



Universitat
de les Illes Balears

TESIS DOCTORAL
2018

**DISEÑO Y DESARROLLO DE SISTEMAS
MICROFLUÍDICOS AUTOMÁTICOS PARA LA
DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES DE
INTERÉS AMBIENTAL**

Alba González López



Universitat
de les Illes Balears

TESIS DOCTORAL
2018

**Programa de Doctorado en Ciencia y
Tecnología Química**

**DISEÑO Y DESARROLLO DE SISTEMAS
MICROFLUÍDICOS AUTOMÁTICOS PARA LA
DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES DE
INTERÉS AMBIENTAL**

Alba González López

Director: Víctor Cerdà Martín
Directora: Sabrina Clavijo Roa
Tutor/a: José Manuel Estela Ripoll

Doctora por la Universitat de les Illes Balears



Universitat
de les Illes Balears

Dr. Víctor Cerdà Martín y Dra. Sabrina Clavijo Roa, ambos de la Universitat de les Illes Balears

DECLARAN:

Que la tesis doctoral que lleva por título *Diseño y desarrollo de sistemas microfluídicos automáticos para la determinación de contaminantes de interés ambiental*, presentada por Alba González López para la obtención del título de doctor, ha sido dirigida bajo nuestra supervisión y que cumple con los requisitos necesarios para optar al título de Doctor Internacional.

Y para que quede constancia de ello firmamos este documento.

Firmas

Dr. Víctor Cerdà Martín

Dra. Sabrina Clavijo Roa

Palma de Mallorca, 23 de julio de 2018.

ÍNDICE

Agradecimientos	i
Abreviaturas	v
Resumen	ix
Resum	xi
Abstract	xiii
Listado de publicaciones	xv
CAPÍTULO 1. Introducción	1
1.1 Compuestos analizados	3
1.1.1 Fenoles	3
1.1.1.1 Marco legal de los fenoles analizados	4
1.1.2 Estrógenos	5
1.1.2.1 Marco legal de los estrógenos analizados	7
1.2 Antecedentes en el análisis de los compuestos de interés	8
1.2.1 Análisis de fenoles	8
1.2.2 Análisis de estrógenos	10
1.3 Fundamentos de las técnicas cromatográficas	12
1.3.1 Cromatografía líquida en fase reversa	12
1.3.2 Cromatografía de gases	13
1.4 Técnicas de preconcentración y extracción utilizadas	18
1.4.1 Extracción líquido-líquido y microextracción líquido-líquido dispersiva	18
1.4.2 Extracción en fase sólida	20
1.5 Introducción general a las técnicas de análisis en flujo	22
1.5.1 Análisis por inyección secuencial	23
1.5.2 Análisis por inyección en flujo multijeringa	24
1.5.3 Laboratorio en válvula (Lab-on-valve)	25

1.6 Química analítica verde	27
1.7 Referencias	29
CAPÍTULO 2. Objetivos	41
2.1 Objetivo general	43
2.2 Objetivos específicos	43
CAPÍTULO 3. Materiales y métodos.....	45
3.1 Instrumentación para las técnicas en flujo	47
3.1.1 Módulo multijeringa	47
3.1.2 Válvula de selección	49
3.1.3 Sistema de agitación magnética asistida (MSA)	50
3.1.4 Lab-on-valve (LOV)	52
3.1.5 Conexiones, tuberías y otros elementos	53
3.2 Software AutoAnalysis	55
3.2.1 Configuración del sistema	55
3.2.2 Edición del método	56
3.2.3 Tratamiento de los datos	58
3.3 Automatización de las técnicas de pretratamiento de muestra utilizadas	59
3.3.1 Extracción líquido-líquido dispersiva en jeringa (in-syringe-DLLME)	59
3.3.2 Extracción en fase microsólida magnética dispersiva en jeringa (in-syringe magnetic D- μ -SPE)	62
3.4 Instrumentación cromatográfica y métodos	64
3.4.1 Cromatografía multijeringa (MSC)	64
3.4.2 Instrumentación para cromatografía de gases	67
3.4.2.1 Inyección de grandes volúmenes con vaporizador con temperatura programable (LVI-PTV)	68
3.4.2.1.1 In-port derivatization	69
3.5 Detectores	71

