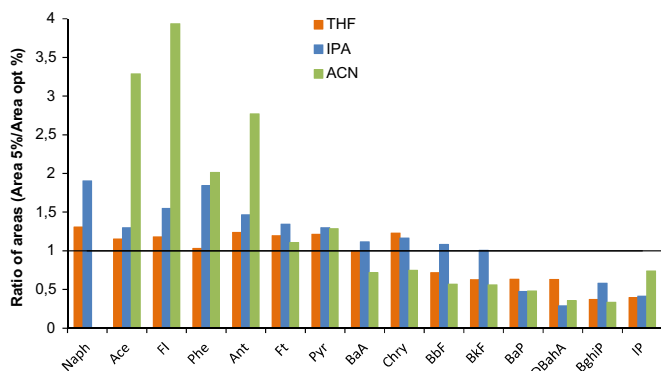


Fig. 3. Ratio of areas using 5% and the optimized percentage (opt %) according to solvent type.

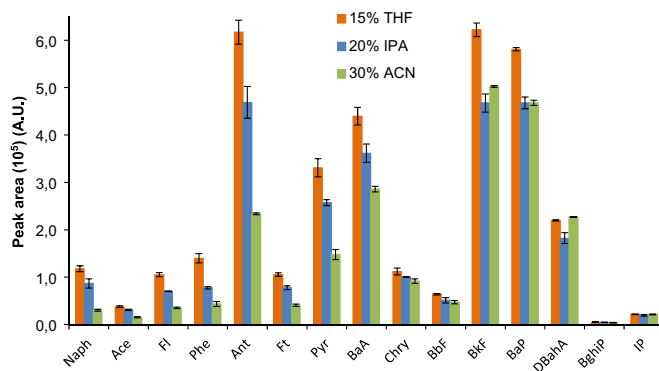


Fig. 4. Sensitivity achieved with the optimized percentage of each solvent. Error bars = \pm SD.

3.3. Study of stability of PAH solutions

A decrease of analytical response of PAHs in aqueous medium was observed over time, after the sample had been defrosted. This loss depends on the PAH type and on the matrix composition. Standards in Milli-Q water presented slower drops than spiked

rainwater samples. Anthracene, pyrene, benzo[a]anthracene, benzo[a]pyrene, and benzo[k]fluoranthene were the most affected PAHs. The loss of analytes may be produced by chemical or biological degradation or by adsorption onto the walls of the glass containers. Wolska et al. [6] had found significant adsorption of the higher-molecular weight PAHs onto glass.

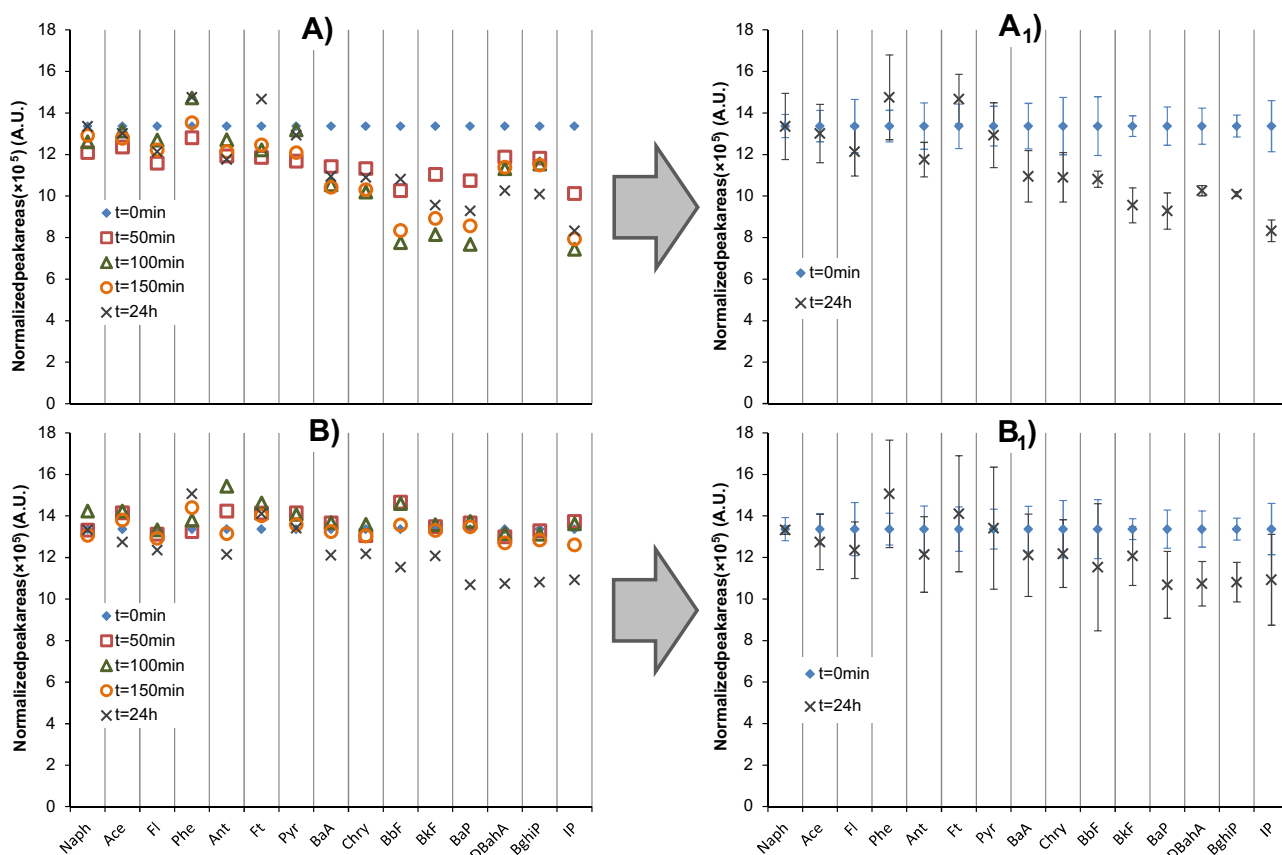


Fig. 5. Effect of the tetrahydrofuran (THF) on the conservation of PAHs in rainwater samples at 4 °C. A) Sample without addition of THF. B) Sample with 15% THF. A₁) Detail of the first (t=0) and last (t=24 h) points of A), with error bars= \pm SD. B₁) Detail of the first (t=0) and last (t=24 h) points of B), with error bars= \pm SD.

A kinetic study about stability of PAH solutions was carried out. A rainwater sample was spiked with analytes (0.25 ng mL^{-1}) and conserved at 4 °C during a day. Fig. 5(A) shows the variation between the normalized peak areas obtained just after the sample was defrosted and spiked and those obtained at different times. For most PAHs (mainly the higher-molecular weight ones), a decreasing to almost 50% was observed. One way to avoid microbial degradation and especially adsorption of PAHs onto the walls of glass containers is the addition of alcohols (methanol, 2-propanol) to aqueous samples [18–20]. In the literature, when the micro-extraction (μ -SPE or DDLME) method uses 2-propanol as an organic modifier, the percentage optimized for the extraction can be used as a preservative [18,20]. In our study, 15% tetrahydrofuran or 20% 2-propanol used as organic modifiers for this IT-SPME method could stabilize PAH solutions.

The results obtained using 15% tetrahydrofuran as a preservative show that a stabilization of the solution of the target PAHs is achieved for at least 150 min, allowing the analysis of up to 4 replicates (Fig. 5(B)). Using 20% IPA as a preservative, the results have a high relative standard deviation (CV up to 37%). Therefore, tetrahydrofuran only was considered suitable as a modifier and preservative. The stability in rainwater for 24 h using 15% THF as a preservative was also examined. For the lower-molecular weight PAHs, although significant differences were not observed after 24 h with respect to t=0, variation coefficients were higher in general for all compounds (Fig. 5(B)₁). Regarding the higher-molecular weight PAHs, from benzo[a]pyrene to indeno[1,2,3-cd]pyrene, present losses (18–20% of peak areas), but these losses are lower than if THF were not used (see Figs. 5(A) and (B)).

Some authors reported the conservation of the rainwater samples at $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ prior to the analysis [2,21]. A spiked rainwater

sample with PAHs (0.25 ng mL^{-1}) was conserved at $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ over a long period of time (over 23 weeks). An acceptable average recovery of 77.4% was obtained, also displaying more pronounced losses for higher-molecular weight PAHs. For the typical preservation time (1 week), the effect of THF was examined using a spiked rainwater sample. Two aliquots of a rainwater sample were frozen, adding THF as preservative to one of them. For lower-molecular weight PAHs, no significant losses were observed in the two aliquots. However, in the case of higher-molecular weight PAHs, the losses are greater in the aliquot without THF (23% versus 8.5% of peak areas for a week). These values indicate that the storage at $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ is a good choice for the rainwater preservation prior to analysis and the use of THF improves its preservation.

3.4. Optimization of previous filtration to IT-SPME

All rainwater samples collected are filtered through pre-calcinated quartz filters according to the procedure described by Moreda-Piñeiro et al. [22]. The aqueous phase is used for the determination of PAHs and the particulate phase could be used for other analytical purposes.

If the goal is to remove the suspended particulate and low sample volume is required, a filtering procedure through syringe filters can be a good option. Filters of different composition (nylon, PTFE, hydrophilic PTFE, polyvinylidene fluoride) were tested. PTFE filters gave the best results at ng L^{-1} concentration level, especially for lower-molecular weight PAHs, with recoveries ranging from 92–73%. However, the higher-molecular weight PAHs are retained in filters and recoveries are not higher than 49%. If 15% THF (used as a modifier) is passed through the filter after the sample, the retained compounds are recovered, giving satisfac-

tory recoveries (98–119%). This procedure was employed using hydrophilic PTFE filters, which allow water samples to pass more easily than PTFE filters, without being modified.

3.5. Performance of analytical method

The method validation was performed with respect to linearity, limits of quantification and detection, precision and recoveries. External calibration was carried out and calibration curves ranging from 10 to 1500 ng L⁻¹ were obtained with correlation coefficients > 0.998 for all the PAHs tested.

PAHs, as other persistent organic pollutants, can be present at trace-level in the work environment. Solvent blanks using Milli-Q water and THF were prepared in order to control the contamination of the laboratory (solvents, glassware and work environment) [23] and were monitored simultaneously with standards and samples. The minimization of blanks was performed cleaning the syringe (used for loading the sample) and volumetric and non-volumetric material with organic solvents. The blanks stabilization was verified by control charts. On the other hand, a potential memory effect was examined. To supervise the cleaning of the system, at the beginning of a working day or after the sample or standard injection, a system blank was performed, passing only the mobile phase through the capillary. No systematic contribution was detected in the capillary or chromatographic system.

Out of the PAHs analyzed, all PAHs were detected in the blanks except naphthalene, fluorene and indeno[1,2,3-cd]pyrene. Blank values and their standard deviation were considered to determine LODs and LOQs. Thus, LODs and LOQs were calculated as follows: $(S_B + a \times SD) / m$, where S_B = average area of blank, SD = standard deviation of blank area, m = slope of calibration curve, $a=3$ for LOD and $a=10$ for LOQ. For the three above-mentioned compounds whose blanks are not recorded, LOQ was established experimentally as the smallest concentration that provides a reproducible peak area (RSD < 20%), whereas LOD was calculated as 1/3 of LOQ [ISO/TS 13,530:2009]. These parameters were verified experimentally (Table 1). Phenanthrene, fluoranthene and pyrene show higher LODs since they have higher blank values than other PAHs analyzed.

The method provides an adequate inter-day precision, with values ranging from 3.4–14.6% at two concentrations levels

(Table 1). In this evaluation, the potential effect on the precision caused by the switching between two configurations (with and without IT-SPME) is considered. Therefore, the configuration presents a good robustness. Recoveries were determined in triplicate by spiking real water samples (Table 1). Satisfactory recoveries and low relative standard deviations were obtained at two different concentration levels (0.25 and 1 ng mL⁻¹) for different aqueous matrices (rainwater, river water and spring water). The use of 2-methylnaphthalene as surrogate standard was also evaluated. This compound was eluted before acenaphthene. However, the results in the matrices studied were comparable with those obtained by external calibration.

In order to evaluate the in-tube SPME efficiency, the absolute recoveries can be obtained comparing the total amount of analyte passed through the capillary with the amount of analyte extracted, which reaches the analytical column. Thereby, the recoveries were calculated by comparing the peak areas when 5 mL (0.25 and 1 ng mL⁻¹) were extracted by IT-SPME with those obtained by direct injection of 20 µL (62.5 and 250 ng mL⁻¹) solution containing an equivalent amount of PAHs. The values obtained depend on each PAH (see Table 1). They are similar (26–30%) to those obtained by other authors for the higher-molecular weight PAHs and slightly higher than those obtained for the lower-molecular weight PAHs [9]. It is noteworthy that the concentration processed by IT-SPME is 250 times lower than that processed by direct injection. As the extraction is not exhaustive, the average absolute recovery was 25.7% and a concentration factor of 64.2 was reached.

3.6. Application to real water samples

The method proposed was applied to several environmental samples. Rainwater samples were collected in two sites in Galicia (Northwestern Iberian Peninsula) with different typologies (suburban and industrial). Rainwater samples from suburban area (named EV) were collected during 24 h and those collected from industrial area (named M) during a month (Fig. 6). The results for each sample analyzed are summarized in Table 2. Despite higher values for the industrial area could be expected, monthly industrial rainwater samples have total PAHs concentrations equal or lower than those collected daily in a suburban area, with all values

Table 1
Limits of detection and quantification, inter-day precision and recoveries for the proposed method.

PAH	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)	%RSD ^A (n=11)	%RSD ^B (n=7)	%R ^{A,*} (rainwater)	%R ^{B,*} (rainwater)	%R ^{A,*} (river water)	%R ^{A,*} (spring water)	%R ^{A,*} (in-tube SPME)	%R ^{B,*} (in-tube SPME)
Naph	6.7	20	9.3	5.8	92 ± 4	83 ± 1	98 ± 1	96 ± 11	11.0 ± 0.3	11.0 ± 0.8
Ace	3.3	10	9.3	5.2	87 ± 5	86 ± 3	100 ± 5	89 ± 7	23.5 ± 0.2	23.9 ± 0.8
Fl	6.7	20	9.4	3.4	88 ± 6	85 ± 2	98 ± 5	95 ± 8	25.5 ± 0.3	25.4 ± 0.9
Phe	28	65	6.7	11.6	85 ± 7	90 ± 4	101 ± 7	92 ± 7	24.3 ± 0.2	24.2 ± 0.9
Ant	2.3	5.7	9.4	6.7	85 ± 9	92 ± 5	103 ± 6	93 ± 9	27.1 ± 0.3	27.1 ± 0.7
Ft	24	46	10.3	7.2	82 ± 8	93 ± 3	102 ± 6	93 ± 6	27 ± 1	27.4 ± 0.6
Pyr	13	27	10.1	5.7	80 ± 8	92 ± 4	98 ± 3	103 ± 19	28.1 ± 0.3	27.9 ± 0.7
BaA	3.7	8.0	10.0	6.9	72 ± 6	89 ± 5	101 ± 2	100 ± 9	29.9 ± 0.3	31.4 ± 0.3
Chry	5.9	8.7	8.5	7.4	72 ± 5	90 ± 6	100 ± 1	103 ± 8	29.0 ± 0.4	30.1 ± 0.3
BbF	9.3	21	12.3	8.5	79 ± 4	84 ± 6	105 ± 3	105 ± 11	26.3 ± 0.6	29.1 ± 0.7
BkF	4.6	9.6	12.5	8.7	78 ± 5	84 ± 7	105 ± 4	102 ± 11	27.4 ± 0.3	30.0 ± 0.7
BaP	4.4	9.2	13.1	10.4	80 ± 6	84 ± 7	103 ± 3	98 ± 11	27.1 ± 0.3	28.8 ± 0.4
DBahA	3.2	6.4	13.9 ^a	14.6	92 ± 3	82 ± 8	107 ± 8	102 ± 14	22.1 ± 0.6	27 ± 1
BghiP	5.2	12	12.9 ^b	13.1	93 ± 4	84 ± 7	110 ± 9	96 ± 14	23.5 ± 0.6	26.4 ± 0.9
IP	6.7	20	13.7 ^b	14.1	96 ± 1	84 ± 9	110 ± 9	100 ± 11	23 ± 2	26.4 ± 0.9

* n=3.

^A 250 ng L⁻¹.

^B 1 × 10³ ng L⁻¹.

^a n=10.

^b n=9.

below 500 ng L^{-1} . That may be explained due to a washing effect and dilution of rainwater. It seems that the volume and sampling time affect the concentration of PAHs more than the differences between types of area. In the case of EV-1, EV-2 and EV-3, which

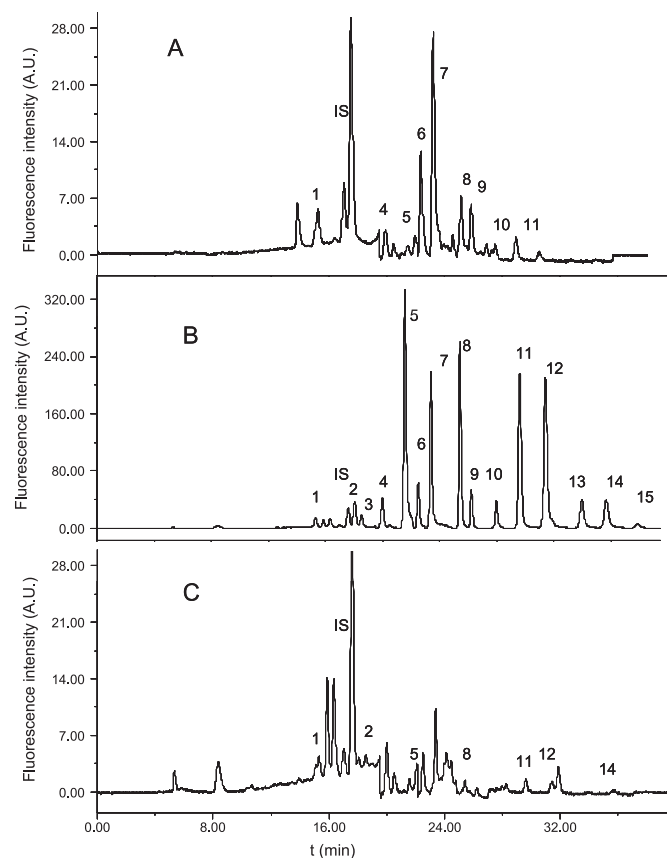


Fig. 6. Chromatograms obtained by the IT-SPME HPLC-FD method proposed. A) and C) Rainwater samples collected over a 24-hour period and monthly rainwater sample. B) Chromatogram of sample (C) spiked with a mixture of 0.25 ng L^{-1} each PAH. Peak assignment: (1) Naph, (2) Ace, (3) Fl, (4) Phe, (5) Ant, (6) Ft, (7) Pyr, (8) BaA, (9) Chry, (10) BbF, (11) BkF, (12) BaP, (13) DBa,hA, (14) Bg,h,iP, (15) IP, IS internal standard. For other details, see text.

Table 2

Concentration (ng L^{-1}) of PAHs found in real water samples.

	Rainwater								Lake water	River water	Spring water
	Daily					Monthly					
	EV-1 275 ^a	EV-2 695 ^a	EV-3 470 ^a	EV-4 260 ^a	EV-5 75 ^a	M-1	M-2	M-3	AP-1	AP-2	AP-3
Naph	180 ± 11	106 ± 10	146 ± 19	258 ± 15	221 ± 2	88 ± 9	47 ± 8	54 ± 12	n.d.	n.d.	n.d.
Ace	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ	< LOQ	12.2 ± 1.4	< LOQ	< LOQ
Fl	n.d.	38.3 ± 0.9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ	32.5 ± 0.6	< LOQ	n.d.	n.d.
Phe	< LOQ	< LOQ	n.d.	< LOQ	47.9 ± 4.8	n.d.	n.d.	124 ± 4	n.d.	n.d.	n.d.
Ant	7.5 ± 1.1	n.d.	6.5	6.4 ± 0.2	7.5 ± 0.03	6.5 ± 0.4	< LOQ	4.6 ± 0.2	3.1 ± 0.2	< LOQ	< LOQ
Ft	< LOQ	n.d.	n.d.	61.2 ± 9.4	92.0 ± 19.2	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.
Pyr	18.0 ± 1.0	19 ± 1	< LOQ	42.4 ± 4.5	58.5 ± 3.5	n.d.	n.d.	35.7 ± 2.2	< LOQ	n.d.	n.d.
BaA	10.4 ± 4.5	n.d.	6.9	11.8 ± 0.4	11.5 ± 0.5	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Chry	11.4 ± 8.1	n.d.	< LOQ	30.0 ± 0.2	21.4 ± 0.3	n.d.	n.d.	n.d.	< LOQ	n.d.	n.d.
BbF	< LOQ	n.d.	n.d.	< LOQ	< LOQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BkF	10.7 ± 3.2	n.d.	n.d.	8.3 ± 0.4	9.8 ± 0.4	n.d.	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
BaP	13.1 ± 6.5	n.d.	n.d.	n.d.	8.6 ± 0.4	n.d.	< LOQ	< LOQ	< LOQ	9.5 ± 1.2	< LOQ
DBaA	12.5	n.d.	11.7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BghiP	13.0 ± 1.2	n.d.	11.2	n.d.	13.1 ± 0.6	n.d.	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
IP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Σ PAHs	277 ± 37	164 ± 12	182 ± 19	418 ± 30	491 ± 32	94 ± 9	55 ± 8	277 ± 51	15.3 ± 1.4	9.5 ± 1.2	< LOQ

n.d.: not detected.

^a Volume of collected sample expressed in mL.

were collected in the same place on consecutive days, the washing effect can be observed more clearly since levels of total PAHs concentration decrease from the first until the last sampling day. In addition, the total concentration of the PAHs correlates negatively with the volume of collected sample ($r^2=0.81$). This pattern agrees with previous results reported in the literature for PAHs [24] and other organic contaminants in rainwater [8], supporting that the higher wet deposition of PAHs occurs in the first mm of rainfall.

Low and medium-molecular weight PAHs predominate in all rainwater samples analyzed. Naphthalene, the most common compound, is also the main PAH in most samples. The river, lake and spring water samples have very low levels of PAHs ($< 15 \text{ ng L}^{-1}$) and the major compounds detected are below limit of quantification.

3.7. Comparison of the literature methods for rainwater samples

Literature methods for PAH analysis in rainwater (Table 3, [23]) were compared in terms of number of analyzed PAHs, LODs, volume of sample, steps and time in sample treatment and consumption of organic solvents/sample using different techniques of treatment and determination (Table 3). Regarding LODs, the method proposed shows comparable or even better values than others using different sample preparation (SPE, SPME, LLE, etc.) and determination techniques (CG-MS, HPLC-FLD, etc.). Limit of detection for naphthalene (7 ng L^{-1}) is lower than those reported in most literature methods ($17\text{--}220 \text{ ng L}^{-1}$) [2,25–31]. It should be pointed out that no information about the control of blanks is provided in the methods listed in Table 3. Besides, this method is among those which involve a lower sample volume (5 mL). Some of the listed methods processed up to 8 L, increasing the time of sample treatment and making it difficult to determine rainwater events. Like in-fiber SPME methods [27,28,31], this IT-SPME method provides a low consumption of toxic organic solvents/sample and the treatment is performed in a single step. However, the extraction times for in-fiber SPME are between 25 and 75 min versus 7 min of the IT-SPME method. Dispersive liquid-liquid microextraction methods (DLLME) also allow a rapid extraction with low LODs, but several steps without automation (demulsification, centrifugation, etc.) may be

Table 3
Comparative features with other methods described in the literature for the determination of PAHs in rainwater.

No. PAHs analyzed	Volume of sample (mL)	Steps and time	Consumption of organic solvents/sample (mL)	Preparation technique	Determination technique	LOD (ng L ⁻¹)	Reference
18 (15 EPA)	10	1. Extraction with modifier, extraction solvent and disperser 2. Cooling in ice-bath (2 min) 3. Centrifugation (5 min) 4. Collected organic extract	2.5	DLLME with IL	HPLC-FLD	0.1–7 ^a	[20]
17 (15 EPA)	50	1. SPE (46 min according work flow-rate) 2. Rotary evaporation 3. Redissolution	25	SPE	HPLC-FLD	0.2–16.9	[2]
16 EPA	3000–8000	1. SPE (100–260 min according work flow-rate) 2. Concentration by rotary evaporator and N ₂ stream 3. Purification by liquid-solid chromatography 4. Concentration by N ₂ stream 5. Redissolution	85 Minimum	SPE (Dissolved), Soxhlet (particles)	GC-MS	0.01–1.0	[7]
16 EPA	50	1. SPE (15 min in the dryness step) 2. Concentration by N ₂ stream 3. Redissolution	16	SPE	HPLC-UV and FLD	0.03–36	[25]
16 EPA	200	1. Three liquid-liquid extractions 2. Filtration to remove water 3. Concentration by N ₂ stream 4. Redissolution	60	LLE	GC-MS	1.42–31.4	[32]
16 EPA	10	1. Extraction with solved salts and adjusted pH (75 min)	–	SPME	GC-MS	1–41	[26]
16 EPA	10	1. Extraction with solved salts and adjusted pH (60 min)	–	SPME	GC-MS	2.67–18.02	[27]
16 EPA	5	1. Extraction with disperser and extraction solvent (2 min) 2. Demulsification with addition of solvent 3. Collected organic extract	1.05	DLLME	GC-MS	3.7–39.1	[28]
16 EPA	100	1. Extraction with salts and organic solvent (30 min) 2. Collected organic extract	1	LLME	GC-MS	4–18 ^a	[33]
16 EPA	1000	1. Liquid-liquid extraction 2. Concentration by rotary evaporator N ₂ stream 3. Purification by SPE	Not specified	LLE	HPLC-FLD	10 ^a	[21]
16 EPA	1000	1. Liquid-liquid extraction (30 min) 2. Evaporation of extract 3. Redissolution	1.5	LLME	HPLC-FLD and UV	30–220 (22,500 for Acy)	[29]
16 (15 EPA)	5	1. Extraction with solved salts (30 min)	0.005	HFM-LPME	GC-MS	2–47	[34]
9 (6 EPA)	0.2	–	–	Freeze sample	L2MS	200–1300	[35]
5 (2 EPA)	40	1. Liquid-liquid extraction 2. Separation of phases	2.53	Homogeneous LLE	CE (MEKC)	32–805	[36]

Table 3 (continued)

No. PAHs analyzed	Volume of sample (mL)	Steps and time	Consumption of organic solvents/sample (mL)	Preparation technique	Determination technique	LOD (ng L ⁻¹)	Reference
		(30 min) 3. Collected organic extract					
Naph, Acy, Ace, Fl	5	1. Extraction with solved salts (25 min)	–	SPME	GC–MS	1–3	[30]
Naph, Ace, Fl	5	1. Extraction with ionic liquid (60 min) 2. Ultrasonication 3. Dilution of ionic liquid extract	0.2	ME with IL	HPLC-FD	30–100	[31]
15 EPA	5	1. Extraction (7 min) with organic modifier	0.76	IT-SPME	HPLC-FD	2.3–28	This work

^a LOQ. DLLME: Dispersive liquid-liquid microextraction, IL: Ionic liquid, SPE: solid phase extraction, LLE: liquid-liquid extraction, SPME: solid phase microextraction, LLME: liquid-liquid microextraction, HFM-LPME: Hollow fiber membrane/liquid phase microextraction, ME: microextraction, IT-SPME: in-tube solid phase microextraction, L2MS: Two-step laser mass spectrometry, MEKC: Micellar electrokinetic chromatography

necessary. In general, methods using microextraction techniques (SPME, DLLME, IT-SPME, LLME) reduce the consumption of organic solvent, number of steps and volume of sample with respect to conventional techniques (SPE, LLE). Tedious processes such as evaporation (critical for PAHs losses), removal of water by drying of SPE cartridges or filtration of sodium sulphate are avoided [2,21,25,26,32].

4. Conclusions

An on-line IT-SPME-HPLC-FLD method was developed for the determination of 15 EPA PAHs in rainwater and other environmental water samples. The one-step treatment proposed (only filtration is required) is simple, cost-effective and time- and reagent-saving with respect to several-step treatments. Each sample is processed in a single run since a very good compromise was found for the lower- and higher-molecular weight PAHs. Less than 5 mL of sample are required and very low volume (0.75 mL per sample) of organic solvent is used, making it recommended for precipitation events with low sample volume, in which the classical routine methods are not applicable. The analytical figures of merit are satisfactory. Good limits of detection are obtained considering procedure blanks, and no carryover effect was found. Higher throughput of the instrumental laboratory was achieved with the configuration proposed. IT-SPME can be considered as another module of the chromatographic system, making this on-line method very accessible.

On the other hand, a decrease of analytical response of PAHs, specially the higher-molecular weight ones, in rainwater over time was observed. For this reason, a new study on stability of PAH solutions was carried out. The results show significant and fast losses of PAHs when rainwater is conserved refrigerated (4 °C). 15% tetrahydrofuran reduces the loss of analytes, achieving stabilization of the sample for at least 150 min after defrosting. Therefore THF works as both organic modifier and preservative in the proposed method.

Low and medium-molecular weight PAHs predominate in the samples analyzed, naphthalene being the most common compound found. Higher concentrations of PAHs are measured in daily rainwater samples than in monthly ones, suggesting a dilution

effect for high volumes.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Spanish Ministry of Science and Innovation (Research Grant, CGL2010-18145), and the Galician Government (Xunta de Galicia; Research Grants 10MSD164019PR and GRC2013-047 Programa de Consolidación y Estructuración de Unidades de Investigación Competitivas [Consolidation and Structuring of Competitive Research Unit] cofinanced by the EU-ERDF Program). M. F. A. acknowledges the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport for an FPU (AP2012-5486). P. Esperón is acknowledged for her technical assistance during the sampling process. The authors are grateful for the technical assistance provided by Rubén Seara from Cienytech (Santiago, Spain).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.04.032>.

References

- [1] S. Danyi, F. Brose, C. Brasseur, Y.-J. Schneider, Y. Larondelle, L. Pussemier, J. Robbens, S. De Saeger, G. Maghuin-Rogister, M.-L. Scippo, Analysis of EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons in food supplements using high performance liquid chromatography coupled to an ultraviolet, diode array or fluorescence detector, *Anal. Chim. Acta* 633 (2009) 293–299.
- [2] O. Delhomme, E. Rieb, M. Millet, Solid-phase extraction and LC with fluorescence detection for analysis of PAHs in rainwater, *Chromatographia* 65 (2007) 163–171.
- [3] K. Ravindra, R. Sokhi, R. Van Grieken, Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: source attribution, emission factors and regulation, *Atmos. Environ.* 42 (2008) 2895–2921.
- [4] International agency for research of cancer, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, IARC Scientific Publications, Lyon, 2010.
- [5] P. Šimko, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives, *J. Chromatogr. B* 770 (2002) 3–18.
- [6] L. Wolska, M. Rawa-Adkonis, J. Namieśnik, Determining PAHs and PCBs in aqueous samples: finding and evaluating sources of error, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1389–1397.
- [7] D. Huang, P. Peng, Y. Xu, Y. Deng, H. Deng, Distribution and deposition of

- polycyclic aromatic hydrocarbons in precipitation in Guangzhou, South China, *J. Environ. Sci.* 21 (2009) 654–660.
- [8] S. Taguchi, K. Murai, M. Takamatsu, Y. Hayakawa, S. Tamizu, M. Kuwata, Y. Katayama, H. Kuramitz, N. Hata, Interpretation of the concentrations of aldehydes in rainwater over a wide area and local areas of Japan by some dominant factors, *Atmos. Environ.* 61 (2012) 588–596.
- [9] P. Campins-Falcó, J. Verdú-Andrés, A. Sevillano-Cabeza, C. Molins-Legua, R. Herráez-Hernández, New micromethod combining miniaturized matrix solid-phase dispersion and in-tube in-valve solid-phase microextraction for estimating polycyclic aromatic hydrocarbons in bivalves, *J. Chromatogr. A* 1211 (2008) 13–21.
- [10] M. Fernández-Amado, M.C. Prieto-Blanco, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, Strengths and weaknesses of in-tube solid-phase microextraction: a scoping review, *Anal. Chim. Acta* 906 (2016) 41–57.
- [11] A. Ishizaki, K. Saito, N. Hanioka, S. Narimatsu, H. Kataoka, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 5555–5563.
- [12] H. Kataoka, A. Ishizaki, Y. Nonaka, K. Saito, Developments and applications of capillary microextraction techniques: A review, *Anal. Chim. Acta* 655 (2009) 8–29.
- [13] M.C. Prieto-Blanco, Y. Moliner-Martínez, P. Lopez-Mahia, P. Campins-Falco, Ion-pair in-tube solid-phase microextraction and capillary liquid chromatography using a titania-based column: Application to the specific lauralkonium chloride determination in water, *J. Chromatogr. A* 1248 (2012) 55–59.
- [14] M.E.C. Queiroz, L.P. Melo, Selective capillary coating materials for in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography to determine drugs and biomarkers in biological samples: a review, *Anal. Chim. Acta* 826 (2014) 1–11.
- [15] R. Fernández-González, I. Yebra-Pimentel, E. Martínez-Carballo, J. Simal-Gándara, X. Pontevedra-Pombal, Atmospheric pollutants in fog and rain events at the northwestern mountains of the Iberian Peninsula, *Sci. Total Environ.* 497–498 (2014) 188–199.
- [16] C. Cháfer-Pericás, R. Herráez-Hernández, P. Campins-Falco, In-tube solid-phase microextraction-capillary liquid chromatography as a solution for the screening analysis of organophosphorus pesticides in untreated environmental water samples, *J. Chromatogr. A* 1141 (2007) 10–21.
- [17] J.M. Miller, *Chromatography: Concepts & Contrasts*, Wiley, Hoboken, 2005.
- [18] L. Guo, H.K. Lee, Development of multiwalled carbon nanotubes based micro-solid-phase extraction for the determination of trace levels of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 9321–9327.
- [19] A. Matthiessen, Use of a keeper to enhance the recovery of volatile polycyclic aromatic hydrocarbons in HPLC analysis, *Chromatographia* 45 (1997) 190–194.
- [20] M.T. Pena, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, Development of an ionic liquid based dispersive liquid–liquid microextraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6356–6364.
- [21] C. Sablayrolles, A. Breton, C. Vialle, C. Vignoles, M. Montréjaud-Vignoles, Priority organic pollutants in the urban water cycle (Toulouse, France), *Water Sci. Technol.* 64 (3) (2011) 541–556.
- [22] J. Moreda-Piñeiro, E. Alonso-Rodríguez, C. Moscoso-Pérez, G. Blanco-Heras, I. Turnes-Carou, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, Influence of marine, terrestrial and anthropogenic sources on ionic and metallic composition of rainwater at a suburban site (northwest coast of Spain), *Atmos. Environ.* 88 (2014) 30–38.
- [23] M.J. Capdeville, H. Budzinski, Trace-level analysis of organic contaminants in drinking waters and groundwaters, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 586–606.
- [24] Y. Wang, P.-h. Li, H.-l. Li, X.-h. Liu, W.-x. Wang, PAHs distribution in precipitation at Mount Taishan China. Identification of sources and meteorological influences, *Atmos. Res.* 95 (2010) 1–7.
- [25] G. Kiss, Z. Varga-Puchony, J. Hlavay, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in precipitation using solid-phase extraction and column liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 725 (1996) 261–272.
- [26] E. Rianawati, R. Balasubramanian, Optimization and validation of solid phase micro-extraction (SPME) method for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in rainwater and stormwater, *Phys. Chem. Earth* 34 (2009) 857–865.
- [27] I. Anil, N. Öztürk, O. Alagha, P. Ergenekon, Optimization of solid-phase microextraction using Taguchi design to quantify trace level polycyclic aromatic hydrocarbons in water, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 3561–3568.
- [28] L. Guo, H.K. Lee, Low-density solvent-based solvent demulsification dispersive liquid–liquid microextraction for the fast determination of trace levels of sixteen priority polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5040–5046.
- [29] G. Vinci, M.L. Antonelli, R. Preti, Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in rainwater by liquid–liquid microextraction and LC with core-shell particles column and fluorescence detection, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 461–468.
- [30] H. Bagheri, A. Roostaie, Aniline–silica nanocomposite as a novel solid phase microextraction fiber coating, *J. Chromatogr. A* 1238 (2012) 22–29.
- [31] J. Xiao, J. Cheng, F. Guo, H. Hu, S. Peng, M. Zhang, M. Cheng, Ultrasound-assisted headspace ionic-liquid microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons at elevated temperatures, *Microchim. Acta* 177 (2012) 465–471.
- [32] D. Istenič, C.A. Arias, V. Matamoros, J. Vollertsen, H. Brix, Elimination and accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban stormwater wet detention ponds, *Water Sci. Technol.* 64 (4) (2011) 818–825.
- [33] M. Guidotti, R. Giovanazzo, O. Cedrone, M. Vitali, Determination of organic micropollutants in rain water for laboratory screening of air quality in urban environment, *Environ. Int.* 26 (2000) 23–28.
- [34] C. Basheer, R. Balasubramanian, H.K. Lee, Determination of organic micropollutants in rainwater using hollow fiber membrane/liquid-phase microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1016 (2003) 11–20.
- [35] T.D. Bucheli, O.P. Haefliger, R. Dietiker, R. Zenobi Jr., Analysis of water contaminants and natural water samples using two-step laser mass spectrometry, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3671–3677.
- [36] Y. Takagai, S. Igarashi, Homogeneous liquid–liquid extraction and micellar electrokinetic chromatography using sweeping effect concentration system for determination of trace amounts of several polycyclic aromatic hydrocarbons, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 87–92.

ANEXO III

A comparative study of extractant and chromatographic phases for the rapid and sensitive determination of six phthalates in rainwater samples. *Chemosphere* 175 (2017) 52–65.