3.5.1 Espectrofotómetro	71
3.5.1.1 Fundamentos de la detección espectrofotométrica	71
3.5.1.2 Espectrofotómetro OceanOptics	72
3.5.2 Detector de ionización de llama (FID)	73
3.5.3 Espectrómetro de masas (MS)	74
3.6 Optimización del método analítico	75
3.6.1 Optimización multivariante	76
3.6.1.1 Función deseabilidad	77
3.7 Referencias	79

CAPÍTULO 4. Desarrollo de un analizador totalmente automatizado para compuestos fenólicos en aguas 85

4.1 Introducción y discusión	87
4.2 Artículo original	89
4.3 Información adicional	100
4.3.1 Espectros de absorción de los compuestos fenólicos	100

CAPÍTULO 5. Desarrollo de un sistema de microextracción líquido-líquido dispersiva en jeringa previo a la detección por GC-MS para la determinación de estrógenos en aguas residuales 103

5.1. Introducción y discusión	105
5.2 Artículo original	107
5.2.1 Material suplementario (Supplementary Material)	116

CAPÍTULO 6. Desarrollo de un sistema de extracción en fase microsólida dispersiva en jeringa basado en el uso de micropartículas magnéticas para la determinación de estrógenos 121

6.1 Introducción y discusión	123
------------------------------------	-----

6.2 Artículo original	125
6.2.1 Material suplementario (Supplementary Material)	136
CAPÍTULO 7. Desarrollo de un sistema SIA-LOV combinado con derivatización en el inyector-LVI-PTV-GC-MS para el análisis de estrógenos en agua de mar	145
7.1 Introducción y discusión	147
7.2 Artículo original	149
7.2.1 Material suplementario (Supplementary Material)	179
CAPÍTULO 8. Conclusiones	185
Conclusiones	187
Conclusions	191
ANEXO	195
Otras publicaciones	197
Comunicaciones en congresos	199

Agradecimientos

Ha llegado el momento de dar las gracias a todas las personas que han estado a mi lado durante estos años.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Víctor Cerdà, por confiar en mí desde el principio. A él y a la Dra. Sabrina Clavijo, por ser los directores de esta tesis, por su paciencia y su inestimable ayuda.

Al Dr. António Rangel y a la Dra. Raquel Mesquita, por la cálida acogida y por hacerme sentir una más en su equipo.

A todos mis compañeros de laboratorio, con los que tanto tiempo he compartido. Muy especialmente a Rogelio, por su apoyo y confianza, y a Jessica, por su sabiduría, sus consejos y su amistad.

A mis amigos, que son mi familia: Magdalena, Joana, Marta, Xaviera, Diana, Roberto... Por ser mi refugio, y porque brillamos más si estamos juntos. Os elegiría una y mil veces.

A mi madre, porque no estaría aquí sin su incansable lucha, y a Juan, por cuidar de ella como se merece.

A mi Mimi, por su amor infinito.

Y finalmente a Alfonso, por formar parte de mi vida y enseñarme tanto, por ser mi mayor apoyo, y por hacerme un hueco en su maravillosa familia.

A todos, gracias.

Alba González agradece al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MINECO) y a la empresa Sciware Systems S.L., spin-off de la Universitat de les Illes Balears (Reg. #4) por el contrato predoctoral DI-15-07998 para la realización de esta tesis, así como a la Conselleria d'Economia, Hisenda i Innovació del Gobierno de las Islas Baleares por el apoyo financiero a grupos competitivos (43/2011), cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

Esta tesis forma parte de los proyectos del Plan Nacional de Ciencia y Tecnología Química CTQ2013-47461-R titulado “Desarrollo de métodos automáticos de análisis mediante sistemas microfluídicos. Aplicación a la determinación de parámetros de interés ambiental”, y del proyecto CTQ2016-77155-R concedido por la Agencia Estatal de Investigación (AEI) titulado “Nuevas tecnologías y materiales avanzados para la automatización de metodologías de análisis medioambiental”, ambos cofinanciado por fondos FEDER.