A comparative study of extractant and chromatographic phases for the rapid and sensitive determination of six phthalates in rainwater samples



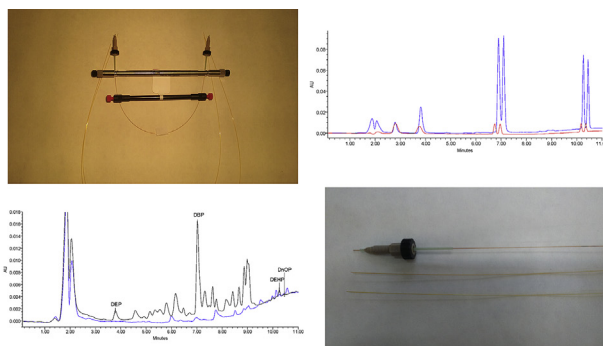
M. Fernández-Amado, M.C. Prieto-Blanco^{*}, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez

Universidade da Coruña, Grupo QANAP, Instituto Universitario de Medio Ambiente (IUMA), Centro de Investigacións Científicas Avanzadas (CICA), Departamento de Química Analítica, Facultade de Ciencias, Zapateira, 15071 A Coruña, Spain

HIGHLIGHTS

- Six phthalates with different hydrophobicity are separated within 11 min.
- Different extractant phases and other variables of IT-SPME are optimized.
- Blank problems are minimized and controlled.
- Rainfall events with different sampling time and volume are compared.
- Higher concentration of phthalates is found in short-term precipitation events.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 November 2016
 Received in revised form
 20 January 2017
 Accepted 1 February 2017
 Available online 3 February 2017

Handling Editor: Caroline Gaus

Keywords:

Phthalates
 Rainwater
 On-line in-tube solid phase
 microextraction-HPLC-DAD
 Monolithic columns
 Blank problems

ABSTRACT

Six phthalic acid esters were determined in rainwater samples, from which a very low sample volume was collected. This method combines on-line in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography with a diode-array detector. In order to obtain a short analysis time and to reduce the consumption of organic solvents, two chromatographic phases (C18 monolithic and cyanopropyl silica) are compared. Although three critical pairs are found, faster separation, good resolution and lower pressures are achieved using C18 monolithic column. In order to achieve a simple and sensitive method, two commercial capillaries (a porous polymer with divinylbenzene-4-vinylpyridine and a liquid-phase capillary with 95% poly(dimethylsiloxane)-5% poly(diphenylsiloxane)) are tested for the extraction process. Due to great differences of hydrophobicity among the six phthalates, the selection of a modifier is necessary for a good extraction. The best conditions are achieved using 5 mL of sample containing 40% methanol in a 70 cm-long porous polymer capillary. The procedural blanks are controlled and taken into account in the calculation of the detection limits. Except for dimethylphthalate, the method detection limits are in the range from 0.2 to 0.9 ng mL⁻¹ and the inter-day precision is between 5.3% and 12.5%. The recoveries were within the range of 71%–101%. Rainwater samples are analyzed in order to examine the dilution effect and washout of phthalates in the atmosphere. Dibutyl

^{*} Corresponding author. Departamento Química Analítica, Universidade da Coruña, Campus da Zapateira s/n, 15071 A Coruña, Spain.
 E-mail address: mcprieto@udc.es (M.C. Prieto-Blanco).

phthalate is the predominant phthalate found and di-(2-ethylhexyl) phthalate is detected in all analyzed samples.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Phthalates are esters of phthalic acid synthesized by the esterification of this acid with different alcohols. They are a group of industrial chemical compounds with a high production volume, due to their use as plasticizer substances. Phthalates containing shorter alkyl chains are used as film-forming agents, solvents and denaturants, and they can also be found in cosmetics and personal care products. Those with a longer alkyl chain, such as di-2-ethylhexylphthalate (DEHP), are employed for lamination of polyvinyl chloride (PVC) being present in a great variety of products of the daily life (coatings, medical devices, packaging, children toys, etc.). As phthalates are not chemically bonded to polymers, they can migrate, leach or evaporate, ending up in the environment, in food and materials that originally did not contain them. As a result, people are exposed to phthalates throughout their entire life in different ways (ingestion, inhalation and dermal contact) (Ventrice et al., 2013).

Their ubiquity and potential risk for human health and environment as endocrine disruptors make them susceptible to be included in national and international regulations (Ventrice et al., 2013; Heudorf et al., 2007; De Coster and Van Larebeke, 2012; Lin et al., 2003). Concerning European regulation, DEHP is identified as a priority hazardous substance in the field of water policy (Directive, 2013/39/EU). Environmental Quality Standards (EQS) have established an annual average of $1.3 \mu\text{g L}^{-1}$ for DEHP (Directive, 2013/39/EU) in surface waters. Moreover, the US Environmental Protection Agency (EPA) set the maximum admissible concentration (MAC) for this compound in water systems at $6 \mu\text{g L}^{-1}$. Other regulations related to food contact materials (Commission Directive, 2007/19/EC) impose restrictions over several phthalates, including di-*n*-butylphthalate (DBP), benzylbutylphthalate (BBP) and DEHP. In addition, DEHP, BBP and DBP are included among the list of substances subject to authorization as toxic for reproduction in the Regulation 1907/2006 of the European Parliament and of the Council. In the same regulation, it is stated that DEHP, BBP, DBP and di-*n*-octylphthalate (DnOP) have restrictions (limit of concentration 0.1% by weight) in the use of plastic material in toys and childcare articles (Regulation (EC) No 1907/2006).

Rainwater may contain a mixture of organic pollutants, many of them not being characterized yet, and other identified compounds whose concentrations depend on multiple factors (Cottrell et al., 2013; Zuo et al., 2011). The use of rainwater in agriculture or as primary source for drinking water justifies a deeper understanding of this topic (Chakraborty et al., 2016). For some organic micro-pollutants such as aldehydes and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), a negative correlation between the levels of pollutant and the volume of sample has been reported. The greatest concentration of pollutant is scavenged in the first collected rainfall volume and the rest, with lower concentration, dilutes the sample (Deng and Zuo, 1999; Taguchi et al., 2012). The scavenging process of the pollutants from aerosols to rainwater, the temporary variations of the pollutant levels and the highest pollutant concentrations reached can be studied by events. However, determination methods usually require relatively large volumes of sample that may not be achieved in short sampling periods.

In addition to this limitation of sample volume, most of the previously reported methods for the determination of phthalates in rainwater involve a lot of tedious and long steps, and high consumption of organic solvents. Miniaturized techniques such as in-tube solid phase microextraction (IT-SPME) can deal with all these limitations. IT-SPME allows the combination of the sample treatment and determination in a single step because it can be easily coupled to liquid chromatography. In addition, it provides a very good sensitivity, selectivity, speed and a very low solvent consumption (Kataoka et al., 2009; Fernández-Amado et al., 2016a). Several methods are able to determine one or two phthalates (DBP and/or DEHP) in environmental matrices using IT-SPME coupled to conventional high performance liquid chromatography (HPLC) (Wen and Feng, 2007; Cháfer-Pericás et al., 2008), capillary liquid chromatography (Muñoz-Ortuño et al., 2014; Jornet-Martínez et al., 2015) or ultra-high performance liquid chromatography (Masiá et al., 2013). A larger number of phthalates are analyzed in other types of matrices: food (Kataoka et al., 2002; Mitani et al., 2004) and medication (Mitani et al., 2003) by IT-SPME in cycle mode. Although the steps of analysis are reduced with respect to classical treatment methods, the analysis time is still long (35 min). In the chromatographic separation using common packed columns, high flows ($1.5\text{--}2.0 \text{ mL min}^{-1}$) are employed, with the consequent high solvent consumption.

In fact, the separation of phthalates by HPLC (coupled or not coupled to IT-SPME) usually takes a long time or needs high flows. The use of a monolithic column allows for the improvement of chromatographic separation because it provides low pressures and very good efficiencies for its porous structure (Zuo, 2014; Núñez et al., 2007; Lim et al., 2004). Monolithic columns have proven their suitability for separation of phthalates by liquid chromatography, both conventional and capillary. Nevertheless, only few phthalates (3–4) were separated in most cases (Núñez et al., 2007; Lim et al., 2004; Su et al., 2010; Jin et al., 2013; Jornet-Martínez et al., 2014), with separation times which may sometimes be long (up to 65 min). When a larger number of phthalates (8) was separated in a short time (8 min), a very high flow up to 10 mL min^{-1} was needed (Nesterenko and Rybalko, 2005). In addition to high pressures (which can lead to a problem with the capillaries when IT-SPME is coupled), high flows imply a high consumption of solvents which is against green chemistry (Jornet-Martínez et al., 2014, 2015; Zhou et al., 2013). One of the trends in analytical chemistry is a reduction of solvent consumption since it implies decreasing of costs, operator exposure to dangerous solvents and generation of toxic residues.

The aim of this work is to develop a rapid (separation in a short time, single-step treatment), sensitive (at ng mL^{-1} concentration level) method for the determination of six EPA phthalates (di-*n*-methyl phthalate (DMP), di-*n*-ethyl phthalate (DEP), DBP, BBP, DEHP and DnOP) in low volume rainwater samples, using simple instrumentation and with low solvent consumption. For this purpose, a comparative study was carried out between different possibilities of the stationary and mobile phases in the chromatographic separation and between capillaries and organic modifiers for the extraction (IT-SPME in-valve mode), in order to achieve a rapid extraction and separation using low flow-rate. In addition, limits of detection and quantitation are usually reported

in the literature without taking into account procedural blanks. For this reason, the control and minimization of blanks was another objective of this work. The pollution levels caused by PAEs in short-term rainfall events (with a sampling period of less than 12 h) can be evaluated because the method allows quantifying these compounds in a low sample volume. Information about the relationship between environmental compartments and some trends in rain-water pollution may only be observed when these short-term events are analyzed (Taguchi et al., 2012).

2. Experimental

2.1. Apparatus

The chromatographic system (Waters Corp, Milford, MA, USA) consisted of a 2695 Alliance module and a photodiode array detector, DAD (Waters 996), with the software Empower 2.0. A six-port injection valve (Rheodyne Model 7725i) was coupled for the IT-SPME procedure.

2.2. Reagents and materials

EPA 606-M Phthalate Esters Mix containing dimethyl- (DMP), diethyl- (DEP), di-*n*-butyl- (DBP), butylbenzyl- (BBP), di-2-ethylhexyl- (DEHP) and di-*n*-octyl (DnOP) phthalates (200 µg/mL each in methanol) was obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Working solutions were prepared from the commercial solution. All solutions were stored at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ in amber glass vials (Waters, Milford, MA, USA, and Supelco, Steinheim, Germany).

All solvents were of Gradient HPLC grade. Acetonitrile (ACN) (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA, and Scharlau, Barcelona, Spain), LC-MS grade methanol (MeOH) (Romil, Cambridge, UK, and Panreac, Barcelona, Spain) and tetrahydrofuran (THF) (Merck, Darmstadt, Germany) were filtered through $0.45\text{ }\mu\text{m}$ PTFE membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain). Water was of Milli-Q quality, filtered through $0.20\text{ }\mu\text{m}$ nylon membranes (Millipore, Darmstadt, Germany) for the mobile phase and through glass microfiber filters GF6 Grade (CHM, Barcelona, Spain) for blank preparation standards and procedure. The Ultra-Resi-Analyzed Water for Environmental Inorganic and Organic Analysis (J.T. Baker, Phillipsburg, USA) was also tested.

2.3. Sampling and filtration of aqueous samples

Inter-day (M1-M3) and event (EV) rainwater samples were collected at an air monitoring station at the University Environmental Institute (suburban area in Liáns-Oleiros, A Coruña, Spain) in February and March 2015. All rainwater samples were collected using a silanized glass sampler (DEPOBULK[®], LabService Analytica, Bologna, Italy), they were filtered through pre-calcinated MK360 Munktell quartz filters (4.7 cm diameter) and later stored at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis.

2.4. Cleanup for the minimization of procedural blanks

The selected protocol to filter Milli-Q water (for blank and standard preparation) consisted of the use of a glass fiber filter previously cleaned with 1 L of Milli-Q water. Procedural blanks were minimized by cleaning glassware material in alkaline detergent for 24 h, and then rinsing it sequentially with abundant tap water, Milli-Q water and acetonitrile (Xu et al., 2010). The direct use of new glass vials has been proven to increase blanks, thus before their first utilization, vials are rinsed sequentially with hexane, tetrahydrofuran, methanol and Milli-Q water. Solvents were selected after checking whether they successfully minimized the

procedural blanks. After being cleaned as recommended, all the glassware was carefully stored and just before its use, it was rinsed with LC-MS grade methanol and then dried at $130\text{ }^{\circ}\text{C}$. The use of plastic material was avoided during sample handling and only glass material was employed. Nevertheless, plastic micropipette tips were used to prepare the control and calibration standards.

2.5. In-tube SPME procedure

For the IT-SPME-HPLC-DAD procedure, the loop of the six-port injection valve was replaced by a 70 cm-long GC PLOT column Rt[®]-S-BOND (divinylbenzene with 4-vinylpyridine, 0.32 mm i.d. , $10\text{ }\mu\text{m}$) purchased from Restek (Bellefonte, PA, USA). Capillary connections were facilitated by the use of a 2.5 cm sleeve of 1/16 in. polyether ether ketone (PEEK) tubing at each end of the capillary. In load position, 5 mL of sample or phthalate solution with 40% methanol (v/v) were passed through the capillary, followed by 60 µL of Milli-Q water to displace the remaining sample in the capillary. The run is started by programming a sample volume equal to zero for the autosampler. At the time the gradient starts, the valve is rotated to the inject position, and mobile phase passes through the capillary, desorbing analytes.

TRB-5 GC capillary columns (95% poly(dimethylsiloxane)-5% poly(diphenylsiloxane), 0.32 mm i.d. , $3\text{ }\mu\text{m}$ thickness), purchased from Teknokroma (Barcelona, Spain), and DB-FFAP (nitro-terephthalic-acid-modified polyethylene glycol, 0.25 mm i.d. , $0.25\text{ }\mu\text{m}$ thickness), purchased from Agilent J&W (Santa Clara, CA, USA) were tested.

Between runs, the all-glass sample syringe (Ruthe, Portugal) was rinsed with acetonitrile while the valve and capillary were flushed with 2 mL of acetonitrile before loading the next sample.

2.6. Chromatographic conditions

The analytical column was an Onyx Monolithic C₁₈ $100\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The gradient elution mode was used, with an acetonitrile/water mixture (Table 1). The column temperature was set to $30 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$. DAD data were recorded between 210 and 400 nm. Integration was performed at 236 nm for DMP and DEP, 225 nm for BBP and DBP, and 223.8 nm for DEHP and DnOP. Under these conditions, the 6 phthalates were separated within 11 min.

A Nova-Pak CN HP column (cyanopropyl silica, $150\text{ mm} \times 3.9\text{ mm}$, $4\text{ }\mu\text{m}$; Waters, Milford, MA, USA) was also tested and acetonitrile/water and methanol/water gradients were developed.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of chromatographic separation with two analytical columns

The optimization was carried out by direct liquid injection using

Table 1
Optimized gradient for the Onyx Monolithic C₁₈ column. Linear variation of flow and composition.

Time (min)	Flow (mL min ⁻¹)	%ACN	%H ₂ O
0	0.3	50	50
5.4	0.55	71.5	28.5
9	1	100	0
10.6	1	100	0
14.5	0.8	50	50
16.5	0.3	50	50

the autosampler, without the six-port valve settled in the chromatographic system.

The main problems for the separation of six di-*n*-alkyl-phthalates DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP and DnOP, which exhibit remarkable differences in hydrophobicity (log of octanol–water partition coefficient $\log K_{ow} = 1.6–8.39$ (Xue et al., 2014)), are an increase of the retention as the number of carbon atoms on the alkyl chain also increases (Nesterenko and Rybalko, 2005), as well as the presence of three critical pairs (DMP-DEP, BBP-DBP and DEHP-DnOP). In the literature, the strategy generally chosen involves the use of C₁₈ column and gradient elution (water/methanol or water/acetonitrile) with an initial step using high water percentages and then a progressive increase of organic solvent in order to elute the most hydrophobic compounds. However, in this case, the time of analysis achieved (Lin et al., 2003) is long (around 30 min). Kataoka et al. (2002) accomplished a reduction of the separation time (including di-*n*-amyl phthalate) to 12 min, by increasing the flow-rate (up to 2 mL min⁻¹), but this approach involves a higher solvent consumption.

In this work, two different columns (monolithic C₁₈ and

cyanopropyl silica) and acetonitrile or methanol as a modifier were tested. The monolithic columns, due to their characteristics (high permeability and low pressure drop) are very suited for coupling with IT-SPME (Núñez et al., 2007). On the other hand, in packed columns less hydrophobic than C₁₈, such as cyanopropyl column, the pair DEHP-DnOP could be less retained. Initially, the percentage of organic solvent to separate two critical pairs (DMP-DEP and BBP-BBP) was examined with isocratic elution (water/acetonitrile). Different percentages are necessary depending on the tested column (35% in nitrile column and 50% in C₁₈ column). For the monolithic column, the improvement in the BBP-BBP separation was achieved by adjusting the % acetonitrile in the first step (from 50% to 71.5% acetonitrile in 5 min). Finally, the elution of DEHP-DnOP was performed, obtaining 100% acetonitrile in the mobile phase for the monolithic column and 60% for the nitrile column. Lower percentages of acetonitrile for the nitrile column were, as expected, due to less retention than that of the monolithic column. A short time (10 and 14 min) and low consumption of solvent were accomplished for the two columns (Fig. 1a and b). In the monolithic column, a gradient flow (Fig. 1c) was optimized to decrease the

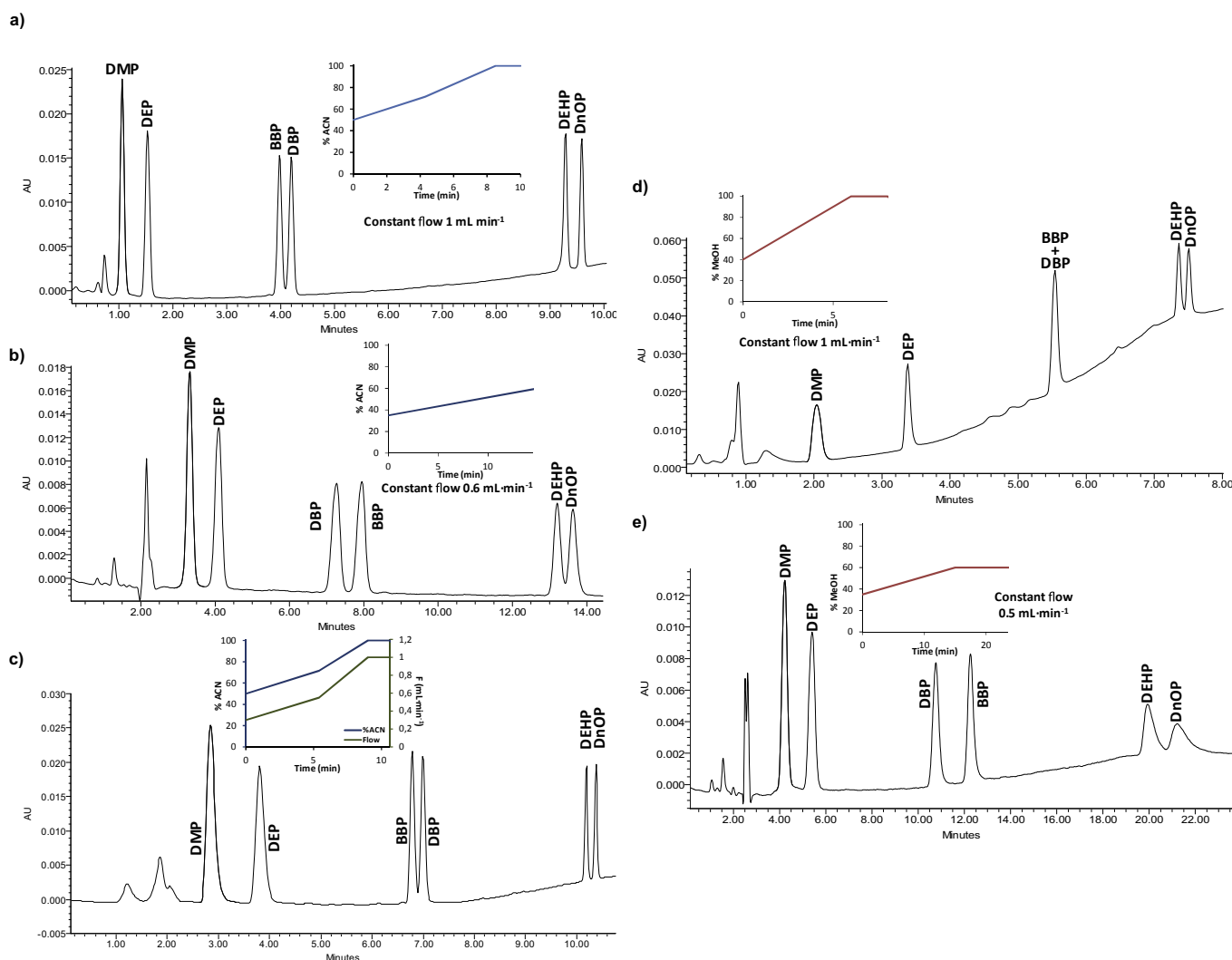


Fig. 1. Chromatograms obtained with the optimized gradients. a) ACN/H₂O (constant flow) for the monolithic C₁₈ column, b) ACN/H₂O for the CN column, c) ACN/H₂O (variable flow) for the monolithic C₁₈ column, d) MeOH/H₂O for the monolithic C₁₈ column, e) MeOH/H₂O for the CN column.

initial pressure in the IT-SPME capillary and to reduce the solvent consumption (3.5 mL per run). The differences between phases consist of the more broadened peaks in the nitrile column compared to the monolithic column. Furthermore, the separation is not the baseline for DBP-BBP in the monolithic column and DEHP-DnOP for the nitrile column.

In terms of time of analysis and solvent consumption, the methanol/water gradient is less effective (Fig. 1d and e). For the cyanopropyl column, the separation is accomplished in 23 min with broader DEHP and DnOP peaks than acetonitrile/water. For the monolithic C₁₈ column, the separation of BBP-DBP with methanol/water gradient could only be achieved with high flows (1.5 mL min⁻¹), in a rather long amount of time (1 h) and very broad peaks. Higher retention in the mobile phase containing methanol/water is explained by Núñez et al. (2007) due to an increase in dispersion interactions.

The difference in the order of elution of the critical DBP-BBP pair for the two analytical columns tested is significant. In the cyanopropyl column, DBP is less retained than BBP with both gradients. By contrast, in the monolithic column and acetonitrile/water, BBP is the less retained compound, whereas the elution order changes with the methanol/water gradient. BBP has an aromatic character, which implies π - π interactions with the cyano column and therefore a higher retention (Croes et al., 2005).

Although the cyano column presents a good performance for the separation of six compounds, the monolithic column with acetonitrile/water was selected because of the improvement in the analysis time, resolution and lower pressures.

3.2. Optimization of IT-SPME using different capillary columns

A simple on-line IT-SPME configuration (manual in-valve mode, without disconnecting the autosampler) described in Fernández-Amado et al. (2016b) was used. The comparison of extraction phases was carried out with commercial GC capillaries. For IT-SPME methods in environmental field studies, the commercial capillaries have provided good results in the extraction of low molecular weight compounds (Fernández-Amado et al., 2016a). In this work, this type of capillaries was chosen due to their excellent repeatability and stability for mixtures of organic solvents and water. Three capillary columns, of different nature (one porous polymer-type capillary column and two liquid-phase type columns), were compared in order to obtain the best conditions of extraction for the six phthalates. One of the chosen liquid-phase type capillaries was a column coated with 95% dimethyl–5% diphenylpolysiloxane (TRB-5), which is used in numerous IT-SPME applications. Despite its low polarity, it gave good results in the extraction of compounds with different hydrophobicity (Fernández-Amado et al., 2016b). Another liquid-phase type capillary, of high polarity (DB-FFAP capillary, coated with nitroterephthalic-acid-modified polyethylene glycol), was tested. Concerning the porous polymer capillary (PLOT Rt[®]-S-BOND), its large adsorption surface area enhances the transfer-mass and can favor a more efficient extraction (Kataoka et al., 2009). In our case, the selected phase containing divinylbenzene-4-vinylpyridine has a mid polarity which makes it suitable for a wide range of compounds. The two components of the polymer may confer a characteristic lipophilic and hydrophilic nature to the phase, allowing for the retention of polar and less polar compounds. Moreover, the capillaries contain aromatic groups in the stationary phase, which can interact with phthalates by specific π - π interactions.

3.2.1. Optimization of the percentage of organic modifier in the sample

In preliminary studies, it was observed that the use of a modifier

was needed in order to improve the extraction of the most hydrophobic di-alkyl-phthalates. As the extraction is due to the distribution of analytes between the stationary phase and sample solvent, the addition of organic solvent to the aqueous sample modulates the retention of hydrophobic compounds. However, the type and percentage of modifier have to be optimized. Three organic solvents –acetonitrile (ACN), methanol (MeOH) and tetrahydrofuran (THF)– were tested for the three capillaries.

For the TRB-5 capillary (Fig. 2a–c) and with the three organic modifiers, a higher concentration of low molecular-weight compounds (till DBP) corresponds to no addition of modifier. The peak areas of BBP and DBP decrease when the percentage increases, whereas DEHP and DnOP show an opposite pattern and the greater areas correspond to the higher tested percentage. As analytes have opposite behaviors, a compromise for all of them must be selected. 15% of tetrahydrofuran and 25% of methanol are acceptable percentages. ACN was dismissed because higher differences between groups of phthalates were found. Using the DB-FFAP capillary, the patterns were similar to the TRB-5 capillary, but a poor concentration of the analytes was achieved.

For the PLOT Rt[®]-S-BOND capillary and with all the tested organic modifiers, there are three behaviors (Fig. 2d–f): DMP-DEP, which concentrate significantly better than with TRB-5 capillary, show a decrease in area when the percentage of modifier increases; DEHP-DnOP show the opposite behavior, increasing area with greater percentages; and BBP-DBP (and also DEP with methanol) have a parabolic performance, with a maximum ranging between 10 and 20% of acetonitrile and methanol and 5% of tetrahydrofuran. Methanol, the more hydrophilic solvent, provided the smallest differences between the three groups. 40% of methanol was selected because it improves the sensitivity of regulated phthalates (mainly DEHP).

3.2.2. Optimization of the capillary length, volume of sample, and desorption process

For the TRB-5 capillary, the results obtained for a 70-cm-long and a 45-cm-long capillaries were compared. As expected, as it has larger stationary phase, the longer capillary provided higher peak areas (for a concentrated standard solution, 100 ng mL⁻¹ and 5 mL sample volume), especially for DMP and DEP, with increases of 170% and 97% respectively, whereas for the other compounds the increase was around 40–50% (see data in Fig. 3a and b).

The volume of sample (with modifier) passed through the extraction capillary was optimized for both TRB-5 and PLOT capillaries. The behavior observed is usually an increase of peak areas with the sample volume, with an initial linear zone and a progressive reduction of slope until a zero slope zone (capillary saturation) is reached (Wang et al., 2014; Prieto-Blanco et al., 2012).

For the TRB-5 capillary, the optimization was performed with 25% MeOH and 15% THF. Using the latter (Fig. 3c), DMP and DEP do not present significant variation in areas with volume, whereas BBP, DBP, DEHP and DnOP show an increase in signal with volume and slopes begin to decrease in the last part (near 5 mL), indicating the saturation is close. Differences are found using 25% MeOH (Fig. 3b): DMP and DEP show a slight increase of peak areas with volume; BBP and DBP present a greater increase with volume, with a decrease in slope in the last part (5–10 mL); DEHP and DnOP show a linear behavior between areas and volume in the studied range. Besides, using the short capillary (45-cm length and 25% methanol, Fig. 3a), the slope for BBP and DBP starts to decrease from a lower volume (2–5 mL) than with the 70-cm long capillary. However, DEHP and DnOP maintained a linear behavior for the short capillary.

For the PLOT Rt[®]-S-BOND, the optimization of the sample volume was carried out with 40% MeOH and a 70-cm capillary. All the

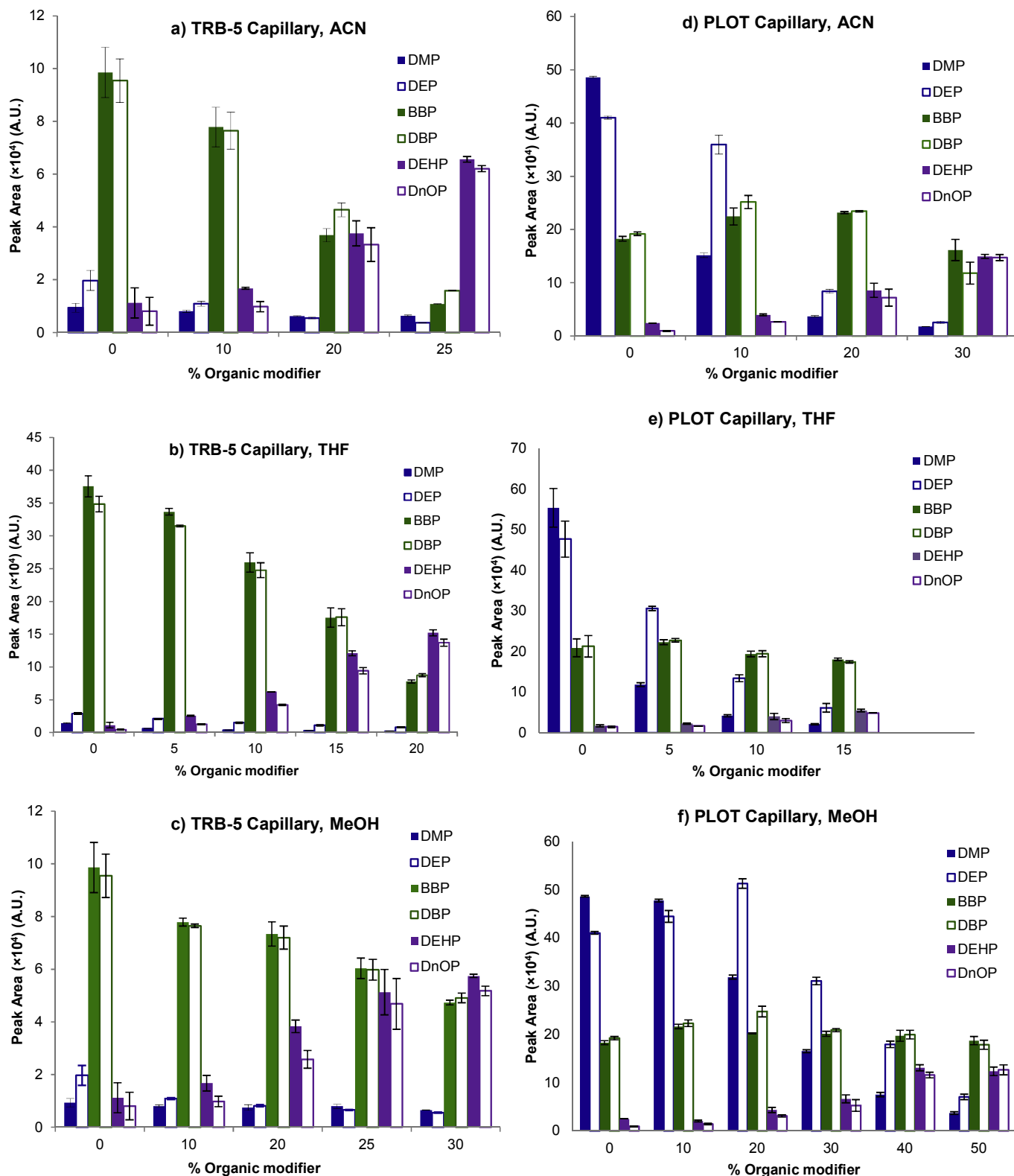


Fig. 2. Effect of concentration of a) ACN, b) THF and c) MeOH on IT-SPME with a TRB-5 capillary, and d) ACN, e) THF and f) MeOH on IT-SPME with PLOT Rt[®]-S-BOND capillary. Error bars = \pm SD.

six target compounds showed a significant increase in peak areas when increasing the sample volume (Fig. 3d). DMP and DEP showed a reduction of slope at higher volumes (between 3 and 10 mL), whereas the other four compounds presented a linear

behavior within 10 mL. Volumes higher than 5 mL were tested in order to verify the extraction capacity of the capillary. Finally, 5 mL was selected as the optimized volume since the used in-valve configuration has no auxiliary pump for sample introduction.

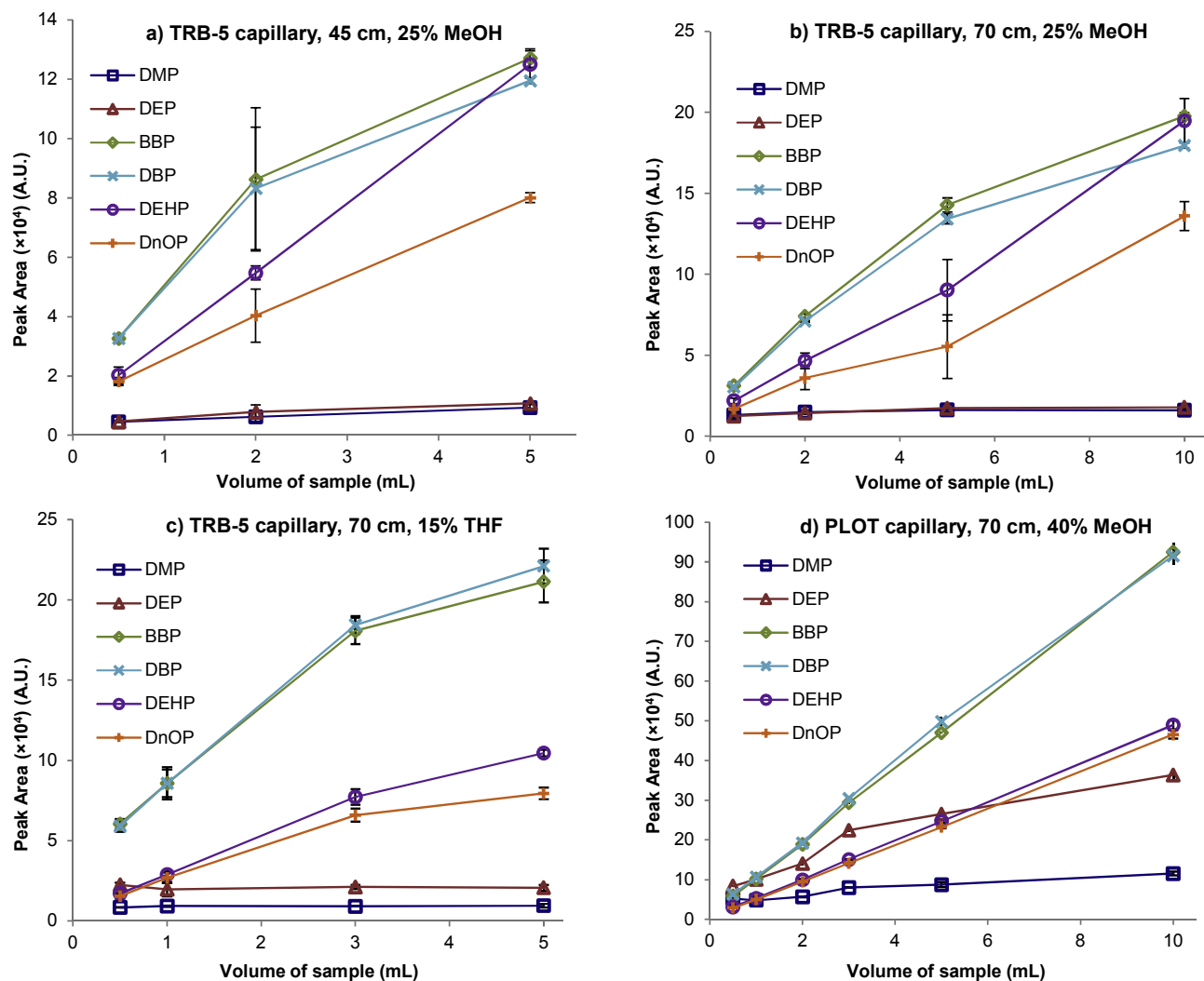


Fig. 3. Effect of the sample volume on the IT-SPME performance. a) 25% MeOH, 45-cm TRB-5 capillary; b) 25% MeOH, 70-cm TRB-5 capillary; c) 15% THF, 70-cm TRB-5 capillary; d) 40% MeOH, 70-cm PLOT Rt[®]-S-BOND capillary.

Furthermore, dynamic and static desorption were tested with two capillaries and the monolithic column. Several organic solvents were used with static desorption (acetonitrile, methanol and water). Acetonitrile provides broader peaks, whereas methanol, in addition to the peak broadening, reduces the precision and signal for DMP and DEP. Therefore, the dynamic desorption using the mobile phase provides the best performance. In addition, water was chosen as a displacement solvent of the liquid sample remaining in the capillary before the dynamic desorption was performed.

3.2.3. Comparative summary between extraction capillaries

For the same concentration, the PLOT Rt[®]-S-BOND capillary provides greater analytical response than the TRB-5 and DB-FFAP capillaries for all the target compounds and all the tested percentages of the different organic modifiers. Absolute recoveries, calculated by comparing the peak areas with those obtained with direct injection, were obtained for three capillaries. For the best compromise conditions using the DB-FFAP capillary absolute recoveries were 4.0–12.6% for BBP, DBP, DEHP and DnOP. These results are worse than those obtained for the TRB-5 capillary (19.7–26.3%) and especially for the PLOT capillary (31.4–37.6%), which also provides an acceptable concentration for DMP and DEP,

in contrast to the other two capillaries. When comparing PLOT and TRB-5 with the optimized conditions for each capillary (5 mL with 15% THF for TRB-5 and 5 mL with 40% MeOH for PLOT), it was observed that sensitivity was higher for the calibration curves of all the analytes on the PLOT capillary, as well as the limits of detection and quantitation. These improvements are particularly significant for DMP and DEP, which are poorly concentrated with the TRB-5 capillary.