Abreviaturas

2-CP	2-clorofenol
2,4-DCP	2,4-diclorofenol
2,4,6-TCP	2,4,6-triclorofenol
2-NP	2-nitrofenol
4-NP	4-nitrofenol
μ-SPE	Extracción en fase microsólida (<i>microsolid phase extraction</i>)
BIA	Análisis por inyección de perlas (<i>bead injection analysis</i>)
BSTFA	N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CCL-4	Lista de contaminantes candidatos (<i>contaminant candidate list</i>)
CE	Electroforesis capilar (<i>capillary electrophoresis</i>)
CPE	Extracción en punto de nube (<i>cloud point extraction</i>)
CZE	Electroforesis capilar de zona (<i>capillary zone electrophoresis</i>)
DAD	Detector de arreglo de diodos (<i>diode-array detector</i>)
DLL	Librería de enlace dinámico (<i>dynamic link library</i>)
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva (<i>dispersive liquid-liquid microextraction</i>)
DLLME-SFO	DLLME basada en solidificación de la gota orgánica flotante (<i>solidification of floating organic drop</i>)
E1	Estrona
E2	17β-estradiol
E3	Estriol
ECD	Detector electroquímico (<i>electrochemical detector</i>)

EDCs	Compuestos disruptores endocrinos (<i>endocrine disruptor compounds</i>)
EE2	17 α -etinilestradiol
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FIA	Análisis por inyección en flujo (<i>flow injection analysis</i>)
FID	Detector de ionización de llama (<i>flame ionization detector</i>)
GC	Cromatografía de gases (<i>gas chromatography</i>)
HF-LPME	Microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca (<i>hollow fiber-based liquid phase microextraction</i>)
HF-MMLLE	Extracción líquido-líquido con membranas microporosas (<i>hollow fiber micro-porous membrane liquid-liquid extraction</i>)
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (<i>high performance liquid chromatography</i>)
LC	Cromatografía líquida (<i>liquid chromatography</i>)
LLE	Extracción líquido-líquido (<i>liquid-liquid extraction</i>)
LLLME	Microextracción líquido-líquido-líquido (<i>liquid-liquid-liquid microextraction</i>)
LOD	Límite de detección (<i>limit of detection</i>)
LOQ	Límite de cuantificación (<i>limit of quantification</i>)
LOV	Laboratorio en válvula (<i>lab-on-valve</i>)
LPME	Microextracción en fase líquida (<i>liquid phase microextraction</i>)
LVI	Inyección de grandes volúmenes (<i>large volume injection</i>)
MCFIA	Análisis por inyección en flujo multiconmutado (<i>multicommutation flow injection analysis</i>)

MEPS	Microextracción por sorbente empaquetado (<i>microextraction by packed sorbent</i>)
MPFS	Sistema en flujo multibomba (<i>multipumping flow system</i>)
MS	Espectrometría de masas (<i>mass spectrometry</i>)
MSA	Agitación magnética asistida (<i>magnetic stirring assisted</i>)
MSC	Cromatografía multijeringa (<i>multisyringe chromatography</i>)
MSFIA	Análisis por inyección en flujo multijeringa (<i>multisyringe flow injection analysis</i>)
O-CLLE	Extracción líquido-líquido continua en línea (<i>online continuous liquid-liquid extraction</i>)
Ph	Fenol
PTFE	Politetrafluoroetileno
PTV	Vaporizador con temperatura programable (<i>programmable temperature vaporization</i>)
RIA	Radioinmuno ensayo (<i>radioimmunoassay</i>)
RSD	Desviación estándar relativa (<i>relative standard deviation</i>)
SFA	análisis en flujo segmentado (<i>segmented flow analysis</i>)
SFC	Cromatografía de fluidos supercríticos (<i>supercritical fluid chromatography</i>)
SIA	Análisis por inyección secuencial (<i>sequential injection analysis</i>)
SIC	Cromatografía por inyección secuencial (<i>sequential injection chromatography</i>)
SPE	Extracción en fase sólida (<i>solid phase extraction</i>)
UPLC	Cromatografía líquida de ultra-alta resolución (<i>ultra performance liquid chromatography</i>)

US-EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (<i>Environmental Protection Agency of the United States</i>)
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
YES	Ensayo estrogénico con levadura bioluminiscente (<i>yeast estrogen screen</i>)

Resumen

La creciente presencia de contaminantes en el medio ambiente se ha convertido en un motivo de preocupación para la sociedad. En este sentido, la monitorización del agua es esencial, por lo que es importante desarrollar metodologías analíticas eficientes, rápidas y de bajo coste, que además tengan en cuenta el impacto ambiental y la seguridad del analista.

Generalmente, las muestras medioambientales no se pueden analizar de manera directa, debido a la complejidad de las matrices o a las bajas concentraciones de los analitos. Por ello, suele ser necesaria una etapa de tratamiento de la muestra previa a la determinación de los compuestos de interés. La tendencia actual se dirige al uso de técnicas de microextracción, que disminuyen el consumo de reactivos y muestra. No obstante, realizar estas técnicas de manera manual sigue resultando largo y costoso. En consecuencia, se está tendiendo cada vez más a su automatización, obteniendo métodos más precisos, rápidos y económicos. Además, la versatilidad de estos sistemas automatizados permite su uso combinado con una gran cantidad de técnicas de separación que posibilitan la determinación selectiva de los analitos, como es el caso de la cromatografía.

En la presente tesis se han desarrollado diferentes metodologías basadas en las técnicas de análisis en flujo y la cromatografía para la determinación de parámetros de interés ambiental en aguas. Por un lado, se han cuantificado compuestos fenólicos listados como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA). Por otra parte, se han diseñado sistemas para la determinación de varios estrógenos catalogados como contaminantes emergentes por la US-EPA debido a sus características como disruptores endocrinos. Todos los procedimientos analíticos propuestos proporcionan una elevada reproducibilidad, precisión y sensibilidad, a la vez que ofrecen una importante reducción de los volúmenes de reactivos y muestra necesarios, por lo que son más sostenibles, y representan una mejora en el tiempo y coste por análisis, comparados con los métodos manuales tradicionales.

A continuación, aparecen listados los trabajos incluidos en esta tesis:

1. Un analizador completamente automatizado, compacto y de bajo coste, basado en el acoplamiento de la microextracción líquido-líquido dispersiva con agitación magnética asistida en jeringa (in-syringe-MSA-DLLME) con la cromatografía multijeringa (MSC), para la extracción, preconcentración, separación y cuantificación de seis compuestos fenólicos (fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol).
2. Un sistema in-syringe-MSA-DLLME para la preconcentración de cuatro estrógenos en aguas residuales (estrona, 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol y estriol). Las características del método desarrollado han permitido la inyección directa del extracto en un cromatógrafo de gases, disminuyendo así el tiempo necesario para el pretratamiento de la muestra.
3. Un sistema in-syringe magnetic D- μ -SPE para la preconcentración de tres estrógenos en aguas residuales (estrona, 17β -estradiol y 17α -etinilestradiol) previa a su detección por GC-MS, en el que se utilizan microcarbones magnéticos como fase sólida, sintetizados a partir de la combustión directa de cristales de ZIF-67, un subtipo de materiales cristalinos con estructuras metal-orgánicas (MOFs).
4. Un método para la extracción de cuatro estrógenos en agua de mar (estrona, 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol y estriol) basado en el desarrollo de un sistema SIA-LOV, el cual proporciona un elevado grado de automatización al pretratamiento de las muestras ya que tanto la extracción como la renovación de la resina tienen lugar de forma automática, seguido de la derivatización del extracto en el inyector del cromatógrafo (in-port derivatization), con lo que se disminuye el gasto de agentes de derivatización y el tiempo necesario para que se dé la reacción, y la posterior separación y cuantificación de los analitos utilizando la técnica LVI-PTV.

Resum

La presència creixent de contaminants en el medi s'ha convertit en un motiu de preocupació per la societat. En aquest sentit, l'anàlisi de l'agua és essencial, per la qual cosa és important desenvolupar metodologies analítiques eficients, ràpides i econòmiques, que a més tinguin en compte l'impacte ambiental i la seguretat de l'analista.

Generalment, les mostres mediambientals no es poden analitzar de manera directa, a causa de la complexitat de les matrius o de les baixes concentracions dels analits. Per això, sol ser necessària una etapa de tractament de la mostra prèvia a la determinació dels composts d'interès. La tendència actual es dirigeix cap a l'ús de les tècniques de microextracció, que disminueixen el consum de reactius i mostra. No obstant, realitzar aquestes tècniques manualment segueix resultant llarg i costós. En conseqüència, es tendeix cada vegada més a la seva automatització, obtenint mètodes més precisos, ràpids i econòmics. A més, la versatilitat d'aquests sistemes automatitzats permet el seu ús combinat amb una gran quantitat de tècniques de separació que possibiliten la determinació selectiva dels analits, com és el cas de la cromatografia.