Furthermore, differences were found in peak area-percentage of the modifier profiles. BBP and DBP have a parabolic behavior with concentration of modifier for the PLOT capillary, while with TRB-5 they have a descending profile. Regarding the effect of the sample volume, the PLOT capillary seems to reach saturation at higher volumes than TRB-5. Differences between capillaries can be explained mainly due to their structure, as the PLOT capillary has a higher inner surface area which contributes to increasing the concentration of analytes. After processing around 400 solutions (blanks, standards and real samples) in the same capillary, no loss of efficiency of the PLOT capillary was observed, since the control standards maintained very good reproducibility (%RSD \leq 16%) over the entire period. Besides, the ability of the PLOT capillary to concentrate with respect to direct injection can be observed in Fig. 4. The standard solution processed by IT-SPME is 21 fold more

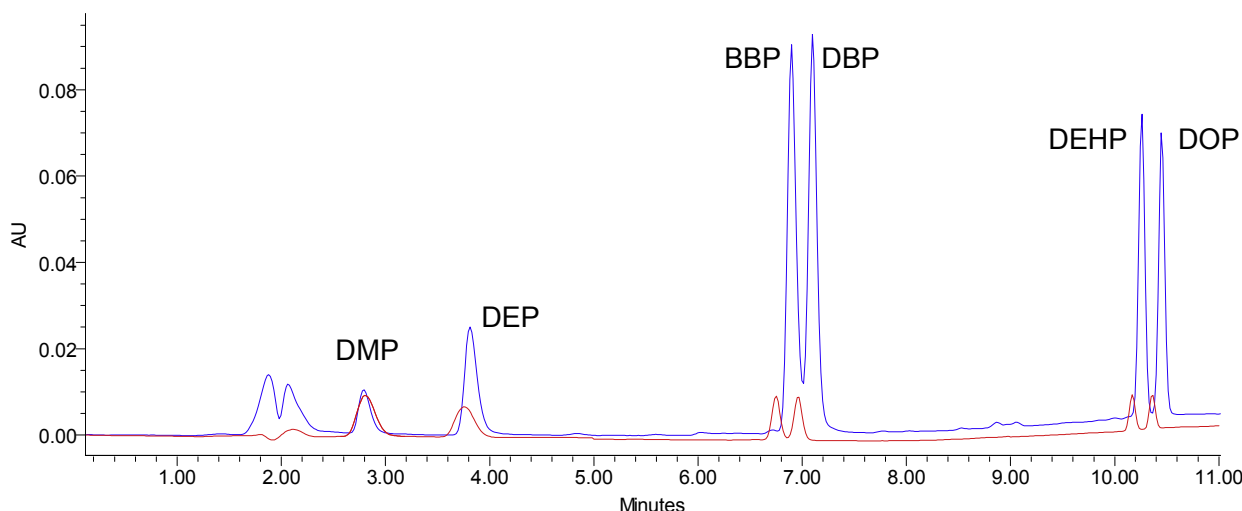


Fig. 4. Chromatograms obtained by direct injection (red line, mixture of 2500 ng mL^{-1} each PAE) and by IT-SPME (blue line, mixture of 120 ng mL^{-1} each PAE). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

diluted than direct injection, but a notably higher response is achieved.

3.3. Estimation of sources and minimization of procedural blanks

The blank problems in the phthalate analysis are well-known, but the solutions are not yet well established (Fankhauser-Noti and Grob, 2007; Vavrouš et al., 2016; Guo and Kannan, 2012). In the proposed method, the effect of several potential contamination sources –the laboratory environment (air and particulate matter), solvents (organic modifiers and water), the analysis system (chromatographic system and capillary) or the materials (sample syringe, vials, plastic tips for micropipettes, filters, etc.)– was examined.

Concerning the material, nylon, glass fiber and nitrocellulose filters for the filtration of solvents were tested. The one made of glass fiber released the least DBP, whereas the one made of nylon released the least DEHP. The nitrocellulose filter provided the worst results. As a result of the procedure described in Experimental section 2.4, it was proven that no phthalates were released after a certain water volume passed through them. The sample syringe was rinsed between analyses. Rinsing it three times with acetonitrile proved to be enough. No significant differences were found between the use of micropipettes with plastic tips and the preparation of the blanks using exclusively glass material, showing that micropipette plastic tips did not contribute visibly to the procedural blanks at these levels.

The solvents are other well-known contamination source. Methanol of HPLC and LC-MS grades was compared as a modifier. LC-MS grade methanol provides the best performance, reducing slightly the peak areas in the blanks especially for DBP and DEP. For the proposed method, it is not possible to prepare procedural blanks without water, and phthalate-free water must be obviously employed, as the phthalate background can cause overestimation of the procedural blanks. To evaluate the effect of the water, ultrapure water from three different purification equipments with the same characteristics, and commercial LC-MS grade and ultra resi-analyzed waters were used for the preparation of procedural blanks. Fresh Milli-Q water from the purification systems led to lower peak areas than the LC-MS grade water. Regarding commercial ultra resi-analyzed water, despite the fact it is stored in glass bottles, no improvement in the background contamination was found with it. After a one-month period alternating this water

with Milli-Q, similar average and standard deviation values for the procedural blanks were obtained with both types of water. Using Milli-Q water, the estimated average \pm SD ($n = 18$) for the detected phthalates in the blanks was $0.59 \pm 0.04 \text{ ng mL}^{-1}$ for DBP, $1.14 \pm 0.78 \text{ ng mL}^{-1}$ for DEHP and $0.47 \pm 0.43 \text{ ng mL}^{-1}$ for DnOP, whereas with ultra resi-analyzed water ($n = 16$), the levels were $0.32 \pm 0.28 \text{ ng mL}^{-1}$ for DBP, $0.81 \pm 0.51 \text{ ng mL}^{-1}$ for DEHP and $0.83 \pm 0.68 \text{ ng mL}^{-1}$ for DnOP.

Phthalate contamination due to the chromatographic system was studied in the literature regarding GC and LC-MS (Guo and Kannan, 2012). Some authors found phthalates in blanks carried out without injection of the sample. This fact is attributed to a possible contamination of the injector for the mobile phase. In the proposed method, the contribution of the chromatographic system coupled to the IT-SPME capillary to the blanks was specifically evaluated by system blanks, without passing anything through the capillary or by passing only conditioning acetonitrile. No phthalates were detected in these system blanks, even when they were analyzed after samples or standards, and consequently no memory effects were found with this method. The mobile phase (50% water/50% ACN) was passed through the capillary for 30 and 60 min and next procedural blanks were performed. No differences among procedural blanks were found. Therefore, the contribution of the mobile phase is negligible. The elution front at the beginning of the chromatogram drastically decreases when no acetonitrile is passed through the capillary (Fig. 5). Therefore, this elution front seems to be caused by the concentration of impurities of the organic solvents in the capillary.

Phthalates ubiquitously present in the laboratory environment can contaminate glassware material and solvents by absorption and they are dependent on season and weather (Fankhauser-Noti and Grob, 2007). In general, the most common and major compounds in procedural blanks of the proposed method are DBP and DEHP. BBP and DnOP appear sporadically and with very low peak areas. Differences were found with different extraction systems tested (type of capillary and modifier). Using the TRB-5 capillary, DEP was never present in procedural blanks, whereas DMP never appeared when 15% THF was used as a modifier, but it was always present (and with relatively high areas) when 25% MeOH was used. With the PLOT Rt[®]-S-BOND capillary and 40% MeOH, DEP was present (with low areas) in procedural blanks as it concentrates better, whereas DMP did not appear in blanks. For both capillaries, the procedural blanks are controlled and the target compounds had

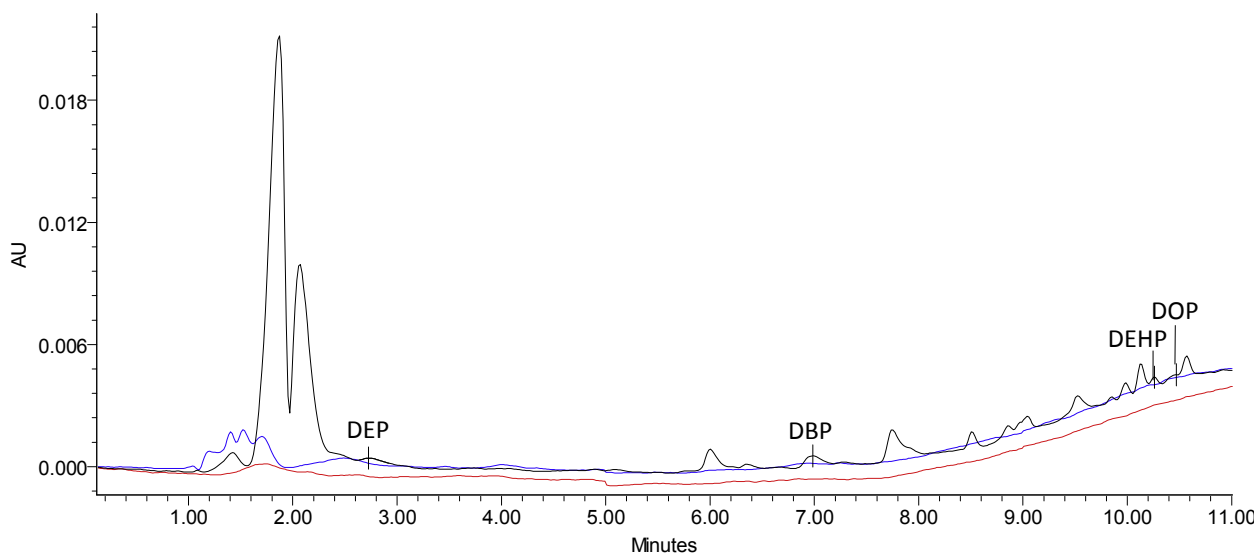


Fig. 5. Chromatograms of a system blank after cleaning with ACN (blue line), a system blank without passing ACN through the capillary (red line) and a procedural blank (black line). Conditions: PLOT Rt[®]-S-BOND capillary, 5 mL of Milli-Q water with 40% MeOH + 60 μ L Milli-Q water for the procedural blank. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

relatively low peak areas.

3.4. Validation of the proposed method

The optimized method with PLOT Rt[®]-S-BOND capillary and 40% MeOH as an organic modifier was validated. The linear range reaches at least 120 ng mL⁻¹ (adding 40% of MeOH, equivalent to 200 ng mL⁻¹ in the aqueous sample before the addition of MeOH) for all the analytes except for DEP, with a linear range only up to 50 ng mL⁻¹ (83 ng mL⁻¹ in the sample) (see Table 2). The inter-day precision was evaluated at a level of 20 ng mL⁻¹ (33.3 ng mL⁻¹ in the sample) (Table 2). Acceptable results were obtained, with RSD below 13% for all analytes except for DMP (16.2%), which has a limit of quantitation close to the used concentration. To evaluate accuracy, as there are no certified reference materials for these compounds in rainwater, recovery assays were carried out in rainwater at a concentration of 50 ng mL⁻¹ (Table 3). Satisfactory results were obtained, with values between 71 and 101% (over 96% for the four higher molecular-weight ones). Recoveries were also checked for a sample with adjusted pH (final pH \approx 7), as pH may have had to be adjusted in some samples to minimize the effect of the elution front. Recoveries did not change significantly with pH (Table 3), except for a slight decrease of DMP.

Blanks are generally controlled, but sometimes they present an irregular pattern which makes their subtraction unsuitable, as

Table 2

Linear ranges (ng mL⁻¹ in the sample without modifier), inter-day precision (20 ng mL⁻¹ with modifier, $n = 17$), method detection limits (MDL), limits of quantitation (LOQ) and reporting levels (RL) (all limits in ng mL⁻¹ in the sample without modifier).

	Linear range	R ²	%RSD	LOD	MDL	LOQ	RL
DMP	30–200	0.9763	16.2 ^a	0.5	9.4	30	30
DEP	1.24–83.3	0.9951	9.3 ^b	0.08	0.4	1.2	1.2
BBP	0.69–200	0.9979	7.0	0.04	0.2	0.7	0.7
DBP	2.05–200	0.9980	12.5	0.07	0.6	2.0	5.9
DEHP	2.8–200	0.9975	5.3	0.14	0.9	2.8	11.4
DnOP	2.4–200	0.9951	6.9	0.21	0.8	2.4	4.7

^a $n = 15$.

^b $n = 16$.

previously stated in a research study (Munch et al., 1995). For this reason, the method detection limits (MDL) were calculated with 99% confidence according to 40 CFR, Part 136, Appendix B (Glaser et al., 1981), which is used in EPA methods for organic contaminants in water (Munch et al., 1995; Price et al., 2005) and MDL were reported before having been applied to the determination of organic pollutants in aqueous samples (Focazio et al., 2008; Cahill et al., 2004). The limits of quantitation (LOQ) were calculated as 10 times the standard deviation obtained in the 7 replicates used for the MDL calculation. All limits (Table 2) were experimentally checked. In addition, despite the fact that the procedural blanks were not subtracted from the samples, they were taken into account with reporting levels (RL) (Table 2), calculated as 10 times the blank average concentration (Barnes et al., 2008). Below reporting level, even above the LOQ, only an estimation of the concentration is given. Except for DMP, all the analytes present MDL below 0.9 ng mL⁻¹, with limits of quantitation between 0.69 and 2.80 ng mL⁻¹. The reporting levels of DBP, DEHP and DnOP are significantly higher than LOQs. However, the procedural blanks (which conditioned the RL values) are lower than those reported by other authors. Vavrouš et al. (2016) have found for DBP and DEHP procedural blanks of 4.5 and 11 ng mL⁻¹ respectively, despite of the implementation of several measures for their minimization (redistilled solvents, contamination trap, etc.).

The absolute recoveries of the IT-SPME procedure were also calculated at three levels. Average values between 31 and 39% for the last four compounds and 17% for DEP were obtained (Table 3). The absolute recoveries were calculated by comparing the peak areas obtained when 5 mL of 5, 20, 50 ng mL⁻¹ (25, 100, 250 ng) were processed by IT-SPME to those obtained by direct injection with 10 μ L of 2.5 μ g mL⁻¹ (25 ng), 10 μ L of 10 μ g mL⁻¹ (100 ng) and 25 μ L of 10 μ g mL⁻¹ (250 ng). The obtained average values were similar to those reported in the literature by IT-SPME (10%–30%). Besides, IT-SPME can process a lower concentration than direct injection. DMP had the highest MDL and the lowest absolute recovery because its concentration under optimized conditions is lower than in other target phthalates.

The validation of the optimized IT-SPME method with the TRB-5 capillary and 15% THF was also carried out, with satisfactory recoveries and similar limits of detection and quantitation, except for

Table 3

Analytical recoveries (%R) \pm SD ($n = 3$) for rainwater spiked with 50 ng mL⁻¹ of the analytes studied, without change of pH and with pH adjusted, and absolute recoveries (%R Abs.) \pm SD ($n = 3$) obtained for the optimized method using PLOT Rt[®]-S-BOND capillary.

	%R (rainwater)	%R (rainwater pH \approx 7)	%R abs. (25 ng)	%R abs. (100 ng)	%R abs. (250 ng)	%R abs. (average 3 levels)
DMP	71 \pm 4 ^a	61 \pm 3 ^a	< LOQ	6 \pm 1	4.1 \pm 0.1	5.0 \pm 0.4
DEP	83 \pm 10	80 \pm 2 ^a	18 \pm 1	19 \pm 3	14.6 \pm 0.3	17 \pm 1
BBP	98 \pm 5	99 \pm 2	36 \pm 1	36 \pm 1	37.7 \pm 0.4	37 \pm 1
DBP	96 \pm 4	99 \pm 4	39 \pm 2	37.6 \pm 0.1	40 \pm 1	39 \pm 1
DEHP	99 \pm 5	100 \pm 1	34 \pm 2	33 \pm 2	36 \pm 1	34 \pm 2
DnOP	101 \pm 5	106 \pm 2	29 \pm 3	31 \pm 3	33 \pm 1	31 \pm 2
Average	91 \pm 5	91 \pm 2	31 \pm 2	27 \pm 2	28 \pm 1	27 \pm 1

^a $n = 2$.

DEP which presented a great improvement in limits using the intermediate polarity PLOT capillary method. Worse inter-day precision (especially for DEHP (12.5%) and DnOP (13.7%)) was also observed with this capillary.

3.5. Application to real rainwater samples

The optimized methods were applied to rainwater samples collected in winter, from a suburban area in Galicia (see 2.3

Experimental). Three kinds of rainwater samplings were performed. One of them was collected over short periods of time (EV-3 - EV-5, 4–8.5 h), with a low volume sample (20–200 mL) due to low intensity of precipitation and/or short sampling time. Another kind was that carried out over longer periods of time (M1-M3, 16–56 h), in which a sample volume collected was within the range from 84 to 530 mL. Finally, the samples collected over short periods of time (EV-F1 and EV-F2) after a few weeks without rainfall were performed to evaluate the washing effect on the phthalates. [Table 4](#)

Table 4

Final concentrations (ng mL⁻¹) \pm SD ($n = 3$) for event/daily rainwater samples.

	EV-F1	EV-F2	M-1	EV-3	EV-4	EV-5	M-2	M-3
Sampling time (h)	4.5	8.5	16	4	8	8.5	31.5	56.5
Sample volume (mL)	89	195	84	107	130	19	295	530
Precipitation (L/m ²)	2.4	5.2	2.2	2.9	3.5	0.5	7.9	14.9
DMP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DEP	14 \pm 1	25.3 \pm 0.4	3.4 \pm 0.3	1.82 \pm 0.07	1.9 \pm 0.3	6.3 \pm 0.4	n.d.	n.d.
BBP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DBP	189 \pm 5	101 \pm 3	69 \pm 1	12 \pm 4	8 \pm 1	38 \pm 1	3.8 \pm 0.8	9.3 \pm 0.7
DEHP	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3.0 \pm 0.9 ^a	<LOQ	<LOQ
DnOP	<LOQ	<LOQ	n.d.	<LOQ	n.d.	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Σ PAE	203	126	72	13.8	9.9	47.3	3.8	9.3

n.d. not detected.

^a Estimated value (<RL).

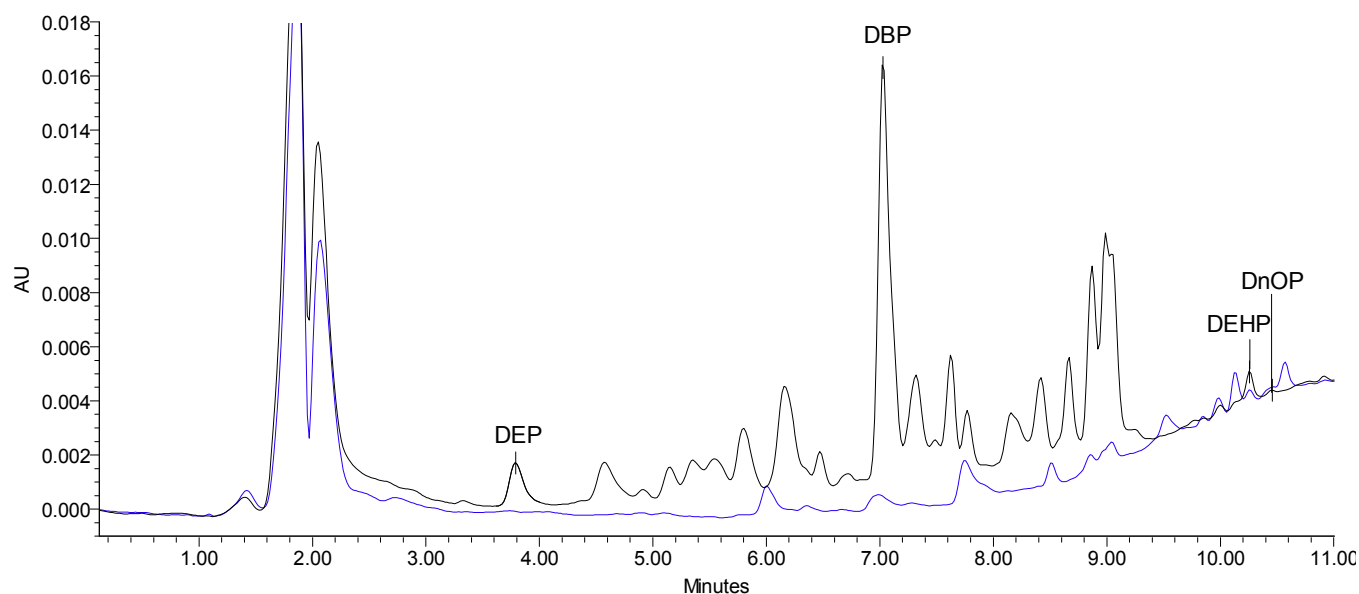


Fig. 6. Chromatograms of a rainfall event sample (black line) and a procedural blank (blue line). Conditions: PLOT Rt[®]-S-BOND capillary, 5 mL of sample with 40% MeOH + 60 μ L Milli-Q water. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 5
Methods for determination of phthalates in rainwater reported in the literature.

Phthalates analyzed	Vol. of sample (mL)	Steps and time	Org. solv./ sample (mL)	Preparation technique	Deter. technique	LOD (ng L ⁻¹)	Blanks	Levels found (ng mL ⁻¹)	Sampling period and site	Type of rainwater sample	Ref.
DEP, DiPrP, DPrP, DiBP, DBP, BBP, DEHP, DnOP	7	1. SPME extraction with solved salts (30 min)	–	SPME (PDMS fiber)	GC-MS	6–94 (MDQ)	Procedural	3.2–11.4 n = 30	Rieti (Italy), 1997	n.e.	Guidotti et al., 2000
DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DnOP	3000	1. Three liquid-liquid extractions (3 × 40 min) 2. Concentration	900	LLE	GC-ECD (on column injector)	10–30	Step	0.010–0.592. DBP and DEHP are the most abundant n = 12	Paris (France), May 2002–Apr 2003	Bulk deposition and rainwater, 15 days, dissolved + particle phases	Teil et al., 2006
DMP, DEP, DBP, DEHP, DnOP	50	1. Nanofiber preconditioning 2. Extraction 3. Concentration by N ₂ stream (30 min the whole process)	0.9	mat-based SPE (Nylon6 nanofibers)	HPLC-UV	2–33	Not reported	0.180 (DEHP) and 0.370 (DnOP) n = 1	Nanjing (China), 23 Feb 2003	Dissolved phase	Xu et al., 2010
DMP	0.05	1. Plates coating (overnight) 2. Washing (3 times) 3. Incubation (30 min) 4. Washing/Incubation (1.5 h) 5. Washing/Incubation (2.5 h) 6. Washing 7. Incubation/enzymatic reaction (30 min) ^a	–	No previous extraction	ic-ELISA	10	Not reported	0.032 n = 1	Wuhu (China)	Dissolved phase	Zhang et al., 2012
DMP, DEP, DBP, BBP	100	1. Cartridge preconditioning 2. Extraction with controlled pH 3. Washing 4. Drying 5. Elution 6. Concentration by N ₂ stream	10	SPE (bamboo charcoal)	HPLC-UV	350–430	Procedural ^b	0.59 (DMP) and 0.469 (DEP) n = 1	Jinan (China), 2 Ago 2007	Dissolved phase	Zhao et al., 2008
DEHP	20	–	–	Direct preconcentration on the analytical column	HPLC-UV	100	Not considered	<0.3–0.3 n.e.	Irkutsk (Russia), Jun 1998	n.e.	Baram et al., 2000
DMP, DEP, DiBP, DBP, BBP, DCHP, DEHP, DPhP, DnOP, DiNP, DiDP	All the sample (600–2300)	1. pH adjustment and addition of NaCl 2. Two liquid-liquid extractions (2 × 3 min) 3. Drying with sodium sulfate 4. Concentration by rotary evaporator and N ₂ stream 5. Redissolution	n.e. (>10.5)	LLE	GC-MS	10–100 (MDL)	0.030–0.600 μg/L ^b	<MDL–98.429. DEHP and DiNP are the most abundant n = 50	50 locations (Germany and The Netherlands), Feb–Mar 2013	Bulk deposition, 4 weeks	Peters et al., 2008
DMP, DEP, BBP, DBP, DEHP, DnOP	10	1. Extraction with solvent salts and adjusted pH (2 min) 2. Centrifugation	0.79	DLLME	HPLC-UV	10–30	Not reported	1.01–6.36. DEHP and DBP are the most abundant n = 1	China, May 2013	Dissolved phase	Xue et al., 2014

Table 5 (continued)

Phthalates analyzed	Vol. of sample (mL)	Steps and time	Org. solv./ sample (mL)	Preparation technique	Deter. technique	LOD (ng L ⁻¹)	Blanks	Levels found (ng mL ⁻¹)	Sampling period and site	Type of rainwater sample	Ref.
DMP, DEP, BBP, DBP, DEHP, DnOP	3	(5 min) 3. Removal of the aqueous phase 1. Extraction with organic modifier (7 min)	2	IT-SPME	HPLC-UV	45–499	0.47–1.14 µg/L	1.82–189. DBP and DEP are the most abundant n = 8	Liáns-Oleiros (Galicia, Spain), Feb–Mar 2015	4–56.5 h. Dissolved phase	This work

MDQ: Minimum detectable quantity of the procedure; MDL: Method detection limit; n.e.: Not specified; ic-ELISA: indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay, n: number of samples.

^a 96 samples can be processed in a run.

^b Blanks subtracted.

shows the samplings in the correlative order in which they were performed, with information about the collected volume and the precipitation intensity. Real samples did not cause any problems regarding system robustness or chromatographic separation, with the additional unidentified compounds present in the samples not interfering with analyte determination (Fig. 6).

DBP and DEHP were detected in all the analyzed samples. DEHP was above LOQ for only one sample, and its concentration could only be estimated as it was below the reporting limit, whereas DBP was above the reporting limit for all the samples and it was the main phthalate in all cases. DEP was present and quantifiable in six of the samples analyzed. DnOP was detected in six samples too, but it was always below the limit of quantitation, whereas DMP and BBP were below detection limit in all the samples.

In general, the less sample volume, the higher concentration of phthalates, which is in agreement with a dilution effect found for other micropollutants (Taguchi et al., 2012; Fernández-Amado et al., 2016b; Wang et al., 2014). Thus, the two samples with the largest volume (M – 2 and M – 3, collected over longer periods of time) are those for which DEP is below LOQ, while the sample with the lowest volume is the only one where DEHP is above LOQ. Samples EV-F1 and EV-F2 had relatively high volumes, but also concentration levels, probably due to the fact they were collected over short periods of time and to the atmospheric removal of phthalates after a period without rainfall. Teil et al. (2006) reported more efficient washout due to particle scavenging during the winter months in which the vapor pressure is reduced.

Results are at the concentration levels (ng mL⁻¹) reported in the literature (Table 5). It should also be noted that the values obtained in this work are not comparable with those previously reported since some of them are seasonal values (Guidotti et al., 2000) collected over a longer sampling period (15 days) (Teil et al., 2006) or information on collection period is not provided.

3.6. Comparison of the literature methods for rainwater samples

A comparative study between methods for the determination of phthalates in rainwater reported in the literature was carried out. Characteristics such as sample volume and organic solvents, time of sample treatment, limits of detection and comments about blank studies are listed in Table 5. The table also includes the reported ranges of concentration and major phthalates found in rainwater, along with data about the sampling season and site, the number of analyzed samples and other information.

As previously pointed out, phthalates are usually present in blanks and must be controlled in order to properly assess

concentrations in environmental matrices like rainwater. Despite this, some of the literature methods did not report anything on this subject or it was just superficially mentioned. Some authors subtracted the blank value, which is not recommended (Zhao et al., 2008; Peters et al., 2008). Even if a blank study is accomplished, LODs of most methods are calculated as 3 times the background or signal-to-noise ratio. With this calculation, all the possible background contamination during the procedure is not considered. Therefore, LODs seem to not represent the real limits of the method, and huge differences between LOD and MDL can be found. For the method presented in this work, actual MDLs (Table 2) increase by 260–1800% the value of LODs calculated as $3 \times S/N$ (Table 5).

In addition, some procedures in the literature require high (Teil et al., 2006; Peters et al., 2008) or medium (Zhao et al., 2008; Xu et al., 2010) sample volumes, making them unsuitable for rainwater event analysis. Besides, a lot of tedious and long steps are necessary, and a high volume of organic solvents (Teil et al., 2006) may be needed. On the other hand, an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay method (Zhang et al., 2012) has low LOD and a very low consumption of sample, but it is a very specific method that only allows the analysis of one phthalate (DMP) at a time. In addition, a very long process is accomplished, although 96 samples can be analyzed in one run. Likewise, a very simple method using 20 mL of sample (that can be enough for event analysis in some cases) is only valid for one phthalate (DEHP) (Baram et al., 2000).

Methods using miniaturized techniques (Xue et al., 2014; Guidotti et al., 2000 and the proposed method) present low sample volumes and organic solvent consumption and relatively fast and simple procedures. The DLLME method proposed by Xue et al. (2014) used a higher volume of sample than the IT-SPME method and more steps were needed in the treatment. In addition, no information about blanks or MDLs was reported. The SPME method conducted by Guidotti et al. (2000) is also a one-step procedure with excellent limits, but the extraction time is 30 min against 7 min for the proposed IT-SPME procedure.

Regarding the levels of phthalates, an exhaustive comparison cannot be performed, as some works only deal with one rainwater sample, others do not provide information about the blanks (which may affect the reported concentrations). Besides, different sampling periods, type of deposition (bulk/wet only) and analyses (dissolved phase only, dissolved + particulate phases) are considered. The found levels ranged from 0.010 to 189 ng mL⁻¹, and despite the fact that not all the studies analyzed the same phthalates, DBP and DEHP are usually among the most common

phthalates.

4. Conclusions

The method developed in this work is appropriate for rainwater samples collected over short periods of time, such as daily or event samples, because of its simplicity, speed and especially low volume requirements. The dilution and washout effects observed in the analyzed samples allow for planning the sampling in the future in order to locate the highest pollution events. A total PAE concentration of 203 ng mL⁻¹ (predominantly DBP, but also DEP and DEHP) was determined in events affected by washout, and 47 ng mL⁻¹ in events with low volume. In comparison with other methods applied to rainwater samples, this on-line method provides results of the extraction and separation steps in a short period of time, and with low method detection limits.

The comparison of different stationary phases and gradient elution allows for selecting the best conditions (C₁₈ monolithic and acetonitrile:water) in terms of analysis time, resolution, consumption of solvents and robustness of the coupling to IT-SPME. Concerning the IT-SPME phases, a PLOT capillary of intermediate polarity is a better choice. The improvement lies especially in more sensitivity for DEP and better precision for DEHP and DnOP.

For an analytical method that quantifies at a concentration level of ng mL⁻¹, the evaluation of procedural blanks is indispensable because of the ubiquity of phthalates. The treatment of filters and the selection of solvents allowed minimizing the blanks. No contribution was detected in the chromatographic system coupled to IT-SPME. The quality of the quantified values was reinforced by the use of MDL and reporting levels. The determination of phthalates in a clean room may allow reducing the reporting levels.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Spanish Ministry of Science and Innovation (Research Grant, CGL2010-18145), and the Galician Government (Xunta de Galicia; Research Grants 10MSD164019PR and GRC2013-047 Programa de Consolidación e Estructuración de Unidades de Investigación Competitivas [Consolidation and Structuring of Competitive Research Unit] co-financed by the EUERDF Program). M. F. A. acknowledges the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport for an FPU (AP2012-5486).

References

- Baram, G.I., Azarova, I.N., Gorshkov, A.G., Vereshchagin, A.L., Lang, B., Kiryukhina, E.D., 2000. Determination of bis(2-ethylhexyl) phthalate in water by high-performance liquid chromatography with direct on-column pre-concentration. *J. Anal. Chem.* 55, 750–754.
- Barnes, K.K., Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Zaugg, S.D., Meyer, M.T., Barber, L.B., 2008. A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - I) Groundwater. *Sci. Total Environ.* 402, 192–200.
- Cahill, J.D., Furlong, E.T., Burkhardt, M.R., Kolpin, D., Anderson, L.G., 2004. Determination of pharmaceutical compounds in surface- and ground-water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1041, 171–180.
- Cháfer-Pericás, C., Campins-Falcó, P., Prieto-Blanco, M.C., 2008. Automatic in-tube SPME and fast liquid chromatography: a cost-effective method for the estimation of dibutyl and di-2-ethylhexyl phthalates in environmental water samples. *Anal. Chim. Acta* 610, 268–273.
- Chakraborty, A., Gupta, T., Tripathi, S.N., 2016. Chemical composition and characteristics of ambient aerosols and rainwater residues during Indian summer monsoon: insight from aerosol mass spectrometry. *Atmos. Environ.* 136, 144–155.
- Commission Directive 2007/19/EC of 30 March 2007 amending Directive 2002/72/EC relating to plastic materials and articles intended to come into contact with food and Council Directive 85/572/EEC laying down the list of simulants to be used for testing migration of constituents of plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs.
- Cottrell, B.A., Gonsior, M., Isabelle, L.M., Luo, W., Perraud, V., McIntire, T.M., Pankow, J.F., Schmitt-Kopplin, P., Cooper, W.J., Simpson, A.J., 2013. A regional study of the seasonal variation in the molecular composition of rainwater. *Atmos. Environ.* 77, 588–597.
- Croes, K., Steffens, A., Marchand, D.H., Snyder, L.R., 2005. Relevance of π - π and dipole-dipole interactions for retention on cyano and phenyl columns in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1098, 123–130.
- De Coster, S., Van Larebeke, N., 2012. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *J. Environ. Public Health* 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/713696>. Article ID 713696.
- Deng, Y., Zuo, Y., 1999. Factors affecting the levels of hydrogen peroxide in rainwater. *Atmos. Environ.* 33, 1469–1478.
- Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy.
- Fankhauser-Noti, A., Grob, K., 2007. Blank problems in trace analysis of diethylhexyl and dibutyl phthalate: investigation of the sources, tips and tricks. *Anal. Chim. Acta* 582, 353–360.
- Fernández-Amado, M., Prieto-Blanco, M.C., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., 2016a. Strengths and weaknesses of in-tube solid-phase microextraction: a scoping review. *Anal. Chim. Acta* 906, 41–57.
- Fernández-Amado, M., Prieto-Blanco, M.C., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., 2016b. A novel and cost-effective method for the determination of fifteen polycyclic aromatic hydrocarbons in low volume rainwater samples. *Talanta* 155, 175–184.
- Focazio, M.J., Kolpin, D.W., Barnes, K.K., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Thurman, M.E., 2008. A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - II) Untreated drinking water sources. *Sci. Total Environ.* 402, 201–216.
- Glaser, J.A., Foerst, D.L., McKee, G.D., Quave, S.A., Budde, W.L., 1981. 40 CFR, Part 136, Appendix B. *Environ. Sci. Technol.* 15, 1426–1435.
- Guidotti, M., Giovannozzo, R., Cedrone, O., Vitali, M., 2000. Determination of organic micropollutants in rain water for laboratory screening of air quality in urban environment. *Environ. Int.* 26, 23–28.
- Guo, Y., Kannan, K., 2012. Challenges encountered in the analysis of phthalate esters in foodstuffs and other biological matrices. *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 2539–2554.
- Heudorf, U., Mersch-Sundermann, V., Angerer, J., 2007. Phthalates: toxicology and exposure. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 210, 623–634.
- Jin, Y.F., Zhang, Y.P., Huang, M.X., Bai, L.Y., Lee, M.L., 2013. A novel method to prepare monolithic molecular imprinted polymer fiber for solid-phase microextraction by microwave irradiation. *J. Sep. Sci.* 36, 1429–1436.
- Jornet-Martínez, N., Antón-Soriano, C., Campins-Falcó, P., 2015. Estimation of the presence of unmetabolized dialkyl phthalates in untreated human urine by an on-line miniaturized reliable method. *Sci. Total Environ.* 532, 239–244.
- Jornet-Martínez, N., Muñoz-Ortuño, M., Moliner-Martínez, Y., Herráez-Hernández, R., Campins-Falcó, P., 2014. On-line in-tube solid phase microextraction-capillary liquid chromatography method for monitoring degradation products of di-(2-ethylhexyl) phthalate in waters. *J. Chromatogr. A* 1347, 157–160.
- Kataoka, H., Ise, M., Narimatsu, S., 2002. Automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the analysis of bisphenol A, alkylphenols, and phthalate esters in foods contacted with plastics. *J. Sep. Sci.* 25, 77–85.
- Kataoka, H., Ishizaki, A., Nonaka, Y., Saito, K., 2009. Developments and applications of capillary microextraction techniques: a review. *Anal. Chim. Acta* 655, 8–29.
- Lim, L.W., Hirose, K., Tatsumi, S., Uzu, H., Mizukami, M., Takeuchi, T., 2004. Sample enrichment by using monolithic precolumns in microcolumn liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1033, 205–212.
- Lin, Z.P., Ikononou, M.G., Jing, H., Mackintosh, C., Gobas, F.A.P.C., 2003. Determination of phthalate ester congeners and mixtures by LC/ESI-MS in sediments and biota of an urbanized marine inlet. *Environ. Sci. Technol.* 37, 2100–2108.
- Masiá, A., Moliner-Martínez, Y., Muñoz-Ortuño, M., Pico, Y., Campins-Falcó, P., 2013. Multiresidue analysis of organic pollutants by in-tube solid phase microextraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1306, 1–11.
- Mitani, K., Izushi, F., Kataoka, H., 2004. Analysis of phthalate contamination in infusion solutions by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *J. Anal. Toxicol.* 28, 575–580.
- Mitani, K., Narimatsu, S., Izushi, F., Kataoka, H., 2003. Simple and rapid analysis of endocrine disruptors in liquid medicines and intravenous injection solutions by automated in-tube solid-phase microextraction/high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32, 469–478.
- Munch, J., Eichelberger, J., Behymer, T., Budde, W., 1995. Method 525.2. US EPA, Washington DC, USA.
- Muñoz-Ortuño, M., Argente-García, A., Moliner-Martínez, Y., Verdú-Andrés, J., Herráez-Hernández, R., Picher, M.T., Campins-Falcó, P., 2014. A cost-effective method for estimating di(2-ethylhexyl)phthalate in coastal sediments. *J. Chromatogr. A* 1324, 57–62.
- Nesterenko, P.N., Rybalko, M.A., 2005. Separation of homologues of organic compounds using the gradient of the eluent flow rate on a monolithic porous column. *J. Anal. Chem.* 60, 349–354.
- Núñez, O., Ikegami, T., Miyamoto, K., Tanaka, N., 2007. Study of a monolithic silica capillary column coated with poly(octadecyl methacrylate) for the reversed-phase liquid chromatographic separation of some polar and non-polar

- compounds. *J. Chromatogr. A* 1175, 7–15.
- Peters, R.J.B., Beeltje, H., Van Delft, R.J., 2008. Xeno-estrogenic compounds in precipitation. *J. Environ. Monit.* 10, 760–769.
- Price, E., Prakash, B., Domino, M., Pepich, B., Munch, D., 2005. Method 527. US EPA, Washington DC, USA.
- Prieto-Blanco, M.C., Moliner-Martínez, Y., López-Mahía, P., Campíns-Falcó, P., 2012. Ion-pair in-tube solid-phase microextraction and capillary liquid chromatography using a titania-based column: application to the specific lauralkonium chloride determination in water. *J. Chromatogr. A* 1248, 55–59.
- Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 Concerning the Registration, Evaluation, authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC.
- Su, R., Zhao, X., Li, Z., Jia, Q., Liu, P., Jia, J., 2010. Poly(methacrylic acid-co-ethylene glycol dimethacrylate) monolith microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of phthalate esters in cosmetics. *Anal. Chim. Acta* 676, 103–108.
- Taguchi, S., Murai, K., Takamatsu, M., Hayakawa, Y., Tamizu, S., Kuwata, M., Katayama, Y., Kuramitz, H., Hata, N., 2012. Interpretation of the concentrations of aldehydes in rainwater over a wide area and local areas of Japan by some dominant factors. *Atmos. Environ.* 61, 588–596.
- Teil, M.J., Blanchard, M., Chevreuil, M., 2006. Atmospheric fate of phthalate esters in an urban area (Paris-France). *Sci. Total Environ.* 354, 212–223.
- Vavrouš, A., Pavloušková, J., Ševčík, V., Vrbík, K., Čabala, R., 2016. Solution for blank and matrix difficulties encountered during phthalate analysis of edible oils by high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1456, 196–204.
- Ventrice, P., Ventrice, D., Russo, E., De Sarro, G., 2013. Phthalates: European regulation, chemistry, pharmacokinetic and related toxicity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36, 88–96.
- Wang, X., Li, X., Li, Z., Zhang, Y., Bai, Y., Liu, H., 2014. Online coupling of in-tube solid-phase microextraction with direct analysis in real time mass spectrometry for rapid determination of triazine herbicides in water using carbon-nanotubes-incorporated polymer monolith. *Anal. Chem.* 86, 4739–4747.
- Wen, Y., Feng, Y.Q., 2007. Preparation and evaluation of hydroxylated poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) monolithic capillary for in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1160, 90–98.
- Xu, Q., Yin, X., Wu, S., Wang, M., Wen, Z., Gu, Z., 2010. Determination of phthalate esters in water samples using Nylon6 nanofibers mat-based solid-phase extraction coupled to liquid chromatography. *Microchim. Acta* 168, 267–275.
- Xue, L., Zhang, D., Wang, T., Wang, X.M., Du, X., 2014. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography for determination of phthalic esters in environmental water samples. *Anal. Methods* 6, 1121–1127.
- Zhang, M., Liu, S., Zhuang, H., Hu, Y., 2012. Determination of dimethyl phthalate in environmental water samples by a highly sensitive indirect competitive ELISA. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166, 436–445.
- Zhao, R.S., Wang, X., Yuan, J.P., Lin, J.M., 2008. Investigation of feasibility of bamboo charcoal as solid-phase extraction adsorbent for the enrichment and determination of four phthalate esters in environmental water samples. *J. Chromatogr. A* 1183, 15–20.
- Zhou, S., Zuo, R., Zhu, Z., Wu, D., Vasa, K., Deng, Y., Zuo, Y., 2013. An eco-friendly hydrophilic interaction HPLC method for the determination of renal function biomarkers, creatinine and uric acid, in human fluids. *Anal. Methods* 5, 1307–1311.
- Zuo, Y. (Ed.), 2014. High-performance Liquid Chromatography (HPLC): Principles, Procedures and Practices. Nova Science Publishers, Inc., New York.
- Zuo, Y., Zhang, K., Wu, J., Men, B., 2011. Determination of phthalic acid in snow and its photochemical degradation by capillary gas chromatography coupled with flame ionization and mass spectrometric detection. *Chemosphere* 83, 1014–1019.

ANEXO IV

Ion-pair in-tube solid phase microextraction for the
determination of phthalates and degradation products in
atmospheric particulate matter

(Manuscript for the submission to Journal of Chromatography A).

Ion-pair in-tube solid phase microextraction for the determination of phthalates and degradation products in atmospheric particulate matter

M. Fernández-Amado, M. C. Prieto-Blanco*, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez

¹ Universidade da Coruña, Grupo QANAP, Instituto Universitario de Medio Ambiente (IUMA), Centro de Investigacións Científicas Avanzadas (CICA), Departamento de Química Analítica, Facultade de Ciencias, Zapateira, 15071 A Coruña, Spain

Abstract

An in-tube solid phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography with diode array detection (IT-SPME-HPLC-DAD) method for the determination of 13 diesters and 2 monoesters of phthalic acid in particulate matter (PM₁₀) has been developed. Ion-pair was used to achieve an efficient separation of the 15 analytes in the chromatographic system in 13 min and also to enhance their extraction in the capillary. The previous extraction with methanol assisted by ultrasounds was also optimized. The presented method is simple and accessible and allows the analysis of a great number of phthalates, including degradation products for the first time in PM, with a significant save of time and organic solvents' consumption due to the use of IT-SPME, avoiding several tedious sample treatment steps like evaporation or purification. The validated method, with limits of detection 0.09-0.52 ng m⁻³, was applied to PM₁₀ samples from different environments collected in Galicia (Spain). DiBP was the major phthalate, followed by its isomer DnBP in urban and urban traffic sites and by DEP in the suburban area.

* Corresponding author: Departamento Química Analítica, Universidade da Coruña, Campus da Zapateira s/n, 15071 A Coruña, Spain

E-mail address: mcprieto@udc.es (M.C. Prieto-Blanco)

Keywords

Phthalates, degradation products, atmospheric particulate matter, ion-pair, on-line in-tube solid phase microextraction-HPLC-DAD

1. Introduction

Phthalic acid esters (phthalates or PAEs) are a group of compounds used as plasticizer substances. Due to their high production volume, ubiquity and endocrine disruptor properties, phthalates are target compounds to monitor in environment, food and some products (Ventrice et al., 2013; Heudorf et al., 2007). For these reasons, some of them are included in regulations. The widely used di-2-ethylhexylphthalate (DEHP) is considered a priority hazardous substance in the field of European water policy and Environmental Quality Standards (EQS) have established an annual average of $1.3 \mu\text{g L}^{-1}$ for this compound in surface waters (Directive 2013/39/EU). The US Environmental Protection Agency (EPA) also has set a maximum admissible concentration (MAC) for this phthalate in water systems ($6 \mu\text{g L}^{-1}$). Along with DEHP, other phthalates like di-n-butylphthalate (DnBP), diisobutylphthalate (DiBP), benzylbutylphthalate (BBP) and di-n-pentylphthalate (diamylphthalate, DAP) are considered toxic for reproduction, while di-n-octylphthalate (DnOP), diisononylphthalate (DiNP) and diisodecylphthalate (DiDP), despite not having that consideration, are below some usage restrictions (Regulation 1907/2006). The long-chain alkyl phthalates DiNP and DiDP, and in a lower proportion (because its danger and consequent regulation) DEHP are the most used phthalates, accounting around 70-80% of the phthalates used in Europe in the last years (Ventrice et al., 2013; Heudorf et al., 2007; ECPI, 2015). They are employed for lamination of polyvinyl chloride (PVC), the most used plastic. The pollution of phthalates is markedly associated with anthropogenic sources (Gao and Wen, 2016). As phthalates are not chemically bond to polymers, they can migrate, leach or evaporate, ending up in a lot of products and in the environment, including the atmosphere (Heudorf et al., 2007; Salgueiro-González et al., 2015). Their presence in ubiquitous polymeric materials is therefore the major source of PAEs in the atmosphere (Wang et al., 2012).

One of the main degradation pathways for phthalates is hydrolysis to phthalic acid, which can occur via monoester (Gao and Wen, 2016). The formation of monoester phthalates as a result of biodegradation has been widely reported, especially for DEHP, which leads to

mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP). This metabolite is used as a biomarker for the presence of the diester in humans ([Jornet-Martínez et al., 2015](#)). Mono-*n*-butyl phthalate (MBP) is the monoester from another widely extended phthalate, DnBP. MEHP, which can also be formed by burning, is a known cause of asthma and its toxicity may be higher than the one of its precursor DEHP ([Nakamiya et al., 2005](#); [Jornet-Martínez et al., 2014](#)). In addition to the interest of their determination for their potential risk to health, if the presence of these degradation products was detected in PM, a better understanding about reactions involving phthalates in the atmosphere could be achieved. Hydrolysis of particle-adsorbed DEHP to MEHP has been observed under laboratory conditions when a monolayer was absorbed on highly dispersed powders of certain oxides ([Behnke et al., 1987](#)), so it is reasonable to think that hydrolysis reactions can be produced onto particulate matter. The presence of monoesters in PM could also be due to adsorption of the already formed monoester onto the particles. Adsorption of MEHP onto dust has been suspected before ([Nakamiya et al., 2005](#)). Despite this interest and potential usefulness, to the authors' knowledge MBP and MEHP have been never determined in PM.

In-tube solid phase microextraction (IT-SPME) is a miniaturized sample preparation technique with wide applications in the last years ([Fernández-Amado et al., 2016a](#)). Despite its increasing use, atmospheric matrices are not among the most analyzed with this technique. Some recent works have analyzed rainwater with IT-SPME ([Fernández-Amado et al., 2016b](#); [Asiabi et al., 2016](#); [Bu et al., 2016](#)), but its application to particulate matter has been very limited ([Prieto-Blanco et al., 2011](#); [Prieto-Blanco et al., 2013](#)). IT-SPME has been applied to phthalates' analysis ([Fernández-Amado et al., 2017](#); [Muñoz-Ortuño et al., 2014](#); [Muñoz-Ortuño et al., 2012](#)), even including MEHP ([Jornet-Martínez et al., 2014](#); [Jornet-Martínez et al., 2015](#)), but never for their determination in atmospheric particulate matter samples. On the other hand, ion-pair has been used in IT-SPME ([Prieto-Blanco et al., 2012a](#)), but it is a very unexplored approach that nevertheless has a great potential.

The purpose of this work is to develop a simple and fast method for the determination of 15 phthalates in particulate matter, using a cheap and widely present instrumentation (HPLC-DAD, US) and with reduction of sample treatment steps and organic solvents' volume compared to the previous methods for phthalates' determination in PM. On-line IT-SPME, with an ion-pair approach, was used to achieve these goals. The great number of analytes, with different hydrophobicity, include the most used phthalates (DiNP and DiDP) and the degradation products MBP and MEHP, which can be very useful to understand the phthalates' fate in the atmosphere. The method was applied to several PM₁₀ samples from different environments (suburban, urban and urban-traffic) to explore the possible differences in concentrations and relative distribution of the analyzed phthalates with the type of area.

2. Experimental

2.1. Apparatus

The chromatographic system (Waters Corp, Milford, MA, USA) consisted of a 2695 Alliance module and a photodiode array detector, DAD (Waters 996), with the software Empower 2.0. A six-port injection valve (Rheodyne Model 7725i) was coupled for the IT-SPME procedure.

2.2. Reagents and materials

EPA 606-M Phthalate Esters Mix containing dimethyl- (DMP), diethyl- (DEP), di-*n*-butyl- (DnBP), butylbenzyl- (BBP), di-2-ethylhexyl- (DEHP) and di-*n*-octyl- (DnOP) phthalates (200 µg mL⁻¹ each in methanol) was obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Di-*n*-hexyl- (DHP), di-*n*-heptyl- (DHepP), diisodecyl- (DiDP), mono-*n*-butyl- (MBP) and mono(2-ethylhexyl)- (MEHP) phthalates were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Diisononylphthalate (DiNP) and solutions in acetone of di-*n*-propyl- (DPP) (100 µg mL⁻¹), diisobutyl- (DiBP) (2500 µg mL⁻¹) and di-*n*-amyl- (DAP) (5000 µg mL⁻¹) phthalates were obtained from Chem Service (West Chester, PA, USA). Working solutions in acetonitrile

were prepared from the commercial products. All solutions were stored at -18°C in amber glass vials (Waters, Milford, MA, USA, and Supelco, Steinheim, Germany).

All solvents were of Gradient HPLC grade. Acetonitrile (ACN) (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA) and LC-MS grade methanol (MeOH) (Panreac, Barcelona, Spain) were filtered through 0.45 µm PTFE membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain). Milli-Q quality water filtered through 0.20 µm nylon membranes (Millipore, Darmstadt, Germany) was used for the mobile phase preparation and Ultra-Resi-Analyzed Water for Environmental Inorganic and Organic Analysis (J.T. Baker, Phillipsburg, USA) was used for blanks and standards preparation.

Triethylamine (TEA) of synthesis grade was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Solutions of 0.05% (for conditioning and as modifier of the sample) and 0.1% (for mobile phase) were prepared every 2 days. Their pH was adjusted to approximately 3 with *ortho*-phosphoric acid 1M, prepared from the commercial solution 85% (Panreac, Barcelona, Spain).

2.3. Sampling, extraction and filtration of samples

Particulate matter (PM₁₀) samples were collected at 5 sampling sites of different typologies (suburban, urban, traffic) in Galicia (Northwestern Spain). Collection was accomplished on quartz-fiber filters (φ=150 mm, MK360 Munktell, Falun, Sweden) for 24 h periods, by using Digital DHA-80 high-volume samplers (Digital Elektronik AG, Hegnau, Switzerland). All filters were weighed before and after sampling, in both cases after 48 h of conditioning at constant temperature (20 ± 1 °C) and relative humidity conditions (50 ± 5 %), according to the EN 12341 European Norm ([EN 12341:2014](#)). Samples were stored at that controlled temperature and humidity conditions until extraction.

2 circles (φ = 1.8 and 2 cm) of the filter were extracted with 10 mL of methanol during 20 min assisted by ultrasounds. Extracts were filtered through Discmic[®]-13HP syringe filters (PTFE, 0.50 µm, 13 mm, Advantec MFS, Dublin, CA, USA). 10 mL of Milli-Q water were previously

passed through the filter to avoid phthalate leaking to the extract. After the extract, 60% (proportion of the final volume) of TEA 0.05% pH \approx 3 was passed through the filter. Extracts were stored at -18°C until analysis, accomplished within 2 days.

Protocol to minimize blanks consisted in cleaning glassware material in alkaline detergent for 24h, and then rinsing it sequentially with abundant tap water, Milli-Q water and acetonitrile. Before the first use of new glass vials, they are rinsed sequentially with hexane, tetrahydrofuran, methanol and Milli-Q water. After be cleaned, all the glassware was carefully stored and just before its use it was rinsed with LC-MS grade methanol and dried in an oven at 130°C.

2.4. In-tube SPME procedure

For the IT-SPME-HPLC-DAD procedure, the loop of the six-port injection valve was replaced by a 70 cm-long GC PLOT column Rt[®]-S-BOND (divinylbenzene with 4-vinylpyridine, 0.32 mm i.d., 10 μ m) purchased from Restek (Bellefonte, PA, USA). Capillary connections were facilitated by the use of a 2.5 cm sleeve of 1/16 in. polyether ether ketone (PEEK) tubing at each end of the capillary. In load position, capillary was conditioned by passing 0.5 mL of TEA 0.05% in water (pH \approx 3). Then 5 mL of PM extract with 60% (v/v) TEA 0.05% in water (pH \approx 3) were passed through the capillary, followed by 60 μ L of Milli-Q water to displace the remaining sample in the capillary. The run is started by programming a sample volume equal to zero for the autosampler. At the time the gradient starts, the valve is rotated to the inject position, and mobile phase passes through the capillary, desorbing analytes.

To avoid memory effects, the all-glass sample syringe (Ruthe, Portugal) was rinsed with acetonitrile between runs while the valve and capillary were flushed with 2 mL of acetonitrile before the conditioning for the next sample.

2.5. Chromatographic conditions

The analytical column was an Onyx Monolithic C₁₈ 100 mm \times 3 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Ion-pair chromatography with gradient elution mode was used, with a

mixture of acetonitrile and TEA 0.1% in water, with pH adjusted to approximately 3 with phosphoric acid (Table 1). The column temperature was set to 30 ± 5 °C. The 15 phthalates were separated within 13 minutes. DAD data were recorded between 210 and 400 nm. Integration was performed at 225 nm until 9.5 min (till DnBP) and then at 223.8 nm (from DAP).

3. Results and discussion

3.1. Optimization of the chromatographic separation

One of the main difficulties for the chromatographic separation were the two monoester degradation products (MBP and MEHP). They are affected by pH due to their carboxylic acid group and therefore pH has to be adjusted to obtain reproducible retention. The protonated forms ($\text{pH} < 3.1$) were selected by adjusting $\text{pH} = 3$ (Jornet-Martínez et al., 2014). Furthermore, ion-pair reagent triethylamine (TEA) was added in order reinforce a reproducible retention and reduce peak tails. In the literature, TEA has been applied to separation of acidic compounds such as nucleic acids (Close et al., 2016) or chloroacetic acids (Prieto-Blanco et al., 2012b) at neutral pH and to the separation of decarboxy- β -cyanins in the range of pH 2.3 and 6.7 (Wybraniec, 2006). Using 0.1% TEA and $\text{pH} = 3$, an increase of the retention of two monoester (more significant for MEHP) was observed. Besides, under these conditions, the pair MEHP-DEP (partially separated) was resolved and elution order DMP and MBP was changed. Higher concentrations of TEA increased the baseline drift without improving the peaks shape. Phosphoric acid was selected for pH adjustment because baseline drift was lower than with formic acid.

The other main difficulty was the separation of isomers DnBP and DiBP, increased by the similar retention of BBP with them. An isocratic step with high percentage of aqueous TEA (45%) improved the separation, although no baseline separation was achieved for these three analytes. By increasing flow rate during this isocratic step, separation time was not extended and separation remained acceptable (Fig. 1a). Finally the separation of the 15

phthalates was achieved in only 13 min (Fig. 1b). DiNP and DiDP are mix of isomers and therefore the correspondent peaks are more broadened than the other diesters.

3.2. Optimization of the extraction of PM and filtration

Methanol has been successfully used before to extract some phthalates from particulate matter (Salgueiro-González et al., 2013). Due to its moderate toxicity and its miscibility with the selected mobile phase for chromatography, it was considered a good choice as extraction solvent. A simple and cheap extraction with MeOH assisted by ultrasounds has been optimized. For each experiment, two circles ($\phi = 1.8$ and 2 cm) of the PM filter spiked with $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ of the analytes were extracted. Only 5.7 cm^2 of the sample (3.7% of the total area) are needed, remaining enough filter for analyzing other compounds. Volume and time were determined simultaneously by comparing two different procedures: 10 mL of MeOH and 20 min of extraction vs. 5 mL MeOH and 10 min of extraction time (Fig. 2a). Although similar recoveries were obtained for several target analytes, suggesting that 10 min may be enough as extraction time for them, poorer precision was achieved with the shortest extraction time. In addition, a few compounds presented too high recoveries, up to 130% for DiBP. These results indicate that the extraction time is not enough to obtain reproducible and accurate extraction and therefore 20 min was selected. Moreover, the degradation product MBP presented a very poor extraction with only 10 min and 5 mL (26%), which is doubled with the alternative procedure. The extraction of both monoesters is not complete but it is reproducible and therefore it is accepted, although final results should be corrected with recoveries for these compounds. Regarding the volume, despite with 5 mL it do not seem that saturation of the solvent is achieved, it is a limit volume to immerse the sample aliquot, which may also affect negatively to precision. In addition, as different typologies of samples are going to be analyzed, higher levels of phthalates may be present. Therefore, to assure reproducibility and to avoid possible saturation, 10 mL was selected.

With 10 mL and 20 min as fixed conditions, changes in the extraction solvent were tested. Acidification of MeOH to $\text{pH} \approx 3$ with phosphoric acid (to protonate MBP and MEHP) did not led to significant changes respect to not acidified MeOH. On the other hand, the addition of TEA as modifier had improved the in-tube extraction, so the extraction with a mixture MeOH/TEA 40:60 was tested (Fig. 2b). The addition of TEA in the US extraction improved the extraction of the most hydrophilic compounds (DMP, DEP and especially MBP) but the extraction of the most hidrophobic (DEHP, DnOP, DiNP and DiDP) decreased too, with recoveries below 80% (only 45% for DiDP). The extraction without TEA was selected as a better compromise for all the analytes is achieved (with all recoveries over 60%).

The extracts must be filtered before passing through the IT-SPME capillary. In preliminary studies for the filtration of aqueous PM extracts, hydrophilic PTFE syringe filters gave a better performance than glass and quartz fiber filters for low volumes of sample, with %R = 90-105% for phthalates. MeOH was needed to be passed through the filter after the aqueous extract to recover the analytes. Therefore this kind of PTFE filter was checked for the present procedure with MeOH extracts. Despite recoveries for this specific step were not calculated, the total recoveries of the procedure were acceptable, indicating that good recoveries are obtained in the filtration. On the other hand, passing 10 mL of Milli-Q water through the filter previously to the sample has proved to be enough to avoid contamination from the filter.

3.3. Optimization of the IT-SPME procedure

In a previous work for the analysis of 6 phthalates in rainwater by IT-SPME ([Fernández-Amado et al., 2017](#)), the final conditions involved a PLOT capillary of intermediate polarity and 5 mL of water/methanol 60:40 sample. From that, in the optimization of the IT-SPME step the same capillary and 5 mL as sample volume were selected. Methanol, which was organic modifier in the water samples, in this case was used to extract the analytes from the PM samples. Despite a lower proportion of the aqueous phase would imply a lower dilution of the organic extract, the proportion 40:60 has been proved to be the best compromise

solution for hydrophilic and hydrophobic phthalates. Thus the same proportion with aqueous modifier was maintained. Nevertheless, the composition of the aqueous modifier had to be optimized.

As the protonated forms of MBP and MEHP were selected for the best performance in the chromatographic separation, the pH should be adjusted to 3. Therefore an acidified aqueous phase must be used as modifier for IT-SPME. Phosphoric acid, which gave the best performance for acidifying the mobile phase, was selected for this purpose (Fig. 3). Ion-pair has been applied to IT-SPME for the analysis of lauralkonium chloride in water samples (Prieto-Blanco et al., 2012a), but to the authors' knowledge ion-pair interactions have not been used again in IT-SPME. In this work, the suitability of TEA to create ion-pair interactions with the analytes also in the extraction was explored. In the first tests, the use of TEA 0.1% (pH \approx 3 adjusted with H_3PO_3) as modifier produced a clear decrease of peak areas for the most hydrophilic compounds (till DAP, with dramatic losses of 86-94% for DMP, DEP, DPP and MBP). Conditioning the capillary with the TEA 0.1% solution previously to pass the standard solved the problem increased dramatically the extraction efficiency (Fig. 4). The concentration of TEA was optimized and compared with the phosphoric-only modifier (Fig. 3). The extraction efficiencies are very similar with the 3 modifiers for BBP until DiDP, and even for MEHP. Nevertheless, the four most hydrophobic compounds presented clear improvement in efficiency when TEA is present. Like in the case of the chromatographic separation, it is expected that the monoesters have an ion-pair-like interaction with TEA that favors the extraction. In addition to the improvement in the extraction of monoester degradation products, the non-hydrolysable DMP and DEP are also better concentrated in the capillary with the addition of TEA at the sample (Fig. 3). In this case, the presence of TEA seems to decrease the affinity of these hydrophilic compounds for the liquid phase, favoring their migration to the solid phase. 0.05% was the concentration of TEA that provided the best performance and therefore it was selected.

3.4. Validation of the method

The proposed method was validated by analyzing its linearity, limits of detection and quantitation, precision and recoveries. The obtained figures are presented in Tables 2 and 3. Linear ranges reach up to 109 ng m⁻³ for most analytes, with $R^2 > 0.995$ for all the target compounds. As commented before, due to the different extraction behaviors between the most hydrophobic and the most hydrophilic compounds, a compromise solution was chosen for both the US and in-tube extractions. For this reason, the most hydrophilic (DMP, DEP, DPP) and most hydrophobic (DiNP, DiDP) phthalates present higher limits and worse precision (and a shorter linear range for the most hydrophilic) than the intermediate compounds (Table 2). In addition, as DiNP and DiDP are mix of isomers and peaks are broadened, integration is less reproducible than for the other analytes, affecting their precision. The two monoesters (MBP and MEHP) have also broadened peaks, in this case due to their carboxylic acid group, and a little higher RSD for inter-day precision. The analytical recoveries for the whole procedure are in acceptable values (Table 3). Recoveries of 89-98% are obtained for almost all the target analytes, except for DMP, MBP, MEHP and DiDP due to the compromise conditions selected for the extraction as exposed before. For the 4 analytes with recoveries below 80% the obtained values (including limits and ranges in Table 2) were corrected taking recoveries into account.

Due to their ubiquity and trace levels, blank problems in phthalates analysis have to be addressed. In a previous work ([Fernández-Amado et al., 2017](#)) the effect of some potential sources was analyzed and protocols to control and minimize blanks for an IT-SPME method were established. Those protocols (see 2.3 section for description) were followed in the proposed method and blanks corresponding to IT-SPME and determination steps were daily controlled. Whole-procedure blanks (including also US extraction and extract filtration) were analyzed too and remained in the levels of the IT-SPME step blanks, not increasing the background. DEHP and DiBP were always found in the blanks, with levels of 0.33 ± 0.10 and $0.79 \pm 1.28 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectively. In the case of DiBP the standard deviation was clearly higher than the average value obtained for the blanks, making it assimilable to zero. The

other compounds usually found in the blanks were DnBP ($0.34 \pm 0.31 \mu\text{g mL}^{-1}$) and DiNP ($0.10 \pm 0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$). All of them were below their respective LOQ. The method detection limits (MDL) were calculated with 99% confidence according to 40 CFR, Part 136, Appendix B (Glaser et al., 1981). The limits of quantitation (LOQ) were calculated as 10 times the standard deviation obtained in the 7 replicates used for the MDL calculation. All limits (Table 2) were experimentally checked. MDL and LOQ were in the ranges 0.09-0.52 and 0.27-1.65 ng m^{-3} respectively. Again, the highest values are for the most hydrophilic and the most hydrophobic compounds for the reasons previously exposed. Blank subtraction is not recommended for phthalates because sometimes they present an irregular pattern (Munch et al., 1995). They were considered by means of reporting levels (RL) (Table 2), calculated as 10 times the blank average concentration (Barnes et al., 2008). When a concentration is between LOQ and RL, only an estimation of the value is given. RL are below 3 ng m^{-3} for most analytes (Table 2). A few compounds that rarely appear in the blanks present high peak areas when they do, increasing reporting limits. This effect is particularly large for the two monoesters, with RL higher than 20 ng m^{-3} . As these compounds are not usually present in blanks (8-12% of presence) in most cases the LOQ value would have been enough as limit, although only an estimation of the concentration level would be reported for assurance.

Absolute recoveries of the IT-SPME (efficiency of the non-exhaustive extraction) were calculated by comparing the peak areas corresponding to 5 mL of 10 and 20 ng mL^{-1} (50 and 100 ng of each analyte respectively) processed by IT-SPME to those obtained by direct injection of 10 and 20 μL of 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (50 and 100 ng respectively). The obtained values (Table 3) were similar to those reported in the literature for IT-SPME (10%-30%). Only DMP presents a low absolute recovery because the compromise conditions are not the best for it.

3.5. Application to samples

The optimized method was applied to 12 PM_{10} samples from 5 sampling sites with different typology, all of them from Galicia (NW Spain). Samples named SU are from a suburban

area, U from an urban area and T from three different urban traffic stations (AC, SC and C). Obtained values are showed in Table 4. Out of the 15 target phthalates, only 4 were found above MDL for these samples: DEP, DiBP, DnBP and DEHP. DiBP (3.23-202.86 ng m⁻³) is the major phthalate for almost all samples, except for one of the urban area (U1) and the two analyzed samples from one of the traffic sites (T-C1 and T-C2). For these three samples, the isomer DnBP is the major. On the contrary, DnBP concentrations are below the reporting level for 4 of 5 samples from the suburban area.

DEP has been quantified in all the 5 suburban samples (with the highest concentrations of all samples for 3 of the 5 suburban samples) and in 3 of 5 traffic samples. For the two urban samples it is below MDL. DEP was not detected neither in T-AC1, from a traffic site of the same city of U1 and U2, so maybe the absence of this compound is due to the characteristics of the city (lack of sources of DEP in the city, poor transport from the possible sources because of predominant winds). The other phthalate detected is DEHP, with generally low levels and below RL for 6 samples. In one sample (T-SC2) the presence of an interfering peak overlaying DEHP did not allow to determinate it. Seemingly this was a punctual problem, as the other sample for the same sampling point, which is clearly the most contaminated of all the analyzed samples, did not have this problem.

Despite only a few samples were analyzed and conclusions are not definitive, it seems that DiBP is the major phthalate in all the studied areas except for T-C, for which DnBP has especially high relative concentrations. This fact is probably related to the specific city as the other urban traffic sampling points do not present this pattern. DEP seems to be an important compound in the suburban area, while it is negligible in the city where T-AC1 and the urban samples were collected. The most contaminated sampling site seems to be T-SC, especially the sample T-SC2, with a total concentration of PAEs of 245.5 ng m⁻³ (1% of PM₁₀). In the analyzed samples, ΣPAEs (14.5-245.5 ng m⁻³) contribute in average a 0.3% to total PM₁₀, ranging from 0.1% in T-AC, T-C and U to 0.6% in T-SC. It is significant that DEHP was found in relatively low concentrations (in literature DEHP is usually the major

phthalate (Table 5), but in the analyzed samples it has lower levels than DiBP and DnBP in most cases). Nevertheless, dibutylphthalate isomers have also been reported as the major phthalates (Xie et al., 2006; Wang et al., 2008, 2012, 2016) and are frequently among the major.

3.6. Comparison with literature methods

Several methods for determination of phthalates in atmospheric particulate matter reported in the literature are compiled in Table 5. Most of the reported methods only analyze a few phthalates (5-7) and none of them analyze the degradation products MBP and MEHP. Despite these two compounds were not detected in the analyzed samples, as the number of samples was limited it is possible that these two analytes are present in PM samples from other places and/or periods and their determination could be very interesting to understand the degradation processes of phthalates in the atmosphere and/or the air/particulate/rainwater partition of these degradation products. In addition, in several methods no distinction between DnBP and DiBP is done. This distinction is significant as DiBP is sometimes the main isomer (Romagnoli et al., 2016; Li et al., 2014; Fu et al., 2010; Gu et al., 2010; this work), while in some areas DnBP can have a higher presence (Wang et al., 2008; Wang et al., 2012; one area in Gu et al., 2010; one area in this work), and distinguishing between the two isomers leads to a better monitoring and understanding. Comparing detection limits, it should be noted that most authors do not consider the background contamination during the procedure and calculate the limit of detection as 3 times the signal-to-noise ratio. These instrumental limits (LOD) do not reflect the real limits of the whole method like MDL, which are higher but more representative. In addition, most methods use mass spectrometry for detection, achieving better limits than those that can be reached with the cheaper UV detection. The proposed method improves more than 10 times the limits presented by Jiao et al. (2015) with HPLC-UV (2-5.7 ng m⁻³) and even the value for DEHP is a little lower than the reported by Li et al. (2014) with GC-MS determination.

The main advantage of the presented method is related to the sample preparation. Only a couple of methods that use thermal desorption ([Weschler, 1984](#); [Wang et al., 2016](#)) have a simpler sample preparation. Despite extraction assisted by US is a widely extended technique for the extraction of the phthalates from the filter, after this extraction (or longer Soxhlet extraction) most methods require several steps of extraction and purification (Table 5). With the proposed method, after a simple and fast filtration only on-line IT-SPME is needed. In addition, very good recoveries were obtained with only one extraction, while most methods using US extraction require two or three extractions ([Romagnoli et al., 2016](#); [Salapasidou et al., 2011](#); [Wang et al., 2006](#); [Ma et al., 2014](#); [Kong et al., 2013](#); [Gu et al., 2010](#); [Fu et al., 2010](#)). As a result, an important save in both time and organic solvents is achieved with the proposed method, that also avoids some tedious steps like concentration. Methanol is less dangerous than dichloromethane, that is usually used (alone or mixed with other solvents) for the extraction. Only 10 mL per sample are consumed with the presented method, while volumes over 70 mL (up to 210 mL) are needed for some reported methods ([Xie et al., 2006](#); [Wang et al., 2012](#); [Xie et al., 2005](#); [Teil et al., 2006](#); [Gu et al., 2010](#); [Xie et al., 2007](#); [Wang et al., 2008](#)).

4. Conclusions

In this work a simple, rapid and cheap method for the determination of 15 phthalates, including the degradation products MBP and MEHP, in atmospheric particulate matter was developed. A simple extraction assisted by US with only 10 mL of methanol, followed by fast syringe filtration and IT-SPME (on-line coupled to HPLC-DAD for determination) is enough to perform the analysis. The separation of the 15 analytes was achieved in only 13 min. Ion-pair interactions were used for improving the monoesters peaks' shape and reproducibility. Ion-pair was also applied to the in-tube solid phase microextraction, an approach very poorly explored in the literature that in this case has improved significantly the extraction efficiency for the most hydrophilic compounds. The proposed method avoids the need of some long and tedious steps widely extended in methods for phthalates' determination in PM like

purification and concentration, producing important savings in time and organic solvents consumption. In addition, only one US extraction is needed, in contrast to 2-3 extractions (and with more toxic solvents) usually reported.

The presented method has been validated, with acceptable inter-day reproducibility and method detection limits between 0.09-0.52 ng m⁻³. Analytical recoveries were quantitative for most phthalates, except for the four analytes less favored for the selected compromise conditions. For these compounds, acceptable and reproducible recoveries were obtained and should be used to correct the obtained concentrations. Blanks issues were taking into account by calculating reporting levels, below which only an estimation of the concentration is given to assess the reported results.

The proposed method was applied to 12 PM₁₀ samples from different environments (urban, suburban and urban-traffic) collected in Galicia (NW Spain). Only DEP, DnBP, DiBP and DEHP were over LOQ, and ΣPAEs ranged from 14.5 to 245.5 ng m⁻³. DiBP was the major phthalate in 75% of the samples, followed by its isomer DnBP (major in the other 25%) in urban and urban traffic sites and by DEP in the suburban area. Quite low concentrations (< 8 ng m⁻³) were found for the widely used DEHP except for the most contaminated sample (18.2 ng m⁻³). Location of the cities seems to affect more than area typology to the phthalates' distribution and concentrations.

Acknowledgements

The authors are grateful to Xunta de Galicia (10MSD164019PR, GRC2013-047) and Ministerio de Ciencia e Innovación (CGL2010-18145, CTM2013-48194-C3-2-R). M. F. A. is grateful to the FPU Program for her grant (AP2012-5486). The authors would like to thank P. Esperón (PTA2013-8375-I) for her support.

References

- Asiabi, H., Yamini, Y., & Shamsayei, M. (2016). Determination of ultra-trace amounts of chlorophenols in rain, tap and river water by an electrochemically controlled in-tube solid phase microextraction method. *RSC Advances*, 6(97), 94564-94573.
- Barnes, K. K., Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Zaugg, S. D., Meyer, M. T., & Barber, L. B. (2008). A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - I) Groundwater. *Science of the Total Environment*, 402(2-3), 192-200.
- Behnke, W., Nolting, F., & Zetzsch, C. (1987). The atmospheric fate of Di(2-ethylhexyl)phthalate, adsorbed on various metal oxide model aerosols and on coal fly ash. *Journal of Aerosol Science*, 18(6), 849-852.
- Bu, Y., Feng, J., Sun, M., Zhou, C., & Luo, C. (2016). Facile and efficient poly(ethylene terephthalate) fibers-in-tube for online solid-phase microextraction towards polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(18), 4871-4882.
- Close, E. D., Nwokeoji, A. O., Milton, D., Cook, K., Hindocha, D. M., Hook, E. C., et al. (2016). Nucleic acid separations using superficially porous silica particles. *Journal of Chromatography A*, 1440, 135-144.
- Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy.
- ECPI (2015). European Council for Plasticisers and Intermediates (ECPI) estimations based on IHS published data about the use of phthalate plasticizers in Europe in 2005-2014, http://www.plasticisers.org/en_GB/plasticisers/Orthophtalates
- EN 12341:2014 - Ambient air - Standard gravimetric measurement method for the determination of the PM₁₀ or PM_{2.5} mass concentration of suspended particulate matter.

- Fernández-Amado, M., Prieto-Blanco, M. C., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., & Prada-Rodríguez, D. (2016a). Strengths and weaknesses of in-tube solid-phase microextraction: A scoping review. *Analytica Chimica Acta*, 906, 41-57.
- Fernández-Amado, M., Prieto-Blanco, M. C., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., & Prada-Rodríguez, D. (2016b). A novel and cost-effective method for the determination of fifteen polycyclic aromatic hydrocarbons in low volume rainwater samples. *Talanta*, 155, 175-184.
- Fernández-Amado, M., Prieto-Blanco, M. C., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., & Prada-Rodríguez, D. (2017). A comparative study of extractant and chromatographic phases for the rapid and sensitive determination of six phthalates in rainwater samples. *Chemosphere*, 175, 52-65.
- Fu, P. Q., Kawamura, K., Pavuluri, C. M., Swaminathan, T., & Chen, J. (2010). Molecular characterization of urban organic aerosol in tropical India: Contributions of primary emissions and secondary photooxidation. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 10(6), 2663-2689.
- Gao, D. W., & Wen, Z. D. (2016). Phthalate esters in the environment: A critical review of their occurrence, biodegradation, and removal during wastewater treatment processes. *Science of the Total Environment*, 541, 986-1001.
- Glaser, J. A., Foerst, D. L., McKee, G. D., Quave, S. A., & Budde, W. L. (1981). 40 CFR, Part 136, Appendix B. *Environ. Sci. Technol.*, 15, 1426-1435.
- Gu, Z., Feng, J., Han, W., Wu, M., Fu, J., & Sheng, G. (2010). Characteristics of organic matter in PM_{2.5} from an e-waste dismantling area in Taizhou, China. *Chemosphere*, 80(7), 800-806.
- Heudorf, U., Mersch-Sundermann, V., & Angerer, J. (2007). Phthalates: Toxicology and exposure. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210(5), 623-634.