En la present tesi s'han desenvolupat diferents metodologies basades en les tècniques d'anàlisi en flux i la cromatografia per a la determinació de paràmetres d'interès ambiental en aigües. Per un costat, s'han quantificat composts fenòlics llistats com a contaminants prioritaris per l'Agència de Protecció Ambiental dels Estats Units (US-EPA). Per altra banda, s'han dissenyat sistemes per a la determinació de diversos estrògens catalogats com a contaminants emergents per la US-EPA degut a les seves característiques com a disruptors endocrins. Tots els procediments analítics proposats proporcionen una elevada reproductibilitat, precisió i sensibilitat, a la vegada que ofereixen una important reducció dels volums de reactius i mostra necessaris, per la qual cosa són més sostenibles, així com una millora del temps i cost per anàlisi, comparats amb els mètodes manuals tradicionals.

A continuació, apareixen llistats els treballs inclosos en aquesta tesi:

1. Un analitzador completament automatitzat, compacte i de baix cost, basat en l'acoblament de la microextracció líquid-líquid dispersiva en xeringa (in-syringe-MSA-DLLME) amb la cromatografia multixeringa (MSC), per a la extracció, preconcentració, separació i quantificació de sis composts fenòlics (fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol).
2. Un sistema in-syringe-MSA-DLLME per a la preconcentració de quatre estrògens en aigües residuals (estrona, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, estriol). Les característiques del mètode desenvolupat han permès la injecció directa de l'extracte en un cromatògraf de gasos, disminuint així el temps necessari per dur a terme el pretractament de la mostra.
3. Un sistema in-syringe magnètic D- μ -SPE per a la preconcentració de tres estrògens en aigües residuals (estrona, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol) prèvia a la seva detecció per GC-MS, en el qual s'empren microcarbons magnètics com a fase sòlida., sintetitzats a partir de la combustió directa de cristalls de ZIF-67, un subtipus de materials cristal·lins amb estructures metall-orgàniques (MOFs).
4. Un mètode per a l'extracció de quatre estrògens en aigua de mar (estrona, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, estriol) basat en el desenvolupament d'un sistema SIA-LOV, el qual proporciona un alt grau d'automatització al pretractament de les mostres ja que tant l'extracció com la renovació de la resina tenen lloc de manera automàtica, seguit de la derivatització de l'extracte dins l'injector del cromatògraf (in-port derivatization), amb la qual cosa es redueix el consum d'agents de derivatització i el temps necessari perquè la reacció es dugui a terme, i la posterior separació i quantificació dels analits mitjançant la tècnica LVI-PTV.

Abstract

The growing presence of pollutants in the environment has become a social concern. In this sense, water monitoring is essential; hence it is important to develop efficient, rapid and low-cost analytical methodologies which also take into account the environmental impact and the analyst safety.

Generally, environmental samples cannot be directly analyzed, due to the complexity of the matrices or the low concentrations of the analytes. Therefore, a stage of sample treatment prior to the determination of the compounds of interest is needed. Currently there is a trend towards the use of microextraction techniques, which reduce reagents and samples consumption. However, performing these techniques manually is still costly and time-consuming. Thus, the automation of sample pretreatment is a good approach to achieve efficient and fast analytical methods. In addition, the versatility of these automated systems allows their combination with a large number of separation techniques, such as chromatography, which enables the selective determination of analytes.

In the present thesis, different methodologies based on flow analysis and chromatographic techniques have been developed for the determination of parameters of environmental interest in water samples. On the one hand, several phenolic compounds listed as priority pollutants by the United States Environmental Protection Agency (US-EPA) have been quantified. On the other hand, different systems have been designed for the determination of estrogenic compounds, which are catalogued as emerging pollutants by the US-EPA due to their characteristics as endocrine disruptors. All the proposed procedures provide high reproducibility, accuracy and sensitivity, while offering a significant reduction in the volumes of reagents and sample needed, resulting in more sustainable methods than the traditional manual ones and in an improvement in time and cost per analysis.