- Jiao, Z., Guo, Z., Zhang, S., Chen, H., Xie, H., & Zeng, S. (2015). Novel Extraction for Endocrine Disruptors in Atmospheric Particulate Matter. *Analytical Letters*, 48(8), 1355-1366.
- Jornet-Martínez, N., Antón-Soriano, C., & Campíns-Falcó, P. (2015). Estimation of the presence of unmetabolized dialkyl phthalates in untreated human urine by an on-line miniaturized reliable method. *Science of the Total Environment*, 532, 239-244.
- Jornet-Martínez, N., Muñoz-Ortuño, M., Moliner-Martínez, Y., Herráez-Hernández, R., & Campíns-Falcó, P. (2014). On-line in-tube solid phase microextraction-capillary liquid chromatography method for monitoring degradation products of di-(2-ethylhexyl) phthalate in waters. *Journal of Chromatography A*, 1347, 157-160.
- Kong, S., Ji, Y., Liu, L., Chen, L., Zhao, X., Wang, J., et al. (2013). Spatial and temporal variation of phthalic acid esters (PAEs) in atmospheric PM₁₀ and PM_{2.5} and the influence of ambient temperature in Tianjin, China. *Atmospheric Environment*, 74, 199-208.
- Li, J., Wang, G., Aggarwal, S. G., Huang, Y., Ren, Y., Zhou, B., et al. (2014). Comparison of abundances, compositions and sources of elements, inorganic ions and organic compounds in atmospheric aerosols from Xi'an and New Delhi, two megacities in China and India. *Science of the Total Environment*, 476-477, 485-495.
- Ma, J., Chen, L. L., Guo, Y., Wu, Q., Yang, M., Wu, M. H., et al. (2014). Phthalate diesters in Airborne PM_{2.5} and PM₁₀ in a suburban area of Shanghai: Seasonal distribution and risk assessment. *Science of the Total Environment*, 497-498, 467-474.
- Munch, J., Eichelberger, J., Behymer, T., Budde, W., 1995. Method 525.2. US EPA, Washington DC, USA.
- Muñoz-Ortuño, M., Argente-García, A., Moliner-Martínez, Y., Verdú-Andrés, J., Herráez-Hernández, R., Picher, M. T., et al. (2014). A cost-effective method for estimating di(2-ethylhexyl)phthalate in coastal sediments. *Journal of Chromatography A*, 1324, 57-62.

- Muñoz-Ortuño, M., Moliner-Martínez, Y., Cogollos-Costa, S., Herráez-Hernández, R., & Campíns-Falcó, P. (2012). A miniaturized method for estimating di(2-ethylhexyl) phthalate in bivalves as bioindicators. *Journal of Chromatography A*, 1260, 169-173.
- Nakamiya, K., Takagi, H., Nakayama, T., Ito, H., Tsuruga, H., Edmonds, J. S., et al. (2005). Microbial production and vaporization of mono-(2-ethylhexyl) phthalate from di-(2-ethylhexyl) phthalate by microorganisms inside houses. *Archives of Environmental and Occupational Health*, 60(6), 321-325.
- Prieto-Blanco, M. C., López-Mahía, P., & Campíns-Falcó, P. (2011). On-line analysis of carbonyl compounds with derivatization in aqueous extracts of atmospheric particulate PM10 by in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(30), 4834-4839.
- Prieto-Blanco, M. C., Moliner-Martínez, Y., López-Mahía, P., & Campíns-Falcó, P. (2012a). Ion-pair in-tube solid-phase microextraction and capillary liquid chromatography using a titania-based column: Application to the specific lauralkonium chloride determination in water. *Journal of Chromatography A*, 1248, 55-59.
- Prieto-Blanco, M. C., Alpendurada M. F., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., Machado S., & Gonçalves C. (2012b). Improving methodological aspects of the analysis of five regulated haloacetic acids in water samples by solid-phase extraction, ion-pair liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta*, 94, 90-98.
- Prieto-Blanco, M. C., Moliner-Martínez, Y., López-Mahía, P., & Campíns-Falcó, P. (2013). Determination of carbonyl compounds in particulate matter PM2.5 by in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography/mass spectrometry. *Talanta*, 115, 876-880.
- Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 Concerning the Registration, Evaluation, authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals agency, amending

Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC.

Romagnoli, P., Balducci, C., Perilli, M., Perreca, E., & Cecinato, A. (2016). Particulate PAHs and n-alkanes in the air over Southern and Eastern Mediterranean Sea. *Chemosphere*, 159, 516-525.

Salapasidou, M., Samara, C., & Voutsas, D. (2011). Endocrine disrupting compounds in the atmosphere of the urban area of Thessaloniki, Greece. *Atmospheric Environment*, 45(22), 3720-3729.

Salgueiro-González, N., De Alda, M. L., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., & Barceló, D. (2013). Determination of 13 estrogenic endocrine disrupting compounds in atmospheric particulate matter by pressurised liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(27), 8913-8923.

Salgueiro-González, N., López de Alda, M. J., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., & Barceló, D. (2015). Analysis and occurrence of endocrine-disrupting chemicals in airborne particles. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 66, 45-52.

Teil, M. J., Blanchard, M., & Chevreuil, M. (2006). Atmospheric fate of phthalate esters in an urban area (Paris-France). *Science of the Total Environment*, 354(2-3), 212-223.

Ventrice, P., Ventrice, D., Russo, E., & De Sarro, G. (2013). Phthalates: European regulation, chemistry, pharmacokinetic and related toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(1), 88-96.

Wang, G., Kawamura, K., Lee, S., Ho, K., & Cao, J. (2006). Molecular, seasonal and spatial distributions of organic aerosols from fourteen Chinese cities. *Environmental Science and Technology*, 40(15), 4619-4625.

- Wang, J., Ho, S. S. H., Ma, S., Cao, J., Dai, W., Liu, S., et al. (2016). Characterization of PM_{2.5} in Guangzhou, China: Uses of organic markers for supporting source apportionment. *Science of the Total Environment*, 550, 961-971.
- Wang, P., Wang, S. L., & Fan, C. Q. (2008). Atmospheric distribution of particulate- and gas-phase phthalic esters (PAEs) in a Metropolitan City, Nanjing, East China. *Chemosphere*, 72(10), 1567-1572.
- Wang, W., Zhang, Y., Wang, S., Fan, C. Q., & Xu, H. (2012). Distributions of phthalic esters carried by total suspended particulates in Nanjing, China. *Environmental Monitoring and Assessment*, 184(11), 6789-6798.
- Weschler, C. J. (1984). Indoor-outdoor Relationships for Nonpolar Organic Constituents of Aerosol Particles. *Environmental Science and Technology*, 18(9), 648-652.
- Wybraniec, S. (2006). Effect of tetraalkylammonium salts on retention of betacyanins and decarboxylated betacyanins in ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1127, 70-75.
- Xie, Z., Ebinghaus, R., Temme, C., Caba, A., & Ruck, W. (2005). Atmospheric concentrations and air-sea exchanges of phthalates in the North Sea (German Bight). *Atmospheric Environment*, 39(18), 3209-3219.
- Xie, Z., Ebinghaus, R., Temme, C., Lohmann, R., Caba, A., & Ruck, W. (2007). Occurrence and air-sea exchange of phthalates in the arctic. *Environmental Science and Technology*, 41(13), 4555-4560.
- Xie, Z., Selzer, J., Ebinghaus, R., Caba, A., & Ruck, W. (2006). Development and validation of a method for the determination of trace alkylphenols and phthalates in the atmosphere. *Analytica Chimica Acta*, 565(2), 198-207.

Figures captions

Fig. 1. a) Effect of gradient flow over the separation of BBP, DiBP and DnBP (final step of the optimization of separation) and b) Chromatogram of a standard of 20 ng mL⁻¹ with the final conditions

Fig. 2. Effect on PM extraction assisted by US of a) volume and time and b) addition of TEA 0.25%. Error bars = \pm SD (n=2)

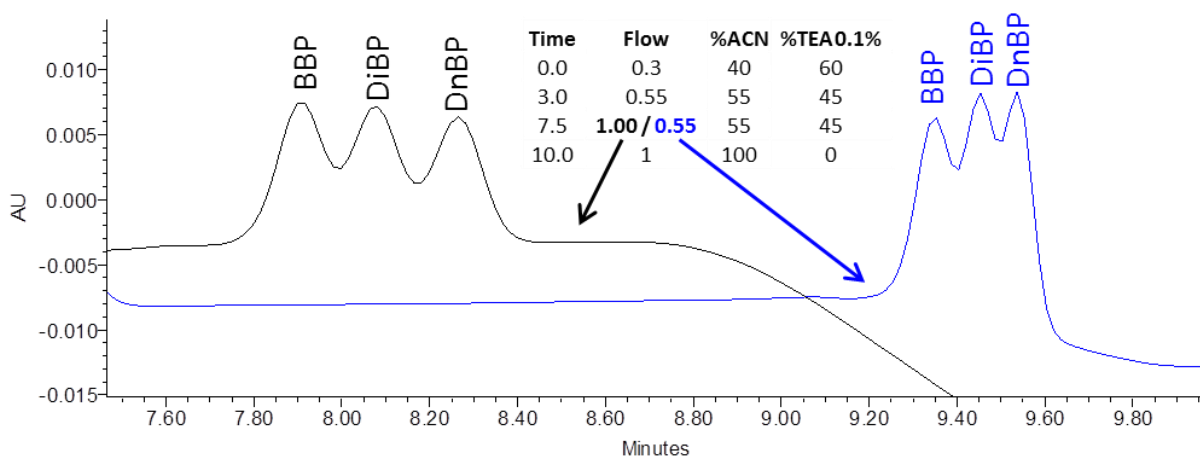
Fig. 3. Effect on IT-SPME of the addition of TEA as modifier and its concentration. Error bars = \pm SD (n=2)

Fig. 4. Effect of conditioning the capillary with TEA 0.1%. Black line: with conditioning; red line: without conditioning

Fig. 5. Chromatogram of a PM sample (SU1, black line) and an IT-SPME blank (red line)

Fig. 1.

a)



b)

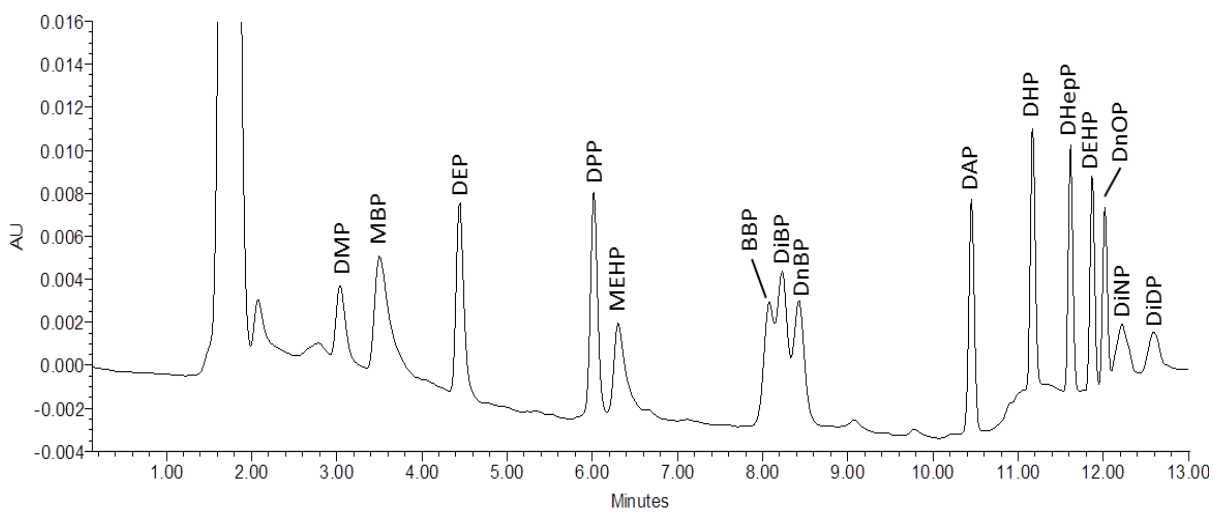
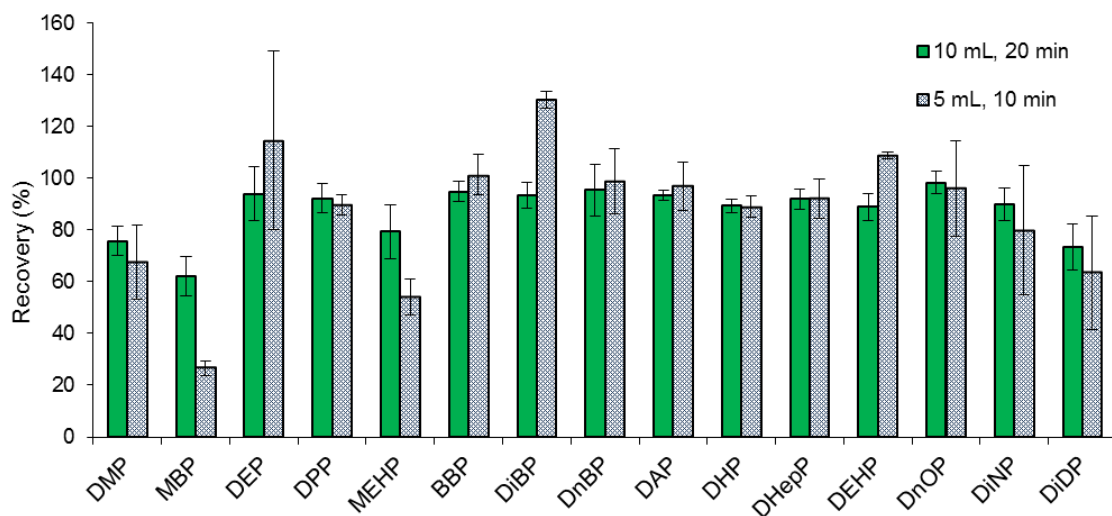


Fig. 2.

a)



b)

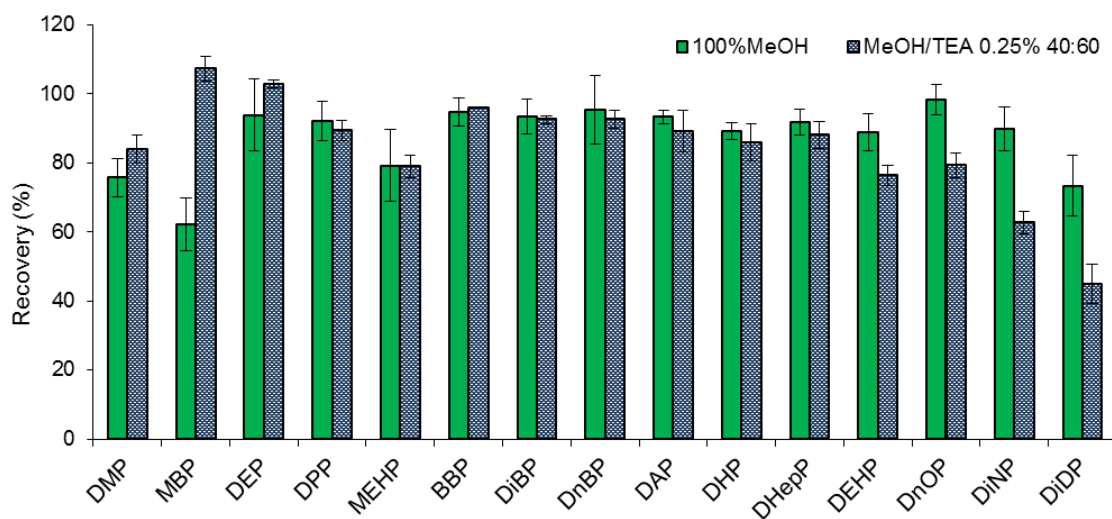


Fig. 3.

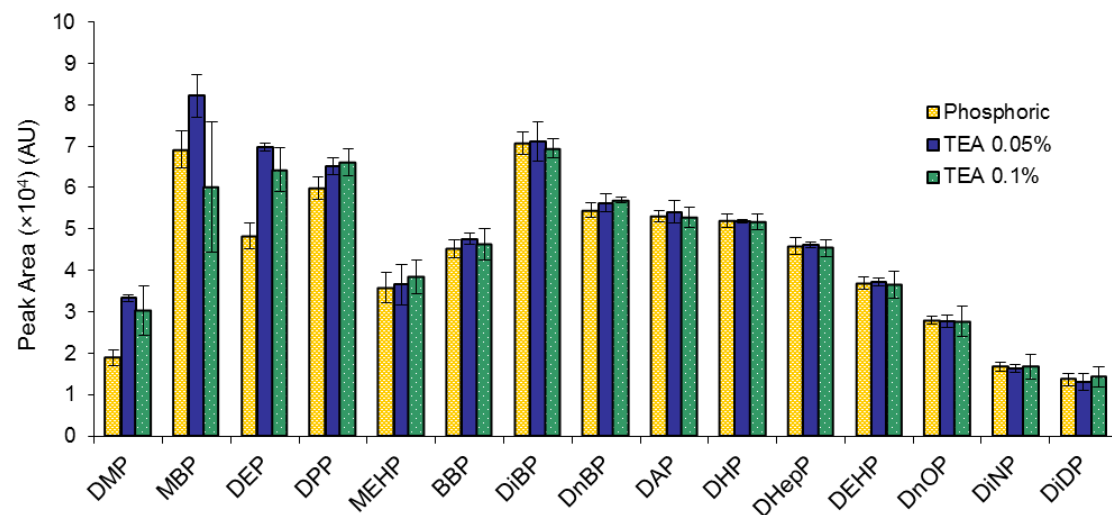


Fig. 4.

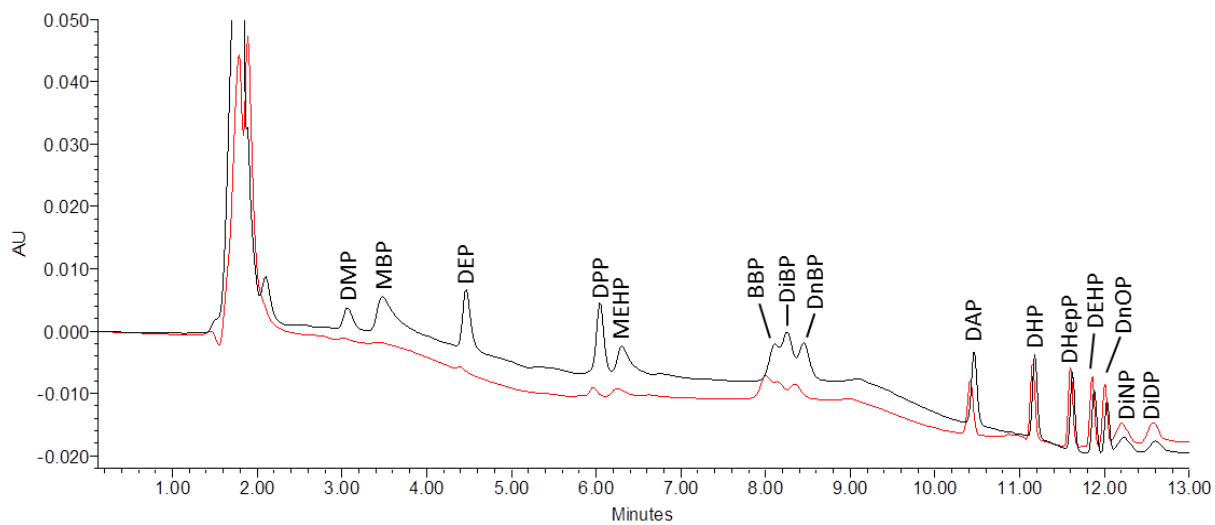


Fig. 5.

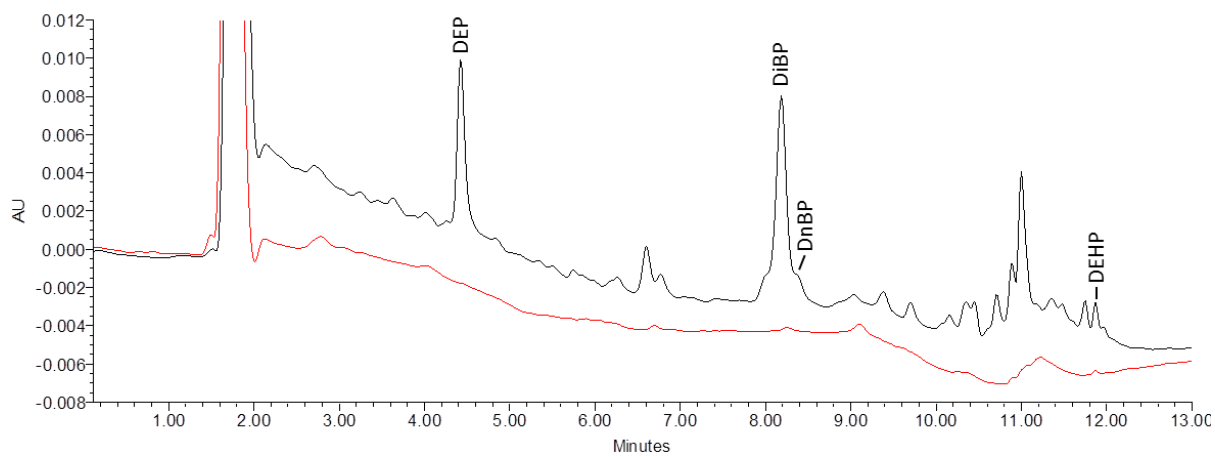


Table 1. Optimized gradient for the separation of the 15 phthalates.

Time	Flow	%ACN	%TEA 0.1% pH = 3
0	0.3	40	60
3.0	0.55	55	45
7.5	1.00	55	45
10.0	1	100	0
13.0	1	100	0
19	0.3	35	65

Table 2. Analytical parameters of the proposed method. Linear ranges and limits are in ng m⁻³. Inter-day reproducibility (given as %RSD) was calculated with a control standard of 20 ng mL⁻¹ in 40%MeOH/60%TEA 0.05%.

	Slope	Intercept	R²	Linear range	MDL	LOQ	RL	%RSD (n=15)
DMP	1233 ± 46	2816 ± 1225	0.9945	LOQ-60	0.52	1.65	1.65	11.4
MBP	3830 ± 67	-5611 ± 2443	0.9982	LOQ-116	0.22	0.71	21.9	14.6
DEP	2605 ± 86	9123 ± 3337	0.9946	LOQ-73	0.33	1.05	1.05	8.0
DPP	3115 ± 30	-173 ± 1112	0.9994	LOQ-73	0.14	0.44	1.17	4.2
MEHP	2309 ± 43	-4840 ± 2286	0.9975	LOQ-137	0.20	0.65	26.9	10.2
BBP	2641 ± 46	-2385 ± 2427	0.9979	LOQ-109	0.14	0.43	0.43	5.8
DIBP	3272 ± 32	2954 ± 1814	0.9994	LOQ-109	0.28	0.89	0.89	7.0
DnBP	2915 ± 36	-759 ± 1887	0.9989	LOQ-109	0.18	0.56	3.06	5.3
DAP	2738 ± 22	-1811 ± 1143	0.9996	LOQ-109	0.14	0.43	0.43	5.4
DHP	2721 ± 31	-2289 ± 1651	0.9991	LOQ-109	0.11	0.33	0.33	5.0
DHepP	2357 ± 21	-1212 ± 1087	0.9995	LOQ-109	0.14	0.43	5.39	4.6
DEHP	1873 ± 12	225 ± 636	0.9997	LOQ-109	0.18	0.56	3.00	5.1
DnOP	1431 ± 9	640 ± 459	0.9997	LOQ-109	0.09	0.27	0.27	6.3
DINP	841 ± 10	1152 ± 555	0.9992	LOQ-109	0.51	1.62	1.62	10.9
DiDP	691 ± 13	1425 ± 755	0.9977	LOQ-148	0.40	1.27	1.27	12.7

Table 3. Analytical recoveries (%R) \pm SD ($n = 6$) for the whole procedure (PM filter spiked with 0.5 μg of the analytes = 20 ng mL^{-1} for the IT-SPME), and absolute recoveries for the IT-SPME step (%R abs.) \pm SD ($n = 3$).

	%R whole procedure	IT %R abs. 50 ng	IT %R abs. 100 ng	IT %R abs. Average
DMP	76 \pm 5*	8 \pm 1	5 \pm 1	7 \pm 3
MBP	62 \pm 8	16 \pm 1	33 \pm 4	25 \pm 11
DEP	94 \pm 10	23.5 \pm 0.3	23 \pm 1	23.3 \pm 0.2
DPP	92 \pm 6	32 \pm 1	29 \pm 2	30 \pm 2
MEHP	79 \pm 10	19 \pm 2	21 \pm 3	20 \pm 1
BBP	95 \pm 4	28 \pm 2	29 \pm 2	28 \pm 1
DiBP	93 \pm 5	42 \pm 2	36 \pm 2	39 \pm 4
DnBP	95 \pm 10	37 \pm 1	36 \pm 2	36 \pm 1
DAP	93 \pm 2	34 \pm 2	33 \pm 2	33 \pm 1
DHP	89 \pm 2	32 \pm 2	32 \pm 2	31.8 \pm 0.3
DHepP	92 \pm 4	32 \pm 2	31 \pm 2	31 \pm 1
DEHP	89 \pm 5	30 \pm 2	29 \pm 2	29 \pm 1
DnOP	98 \pm 4	28 \pm 2	26 \pm 2	27 \pm 1
DiNP	90 \pm 6	22 \pm 2	20 \pm 3	21 \pm 1
DiDP	73 \pm 9	18 \pm 2	16 \pm 2	17 \pm 1

* $n=5$

Table 4. Levels (ng m⁻³) of phthalates obtained for the analyzed PM₁₀ samples.

	SU1	SU2	SU3	SU4	SU5	U1	U2	T-AC1	T-SC1	T-SC2	T-C1	T-C2
PM ₁₀ (µg/m ³)	11	15	13	10	5	42	19	25	24	16	29	25
DMP	< 0.52	< 0.52	< 0.52	< 0.52	< 0.52	< 0.52	< 0.52	< 0.52	< 0.52	< 0.52	< 0.52	< 0.52
MBP	< 0.22	< 0.22	< 0.22	< 0.22	< 0.22	< 0.22	< 0.22	< 0.22	< 0.22	< 0.22	< 0.22	< 0.22
DEP	15.81	2.42	3.54	9.31	11.42	< 0.33	< 0.33	< 0.33	2.73	7.48	< 0.33	3.43
DPP	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14
MEHP	< 0.20	< 0.20	< 0.20	< 0.20	< 0.20	< 0.20	< 0.20	< 0.20	< 0.20	< 0.20	< 0.20	< 0.20
BBP	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14
DiBP	20.44	30.56	51.55	14.11	24.93	14.72	20.57	10.11	202.86	37.50	3.23	17.42
DnBP	1.89*	1.42*	3.18	0.98*	1.60*	25.71	9.17	5.37	21.69	1.48*	3.28	18.75
DAP	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14
DHP	< 0.11	< 0.11	< 0.11	< 0.11	< 0.11	< 0.11	< 0.11	< 0.11	< 0.11	< 0.11	< 0.11	< 0.11
DHepP	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14	< 0.14
DEHP	2.06*	2.65*	1.71*	1.78*	1.39*	3.95	5.17	2.84*	18.23	n.d.	7.98	7.53
DnOP	< 0.09	< 0.09	< 0.09	< 0.09	< 0.09	< 0.09	< 0.09	< 0.09	< 0.09	< 0.09	< 0.09	< 0.09
DINP	< 0.51	< 0.51	< 0.51	< 0.51	< 0.51	< 0.51	< 0.51	< 0.51	< 0.51	< 0.51	< 0.51	< 0.51
DiDP	< 0.40	< 0.40	< 0.40	< 0.40	< 0.40	< 0.40	< 0.40	< 0.40	< 0.40	< 0.40	< 0.40	< 0.40
ΣPAEs	40.19	37.05	59.98	26.17	39.33	44.38	34.92	18.32	245.51	46.46	14.50	47.12

* Estimated value (< RL); n.d. Not determined due to an interfering peak.

Table 5. Characteristics of methods for determination of phthalates in particulate matter reported in the literature and levels found (continues).

Phthalates	Steps	Organic solvent vol.	Deter. technique	LOD (ng m ⁻³)	Levels (ng m ⁻³)	Sampling period and site, number of samples	Type of sample	Reference
DMP, DEP, diallylphthalate, DPrP, DnBP, DiBP, BBP, butyloctyl phthalate, DHePp, DEHP, DnOP, DiOP, DiNP, DiDP	1. Soxhlet extraction (40 h) 2. SPE purification 3. Concentration	>70 mL	GC-MS	0.0004-0.0013	0.05-17.9 (urban) and 0.01-7.8 (suburban). DnBP is the major	Apr, Jul and Oct 2005 and Jan 2006, Nanjing (Jiangsu, China), n=170	12h-TSP (High volume). Urban and suburban	Wang et al., 2008
BBP, DnBP, DiBP, DEHP, butyl isobutyl phthalate	1. US Extraction 2. Concentration 3. Derivatization (3h, for other analytes)	n.e.	GC-MS	0.26 for DEHP	3.3-164 (Xian, 24h) and 12-689 (New Delhi, 24h). DEHP is the major	Jan-Feb 2009, Xian (China) and Nov 2006-Feb 2007 and Jan 2008, New Delhi (India). n=28 (n=15 for 24h)	TSP (day and night) (High and medium volume). Urban	Li et al., 2014
DMP, DEP, diallyl phthalate, butyloctyl phthalate, BBP, DPP, DnBP, DiBP, DHePp, DEHP, DnOP, diisooctyl phthalate, DiNP, DiDP	1. US Extraction 2. Filtration 3. Concentration 4. SPE purification 5. Concentration 6. Redissolution	> 100 mL	HPLC-UV	0.01-0.06 ng	<LOD-150.0. DnBP is the major	Apr 2009-Apr 2010, 10 sites in Nanjing (China), n=450	TSP. Different types of area	Wang et al., 2012
DMP, DEP, DnBP, BBP, DEHP, DnOP	1. Soxhlet extraction (16 h) 2. SPE purification 3. Concentration 4. Derivatization (1 h, for other analytes) 5. Volume adjustment	190 mL	GC-MS	5-34.4 ng	<LOD-1.2. DEHP is the major	29 Feb - 10 Mar 2004, North Sea, n=6	TSP (High volume)	Xie et al., 2005
DMP, DEP, DnBP, DiBP, BBP, DEHP	1. Soxhlet extraction (24 h) 2. SPE purification 3. Concentration 4. Volume adjustment	> 85 mL	GC-MS	0.0002-0.024	0.001-0.735. DEHP is the major	Summer 2004, The Arctic, n=6	TSP (High volume)	Xie et al., 2007

Table 5. Characteristics of methods for determination of phthalates in particulate matter reported in the literature and levels found (continues).

Phthalates	Steps	Organic solvent vol.	Deter. technique	LOD (ng m ⁻³)	Levels (ng m ⁻³)	Sampling period and site, number of samples	Type of sample	Reference
DMP, DEP, DnBP, BBP, DEHP, DnOP	<ol style="list-style-type: none"> 1. Volatilization-condensation extraction (12 h) 2. Concentration 3. Redissolution 	100 mL	GC-ECD	0.025-0.075	<LOD-10.4. DEHP is the major	May 2002-Apr 2003, Paris (France), n=20	TSP (High volume). Urban	Teil et al., 2006
DMP, DEP, DnBP, DiBP, BBP, DEHP, DnOP	<ol style="list-style-type: none"> 1. Soxhlet extraction (16 h) 2. Evaporation 3. Storage for water residues elimination (overnight) 4. SPE purification 5. Evaporation 6. Derivatization (for other analytes) 	210 mL	GC-MS	0.001-0.013	<LOD-6.85. DnBP and DiBP are the major.	GKSS Research Centre (Germany) and North Sea, n=16	TSP (High volume). Suburban and ocean	Xie et al., 2006
DEP, DnBP, DEHP	<ol style="list-style-type: none"> 1. Microwave-assisted microsolid phase extraction (15 min) 2. Rinsing and drying 3. Desorption with US (25 min) 4. Filtration 5. Evaporation by N₂ stream 6. Redissolution 	~ 10 mL	HPLC-UV	2-5.7	0.57-5.56 (urban), 4.5-11.9 (business center), 19.2-68.8 (industrial). DEHP is the major	Dongguan (China), n=3	24h-TSM (High volume). Urban, business center and industrial sites	Jiao et al., 2015
DMP, DEP, DnBP, DiBP, BBP, DEHP	<ol style="list-style-type: none"> 1. US extraction (3x10 min) 2. Concentration 3. Derivatization (3 h, for other analytes) 	15 mL	GC-MS	n.e.	0.3-1748. DEHP is the major.	Jan, Jun and Jul 2003, 14 cities (China), n=56	24h-PM _{2.5} (mini-volume)	Wang et al., 2006
DMP, DEP, DnBP, DEHP	<ol style="list-style-type: none"> 1. Spiking with surrogate standard (overnight) 2. PLE (3x8 min) 3. Concentration by N₂ stream evaporator 4. Redissolution 	n.e.	LC-MS/MS	0.002-0.010	<LOQ-35.3 (suburban), <LOD-10.2 (urban) and 0.221-54.7 (industrial). DnBP is the major	La Coruña (Spain), n=8	24h-PM _{2.5} (High volume). Industrial, urban and suburban	Salgueiro-González et al., 2013

Table 5. Characteristics of methods for determination of phthalates in particulate matter reported in the literature and levels found (continues).

Phthalates	Steps	Organic solvent vol.	Deter. technique	LOD (ng m ⁻³)	Levels (ng m ⁻³)	Sampling period and site, number of samples	Type of sample	Reference
DMP, DnBP, DiBP, DEHP, DnOP	1. US Extraction (3x15 min) 2. Filtration 3. Concentration 4. Redissolution	180 mL	GC-MS	n.e.	0.02-191.82. DEHP is the major	Jul 2006 and Jan 2007, Taizhou (China), n=26	24h-PM _{2.5} (High volume). Urban	Gu et al., 2010
DMP, DEP, BBP, DnBP, DEHP, DnOP, bis(2-ethylhexyl)adipate	1. Thermal desorption	-	GC-MS	0.023-0.822 ng/sample	<LOD-811 (winter) and <LOD-1242 (summer). DnBP is the major	Winter and summer 2012/2013, Guangzhou (China), n=24	24h-PM _{2.5} (High volume). Urban	Wang et al., 2016
DnBP, BBP, DEHP, DHep, DNP, DDP	1. Thermal desorption	-	GC-MS	n.e.	0.2-2.2 (outdoor) and 0.2-55 (indoor). DEHP is the major	Autumn-Winter 1981-1982 (Wichita, USA); Winter-Spring 1982 (Lubbock, USA), n=36	PM _{2.5} and PM _{2.5-15} (84h outdoor and 168h indoor). Offices	Weschler, 1984
DMP, DEP, BBP, DnBP, DEHP, DnOP	1. US Extraction (2x15 min) 2. Filtration 3. Concentration by N ₂ stream 4. Volume adjustment	20 mL	GC-MS	0.002-0.016	<LOD-191.93 (PM _{2.5}) and <LOD-283.13 (PM ₁₀). DEHP is the major	Jan, Apr and Jul 2010, 7 sites in Tianjin (China), n=150	24h-PM _{2.5} and PM ₁₀ (medium volume). Urban	Kong et al., 2013
DMP, DEP, DiBP, DnBP, BBP, DHP, DCHP, DEHP, DnOP	1. Spiking with deuterated standards and equilibration (3h) 2. Extraction assisted by US and shaking in an orbital shaker (3x (30+20) min) 3. Centrifugation (5 min) 4. Concentration by N ₂ stream	12 mL	GC-MS	0.05 (LOQ)	<LOQ-441 (PM ₁₀) and <LOQ-154 (PM _{2.5}). DEHP, DnBP and DiBP are the major phthalates	Oct 2011-Aug 2012, Shanghai (China), n=77	24h-PM _{2.5} and PM ₁₀ (High volume sampler). Suburban residential area	Ma et al., 2014

Table 5. Characteristics of methods for determination of phthalates in particulate matter reported in the literature and levels found.

Phthalates	Steps	Organic solvent vol.	Deter. technique	LOD (ng m ⁻³)	Levels (ng m ⁻³)	Sampling period and site, number of samples	Type of sample	Reference
DMP, DEP, DnBP, BBP, DEHP, DnOP	<ol style="list-style-type: none"> 1. US Extraction (3x30 min) 2. SPE Purification 3. Evaporation 4. Redissolution 	n.e.	GC-MS	n.e.	<LOD-45 (traffic) and <LOD-6.50 (industrial). DEHP is the major	Jan-Feb 2007, Thessaloniki (Greece), n=20	24h-PM ₁₀ (Low volume). Urban (traffic and industrial)	Salapavidou et al., 2011
DMP, DEP, DnBP, DiBP, DEHP	<ol style="list-style-type: none"> 1. US Extraction (3x10 min) 2. Filtration 3. Concentration 4. Derivatization (3 h, for other analytes) 	n.e.	GC-MS	n.e.	<LOD-373 (winter) and 0.04-579 (summer). DEHP is the major	Jan, Feb and May 2007, Chennai (India), n=49	PM ₁₀ (day and night) (High volume)	Fu et al., 2010
DMP, DEP, DiBP, DnBP, BBP, DEHP	<ol style="list-style-type: none"> 1. US Extraction (3x20 min) 2. Volume reduction 3. Fractionation in column 4. Evaporation 5. Redissolution 	n.e.	GC-MS	n.e.	0.01-31. DEHP is the major in most sampling points (DEP, DiBP and DnBP in the other)	27 Jul - 11 Aug 2013, Southern and Eastern Mediterranean Sea, n=40	PM ₁₀ (High volume sampler)	Romagnoli et al., 2016
DMP, DEP, DPP, DiBP, DnBP, DAP, DHP, DHeP, DEHP, DnOP, DiNP, DiDP, BBP, MBP, MEHP	<ol style="list-style-type: none"> 1. US Extraction (20 min) 2. Filtration 3. IT-SPME 	10 mL	HPLC-DAD	0.09-0.51	<LOD-203. DiBP is the major	5 sites in Galicia (NW Spain), n=12	24h-PM ₁₀ (High volume). Urban, suburban and traffic sites	This work

ANEXO V

Interrelationships between major components of PM₁₀ and sub-micron particles: Influence of Atlantic air masses
(Manuscript for the submission to Atmospheric Environment).