The works included in this thesis are listed below:

1. A fully automated, compact and low-cost analyzer, based on the coupling of the dispersive liquid-liquid microextraction (in-syringe-MSA-DLLME) with multisyringe chromatography (MSC), for the extraction, preconcentration, separation and quantification of six phenolic compounds (phenol, 2-nitrophenol, 4-nitrophenol, 2-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol).
2. An in-syringe-MSA-DLLME system for the preconcentration of four estrogens (estrone, 17 β -estradiol, 17 α -ethinylestradiol and estriol) in wastewater samples. The characteristics of the developed method have allowed the direct injection of the extract into a gas chromatograph, thus decreasing the time necessary for the sample pretreatment.
3. An in-syringe magnetic D- μ -SPE system for the preconcentration of three estrogens (estrone, 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol) in wastewater samples prior their detection by GC-MS, in which magnetic carbon microparticles synthesized from the direct combustion of ZIF-67 crystals, a subtype of crystalline materials with metal-organic structures (MOFs), are used as solid phase.
4. A method for the extraction of four estrogens (estrone, 17 β -estradiol, 17 α -ethinylestradiol and estriol) in seawater samples, based on the development of a SIA-LOV system, which provides a high degree of automation to the samples pretreatment since both the extraction and the renewal of the resin are performed automatically, followed by the on-line derivatization of the extract (in-port derivatization), which decreases the derivatization agents consumption and the reaction time, and the subsequent quantification of the analytes using the LVI-PTV technique.

Listado de publicaciones

La presente tesis doctoral es un compendio de los siguientes artículos de investigación:

- 1. Determination of priority phenolic pollutants exploiting an in-syringe dispersive liquid–liquid microextraction–multisyringe chromatography system.**

Autores: A. González, J. Avivar y V. Cerdà

Revista: Analytical and Bioanalytical Chemistry

Año: 2015

Volumen: 407

Páginas: 2013-2022

DOI: 10.1007/s00216-015-8464-1

Índice de impacto: 3,431

- 2. Estrogens determination in wastewater samples by automatic in-syringe dispersive liquid–liquid microextraction prior silylation and gas chromatography.**

Autores: A. González, J. Avivar y V. Cerdà

Revista: Journal of Chromatography A

Año: 2015

Volumen: 1413

Páginas: 1-8

DOI: 10.1016/j.chroma.2015.08.031

Índice de impacto: 3,981

3. In-syringe dispersive μ -SPE of estrogens using magnetic carbon microparticles obtained from zeolitic imidazolate frameworks.

Autores: A. González, J. Avivar, F. Maya, C. Palomino Cabello, G. Turnes

Palomino y V. Cerdà

Revista: Analytical and Bioanalytical Chemistry

Año: 2017

Volumen: 409

Páginas: 225-234

DOI: 10.1007/s00216-016-9988-8

Índice de impacto: 3,431

4. Estrogens determination exploiting a SIA-LOV system prior in-port derivatization-large volume injection-programmable temperature vaporization-gas chromatography.

Autores: A. González, S. Clavijo y V. Cerdà

Revista: Talanta

Año: 2018

Estado: Enviado para su publicación

Índice de impacto: 4,244

CAPÍTULO 1

Introducción

1.1 Compuestos analizados

1.1.1 Fenoles

Los fenoles son compuestos orgánicos aromáticos con el grupo hidroxilo como grupo funcional. El más sencillo es el fenol, un hidroxibenceno (Figura 1.1). Los cinco carbonos aromáticos no unidos al grupo hidroxilo pueden reaccionar para formar una gran variedad de compuestos, conocidos como compuestos fenólicos o fenoles.

Determinados fenoles se pueden encontrar de manera natural en el ambiente, ya que son metabolitos secundarios de un gran número de plantas, además de ser sintetizados por bacterias, hongos y animales. Por otra parte, también encontramos estos compuestos en aguas, suelos y sedimentos provenientes de distintos tipos de industrias, dado que tienen muchas y diversas aplicaciones, desde pesticidas y herbicidas a conservantes de maderas, productos farmacéuticos, tintes o explosivos [1-3].

La determinación de fenoles en el medio es de gran interés debido a su toxicidad, especialmente para organismos acuáticos, incluso a concentraciones del orden de los mg L^{-1} . Esta toxicidad está relacionada tanto con la hidrofobicidad del compuesto individual, que influye en la posibilidad de interacción del mismo con las células y los tejidos de los organismos vivos, como con la capacidad de formación de radicales libres, y con el número, posición y naturaleza de sus sustituyentes [4].

Por otra parte, algunos compuestos fenólicos pueden modificar las características organolépticas (cambios en el sabor y/o en el olor) del agua potable y de animales acuáticos que forman parte de nuestra alimentación, aun estando a concentraciones del orden de los $\mu\text{g L}^{-1}$ [3].

En consecuencia, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA) ha incluido varios compuestos fenólicos en sus listas de contaminantes prioritarios [5]. Por todo ello, se ha desarrollado un método automatizado para la determinación de seis de los fenoles listados, cuyas estructuras se muestran en la Figura 1.1.

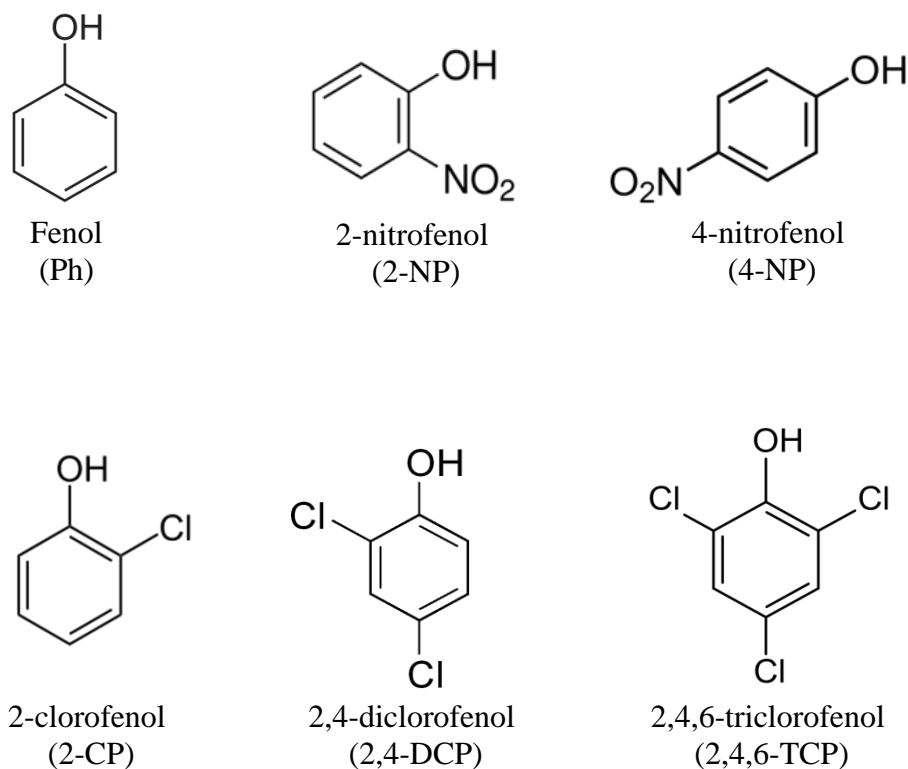


Figura 1.1. Estructura de los fenoles estudiados.

1.1.1.1 Marco legal de los fenoles analizados

Todos los fenoles estudiados han sido catalogados como contaminantes tóxicos de acuerdo a la Sección 307(a)(1) de la Ley Federal de Control de Contaminación del Agua (Federal Water Pollution Control Act) [6].

Para el Ph, la US-EPA establece como dosis oral de referencia $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ por día [7], así como valores límite en agua potable de 6 mg L^{-1} durante un período de máximo 10 días en niños y 2 mg L^{-1} de Ph en el agua potable de por vida [8].

Respecto a los nitrofenoles, la US-EPA establece como concentración límite en efluentes de industrias $231 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para el 2-NP y $576 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para el 4-NP por día, además de requerir que se le informe en caso de descargas o derrames accidentales al medio ambiente de 100 libras (45,5 kg) o más de nitrofenoles [9].

En cuanto a los clorofenoles, dado que pueden modificar las características organolépticas del agua potable, se recomienda que la concentración en agua de consumo no sea mayor de $0,04 \text{ mg L}^{-1}$ para el 2-CP ni $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ para el 2,4-DCP, ya que a estos niveles ya se percibe sabor. También se establece como concentración límite en efluentes de industrias $112 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para el 2,4-DCP [10].

1.1.2 Estrógenos

Las hormonas son compuestos naturales producidos en el organismo, responsables de funciones como el crecimiento y desarrollo, el metabolismo, la regulación del medio interno y la reproducción. De entre ellas, los estrógenos constituyen un grupo de hormonas sexuales femeninas que se caracterizan por poseer un anillo aromático con un grupo hidroxilo en posición 3 [11].