INTER-RELATIONSHIPS BETWEEN MAJOR COMPONENTS OF PM₁₀ AND SUB-MICRON PARTICLES: INFLUENCE OF ATLANTIC AIR MASSES

M. Fernández-Amado¹, M.C. Prieto-Blanco¹, P. López-Mahía¹, M. Piñeiro-Iglesias¹, S. Muniategui-Lorenzo¹, D. Prada-Rodríguez¹, C. Alves², D. Custódio², V. Esteves², T. Nunes²

¹ Universidade da Coruña, Grupo QANAP, Instituto Universitario de Medio Ambiente (IUMA), Centro de Investigacións Científicas Avanzadas (CICA), Departamento de Química Analítica, Facultade de Ciencias, Zapateira, 15071 A Coruña, Spain.

² Department of Environment & Centre for Environmental and Marine Studies (CESAM), University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal.

Abstract

The characterization of 140 particulate matter (PM₁₀) samples collected from April 2014 to January 2015 in a suburban area in Northwestern Spain was performed. The carbonaceous fraction, including water soluble organic carbon (WSOC), the major ions, and carbon and nitrogen isotopic ratios were determined. The data on ultrafine particles for one season were also recorded. A comparison with reported values, the recognition of seasonal trends, and the determination of correlations between parameters were carried out in order to identify the possible sources of pollution. The selected sampling site has a significant marine contribution, as it is located very close to the Atlantic Ocean, and the influence of these conditions on the PM of the site was studied. PM₁₀ concentrations varied from 2 to 35 µg/m³, with a mean value of 9 µg/m³. Organic (OC) and elemental carbon (EC) concentrations were within the reported range for suburban areas in Spain. Seasonal variations in both concentrations and correlations between parameters were detected, with several species with higher levels in winter-spring, and others with higher levels in spring-summer. Nanoparticle modes showed correlation with all the carbonaceous fractions and some meteorological parameters. Their correlations suggested the possible influence of a few industrial sources, depending on the predominant winds. Isotopic data indicated the presence of a significant input from domestic heating during the cold period and primary biogenic input during spring, reinforced by OC/EC ratios and WSOC values. These parameters also suggested a significant presence of secondary organic aerosol in the area, except for spring. A high contribution of inorganic secondary aerosol was also observed, with ammonium sulfate (all seasons), sodium nitrate (except in autumn) and potassium sulfate (except in spring) being the main species. The Atlantic Ocean influence was observed by a contribution of sea-salt to PM₁₀ of 19.1% on average, up to 84.5% in some days.

Keywords

Atmospheric particulate matter, carbonaceous fractions, isotopic analyses, sub-micron particles, Atlantic air masses

1. Introduction

Among the components of PM, carbonaceous matter is usually an important fraction, accounting for 10-43% of the total PM mass. Carbonaceous PM is highly related to the effects over health, climate and visibility produced by the particulate matter. Carbonaceous PM is classified into organic carbon (OC) and elemental carbon (EC). Organic carbon may be composed of primary OC, directly emitted from different sources (marine or vegetation origin, biomass burning and fossil-fuel combustion), and secondary OC. The latter is produced in the atmosphere by oxidation of the primary organic compounds (including volatile organic compounds, VOCs) or by gas-particle condensation on the particulate. EC, which only has a primary origin, is considered a marker of primary emissions from traffic, and to a lesser extent of biomass burning. OC/EC ratios and their minimum values $[(OC/EC)_{min}]$ are used to assess the sources of the carbonaceous fraction in PM (Pio et al., 2011).

Water soluble organic carbon (WSOC) is the soluble fraction of OC, composed of soluble and oxidized organic compounds. It has both natural and anthropogenic sources, as some primary organic compounds of both origins are part of WSOC. In addition, WSOC is strongly linked to aerosol ageing and several WSOC components are believed to be oxidation products of atmospheric reactions (Zong et al., 2016; Jafrezzo et al., 2005).

Other important components of PM are ions. The major ions have both natural and anthropogenic origin, including an important contribution of secondary inorganic aerosol (SIA), which accounts for the largest part of ions fraction in PM. SIA (including species NO_3^- , NH_4^+ , SO_4^{2-} ...) is formed in the atmosphere through chemical and/or physical transformations of precursor gases (SO_2 , NO_2 and NH_3). Other important ions have a marine origin (Cl^- , Na^+ , Mg^{2+}), are linked to biomass burning (K^+) or have mainly a mineral contribution (Ca^{2+}) (Moreda-Piñeiro et al., 2015; Blanco Heras, 2009).

Stable isotopic compositions are widely used in the evaluation of the contribution of different sources to PM. The stable isotopic composition of an element is expressed in delta notation, parts per thousand units. The higher the delta value, the higher is the enrichment of the sample in the heavier isotope (López-Veneroni, 2009). Negative values for delta are obtained when the sample contains lighter isotopes than the standard. $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ are really useful in understanding the contribution of several sources to organic aerosols. Carbon isotopic ratios provide information about the carbon cycle and long-range transport. Moreover, they are very useful to distinguish between marine and terrestrial sources, as marine carbon is enriched in the heavier isotope. $\delta^{13}C$ also helps to identify the presence of SOA. In turn, nitrogen isotopic signatures allow for distinguishing between particles derived from NO_x originated in high and low temperature processes, which helps to distinguish between diesel and coal sources. The combined data of both analyses allow identifying (and distinguishing between) different sources, including road traffic,

industrial, diesel, fuel oil and biomass burning (Mkoma et al., 2014; Dusek et al., 2013; Mašalaitė et al., 2012; Górká et al., 2012; Jung and Kawamura, 2011).

Linking meteorological parameters with characterization data for PM has been used for years to gain a better understanding of sources and atmospheric processes. Weather has important effects over air quality, due to the washout produced by precipitation or the photochemical degradation caused by solar radiation. Weather conditions also affect kinetics in secondary aerosol formation reactions and have a critical part in dispersion and transport of contaminants. Wind direction dominates the impact of local sources, whereas backward trajectories, which estimate the origin of air masses, are really useful to assess long-range transport (Masiol et al., 2017).

Size distribution of the atmospheric particles is a very important property of aerosols. It is related to the origin and journey of the particles and also has a critical influence over health effects of PM. The smaller the size, the more dangerous the particles are, as they have a higher degree of penetration in the respiratory system and also a longer residence time in the atmosphere. Nanoparticles or submicron particles are strictly nanometre-sized particles ($<1\ \mu\text{m}$), but different definitions for the term nanoparticles are used in the literature, and usually only a smaller size is considered. Despite the fact that nanoparticles refer sometimes to particles with size $<100\ \text{nm}$ only, there are several authors who considered nanoparticles only those with a size below $300\ \text{nm}$. This size range includes more than 99% of the total number concentration of particles (N) in the ambient atmospheric environment (despite the fact that their contribution to the total mass of particles is lower due to their small size). In turn, nanoparticles are usually classified in three modes: nucleation ($1\text{-}30\ \text{nm}$), Aitken ($20\text{-}100\ \text{nm}$) and accumulation ($90\text{-}300\ \text{nm}$). Nucleation mode particles, whose life time in the atmosphere is relatively short, have no primary contribution, but they are formed through gas-to-particle conversion in the atmosphere. Aitken mode particles are formed due to growing or coagulation of the nucleation mode particles, although primary emissions (such as combustion sources) also contribute to the Aitken mode. Finally, accumulation mode particles are derived from combustion processes, as well as through coagulation of smaller sized particles. They are carbonaceous agglomerates with different components due to their formation mechanism. Although washout is an efficient removal mechanism for this type of particles, neither diffusion nor settling are effective for atmospheric removal of this mode, thus accumulation mode particles have a longer atmospheric life time (days to weeks) than the other modes (Kumar et al., 2010; Gómez-Moreno et al., 2011).

The marine influence over PM contamination is well-known and has been widely observed, affecting the composition and size of particles. Nevertheless, this influence can vary depending on the coast location. In Europe, significant differences between the sites near the Atlantic Ocean and those close to other water masses (such as, for instance the Mediterranean or North Seas) have been reported (Amato et al., 2016a; Manders et al., 2009). The characteristics of the Atlantic Ocean produce unusual effects on PM of the near sites, which is extremely interesting in order to fully understand the marine influence on air quality. The sampling site selected for this work has a high influence from the Atlantic Ocean, allowing the study on its effect on the atmospheric particulate matter. Therefore,

the aim of this work is to characterize the PM from an area highly influenced by the Atlantic Ocean and to identify the main sources contributing to the atmospheric pollution in the area, in order to eventually evaluate the effect of the Atlantic Ocean on the atmospheric environment of the coastal areas of Western Europe.

2. Experimental

2.1. Description of sampling

A Digital DHA-80 high-volume sampler (Digital Elektronik AG, Hegnau, Switzerland) was used for the collection of particulate matter (PM₁₀) on quartz-fiber filters ($\phi = 150$ mm, MK360 Munktell, Falun, Sweden) for 24 h periods. Mass determination was performed according to the EN 12341 European Norm (EN 12341:2014). Samples were stored at controlled temperature and humidity conditions until further analysis. The sampling site is the University Institute of Environment (*Instituto Universitario de Medio Ambiente, IUMA*). It is located in a suburban area in Liáns, Oleiros (Northwestern Spain), in a residential area surrounded by small forests. The possible pollution sources include A Coruña (medium-size city, 5 km), the sea (500 m), a nearby road (500 m, with low traffic, ~ 25000 vehicles per day, increased during rush hours and during summer due to the close beaches), two power stations (25 and 60 km), a solid waste incinerator (25 km), an airport (6 km), a petrochemical refinery (10 km), a harbor (4 km) and two small industrial zones (10 km).

Climate of zone is humid oceanic, with low thermal oscillation and abundant rainfall throughout the whole year. In general, winds are weaker during the night than during the day, with maximum values around noon. The prevailing winds are from the north in summer and south in winter ([Gómez-Carracedo et al., 2015](#); [Moreda-Piñeiro et al., 2015](#)).

Meteorological parameters (wind speed and direction, precipitation, solar radiation, temperature and pressure) were recorded. Backward trajectories were calculated by using the NOAA's HYSPLIT model ([Stein et al., 2015](#)).

2.2. Analytical methods for chemical characterization

The organic carbon (OC) and elemental carbon (EC) in PM₁₀ samples were measured by the thermal-optical method developed by the University of Aveiro and previously described ([Castro et al., 1999](#); [Pio et al., 2011](#)). This method allows quantifying carbonaceous matter in aerosols by using a system which comprises a quartz tube with two heating zones, a pulsed laser and a non-dispersive infrared (NDIR) CO₂ analyzer.

For WSOC determination, depending on the sample, 4 circles ($\phi = 9$ mm) or 2 circles ($\phi = 19$ mm) were extracted by ultrasonication with 10 mL of ultrapure water for 20 minutes. Extracts were filtered through syringe filters of PVDF 0.2 μm (Whatman, Maidstone, UK) or 0.45 μm (Millipore, Darmstadt, Germany) prior to carbon measurements in a TOC-VCPH (Shimadzu, Kyoto, Japan) or a TOC 5000A (Shimadzu, Kyoto, Japan).

For the determination of anions and cations, 6 circles ($\phi = 7$ mm) of each sample were extracted with 3 mL of Milli-Q water by ultrasonication for 15 min. Poured supernatant was analyzed by capillary electrophoresis using a HP 3D CE (Agilent, Palo Alto, CA, USA) with a contactless conductivity detector (TraceDec, IST, Strasshof, Austria).

Elemental analysis (C, N, S and H) was carried out on the filter with a Carlo Erba Instruments EA 1108 / ThermoQuest Flash EA 1112. Carbon and nitrogen isotopes analyses were performed using a stable Isotope Ratio Mass Spectrometer (IRMS) calibrated by international certified reference standards (NBS-22, IAEA-CH-6 and USGS 24). The filters were analysed with an elemental analyzer FlashEA 1112 connected to the stable isotope ratio mass spectrometer Thermo Finnigan Delta Plus through a Conflo II interface. Acetanilide was used as laboratory standard and the references were VPDB (*Vienna Pee Dee Belemnite*) for $\delta^{13}\text{C}$ and air for $\delta^{15}\text{N}$.

Number of particles was continuously measured in the sampling site by a Scanning Mobility Particle Sizer (SMPS) model 3936 (TSI, Shoreview, MN, USA) during the first sampling campaign (April-June 2014). Particles were classified by an electrostatic classifier TSI 3080 using a differential mobility analyzer TSI 3081. Concentrations were measured with a water condensation particle counter (TSI 3785).

For the analysis of metals, the procedure described in [Moreda-Piñeiro et al. \(2014\)](#) was followed. The analytical determination was carried out using a quadrupole ICP-MS Thermo X-series 2 (Thermo, Waltham, MA, USA). Metal concentrations were used to calculate the marine contribution of each element as follows: sea-salt sodium (ssNa) as $\text{Na} - 0.348 \times \text{Al}$, $\text{ssMg} = 0.119 \times \text{ssNa}$, $\text{ssK} = 0.037 \times \text{ssNa}$, $\text{ssCa} = 0.038 \times \text{ssNa}$. Sea-salt sulfate (ssSO_4^{2-}) was calculated as $0.25 \times \text{Na}^+$ concentration ([Amato et al., 2016b](#); [Querol et al., 2001](#)).

Statistical analyses (ANOVA, differences between means and correlations) were performed with IBM SPSS Statistics 23 software.

3. Results and discussion

3.1. PM₁₀, carbonaceous fraction, N and S and their interrelationships

The mean values and ranges for PM₁₀, carbonaceous fractions and elemental N and S are shown in Table 1. Likewise, their temporal profile (on a weekly basis) in the studied period is depicted in Fig. 1. In all seasons, the mean PM₁₀ concentrations were lower than those recorded at the same sampling site from 2003 to 2010 (13-18 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) and in Spanish rural background areas from 1999 to 2005 (14-22 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) ([Juncal Bello, 2012](#); [Gómez-Carracedo et al., 2015](#); [Alves et al., 2010](#)). Levels in autumn were lower than in any other season ($p = 0.011$). Besides, in summer, the upper limit of the variability range was higher due to a single value (35 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) recorded in September 3rd, 2014, which corresponded to a day with dominant regional backward trajectory. Seasonal variations were found either for elemental nitrogen and sulfur, or for the carbonaceous fraction. For nitrogen and elemental sulfur, the concentration levels in winter (although higher than in autumn) were significantly lower than those in spring and summer.

In contrast, total carbon showed an inverse trend, with the highest concentrations measured during the cold period. For these parameters, in summer the upper limit also corresponded to the day of the regional backward trajectory and its consecutive days. Total carbon represented a higher mass rate of PM₁₀ in winter (38% on average) and showed a high variability in all seasons (especially in autumn). When looking in more detail at weekly temporal variations, the highest TC and OC values were recorded in the first week of January and matched relative maximum levels of nitrogen and sulfur profiles. A maximum value for all the carbon fractions, concomitant with spikes for N and S, was noticed in the second half of November. Nevertheless, no significant peak for PM₁₀ was observed during those weeks. This maximum value coincided with the wind direction from urban and industrial areas, along with an African dust outbreak. On the contrary, the main maximum value for PM₁₀, in September, seemed to be reflected in carbon (TC and OC), nitrogen and sulfur levels. Temporal variation profiles for elemental sulfur and gaseous SO₂ seem similar, but one week delayed for the latter (Fig. S1a). Comparing means for both S and SO₂ for each backward trajectory (Fig. S1b), it seems that air masses from Europe led to some of the highest levels for both parameters, whilst some of the lowest means matched air masses from the Mediterranean.

Concerning the components of TC, elemental carbon also showed the highest values in winter, possibly due to a higher activity of fossil combustion processes due to a high demand of energy in this period (see Table 1 and Fig. 1). OC had a similar trend to that of TC: levels in winter and spring were higher than in summer-autumn. As OC is the main fraction of TC, it is reasonable to believe that OC variations dominate the TC trend. OC/EC ratios showed a high variability and were higher in the warm period, due to the lower levels of EC, and especially in spring, when OC concentrations were among the highest. The high contribution of biogenic sources in this period of growing vegetation may explain these results, as well as the higher photochemical formation of SOA during spring and summer. In contrast, OC/EC ratios between 1 and 3 were frequent in autumn, as the lowest OC/EC ratios were gathered in November and December (and August 12-14th). These unusually low OC/EC ratios for a suburban area may be related to a low photochemical activity during that period and limited ageing of the aerosol, which reduce the contribution of SOA. Local emissions were probably dominant during this period, including traffic, domestic heating and stubble burning. Considering all the samples analyzed, 89% of them had OC/EC ratios over 2, whereas 75% presented OC/EC values over 3. This implies a limited contribution of fossil-fuel combustion, which would have led to OC/EC ratios near 1. Therefore, most of the organic carbon must be the result of other factors such as biomass burning, biogenic contribution and/or presence of secondary aerosol (Pio et al., 2011). In the literature, 2 to 5 ratios were described for urban background sites (Custódio et al., 2016).

The mean levels found for carbonaceous fractions of PM₁₀ were in the ranges reported in the literature (Querol et al., 2013) for Spanish rural areas (TC, 1.8-2.6 µg/m³), urban background (OC, 1.8-4.5 µg/m³) or between both (EC, 0.2-0.3 µg/m³ for rural areas and 0.6-0.9 µg/m³ for urban background), as expected for a suburban area. The EC mean concentration (0.46 µg/m³) was very similar to the reported concentration for a suburban

area of Athens (Greece) ($0.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$, [Amato et al., 2016a](#)) and a little lower than that described for a suburban area in Aveiro (Portugal) ($0.68 \mu\text{g}/\text{m}^3$, [Pegas et al., 2012](#)). Examining the results according to wind predominant directions, 82% of the samples corresponded to days with winds blowing from the West and South. For these directions, the mean values were in the same ranges as the entire dataset. Despite the small number of days with winds that blew predominantly from the NNE ($n=3$), ENE ($n=2$) and ESE ($n=8$), differences were observed. When the predominant direction was NNE, the highest levels of OC and TC were observed (3.0 and $3.7 \mu\text{g}/\text{m}^3$, respectively).

For this direction, where a power plant is located, all the four parameters (OC, EC, TC and OC/EC) lied in the urban/suburban background ranges reported by [Querol et al. \(2013\)](#) for Spanish small-medium cities. On the contrary, for the ESE direction, OC, EC and TC had the lowest mean values (1.0 , 0.3 and $1.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$, respectively), within the reported ranges for remote areas (rural areas in the case of EC). For the predominant ENE direction, the highest mean value for EC was observed ($1.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$) and, therefore, the lowest OC/EC ratio (1.8) was obtained. [Querol et al. \(2013\)](#) reported relatively high levels of EC for the background atmosphere of the small city of Melilla, due to the influence of shipping emissions. Maritime traffic could be a possible explanation for the higher levels of EC with the ENE wind direction, corresponding to the "Ria de Betanzos" (which is similar to an estuary). TC had an excellent correlation with OC (Fig. 2a), with no seasonal variations. As expected, after the results obtained for the OC/EC ratio, the correlation between TC and EC presented differences between seasons in both intensity (higher correlation in the cold period) and slope (Fig. 2b).

The relationship between the carbonaceous components, OC and EC, was explored by plotting the results from each season (Fig. 3). Taking into account the influence of traffic and biomass burning, [Querol et al. \(2013\)](#) established correlations between these two parameters by fitting them to a potential equation. In the current study, using this type of fitting, a good correlation was observed only in winter (Fig. 3a). On the other hand, if the line representing $(\text{OC}/\text{EC})_{\text{min}}$ was drawn considering the points in the lower edge, in spring the fit line would not pass through the origin, indicating the presence of a source emitting OC without EC ([Pio et al., 2011](#)). For the plot corresponding to the other seasons, $(\text{OC}/\text{EC})_{\text{min}}$ had an intercept close to zero and slopes which varied from 1 (autumn) to 2 (winter). VOCs from biogenic sources or primary anthropogenic emissions can be oxidized and condensate on the particulate matter increasing the OC/EC ratio. Furthermore, the plot OC/EC versus EC could be fitted to different potential equations in spring, autumn and winter. In this type of graph, [Querol et al. \(2013\)](#) observed that the highest slope part is related to rural sites, while traffic sites are situated in the lowest slope area. In this study, the carbonaceous fraction in spring showed a behavior more similar to a rural site, while in winter and autumn it was more influenced by traffic emissions (Fig. 3b).

Traffic should also be an important source for the sampling site in summer (because of the surrounding beaches), but no correlations were found for this season, which could be explained by the contribution of another source, not considered in this fitting. If the values corresponding to a dominant regional backward trajectory and wind direction from

the SSE and SSW (with high values only for OC) were removed, a weak to moderate correlation would be observed in summer ($r^2 = 0.33$, $n=16$). Agricultural biomass burning takes place in autumn and winter, while wildfire episodes occur in summer.

WSOC is a mixture of soluble and oxidized organic compounds with contributions of anthropogenic sources and volatile compounds of biogenic origin, as well as the oxidation compounds produced in the atmosphere. The WSOC concentration and its rate of OC were lower in spring ($0.33 \mu\text{g}/\text{m}^3$ and 16%) than in the other seasons, although high OC values were found during this season.

An increase of primary OC in spring could explain the low WSOC, since this fraction increases with aerosol ageing (Jafrezzo et al., 2005). Some hydrophobic compounds from vegetation have low solubility and could not be found in WSOC, despite the fact that they increase OC values. In summer and autumn, similar mean values (around $0.7 \mu\text{g}/\text{m}^3$) and rates of OC greater than 50% were found. The highest concentration was recorded in winter, accounting for around 40% of the OC mass.

Total carbon showed correlation with elemental and water soluble organic carbon fractions, but with seasonal variability. Excellent correlations were observed in winter (Table S1), while weaker correlations were recorded in summer (especially between TC and WSOC). Total nitrogen (TN) correlated with carbon (TC, EC and WSOC) in all seasons, except with EC in summer. Once again, the highest correlations were found in winter (Table S1). Better correlations of WSOC and N were noticed in autumn and winter ($r = 0.7$ and 0.8 , respectively). This fact may suggest the presence of nitrogen groups in WSOC during this period.

Total sulfur presented strong correlations with nitrogen in all seasons, and also when the entire dataset, including data collected from all seasons, was considered. On the contrary, it presented poorer correlations with carbon (Table S1). Taking into account all the data, it only correlated slightly with TC. Total sulfur did not show any significant correlation with EC or TC in autumn, and neither with TC nor WSOC in spring. Total sulfur also presented correlation with PM_{10} concentrations (Fig. 2c), moderate in spring and autumn, and strong in winter and particularly in summer.

3.2. Major ions and their interrelationships with meteorological parameters

Table 2 shows the data for the major ions (mean values, standard deviations and ranges for each season). Sulfate was dominant, followed by chloride and sodium, while Mg^{2+} and K^+ had the lowest levels. Similar relative trends had been previously found for ions in PM_{10} at this sampling site (Blanco Heras, 2009), despite the fact that the concentrations of the anions and cations were higher in 2004-2005 (0.14 - $3.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$) than in this study. As the total PM_{10} levels had also decreased over these years, it is reasonable to presume that all the components had lower concentrations. Seasonal variations were observed in anions and cations. For sulfate and ammonium, levels were higher in the warm season, as recorded for PM_{10} . This trend was already observed for total N and S. The

higher levels of sulfate in the warm season should be linked to a higher photochemical formation from SO₂, favored by solar radiation and temperature (Blanco Heras, 2009). In turn, chloride and calcium presented higher levels in winter and spring than in summer and autumn, following the same trend as OC and TC. For most cations and sulfate, the lowest concentration was found in autumn. This is particularly evident in the case of sodium.

Given that the sampling site is on the Atlantic coast, the contribution of sea salt to aerosol mass is relevant (Camacho-Jiménez et al., 2013). Sodium is the marker of this influence, since chloride can be also produced by industrial sources and participates in reactions in the atmosphere, being removed in gas phase as HCl_(g). The bulk sea water weight concentration ratio is Cl⁻ = 1.8Na⁺ (Almeida et al., 2005). An excellent correlation between the two ions was observed in winter (r² = 0.97) with a relation Cl⁻ = 1.79Na⁺ - 0.41. In autumn and spring, the slope and determination coefficient were lower (1.4 and 0.89 and 1.43 and 0.78, respectively). In summer, the slope decreased to 0.93 (r² = 0.83), but the values dominated by regional backward trajectory should be removed from the plot. These values corresponded to high sodium and low chloride levels.

The sea salt levels (sum of ssNa + Cl⁻ + ssMg + ssK + ssCa + ssSO₄²⁻) were between 0.034 and 14.9 µg/m³, with a high variability (mean value ± SD = 2.21 ± 2.48 µg/m³). Sea salt contributed from 0.6 to 84.5% to PM₁₀ (mean 19.1%). Despite the fact that the mean concentration was lower than that reported by Amato et al. (2016a) for an Atlantic site (Porto, Portugal, 4.4 µg/m³), the contribution to the PM₁₀ load was higher (13% at Porto).

Concerning secondary inorganic aerosol (SIA), ammonium sulfate appears to be formed in all seasons, as suggested by the good correlation between the two ions, which is better during summer and spring (r = 0.66 and 0.58, respectively) than in autumn and winter (r = 0.51 and 0.45, respectively). Sodium nitrate was formed in all seasons, except in autumn (r = 0.71 in summer, 0.66 in spring, 0.52 in winter). Sodium sulfate and potassium nitrate were found only in summer (r = 0.45 and 0.46, respectively). Potassium sulfate was formed in all seasons, except in spring. Potassium correlated moderately with sodium in summer (marine origin) and with ammonium in autumn and winter. Sodium sulfate could be formed by the reaction of excess sulfate with sea salt.

3.3. Carbon and nitrogen isotopes of PM₁₀ and their interrelations with WSOC, major ions and meteorological parameters

Isotopic results for carbon and nitrogen are included in Table 3. As mentioned above, negative values of isotopic composition are obtained when the sample contains lighter isotopes than the standard. In the case of carbon, δ¹³C_{VPDV} values were in the range from -25.4 to -34.3‰ (n=140) with a mean value of -26.7±0.8‰ and two outliers of -34.3 and -28.3‰. These values had a smaller proportion of the heaviest isotope than those found by Mkoma et al. (2014) in Tanzanian samples, dominated by biomass burning of C4 plants (-24.4 to -22.4‰) or by Kunwar et al. (2016) in Okinawa, influenced by long-range transported pollutants (-24.2 to -21.6‰). The mean value is within the interval found by

Widory et al. (2004) in Paris for urban ambient and background sites (-26.7 to -25.7‰). The vegetation may be related to the obtained low $\delta^{13}\text{C}$, as a similar value (-27.3‰) was reported by Turekian et al. (1998) for *Eucalyptus* burning. *Eucalyptus* is the dominant C3 vegetative species around the sampling site.

Concerning the seasonal variation, $\delta^{13}\text{C}$ values were in a very narrow range, except in spring, when the lowest values for all the four seasons (containing the lighter isotope in total carbon) were found (-34.3 and -28.3‰). For $\delta^{13}\text{C} = -34.3\text{‰}$ (April 23rd), the precipitation value was the highest observed in spring (13.4 L/m²). Therefore, a possible scavenging could cause the $\delta^{13}\text{C}$ depletion. Emissions of primary organic carbon from plants or insects can also cause depletion of $\delta^{13}\text{C}$ in spring (Górka et al., 2008). Besides, Fisseha et al. (2009) reported lower values for secondary organic carbon resulting from the ozonolysis of β -pinene. In spring, the range without these two values was from -27.6 to -25.4‰.

The $\delta^{15}\text{N}$ values were in the range from -4.7 to 20‰ (n=140), averaging $6.0 \pm 5.3\text{‰}$. These values are similar to those obtained by Yeatman et al. (2001) in Weybourne (United Kingdom) for nitrate ($\delta^{15}\text{NO}_3^-$), $7 \pm 6\text{‰}$ (-6 to +19‰), although slightly lower (less enrichment in ¹⁵N) and with higher variability than those reported by Widory (2007) for PM₁₀ in Paris, France (5.3 to 16.1, with a mean value of $10.7 \pm 3.1\text{‰}$) and Górka et al. (2012) in Wrocław, Poland (5.0-13.7‰, with a mean value of $9.9 \pm 2.0\text{‰}$). The high variability in $\delta^{15}\text{N}$ values suggests the presence of different sources of nitrogen. Some seasonal differences were found. The most positive values (enriched ¹⁵N) were observed in the warm period (especially in spring) and negative values (depleted ¹⁵N) in the cold period. In autumn, a narrower range (-4.7 to 8.5‰, with a mean value of $1.2 \pm 2.4\text{‰}$) than in other seasons may suggest that less sources were contributing. Besides, the total nitrogen concentration measured as isotopic N and elemental N had a higher concentration in the warm period (Table 1). Although a mixture of sources (diesel vehicles, heating, etc.) appears to contribute to nitrogen levels, fuel-oil combustion for heating with more negative values (-19.4 to 2.9‰, Widory, 2007) may explain the $\delta^{15}\text{N}$ depletion during the cold period. This trend was also observed by Widory (2007) in Paris.

In all samples, nitrogen concentrations in PM₁₀ (as mass %) correlated with $\delta^{15}\text{N}$ ($r = 0.67$). An increase of nitrogen caused an enrichment of ¹⁵N (but more intense in spring and winter). Moreover, good correlations were found between $\delta^{15}\text{N}$ and ammonium for all the seasons ($r = 0.7$). This fact is justified by several authors (Pavuluri et al., 2010; Mkoma et al., 2014) due to the reaction of NH₃ with acids, leading to gas-particulate conversion between NH₃ and NH₄⁺ (enriched in ¹⁵N). In this dataset, both NH₄⁺ and $\delta^{15}\text{N}$ correlated positively with non-marine sulfate, especially in the warm period ($r = 0.6$). Therefore, one of the species formed has to be (NH₄)₂SO₄. Concerning the other species containing nitrogen, nitrate correlated negatively with $\delta^{15}\text{N}$ in spring and winter ($r = -0.48$ and -0.41 , respectively). In this case, it seems to indicate that nitrate formation caused depletion of ¹⁵N. NO_x from diesel vehicles with a range of negative values (-13 to -2‰) could be the source of nitrate in particulate matter. Nitrate had a low and negative correlation with ammonium in spring and winter (the highest Pearson's coefficient value (-0.37) was in

spring), suggesting different sources. However, nitrate showed a good and positive correlation with sodium, marine sulfate and chloride ($r = 0.6-0.7$) in the warm period and winter. The reaction of nitric acid with sea salt can form sodium nitrate with loss of HCl (Pey et al., 2009). To reinforce this hypothesis, $\delta^{15}\text{N}$ also correlated negatively with sodium (a tracer of primary marine contribution) in all the seasons (weakly in summer). Thus, both species, nitrate and ammonium, were mainly found as ammonium sulfate and sodium nitrate in all seasons, except for autumn (when only ammonium sulfate was recorded). In summer, the correlation coefficient also indicated the presence of potassium nitrate.

In winter, WSOC, a tracer of atmospheric oxidation of organic compounds, correlated positively with $\delta^{15}\text{N}$ ($r = 0.48$) and negatively with $\delta^{13}\text{C}$ ($r = -0.41$). EC (a tracer of incomplete combustion) did not correlate with any of them. No correlations between $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ were found, except for the cold period (autumn and winter, $r = -0.56$), suggesting the input from different sources.

Comparing means for each backward trajectory, only nitrogen (both TN and $\delta^{15}\text{N}$) showed significant differences between backward trajectories. Regional backward trajectories led to the highest levels for both nitrogen ($0.52 \pm 0.32 \mu\text{g}/\text{m}^3$) and $\delta^{15}\text{N}$ ($13.2 \pm 3.4\text{‰}$), whereas the mean value for European backward trajectory ($13.2 \pm 3.4\text{‰}$) was also significantly higher than most of the TN means for the Atlantic backward trajectories ($0.57 \pm 0.37 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Only one sample was associated with a Mediterranean backward trajectory, so the averaging was not possible. It should be noted that this sample had the second lowest value for $\delta^{15}\text{N}$ (-3.0‰).

3.4. Sub-micron particles and their interrelationships with PM₁₀ components and meteorological parameters

Sub-micron particles data was recorded from April to June 2014. The mean values for the number of nanoparticles in spring ($n=35$) were 1507, 2019 and 547 cm^{-3} for nucleation, Aitken and accumulation modes, respectively. The temporal profiles of the three modes were quite similar (Fig. S2). The number of accumulation particles remained low almost every day, with maximum values less pronounced than in the other modes. Main maximum values were found around April 29-30th, May 5-8th (with a relative minimum on May 7th) and May 14-17th. From May 30th until the last day of the sampling campaign (June 1st), the lowest number of particles was obtained.

During this period (first campaign), most air mass backward trajectories corresponded to the Atlantic Ocean (Fig. S3): West (15), Northwest (10) or North (7) Atlantic. It had a European backward trajectory from the continent for three days only. No significant (95%) differences were found between means for each backward trajectory and any size range, although for Aitken mode differences were significant at a significance level of 0.10 ($p = 0.081$). For this mode, the Atlantic-West backward trajectory led to the highest mean (2549 cm^{-3}), whereas the lowest mean for Aitken corresponded to air masses from Europe (1339 cm^{-3}). For the latter backward trajectory, Aitken and nucleation had the same mean, whereas for other air mass paths, Aitken was the most abundant mode. Aitken was the mode with the highest number of particles in almost all days (29

out of 35), whereas accumulation mode was the one with the smallest number of particles in 31 days. Two of the cases for which nucleation (instead of accumulation) had the lowest N value, coincided with two of the three European backward trajectory days. This backward trajectory implies long-distance transport, during which the accumulation processes occur, increasing the accumulation fraction (Gietl and Klemm, 2009).

Contributions of each mode to the total number of particles in terms of percentage showed opposite profiles for nucleation and Aitken modes, which are dominant (Fig. 4). Accumulation mode contributed only between 7 and 20% in most cases. Only on May 18th (European backward trajectory) and the last three days of the sampling campaign (including again one with European backward trajectory) it contributed up to 36% of the total number of nanoparticles. As commented before, particles in accumulation mode can suffer long-range transport and an increase of accumulation rate was observed after backward trajectories from Europe.

For nanoparticles, a correlation between the different modes (nucleation, Aitken and accumulation) was found, especially strong between Aitken and the other two fractions (Table S2a). Strong correlations were found between the total number of nanoparticles (sum of the three modes) and each fraction, especially at the smallest size ranges (Pearson's coefficients of 0.934, 0.960 and 0.800 with nucleation, Aitken and accumulation, respectively, with $p < 0.001$). The nucleation mode does not encompass primary exhaust emissions (Kumar et al., 2010). Therefore, a high correlation between Aitken with nucleation ($r = 0.81$) indicates that in Aitken mode, the contribution of nucleation was more important than primary sources. A lower correlation between nucleation and accumulation ($r = 0.59$) suggests a higher contribution of primary sources in accumulation mode.

Significant correlations between %Nucleation and both %Aitken ($r = -0.723$, $p < 0.001$) and %Accumulation ($r = -0.720$, $p < 0.001$) were recorded. Rates of Aitken- and accumulation-mode particles did not correlate between them. The total number of nanoparticles showed positive correlation with the nucleation rate ($r = 0.577$, $p < 0.001$) and negative correlation with the other two fractions ($r = -0.354$, $p = 0.037$ with %Aitken and -0.480 , $p = 0.004$ with %Accumulation).

The interrelations of the three modes and their rates with carbonaceous fractions, nitrogen, sulfur and ions measured in PM₁₀ were studied. Vanadium concentrations in PM₁₀ were also included in the table of correlations to support some of the results. The three modes correlated with carbonaceous fractions (Table S2b). All the nanoparticle fractions (nucleation, Aitken and accumulation) correlated with TC, OC, EC and WSOC. The temporal profile of elemental carbon (black carbon) was quite similar to the Aitken mode profile (Fig. 5). Until May 20th the maximum values seemed to be more pronounced for EC than in the case of N(Aitken). The isotopic $\delta^{13}\text{C}$ also correlated with the two lower fractions of nanoparticles, but in these cases it was a negative correlation.

When relationships were studied based on wind directions, the correlation for Aitken and accumulation with EC was maintained for all directions. In contrast, nucleation

correlated with EC only for the SSE ($r = 0.74$) and SSW ($r = 0.66$) wind directions, while for the WSW there was no significant correlation ($r = 0.12$). Correlations with vanadium followed the same pattern ($r = 0.32$ for the SSE, $r = 0.30$ for the SSW and $r = 0.01$ for the WSW), which may suggest that EC and V were emitted together, probably from a power plant and/or a solid waste incinerator (both in the SSW direction). These emissions may include several precursors that finally were converted into nucleation particles. Both power generation and incineration had been reported as sources of vanadium in ultrafine particles ([Sanderson et al., 2014](#)).

On the contrary, no correlation was found between nitrogen (TN or $\delta^{15}\text{N}$) and no nanoparticle mode. For sulfur, only the accumulation fraction showed significant correlation with total sulfur, total sulfate and non-sea salt sulfate, while sea salt sulfate did not correlate with nanoparticles.

No contribution of sea salt in nanoparticles was observed, as there was no correlation of any fraction with tracers such as Na^+ , Cl^- or ssSO_4^{2-} (while accumulation presented correlation with nssSO_4^{2-}). This result was expected, as sea salt usually contributes to the coarse fraction of particulate matter (Guevara, 2016). Correlation of accumulation mode with nssSO_4^{2-} (mostly secondary sulfate) can be explained by the relation of secondary aerosol with accumulation particles, as both are formed with aerosol ageing.

Concentrations of gaseous SO_2 showed negative correlation with all the modes, especially with nucleation ($r = -0.744$, with -0.561 and -0.585 for Aitken and accumulation, respectively), and with the total number of particles ($r = -0.674$). This is related to the fact that SO_2 is converted to particle as sulfuric acid, decreasing its concentrations in gas phase and increasing the nucleation mode. The negative correlation for other modes is due to the conversion of finer particles originated from SO_2 to Aitken or accumulation modes. Regarding the correlation with the rates of each size range, a negative correlation was maintained with nucleation ($r = -0.528$), while for the Aitken rate a highly positive correlation ($r = 0.783$) was found. The accumulation rate did not show any significant correlation with SO_2 concentration. Finally, the particles resulting from gas-particle conversion of SO_2 caused a rate increase of Aitken mode (positive correlation). Besides, the nucleation mode had a positive correlation with non-sea salt sulfate, which could be part of its composition (Table S2).

CO concentrations correlated negatively with %Aitken ($r = -0.461$) and positively with %Accumulation ($r = 0.427$), but once again with a significance level of only 0.10 (because there are data of CO for 18 days only).

Correlations between nanoparticles and meteorological parameters were explored. Mean temperature showed correlation with nucleation, accumulation and the total number of particles ($r = 0.414$, 0.401 and 0.359 , respectively). It did not correlate with N(Aitken), but it did with the rate of Aitken, obtaining a negative correlation ($r = -0.467$), whereas neither nucleation, nor accumulation rates correlated with temperature.

A negative correlation (-0.552 , $p = 0.002$) was found between the rate of Aitken particles and solar radiation. Solar radiation had a lower, less significant and positive

correlation (0.324 with $p = 0.081$) with the nucleation rate. On the contrary, humidity had a positive correlation with the rate of Aitken (0.612, $p < 0.001$) and a negative correlation with the nucleation rate (-0.607, $p < 0.001$). Neither solar radiation, nor humidity correlated with the accumulation rate. Therefore, an increase of humidity and decrease of solar radiation favored the conversion of nucleation in Aitken mode by coagulation. It is known that nucleation can be produced by photochemical mechanisms.

Regarding correlations with number of particles, only the nucleation mode had a negative correlation with humidity (-0.435, $p = 0.016$). Nucleation, accumulation and the total number of particles correlated slightly (about 0.3 at a significance level of 0.10) with wind direction. Although the differences between mean values for each direction were not significant (because of the small amount of data), it was clear that the two points with the WNW (300-310°) wind direction led to the highest mean for N of all modes. This direction corresponds to the near medium-sized city of A Coruña. In addition, the relative weight of nucleation mode in total N was clearly increased with this wind direction (equalizing the contribution of the Aitken mode to the total), while the contribution of the other two fractions decreased. No significant correlations were found between other meteorological parameters (wind speed, ozone concentrations and precipitation) with any nanoparticle size range or their rate.

3.5. Identification of sources

The previously commented contribution of diverse seasonal WSOC sources is reinforced by different correlations with the major cations (potassium, ammonium and sulfate). In summer, WSOC correlated with marine sulfate ($r = 0.47$) and sodium ($r = 0.47$), which suggested that a part of WSOC was formed from marine organic aerosol (Ceburnis et al., 2011). WSOC correlated with EC (around 0.6, Table S1), a tracer of incomplete combustion of fossil-fuels and brake wear (Querol et al., 2013), indicating the input of this anthropogenic sources. Except for spring, WSOC correlated with K, showing the influence of biomass combustion or use of residential wood burning.

Despite the fact that potassium may be also of marine origin, correlations with ssK and nssK were analyzed to verify if combustion was the main source. Low correlations were found between marine K and WSOC, whereas WSOC correlated moderately with nssK ($r = 0.5-0.7$ in summer, autumn and winter). Furthermore, its correlation with non-marine sulfate showed the contribution of WSOC to secondary aerosol. In winter, correlations with ammonium, enrichment in ^{15}N and depletion in ^{13}C indicate a strong contribution of secondary processes (Table S1).

In general, opposite trends were observed for OC/EC ratio and rate of soluble organic carbon (Fig. 6). Higher OC/EC ratios may be related to a high contribution of biogenic sources, which explain the highest values found in spring. On the other hand, %WSOC/OC is linked to aerosol ageing, with increasing values as secondary organic aerosol (SOA) content increases. Therefore, it makes sense that in spring, with higher contributions from primary biogenic sources, the share of SOA (%WSOC) had less importance (i.e. lower

levels). On the contrary, when the biogenic contribution is low, most of the organic aerosol mass is SOA, leading to high %WSOC.

The low presence of SOA in spring was also supported by the $\delta^{13}\text{C}$ data, which are also related to aerosol photochemical ageing. SOA is enriched in the heavier isotope and, therefore, higher $\delta^{13}\text{C}$ values have been found for oxidized aerosol (Prada-Rodríguez et al., 2014; Kunwar et al., 2016; Fisseha et al., 2009). In spring, $\delta^{13}\text{C}$ values were significantly lower than in the other seasons, indicating less presence of SOA.

$\delta^{13}\text{C}$ values also agree with the low presence of carbonate, as high values (-15 to -18‰) have been associated with this carbonaceous constituent (Kunwar et al., 2016) and, in this case, values were significantly lower. Plotting $\delta^{13}\text{C}$ vs %C was used for source apportionment (Widory et al., 2004). This diagram (Fig. 7) shows that diesel was the main source, although in many samples, it was mixed with domestic fuel oil. These samples were gathered in summer, whereas the results with the most negative values (indicating less presence of SOA) were gathered in spring, when the high biogenic input reduces the secondary contribution to total aerosol.

Plotting $\delta^{13}\text{C}$ vs $\delta^{15}\text{N}$ (Fig. 8), similar results were observed, but new information on biogenic sources and agricultural activities was obtained. Most samples seem to have a strong contribution from fuel-oil and diesel combustion, especially in autumn (97% of the samples collected in autumn had values corresponding to these sources). Therefore, despite taking into account nitrogen, fuel-oil seems to have a higher weight than diesel, domestic fuel burning still seems to be the main source in the sampling area. In this diagram, the contribution of biomass (both natural emissions from the vegetation and biomass burning) is included. Several samples, mainly from spring and summer, but also from winter, had high vegetation contribution. This source could be observed for 26-36% of the samples gathered in spring, summer and winter. In addition, in spring, most samples were around the limit values of biomass, which suggests a strong contribution of vegetation in this period, even when mixed with other sources.

4. Conclusions

For the characterization of 140 daily PM_{10} samples collected from April 2014 to January 2015 in a suburban area of Northwestern Spain, several components, including carbonaceous fraction, stable isotopes and major ions were determined, and meteorological and sub-micron particles data were also considered.

Total PM_{10} levels were lower than in previous years, with a mean value of $9 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Seasonal variations were observed for different parameters, with the highest levels of carbonaceous matter in winter, whereas nitrogen (and NH_4^+) and sulfur (and SO_4^{2-}) presented more significant concentrations in the warm period, as observed for PM_{10} . On the contrary, calcium and chloride ions followed the same trend as OC and TC, with higher concentrations in winter-spring. OC was the main component of the carbonaceous fraction in PM, controlling the temporal profile and presenting a very high correlation with TC, while the correlation between EC and TC showed seasonal variation in both slope and intensity.

The correlations between OC and EC fit to a potential equation only in winter, whereas OC/EC vs EC plot also presented seasonal variations, in spring behaving as a rural site and with traffic influence in autumn and winter. In summer, additional sources were present, as the plot did not fit to a potential equation.

Two main contributions to PM₁₀ at the sampling site were sea salt and secondary aerosol. Because of the location of the sampling site, there is an expectable high marine contribution from the Atlantic Ocean, and a good correlation between Na⁺ and Cl⁻ was found, especially in winter. Sea salt levels contributed up to 84.5% to PM₁₀ (19.1% on average), the contribution being even a little more significant than that recently reported for Porto (Portugal), also with a high Atlantic influence. The great importance of secondary aerosol was suggested by the high percentage of WSOC (related to aerosol ageing) in OC (mean around 40%) and relatively high concentrations of SIA ions. The SIA species identified by correlations were: ammonium sulfate (all seasons), sodium nitrate (except in autumn) and potassium sulfate (except in spring), along with Na₂SO₄ and KNO₃ in summer. In spring, due to the higher input of biogenic OC, the contribution of SOA was more limited, as observed in the WSOC and δ¹³C values. The correlations showed a strong relationship between sea salt and secondary aerosol, being the Atlantic Ocean the origin of part of secondary aerosol precursors.

A mean value of -26.7±0.8‰ for δ¹³C was obtained, with a very narrow range of variation. It was a relatively low value that could be linked to the vegetation (*Eucalyptus*) present in the surrounding area of the sampling site. For δ¹⁵N, a mean value of 6.0±5.3‰ and a higher variation were found, suggesting the presence of different sources contributing to the total nitrogen.

The highest numbers of particles were observed for the Aitken mode, whilst the accumulation mode corresponded to the lowest numbers in most days. Accumulation seemed to increase with long-range transport in days with dominant European backward trajectories. In addition to strong correlations between them, nanoparticle modes showed a correlation with all the carbonaceous fractions and some meteorological parameters related to their formation. The different correlations found with EC and V, according to the wind directions, suggested that the power plant and/or the solid waste incinerator located in the SSW direction were possible sources when the wind blows from that direction. Another medium-range possible source suggested by the correlations between nanoparticles was the city of A Coruña, which produced an increased number of particles (especially of nucleation mode) with the WNW wind direction.

Exploring the possible sources in more detail, the values of δ¹³C suggested a high contribution of vegetation in spring, while δ¹⁵N data indicated a significant input from domestic heating during the cold period and the importance of nitrate with marine origin. From the plots of isotopic results, the combustion sources (fuel oil and diesel) seemed to be of high importance in the cold period, probably due to domestic heating, and primary biogenic input was suggested as a probable source during spring. OC/EC ratios and WSOC values agreed with this conclusion.

References

- Almeida S. M., Pio C. A., Freitas M. C., Reis M. A., Trancoso M. A. Source apportionment of fine and coarse particulate matter in a sub-urban area at the Western European Coast. *Atmospheric Environment*, 39 (2005) 3127–3138.
- Alves C. A., Gonçalves C., Mirante F., Nunes T., Evtugina M., Sánchez De La Campa A., Rocha A. C., Correia Marques M. Organic speciation of atmospheric particles in Alvão Natural Park (Portugal). *Environmental Monitoring and Assessment*, 168(1-4) (2010) 321–337.
- Amato F., Lucarelli F., Nava S., Calzolari G., Karanasiou A., Colombi C., Gianelle V. L., Alves C., Custódio D., Eleftheriadis K., Diapouli E., Reche C., Alastuey A., Minguillón M. C., Severi M., Becagli S., Nunes T., Cerqueira M., Pio C., Manousakas M., Magoos T., Vratolis S., Harrison R. M., Querol X. Case Studies of Source Apportionment and Suggested Measures at Southern European Cities. *Issues in Environmental Science and Technology No. 42. Airborne particulate matter: Sources, Atmospheric Processes and Health*, Eds. Hester R. E., Harrison R. M., Querol X. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2016a.
- Amato F., Alastuey A., Karanasiou A., Lucarelli F., Nava S., Calzolari G., Severi M., Becagli S., Gianelle V. L., Colombi C., Alves C., Custódio D., Nunes T., Cerqueira M., Pio C., Eleftheriadis K., Diapouli E., Reche C., Minguillón M. C., Manousakas M.-I., Magoos T., Vratolis S., Harrison R. M., Querol X. AIRUSE-LIFE+: a harmonized PM speciation and source apportionment in five southern European cities. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 16 (2016b) 3289–3309.
- Blanco Heras G. A. *Determinación de aniones, cationes y ácidos orgánicos en material particulado atmosférico mediante electroforesis capilar*. PhD Thesis, Departamento de Química Analítica, Universidade da Coruña (2009).
- Camacho-Jiménez A., Piñeiro-Iglesias M., Prieto-Blanco M. C., López-Mahía P., Muniategui-Lorenzo S., Prada-Rodríguez D. Seasonal evolution of the PM₁₀ major components at urban sites in Galicia. *XVIII Meeting of the Spanish Royal Society of Analytical Chemistry*, 2013.
- Castro L. M., Pio C. A., Harrison R. M., Smith D. J. T. Carbonaceous aerosol in urban and rural European atmospheres: Estimation of secondary organic carbon concentrations. *Atmospheric Environment*, 33(17) (1999) 2771–2781.
- Ceburnis D., Garbaras A., Szidat S., Rinaldi M., Fahrni S., Perron N., Wacker L., Leinert S., Remeikis V., Facchini M. C., Prevot A. S. H., Jennings S. G., Ramonet M., O'Dow C. D. Quantification of the carbonaceous matter origin in submicron marine aerosol by ¹³C and ¹⁴C isotope analysis. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 11 (2011) 8593–8606.
- Custódio D., Cerqueira M., Alves C., Nunes T., Pio C., Esteves V., Frosini D., Lucarelli F., Querol X.. A one-year record of carbonaceous components and major ions in aerosols from an urban kerbside location in Oporto, Portugal. *Science of the Total Environment*, 562 (2016) 822–833.
- Dusek U., Meusinger C., Oyama B., Ramon W., de Wilde P. A., Holzinger R., Röckmann T. A thermal desorption system for measuring $\delta^{13}\text{C}$ ratios on organic aerosol. *Journal of Aerosol Science*, 66 (2013) 72–82.

European Norm EN-12341:2014. *Ambient air. Standard gravimetric measurement method for the determination of the PM₁₀ or PM_{2.5} mass concentration of suspended particulate matter.*

Fisseha, R., Spahn, H., Wegener, R., Hohaus, T., Brasse, G., Wissel, H., Tillmann R., Wahner A., Koppmann R., Kiendler-Scharr A. Stable carbon isotope composition of secondary organic aerosol from β -pinene oxidation. *Journal of Geophysical Research Atmospheres*, 114 (2009) D02304, doi:10.1029/2008JD011326.

Gietl J. K., Klemm O. Source Identification of Size-Segregated Aerosol in Münster, Germany, by Factor Analysis. *Aerosol Science and Technology*, 43(8) (2009) 828–837.

Gómez-Carracedo M. P., Andrade J. M., Ballabio D., Prada-Rodríguez D., Muniategui-Lorenzo S., Consonni V., Piñeiro-Iglesias M., López-Mahía P. Impact of medium-distance pollution sources in a Galician suburban site (NW Iberian peninsula). *Science of the Total Environment*, 512-513 (2015) 114–124.

Gómez-Moreno F. J., Pujadas M., Plaza J., Rodríguez-Maroto J. J., Martínez-Lozano P., Artíñano B. Influence of seasonal factors on the atmospheric particle number concentration and size distribution in Madrid. *Atmospheric Environment*, 45 (2011) 3169–3180.

Górka, M., Zwolińska E., Malkiewicz M., Lewicka-Szczebak D., Jędrysek M. O. Carbon and nitrogen isotope analyses coupled with palynological data of PM₁₀ in Wrocław city (SW Poland) –assessment of anthropogenic impact. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 48(2) (2012) 327–344.

Górka M., Jędrysek, M. O. $\delta^{13}\text{C}$ of organic atmospheric dust deposited in Wrocław (SW Poland): Critical remarks on the passive method. *Geological Quarterly*, 52(2) (2008) 115–126.

Guevara, M. Emissions of Primary Particulate Matter. *Issues in Environmental Science and Technology No. 42. Airborne particulate matter: Sources, Atmospheric Processes and Health*, Eds. Hester R. E., Harrison R. M., Querol X. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2016.

Jaffrezou J.-L., Aymoz G., Delaval C., Cozic J. Seasonal variations of the water soluble organic carbon mass fraction of aerosol in two valleys of the French Alps. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 5 (2005) 2809–2821.

Juncal Bello V. *Determinación de compuestos orgánicos volátiles precursores de ozono y otros contaminantes atmosféricos en un área suburbana de A Coruña*. PhD Thesis, Departamento de Química Analítica, Universidade da Coruña (2012).

Jung J., Kawamura K. Springtime carbon emission episodes at the Gosan background site revealed by total carbon, stable carbon isotopic composition, and thermal characteristics of carbonaceous particles *Atmospheric Chemistry and Physics*, 11 (2011) 10911–10928.

Kumar P., Robins A., Vardoulakis S., Britter R. A review of the characteristics of nanoparticles in the urban atmosphere and the prospects for developing regulatory controls. *Atmospheric Environment*, 44 (2010) 50357–5052.

Kunwar B., Kawamura K., Zhu C. Stable carbon and nitrogen isotopic compositions of ambient aerosols collected from Okinawa Island in the western North Pacific Rim, an outflow region of Asian dusts and pollutants. *Atmospheric Environment*, 131 (2016) 2437–253.

López-Veneroni D. The stable carbon isotope composition of PM_{2.5} and PM₁₀ in Mexico City Metropolitan Area air, *Atmospheric Environment*, 43 (2009) 44917–44502.

Manders A. M. M., Schaap M., Jozwicka M., van Arkel F., Weijers E. P., Matthijsen J. *The contribution of sea salt to PM₁₀ and PM_{2.5} in the Netherlands*. BOP report, Netherlands Environmental Assessment Agency (2009).

Martinelli L. A., Camargo P. B., Lara L. B. L. S., Victoria R. L., Artaxo P. Stable carbon and nitrogen isotopic composition of bulk aerosol particles in a C4 plant landscape of southeast Brazil. *Atmospheric Environment*, 36 (2002) 2427–2432.

Mašalaitė A., Garbaras A., Remeikis V. Stable isotopes in environmental investigations. *Lithuanian Journal of Physics*, 52(3) (2012) 261–268.

Masiol M., Hopke P. K., Felton H. D., Frank B. P., Rattigan O. V., Wurth M. J., LaDuke G. H. Analysis of major air pollutants and submicron particles in New York City and Long Island. *Atmospheric Environment*, 148 (2017) 203–214.

Mkoma S. L., Kawamura K., Tachibana E., Fu P. Stable carbon and nitrogen isotopic compositions of tropical atmospheric aerosols: sources and contribution from burning of C3 and C4 plants to organic aerosols. *Tellus B*, 66 (2014) 20176 pp. 14.

Moreda-Piñeiro J., Turnes-Carou I., Alonso-Rodríguez E., Moscoso-Pérez C., Blanco-Heras G., López-Mahía P., Muniategui-Lorenzo S., Prada-Rodríguez D. The Influence of Oceanic Air Masses on Concentration of Major Ions and Trace Metals in PM_{2.5} Fraction at a Coastal European Suburban Site. *Water, Air, and Soil Pollution*, 226(1) (2015) 2240 pp. 15.

Moreda-Piñeiro J., Alonso-Rodríguez E., Moscoso-Pérez C., Blanco-Heras G., Turnes-Carou I., López-Mahía P., Muniategui-Lorenzo S., Prada-Rodríguez D. Influence of marine, terrestrial and anthropogenic sources on ionic and metallic composition of rainwater at a suburban site (northwest coast of Spain). *Atmospheric Environment*, 88 (2014) 30–38.

Pavuluri C. M., Kawamura K., Tachibana E., Swaminathan T. Elevated nitrogen isotope ratios of tropical Indian aerosols from Chennai: implication for the origins of aerosol nitrogen in South and Southeast Asia. *Atmospheric Environment*, 44 (2010) 3597–3604.

Pegas P. N., Nunes T., Alves C. A., Silva J. R., Vieira S. L. A., Caseiro A., Pio C. A. Indoor and outdoor characterisation of organic and inorganic compounds in city centre and suburban elementary schools of Aveiro, Portugal. *Atmospheric Environment*, 55 (2012) 80–89.

Pey J., Querol X., Alastuey A. Variations of levels and composition of PM₁₀ and PM_{2.5} at an insular site in the Western Mediterranean. *Atmospheric Research*, 94 (2009) 285–299.

Pio C., Cerqueira M., Harrison R. M., Nunes T., Mirante F., Alves C., Oliveira C., Sanchez de la Campa A., Artíñano B., Matos M. OC/EC ratio observations in Europe: Re-thinking the approach for apportionment between primary and secondary organic carbon. *Atmospheric Environment*, 45(34) (2011) 6121–6132.

Prada-Rodríguez D., Gallego-Fernández N., Piñeiro-Iglesias M., Muniategui-Lorenzo S., Macho-Eiras M. L., López-Mahía P. *Stable carbon isotopic ratios of a rural aerosol at the centre of Galicia (Spain)*. Paper presented at the 1st International Conference on Atmospheric Dust - DUST2014. *ProScience*, 1 (2014) 196–200.

Querol X., Alastuey A., Rodríguez S., Plana F., Mantilla E., Ruiz C.R. Monitoring of PM₁₀ and PM_{2.5} around primary particulate anthropogenic emission sources. *Atmospheric Environment*, 35 (2001) 845–858.

Querol X., Alastuey A., Viana M., Moreno T., Reche C., Minguillón M. C., Ripoll A., Pandolfi M., Amato F., Karanasiou A., Pérez N., Pey J., Cusack M., Vázquez R., Plana F., Dall'Osto M., de la Rosa J., Sánchez de la Campa A., Fernández-Camacho R., Rodríguez S., Pio C., Alados-Arboledas L., Titos G., Artíñano B., Salvador P., García Dos Santos S., Fernández Patier R. Variability of carbonaceous aerosols in remote, rural, urban and industrial environments in Spain: Implications for air quality policy. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 13(13) (2013) 6185–6206.

Sanderson P., Delgado-Saborit J. M., Harrison R. M. A review of chemical and physical characterisation of atmospheric metallic nanoparticles. *Atmospheric Environment*, 94 (2014) 353–365.

Stein A. F., Draxler R. R., Rolph G. D., Stunder B. J. B., Cohen M. D., Ngan F. NOAA's HYSPLIT atmospheric transport and dispersion modeling system. *Bulletin of the American Meteorological Society*, 96 (2015) 2059–2077, <http://dx.doi.org/10.1175/BAMS-D-14-00110.1>

Turekian V. C., Macko S., Ballentine D., Swap R. J., Garstang M. Causes of bulk carbon and nitrogen isotopic fractionations in the products of vegetation burns: laboratory studies. *Chemical Geology*, 152 (1998) 181–192.

Widory D. Nitrogen isotopes: Tracers of origin and processes affecting PM₁₀ in the atmosphere of Paris. *Atmospheric Environment*, 41 (2007) 2382–2390.

Widory D., Roy S., Le Moullec Y., Goupil G., Cocherie A., Guerrot C. The origin of atmospheric particles in Paris: A view through carbon and lead isotopes. *Atmospheric Environment*, 38(7) (2004) 953–961.

Yeatman S. G., Spokes L. J., Dennis P. F., Jickells T. D. Comparisons of aerosol nitrogen isotopic composition at two polluted coastal sites. *Atmospheric Environment*, 35 (2001) 1307–1320.

Zong Z., Wang X., Tian C., Chen Y., Han G., Li J., Zhang G. Source and formation characteristics of water-soluble organic carbon in the anthropogenic-influenced Yellow River Delta, North China. *Atmospheric Environment*, 144 (2016) 124–132.

Figure captions

Fig. 1. Temporal profiles (on a weekly basis) for total PM₁₀, carbonaceous fractions and total nitrogen and sulfur concentrations in PM₁₀. Error bars = ±SD.

Fig. 2. Correlation between: a) TC and OC; b) TC and EC; c) S and PM₁₀.

Fig. 3. Correlation and regression equations between: a) OC and EC; b) OC/ EC ratios and EC levels.

Fig. 4. Temporal variation (on a daily basis) for the percentage of nucleation, Aitken and accumulation modes during the first sampling campaign (in spring).

Fig. 5. Temporal variation (on a daily basis) for the number of particles of Aitken mode (left axis) and EC in PM₁₀ (right axis) during the first sampling campaign (in spring).

Fig. 6. Temporal variation (on a weekly basis) of the WSOC/OC percentages and OC/EC ratios.

Fig. 7. Tracing of sources by stable carbon isotopes.

Fig. 8. Tracing of sources by plotting $\delta^{13}\text{C}$ versus $\delta^{15}\text{N}$ with signed level of potential sources. *Data of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ adapted from Górká et al., 2008 (coal); Górká et al., 2012 (diesel); Martinelli et al., 2002 (natural forest); Turekian et al., 1998 (biomass burning); Widory et al., 2004 (gasoline) and Widory, 2007 (natural gas, coal, gasoline, diesel, fuel oil).*

Fig. 1

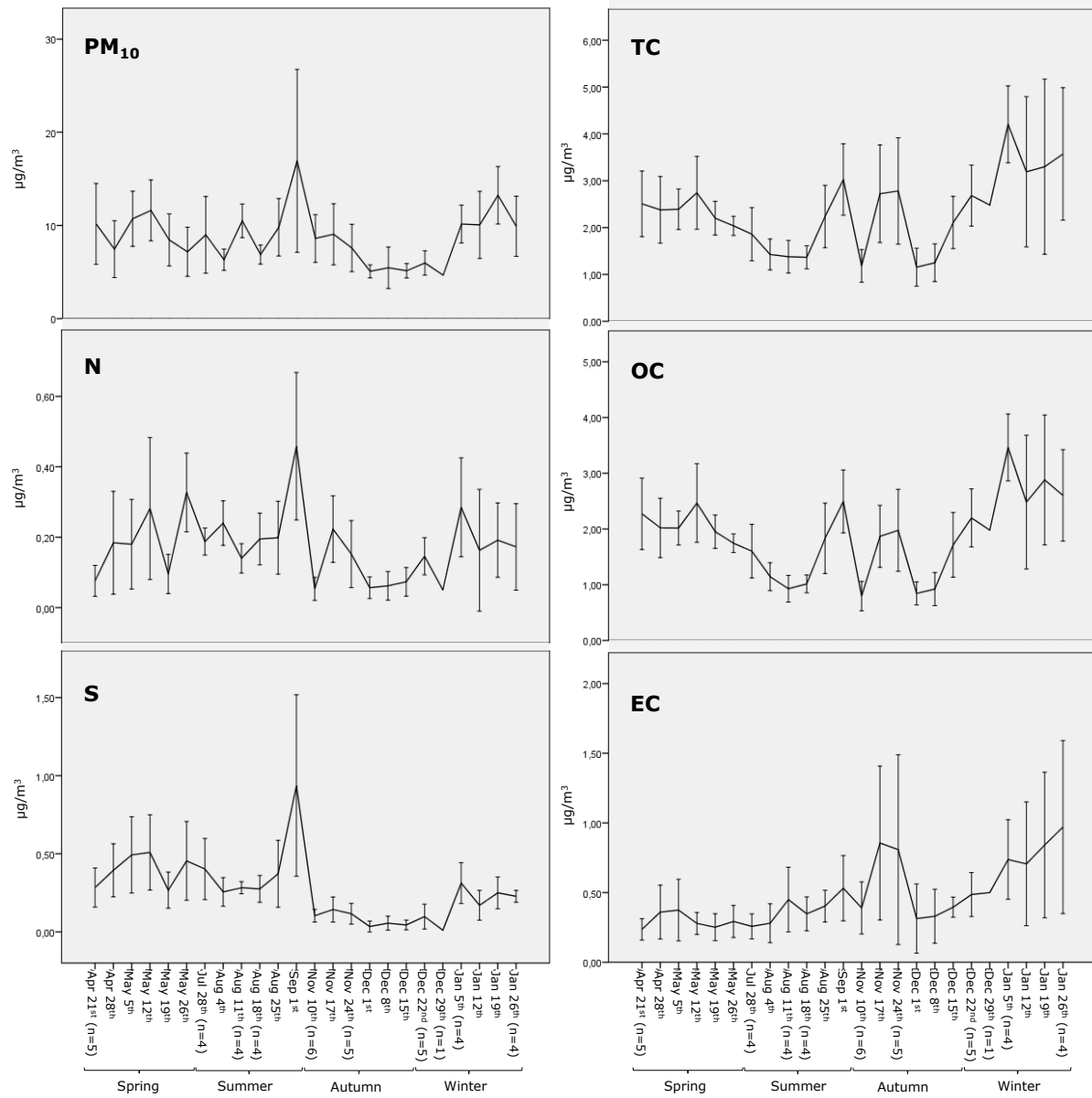


Fig. 2

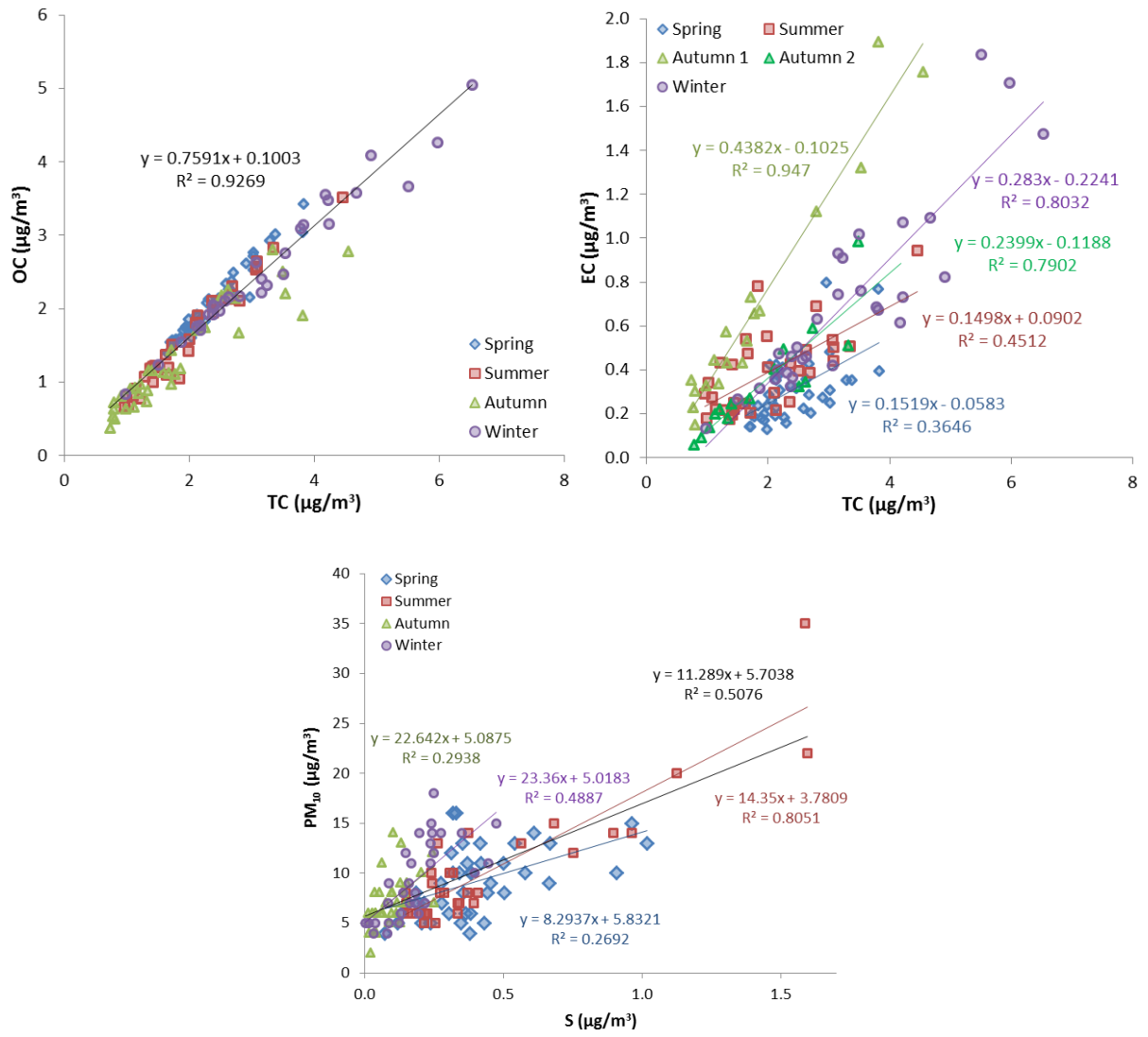


Fig. 3

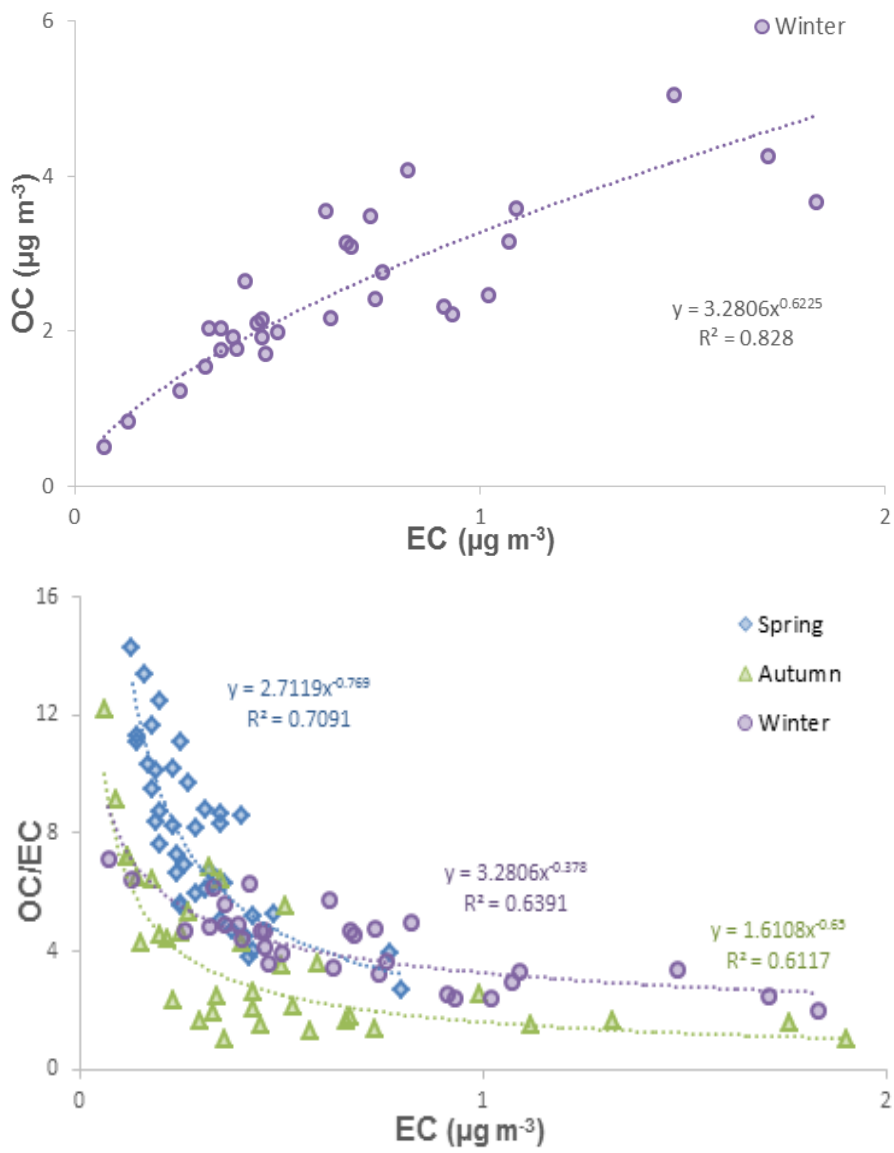


Fig. 4

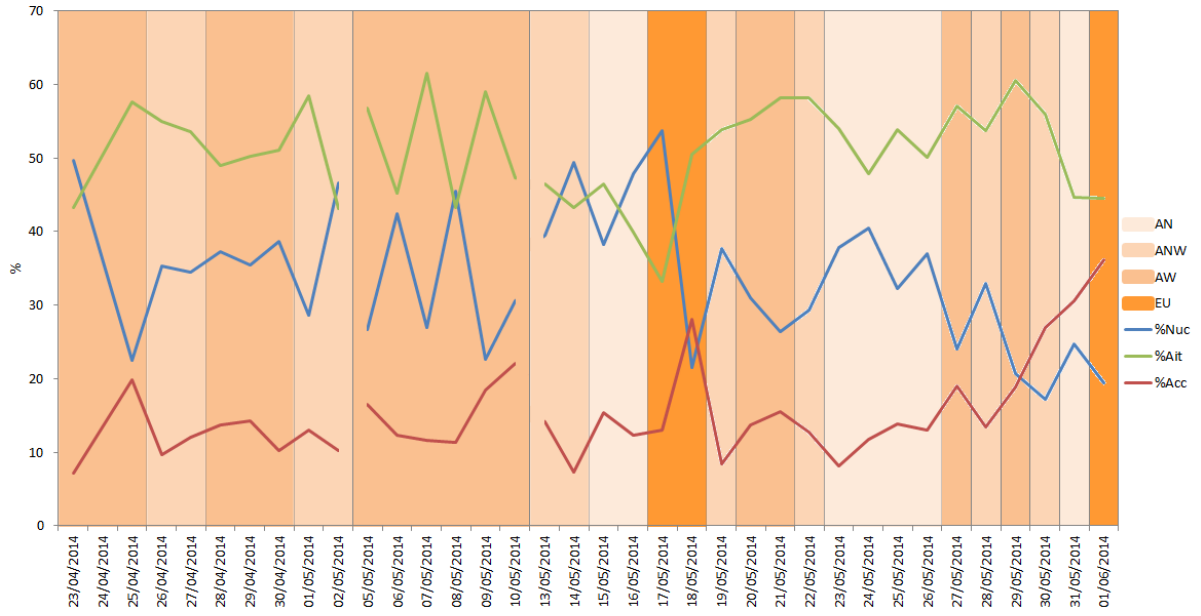


Fig. 5

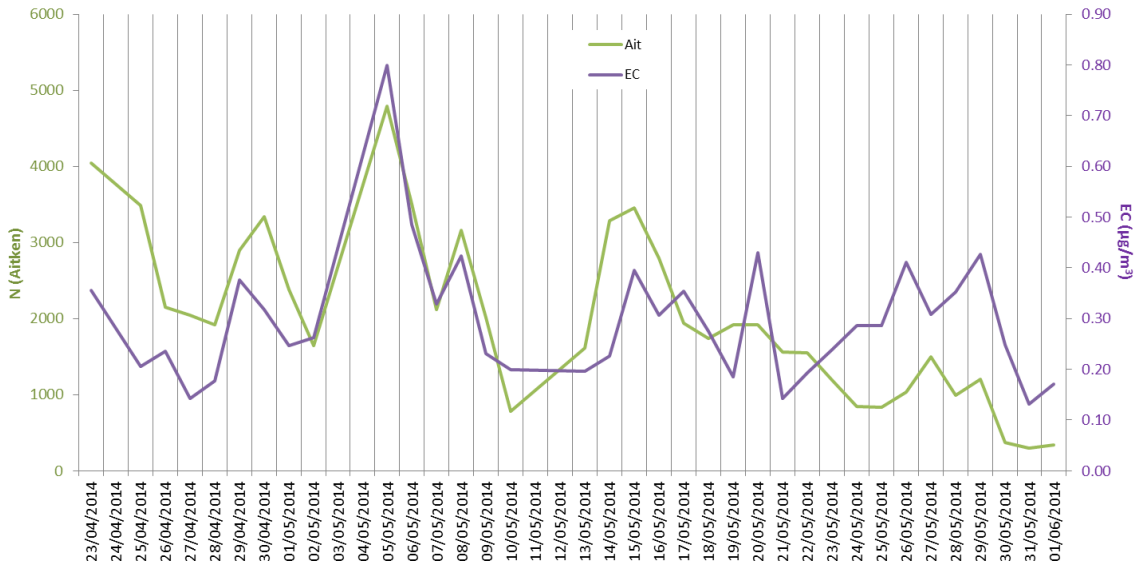


Fig. 6

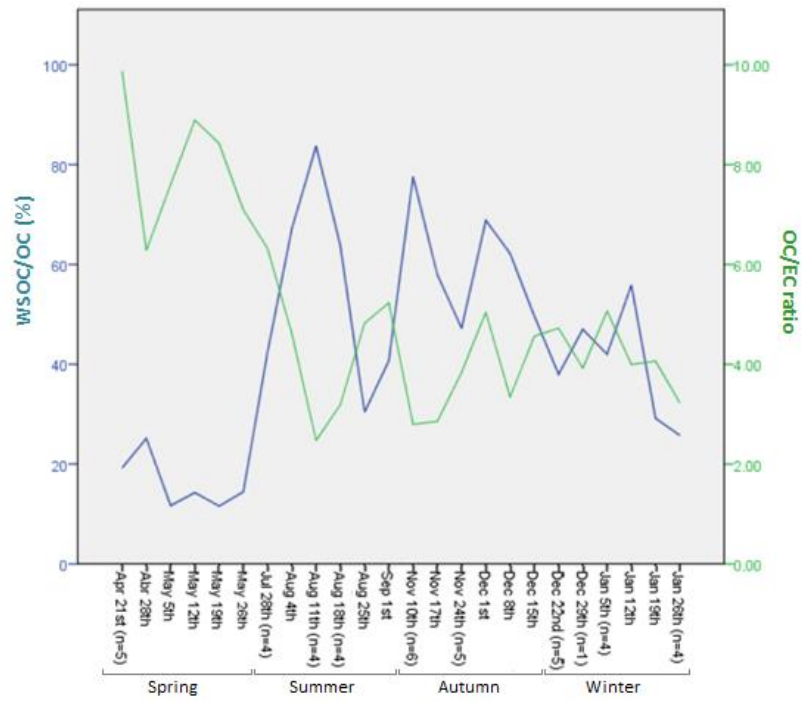


Fig. 7

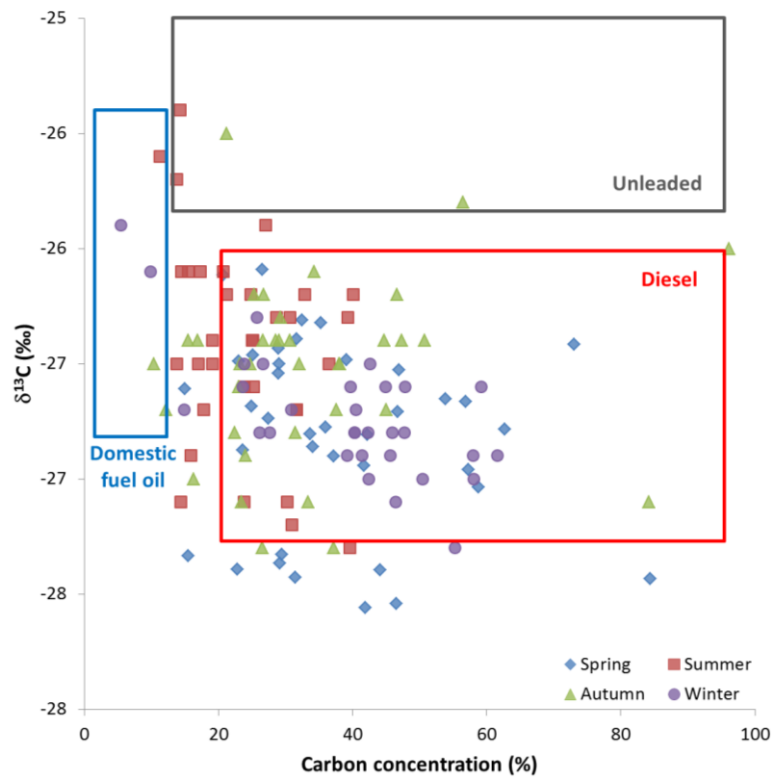


Fig. 8

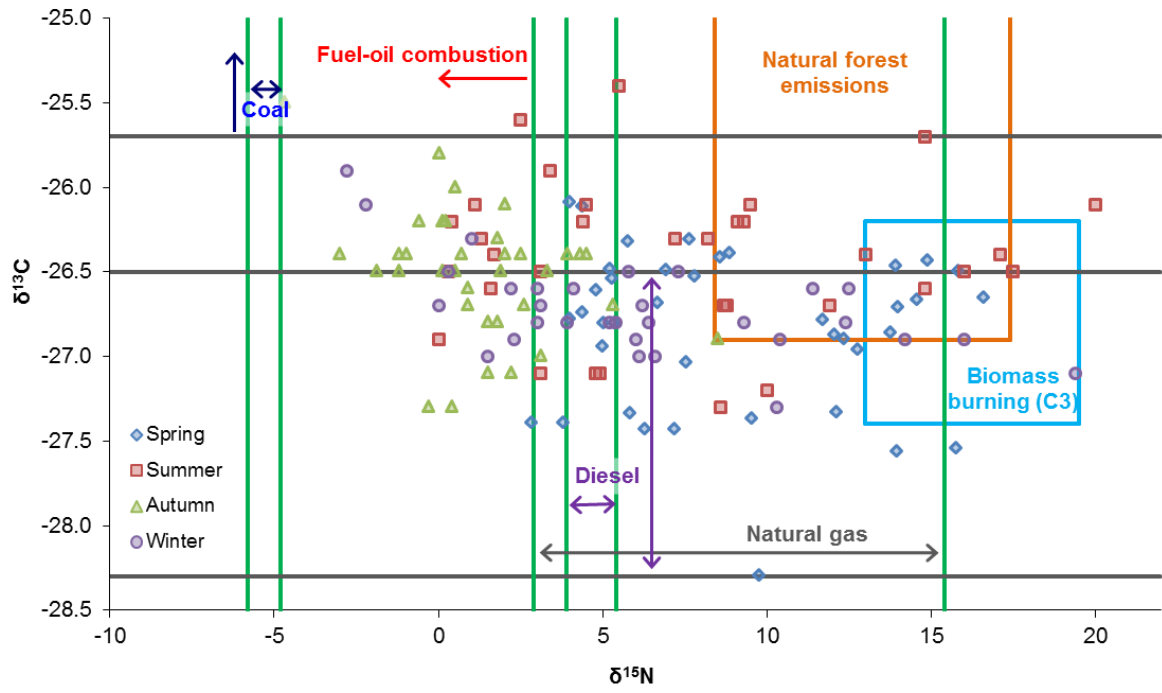


Table 1. Average concentrations \pm Standard deviation (range in brackets) of different parameters of the carbonaceous and elemental analyses of PM₁₀ samples of the studied suburban area, distributed by seasons.

	PM ₁₀ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	OC ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	EC ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	OC/EC	TC ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	%TC/PM ₁₀	WSOC ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	%WSOC/OC	N ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	S ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
Spring (n=40)	9 \pm 3 (4-16)	2.07 \pm 0.50 (1.39-3.43)	0.30 \pm 0.14 (0.13-0.80)	7.8 \pm 2.8 (2.7-14.2)	2.37 \pm 0.57 (1.64-3.82)	29 \pm 12 (11-65)	0.33 \pm 0.16 (0.10-0.78)	16 \pm 7 (5-32)	0.20 \pm 0.15 (0.03-0.68)	0.41 \pm 0.21 (0.07-1.02)
Summer (n=33)	10 \pm 6 (5-35)	1.59 \pm 0.71 (0.66-3.51)	0.39 \pm 0.18 (0.17-0.94)	4.6 \pm 1.9 (1.3-8.8)	1.98 \pm 0.82 (0.96-4.45)	21 \pm 8 (9-44)	0.72 \pm 0.36 (0.25-2.12)	52 \pm 27 (13-118)	0.25 \pm 0.16 (0.03-0.74)	0.45 \pm 0.38 (0.15-1.60)
Autumn (n=36)	7 \pm 3 (2-14)	1.32 \pm 0.69 (0.38-2.81)	0.53 \pm 0.44 (0.06-1.90)	3.6 \pm 2.6 (1.0-12.4)	1.84 \pm 1.01 (0.73-4.54)	27 \pm 16 (6-86)	0.73 \pm 0.33 (0.24-1.54)	61 \pm 23 (11-116)	0.11 \pm 0.09 (0.00-0.33)	0.08 \pm 0.07 (0.00-0.25)
Winter (n=31)	9 \pm 4 (4-18)	2.57 \pm 0.96 (0.84-5.05)	0.70 \pm 0.41 (0.13-1.83)	4.2 \pm 1.2 (2.0-6.3)	3.19 \pm 1.37 (0.75-6.53)	38 \pm 14 (4-61)	1.05 \pm 0.77 (0.18-4.14)	41 \pm 20 (19-98)	0.17 \pm 0.12 (0.00-0.54)	0.19 \pm 0.12 (0.00-0.47)
Warm period (n=73)	10 \pm 5 (4-35)	1.85 \pm 0.65 (0.66-3.51)	0.34 \pm 0.17 (0.13-0.94)	6.3 \pm 2.9 (1.3-14.2)	2.19 \pm 0.72 (0.96-4.45)	26 \pm 11 (9-65)	0.51 \pm 0.33 (0.10-2.12)	33 \pm 26 (5-118)	0.22 \pm 0.15 (0.03-0.74)	0.43 \pm 0.30 (0.07-1.60)
Cold period (n=67)	8 \pm 3 (2-18)	1.91 \pm 1.04 (0.38-5.05)	0.61 \pm 0.43 (0.06-1.90)	3.9 \pm 2.1 (1.0-12.4)	2.49 \pm 1.37 (0.73-6.53)	32 \pm 16 (4-86)	0.88 \pm 0.59 (0.18-4.14)	51 \pm 24 (11-116)	0.14 \pm 0.11 (0.00-0.54)	0.13 \pm 0.11 (0.00-0.47)
Total (n=140)	9 \pm 4 (2-35)	1.88 \pm 0.85 (0.38-5.05)	0.46 \pm 0.35 (0.06-1.90)	5.2 \pm 2.8 (1.0-14.2)	2.33 \pm 1.08 (0.73-6.53)	29 \pm 14 (4-86)	0.69 \pm 0.51 (0.10-4.14)	41 \pm 26 (5-118)	0.18 \pm 0.14 (0.00-0.74)	0.29 \pm 0.27 (0.00-1.60)

Table 2. Average concentrations ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) \pm Standard deviation (range in brackets) of the major ions in PM_{10} samples of the studied suburban area, distributed by seasons.

	Cl⁻	SO₄²⁻ (total)	ssSO₄²⁻	nssSO₄²⁻	NO₃⁻	NH₄⁺	K⁺	Na⁺	Ca²⁺	Mg²⁺
Spring (n=40)	1.26±1.20 (0.19-5.47)	1.78±0.72 (0.59-3.67)	0.28±0.19 (0.05-0.87)	1.50±0.71 (0.52-3.36)	0.72±0.36 (0.24-1.87)	0.24±0.17 (0.03-0.63)	0.14±0.28 (0.05-1.87)	1.13±0.74 (0.19-3.47)	0.37±0.87 (0.05-4.36)	0.10±0.07 (0.02-0.39)
Summer (n=33)	0.60±0.68 (0.11-2.79)	1.89±1.29 (0.70-5.76)	0.28±0.20 (0.06-0.81)	1.62±1.19 (0.52-5.05)	0.52±0.32 (0.05-1.39)	0.34±0.25 (0.05-1.05)	0.09±0.04 (0.05-0.28)	1.10±0.78 (0.26-3.23)	0.15±0.08 (0.06-0.46)	0.09±0.07 (0.02-0.31)
Autumn (n=36)	0.90±0.62 (0.13-2.95)	0.63±0.26 (0.20-1.25)	0.18±0.10 (0.03-0.50)	0.45±0.24 (0.16-1.17)	0.64±0.24 (0.15-1.19)	0.10±0.06 (0.02-0.30)	0.06±0.03 (0.02-0.18)	0.72±0.42 (0.12-1.98)	0.18±0.06 (0.06-0.41)	0.07±0.03 (0.02-0.16)
Winter (n=31)	1.52±2.23 (0.01-9.05)	1.07±0.64 (0.23-2.87)	0.26±0.31 (0.01-1.29)	0.81±0.54 (0.12-2.45)	0.57±0.35 (0.05-1.39)	0.18±0.12 (0.06-0.55)	0.13±0.07 (0.03-0.27)	1.05±1.22 (0.05-5.14)	0.32±0.18 (0.07-0.88)	0.11±0.10 (0.01-0.40)
Warm period (n=73)	0.96±1.05 (0.11-5.47)	1.83±1.01 (0.59-5.76)	0.28±0.19 (0.05-0.87)	1.55±0.95 (0.52-5.05)	0.63±0.35 (0.05-1.87)	0.28±0.22 (0.03-1.05)	0.12±0.21 (0.05-1.87)	1.12±0.76 (0.19-3.47)	0.27±0.65 (0.05-4.36)	0.10±0.07 (0.02-0.39)
Cold period (n=67)	1.18±1.59 (0.01-9.05)	0.84±0.52 (0.20-2.87)	0.22±0.22 (0.01-1.29)	0.62±0.44 (0.12-2.45)	0.61±0.29 (0.05-1.39)	0.13±0.10 (0.02-0.55)	0.09±0.06 (0.02-0.27)	0.87±0.89 (0.05-5.14)	0.25±0.15 (0.06-0.88)	0.09±0.08 (0.01-0.40)
Total (n=140)	1.07±1.33 (0.01-9.05)	1.36±0.95 (0.20-5.76)	0.25±0.21 (0.01-1.29)	1.11±0.88 (0.12-5.05)	0.62±0.33 (0.05-1.87)	0.21±0.18 (0.02-1.05)	0.10±0.16 (0.02-1.87)	1.00±0.83 (0.05-5.14)	0.26±0.48 (0.05-4.36)	0.09±0.07 (0.01-0.40)

Table 3. Average concentrations \pm Standard deviation (range in brackets) of the results of isotopic analyses of PM₁₀ samples of the studied suburban area, distributed by seasons.

	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
Spring (n=40)	-27.0 \pm 1.3 (-34.3--26.1)	8.9 \pm 4.1 (2.8-16.6)
Summer (n=33)	-26.4 \pm 0.4 (-27.3--25.4)	7.5 \pm 5.6 (0.0-20.0)
Autumn (n=36)	-26.5 \pm 0.4 (-27.3--25.5)	1.2 \pm 2.4 (-4.7-8.5)
Winter (n=31)	-26.7 \pm 0.3 (-27.3--25.9)	6.1 \pm 5.3 (-2.8-19.4)
Warm period (n=73)	-26.8 \pm 1.0 (-34.3--25.4)	8.2 \pm 4.9 (0.0-20.0)
Cold period (n=67)	-26.6 \pm 0.4 (-27.3--25.5)	3.5 \pm 4.7 (-4.7-19.4)
Total (n=140)	-26.7 \pm 0.8 (-34.3--25.4)	6.0 \pm 5.3 (-4.7-20.0)

Supplementary material

Figure S1. a) Temporal variation (on a weekly basis) for total sulfur in PM₁₀ and gaseous SO₂ (Riazor station); b) Relationship between backward trajectories and S and SO₂.

Figure S2. Temporal variation (on a daily basis) for the number of particles of nucleation, Aitken and accumulation modes during the first sampling campaign (in spring).

Figure S3. Relationship between the number of particles (nucleation, Aitken and accumulation modes) and backward trajectories.

Table S1. Correlation matrices for PM₁₀, carbonaceous fractions, N, S and major ions, split by seasons.

Table S2. Correlations for nanoparticles with a) gases, metals and meteorological parameters, and b) PM₁₀, carbonaceous fractions, N, S and major ions.

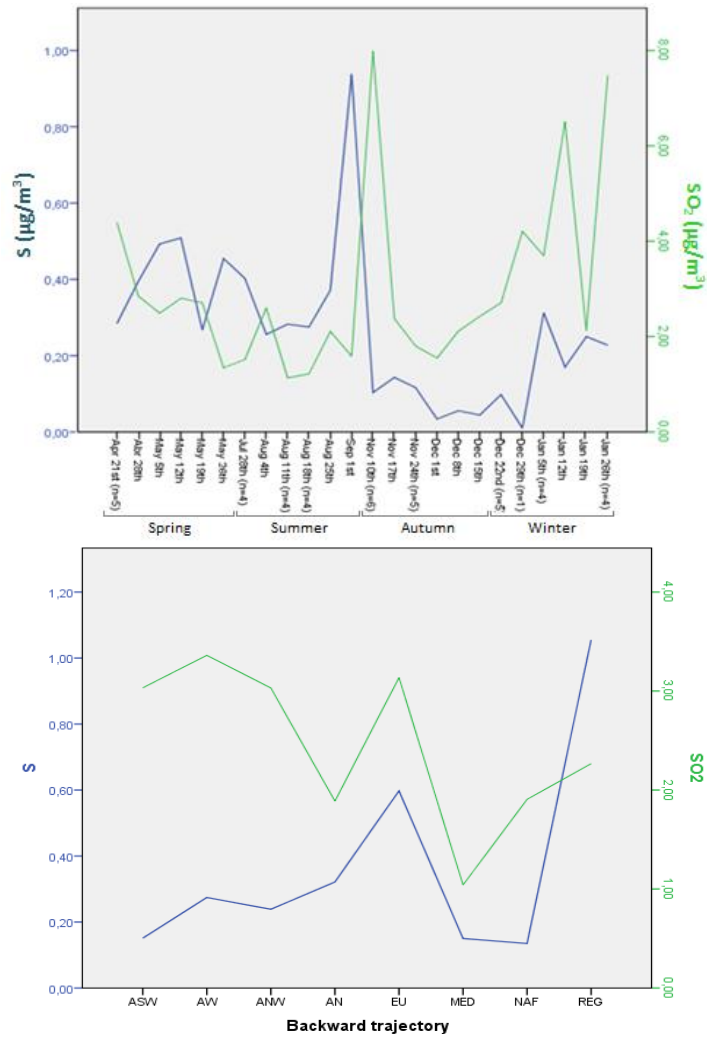


Figure S1. a) Temporal variation (on a weekly basis) for total sulfur in PM₁₀ and gaseous SO₂ (Riazor station); b) Relationship between backward trajectories and S and SO₂.

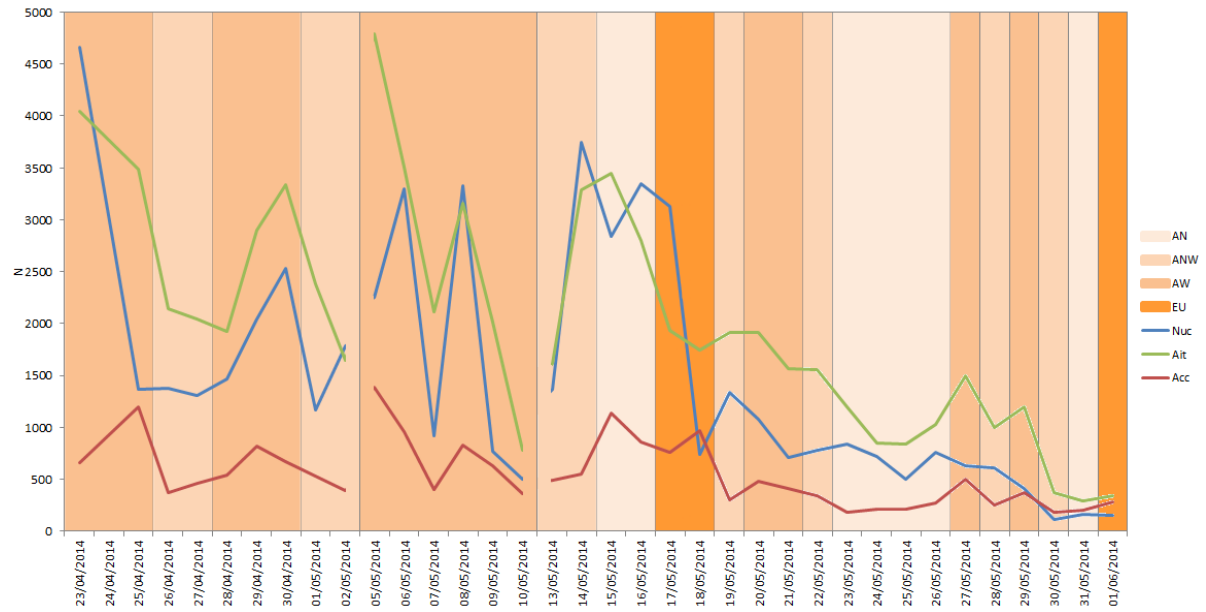


Figure S2. Temporal variation (on a daily basis) for the number of particles of nucleation, Aitken and accumulation modes during the first sampling campaign (in spring).

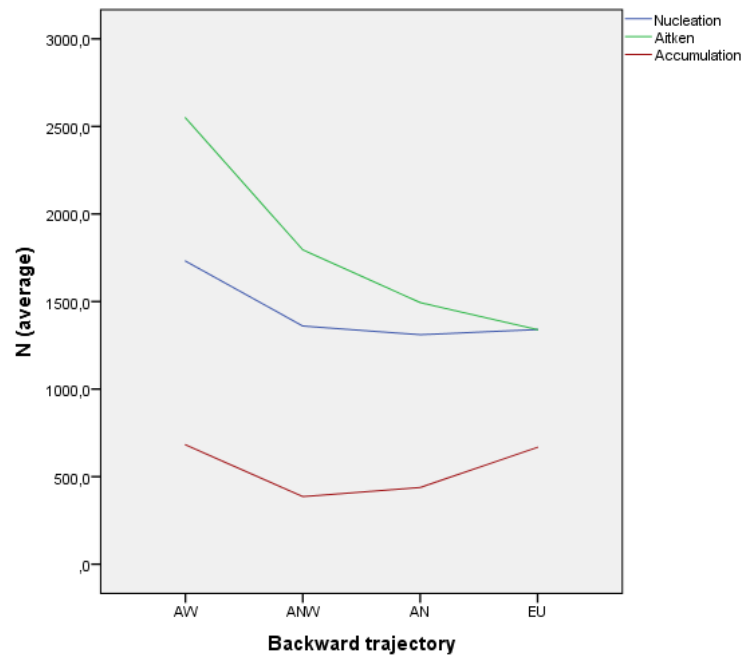


Figure S3. Relationship between the number of particles (nucleation, Aitken and accumulation modes) and backward trajectories.

Table S1. Correlation matrices for PM₁₀, carbonaceous fractions, N, S and major ions, split by seasons (continues).

PM ₁₀	Spring																	
	OC	EC	TC	WSOC	δ ¹³ C	δ ¹⁵ N	N	S	Cl	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	ssSO ₄ ²⁻	nsSO ₄ ²⁻	NH ₄ ⁺	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
1	.289	.222	.308	.081	-1.177	-1.135	.156	.548**	.395*	.322*	.578**	.589**	.430**	.043	.114	.589**	-.051	.478**
OC	1	.401*	.973**	.635**	-.396*	.103	.343*	.246	-.183	.031	.240	-.069	.261	.145	-.114	-.069	.081	-.027
EC		1	.601**	.553**	-.103	.320*	.383*	.371*	-.336*	-.075	.375*	-.178	.424**	.092	-.154	-.178	-.106	-.269
TC			1	.679**	-.374*	.171	.397*	.311	-.245	.005	.307	-.106	.337*	.152	-.138	-.106	.044	-.092
WSOC				1	-.094	.280	.336*	.209	-.256	.151	.265	-.171	.315	.155	.148	-.171	-.018	-.031
δ ¹³ C					1	-.048	.016	.019	-.089	-.048	.078	-.120	.110	.088	.021	-.120	.022	-.051
δ ¹⁵ N						1	.778**	.517**	-.673**	-.481**	.409**	-.508**	.545**	.637**	-.095	-.508**	-.260	-.489**
N							1	.754**	-.588**	-.314*	.648**	-.332*	.740**	.682**	-.170	-.332*	-.163	-.364*
S								1	-.243	-.106	.938**	.112	.918**	.609**	-.011	.112	-.181	.013
Cl									1	.693**	-.144	.886**	-.376*	-.469**	.303	.886**	.078	.804**
NO ₃ ⁻										1	.030	.657**	-.141	-.368*	.278	.657**	.021	.607**
SO ₄ ²⁻											1	.161	.967**	.514**	.007	.161	-.144	.069
ssSO ₄ ²⁻												1	-.098	-.256	.269	1.000**	-.209	.755**
nsSO ₄ ²⁻													1	.585**	-.063	-.098	-.091	-.126
NH ₄ ⁺														1	-.173	-.256	-.187	-.314*
K ⁺															1	.269	.031	.686**
Na ⁺																1	-.209	.755**
Ca ²⁺																	1	.254
Mg ²⁺																		1

**Correlation is significant at a significance level of 0.01 (bilateral). * Correlation is significant at a significance level of 0.05 (bilateral).

Table S1. Correlation matrices for PM₁₀, carbonaceous fractions, N, S and major ions, split by seasons (continues).

	Summer																		
	PM ₁₀	OC	EC	TC	WDOC	δ ¹³ C	δ ¹⁵ N	N	S	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	ssSO ₄ ²⁻	nssSO ₄ ²⁻	NH ₄ ⁺	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
PM ₁₀	1	.628**	.662**	.692**	.748**	.383*	.257	.591**	.895**	.257	.575**	.885**	.819**	.824**	.280	.822**	.819**	.903**	.882**
OC		1	.521**	.982**	.273	.204	.350*	.519**	.565**	.023	.470**	.582**	.383*	.568**	.248	.722**	.383*	.543**	.441*
EC			1	.674**	.580**	.116	.182	.298	.489**	.155	.499**	.510**	.472**	.475**	.140	.633**	.472**	.617**	.535**
TC				1	.366*	.202	.344	.516**	.599**	.054	.519**	.619**	.437*	.598**	.247	.766**	.437*	.608**	.501**
WDOC					1	.252	.280	.437*	.702**	-.132	.217	.701**	.469**	.682**	.196	.671**	.469**	.682**	.544**
δ ¹³ C						1	.014	.392*	.375*	.276	.251	.325	.475**	.273	.118	.222	.475**	.372*	.458**
δ ¹⁵ N							1	.764**	.554**	-.530**	-.133	.583**	-.178	.661**	.817**	.290	-.178	.153	-.071
N								1	.817**	-.260	.084	.814**	.224	.845**	.511**	.224	.469**	.308	
S									1	-.038	.367*	.992**	.600**	.976**	.701**	.600**	.797**	.685**	
Cl ⁻										1	.548**	-.079	.723**	-.205	-.437*	.078	.723**	.260	.640**
NO ₃ ⁻											1	.354*	.729**	.264	-.076	.463**	.729**	.557**	.744**
SO ₄ ²⁻												1	.565**	.991**	.600**	.711**	.565**	.781**	.639**
ssSO ₄ ²⁻													1	.447**	-.092	.578**	1.000**	.785**	.987**
nssSO ₄ ²⁻														1	.665**	.676**	.447**	.717**	.551**
NH ₄ ⁺															1	.213	-.092	.280	-.003
K ⁺																1	.578**	.722**	.640**
Na ⁺																	1	.785**	.987**
Ca ²⁺																		1	.830**
Mg ²⁺																			1

**Correlation is significant at a significance level of 0.01 (bilateral). * Correlation is significant at a significance level of 0.05 (bilateral).

Table S1. Correlation matrices for PM₁₀, carbonaceous fractions, N, S and major ions, split by seasons (continues).

PM ₁₀	Autumn																	
	OC	EC	TC	WDOC	δ ¹³ C	δ ¹⁵ N	N	S	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	ssSO ₄ ²⁻	nssSO ₄ ²⁻	NH ₄ ⁺	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
PM ₁₀	1	.239	.410*	.340	.636**	-.289	.073	.557**	.609**	.355*	.265	.674**	.542**	.486**	.649**	.542**	.132	.527**
OC		1	.583**	.936**	.495**	-.286	.243	.668**	.205	-.478**	-.107	.181	-.378*	.356*	.683**	-.378*	-.132	-.260
EC			1	.832**	.592**	-.437*	.388*	.580**	.153	-.309	.382*	.204	-.277	.337	.803**	-.277	.014	-.248
TC				1	.595**	-.385*	.326	.714**	.207	-.462**	.092	.213	-.379*	.391*	.814**	-.379*	-.085	-.286
WDOC					1	-.166	.238	.720**	.398*	-.145	.223	.465**	-.007	.502**	.288	.621**	-.032	-.015
δ ¹³ C						1	-.366*	-.115	-.253	-.116	-.448**	-.366*	-.114	-.343*	-.304	-.405*	-.114	-.193
δ ¹⁵ N							1	.442*	.371*	-.377**	-.100	.305	-.499**	.540**	.714**	.377*	-.499**	-.217
N								1	.617**	-.391*	.098	.652**	-.150	.782**	.400*	.728**	-.150	-.185
S									1	.080	.087	.931**	.294	.874**	.323	.403*	.294	.099
Cl ⁻										1	.219	.154	.943**	-.249	-.408*	-.160	.943**	.371*
NO ₃ ⁻											1	.192	.245	.059	.230	.170	.245	.232
SO ₄ ²⁻												1	.368*	.913**	.270	.469**	.368*	.158
ssSO ₄ ²⁻													1	-.044	-.394*	1.000**	.351*	
nssSO ₄ ²⁻														1	.463**	.521**	.016	
NH ₄ ⁺															1	.478**	.079	
K ⁺																1	.069	
Na ⁺																	1	
Ca ²⁺																		1
Mg ²⁺																		

**Correlation is significant at a significance level of 0.01 (bilateral). *Correlation is significant at a significance level of 0.05 (bilateral).

Table S1. Correlation matrices for PM₁₀, carbonaceous fractions, N, S and major ions, split by seasons (continues).

Winter																		
PM ₁₀	OC	EC	TC	WSDC	δ ¹³ C	δ ¹⁵ N	N	S	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	ssSO ₄ ²⁻	nsSO ₄ ²⁻	NH ₄ ⁺	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
1	.498**	.579**	.340	.230	.438*	-.206	.455*	.720**	.655**	.456**	.651**	.714**	.365*	.059	.810**	.714**	.328	.715**
OC	1	.796**	.982**	.733**	-.361	.524**	.922**	.645**	-.360	-.036	.293	-.282	.465**	.644**	.790**	-.282	-.354	-.232
EC		1	.897**	.554**	-.175	.163	.686**	.426*	-.164	.042	.168	-.059	.221	.298	.754**	-.059	-.212	.000
TC			1	.719**	-.432*	.493**	.890**	.536**	-.438*	-.054	.180	-.371*	.421*	.583**	.720**	-.371*	-.394*	-.309
WSDC				1	-.415*	.478**	.778**	.387*	-.299	-.205	.241	-.294	.450*	.786**	.582**	-.294	-.237	-.226
δ ¹³ C					1	-.572**	-.382*	.058	.751**	.466**	.312	.730**	-.044	-.453*	.005	.730**	.457**	.695**
δ ¹⁵ N						1	.681**	.322	-.624**	-.411*	-.045	-.654**	.316	.760**	.130	-.654**	-.590**	-.647**
N							1	.703**	-.361	-.070	.350	-.300	.539**	.799**	.742**	-.300	-.378*	-.250
S								1	.209	.233	.684**	.269	.654**	.465**	.791**	.269	.135	.272
Cl ⁻									1	.483**	.518**	.988**	.051	-.402*	.207	.988**	.677**	.966**
NO ₃ ⁻										1	.643**	.519**	.465**	-.283	.224	.519**	.312	.593**
SO ₄ ²⁻											1	.532**	.879**	.187	.581**	.532**	.505**	.611**
ssSO ₄ ²⁻												1	.063	-.408*	.282	1.000**	.696**	.973**
nsSO ₄ ²⁻													1	.450*	.526**	.063	.202	.171
NH ₄ ⁺														1	.400*	-.408*	-.388*	-.369*
K ⁺															1	.282	.067	.325
Na ⁺																1	.696**	.973**
Ca ²⁺																	1	.716**
Mg ²⁺																		1

**Correlation is significant at a significance level of 0.01 (bilateral). *Correlation is significant at a significance level of 0.05 (bilateral).

Table S1. Correlation matrices for PM₁₀, carbonaceous fractions, N, S and major ions, split by seasons.

		Total																	
	PM ₁₀	OC	EC	TC	WDOC	δ ¹³ C	δ ¹⁵ N	N	S	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	ssSO ₄ ²⁻	nssSO ₄ ²⁻	NH ₄ ⁺	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
PM ₁₀	1	.408**	.309**	.389**	.318**	.005	.166	.478**	.723**	.361**	.362**	.737**	.672**	.635**	.264**	.247**	.672**	.069	.662**
OC		1	.542**	.963**	.472**	-.237**	.404**	.478**	.289**	-.112	.073	.289**	-.024	.316**	.221**	.205*	-.024	.088	.073
EC			1	.749**	.621**	-.044	.053	.273**	-.001	-.129	.095	-.009	-.091	.010	.035	.097	-.091	-.040	-.018
TC				1	.574**	-.210*	.349**	.465**	.227**	-.175*	.080	.219*	-.097	.258**	.193*	.187*	-.097	.048	.004
WDOC					1	.036	.125	.369**	.098	-.193*	-.091	.108	-.111	.143	.182*	.119	-.111	-.040	-.012
δ ¹³ C						1	-.177*	.052	.034	.014	-.055	.041	.059	.030	.034	-.040	.059	-.021	.063
δ ¹⁵ N							1	.714**	.592**	-.421**	-.224**	.541**	-.269**	.645**	.733**	.108	-.269**	-.086	-.247**
N								1	.739**	-.384**	-.126	.685**	-.051	.750**	.768**	.056	-.051	-.100	-.060
S									1	-.056	.120	.958**	.347**	.949**	.658**	.158	.347**	-.006	.313**
Cl ⁻										1	.489**	.063	.867**	-.135	-.332**	.204*	.867**	.182*	.834**
NO ₃ ⁻											1	.223**	.594**	.115	-.199*	.231**	.594**	.098	.548**
SO ₄ ²⁻												1	.422**	.977**	.617**	.178*	.422**	.039	.409**
ssSO ₄ ²⁻													1	.219**	-.108	.228**	1.000**	.043	.913**
nssSO ₄ ²⁻														1	.689**	.138	.219**	.032	.226**
NH ₄ ⁺															1	.006	-.108	-.100	-.119
K ⁺																1	.228**	.076	.464**
Na ⁺																	1	.043	.913**
Ca ²⁺																		1	.276**
Mg ²⁺																			1

**Correlation is significant at a significance level of 0.01 (Bilateral). *Correlation is significant at a significance level of 0.05 (Bilateral).

Table S2. Correlations for nanoparticles with a) gases, metals and meteorological parameters, and b) PM₁₀, carbonaceous fractions, N, S and major ions.

a)																	
	Nuc	Ait	Acc	N _t	%Nuc	%Ait	%Acc	SO ₂	CO	O ₃	Wind dir.	Humidity	Solar radiation	Prec.	T (°C)	V	Fe
Nuc	1	.806**	.589**	.934**	.782**	-.586**	-.543**	-.744**	-.040	-.051	.310	-.435*	.192	.297	.414*	.000	.233
Ait		1	.834**	.960**	.389*	-.105	-.457**	-.561*	-.060	-.082	.290	-.111	-.131	.241	.235	.299	.005
Acc			1	.800**	.137	-.160	-.038	-.585*	.149	-.107	.331	-.151	-.048	.033	.401*	.464**	.145
N_t				1	.577**	-.354*	-.480**	-.674**	-.028	-.073	.325	-.280	.025	.259	.359	.198	.134
%Nuc					1	-.723**	-.720**	-.528*	-.057	.196	.203	-.607**	.324	.180	.285	-.332	.233
%Ait						1	.041	.783**	-.461	-.124	-.233	.612**	-.552**	-.039	-.467**	.196	-.383*
%Acc							1	.025	.427	-.140	-.064	.276	.087	-.229	.056	.283	.047

**Correlation is significant at a significance level of 0.01 (bilateral). * Correlation is significant at a significance level of 0.05 (bilateral).
Nuc: Nucleation mode; Ait: Airken mode; Acc: Accumulation mode; Wind dir.: Wind direction; Prec.: Precipitation.

b)																			
	PM ₁₀	OC	EC	TC	WSOC	δ ¹³ C	δ ¹⁵ N	N	S	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	ssSO ₄ ²⁻	nssSO ₄ ²⁻	NH ₄ ⁺	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
Nuc	.336*	.604**	.368*	.632**	.392*	-.610**	-0.01	-0.08	.146	.073	.242	0.209	.158	.173	-0.1	.000	.158	0	0.11
Ait	0.248	.500**	.537**	.578**	.524**	-.427*	-0.04	-0.09	.138	.016	.241	.224	.075	.209	.021	.035	.075	0.04	0
Acc	0.253	.580**	.542**	.651**	.650**	-.218	.182	0.28	.363*	-.260	.075	.425*	-.138	.469**	.340*	-0.03	-.138	0.02	-0.1
N_t	0.311	.599**	.496**	.658**	.507**	-.521**	0.003	-0.04	.182	.009	.239	.260	.094	.241	.006	.012	.094	-0	0.09
%Nuc	0.326	.415*	.125	.402*	0	-.384*	-0.27	-0.31	-.092	.292	.305	-0.03	.320	-.113	-.399*	.029	.320	-0.1	0.21
%Ait	-.369*	-.460**	.004	-.414*	-0.18	0	-.151	-0.22	-.351*	.046	-.035	-.347*	-0.13	-.320	-0.13	.064	-0.13	0.2	-.026
%Acc	-0.100	-.14	-.184	-.17	-.15	.243	.545**	.671**	.486**	-.469**	-.406*	.393*	-.328	.486**	.710**	-.106	-.328	-0	-0.3

**Correlation is significant at a significance level of 0.01 (bilateral). * Correlation is significant at a significance level of 0.05 (bilateral).
Nuc: Nucleation mode; Ait: Airken mode; Acc: Accumulation mode.