Los estrógenos que se han aislado a partir de fuentes naturales en cantidades notables son la estrona (E1), el 17β -estradiol (E2) y el estriol (E3) [12]. Por otro lado, se han desarrollado estrógenos sintéticos con actividades similares a los naturales pero de metabolismo más lento para ser usados como fármacos, entre los que destaca el etinilestradiol (EE2) [13]. Las estructuras de los citados estrógenos se encuentran en la Figura 1.2. Todos estos compuestos son utilizados de forma terapéutica, sobre todo para la contracepción y el alivio de los síntomas de la menopausia [14].

Desde hace unos años, el análisis y la determinación de estrógenos han suscitado un gran interés, fundamentalmente por dos razones. En primer lugar, se trata de compuestos disruptores endocrinos (endocrine disruptor compounds, EDCs). Los EDCs fueron definidos por la Comisión Europea en 1996 como “sustancias exógenas que causan efectos adversos en la salud de los organismos o su descendencia, como consecuencia de cambios en sus funciones endocrinas” [15]. Más tarde, también la Organización Mundial de la Salud los definió como “una sustancia o mezcla exógena que altera la(s) función(es) del sistema endocrino y por tanto causa efectos adversos sobre la salud de un organismo sano, de su descendencia o parte de la población” [16]. Por lo tanto, son sustancias que pueden alterar la reproducción y el desarrollo de animales y seres humanos. Por otra parte, estos compuestos han sido catalogados como

contaminantes emergentes [17]. Este grupo de contaminantes comprende principalmente productos utilizados en grandes cantidades en el día a día, como pueden ser fármacos, productos de cuidado personal o aditivos industriales. Una de las características de estos contaminantes es que, a causa de su elevada producción y consumo, no necesitan ser persistentes para causar efectos negativos en el medio [18].

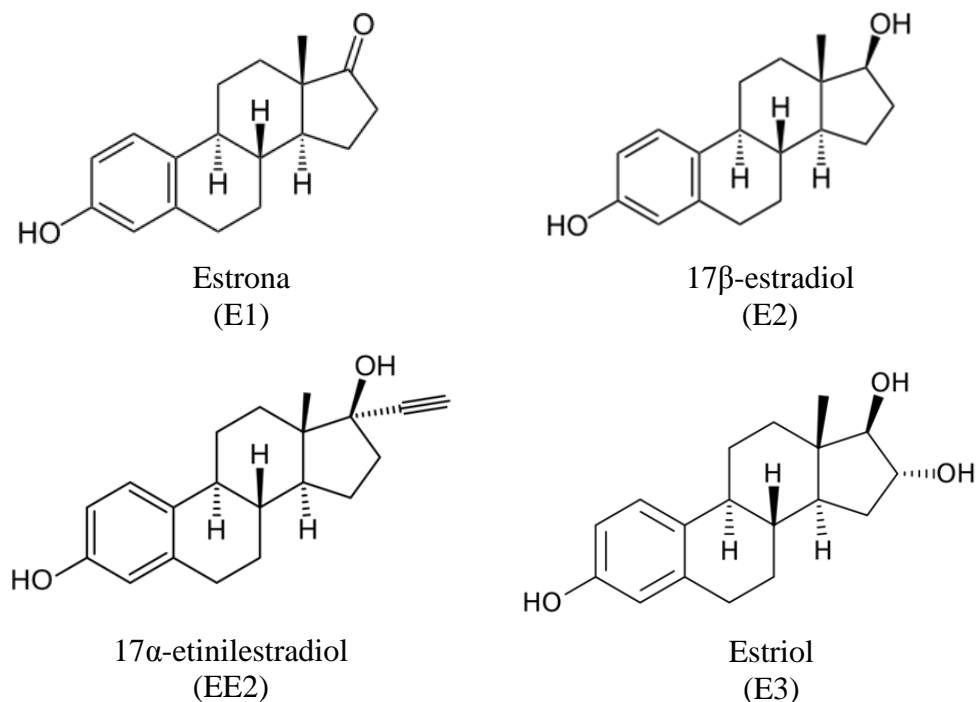


Figura 1.2. Estructura de los estrógenos estudiados.

En el caso de las hormonas estudiadas, una de las principales vías de introducción en el medio ambiente son las aguas residuales domésticas, en gran medida a causa del aumento en el consumo de productos farmacéuticos que las contienen. Así, tanto las hormonas producidas naturalmente por el organismo como las presentes en medicamentos son excretadas a través de la orina, incorporándose en primer lugar a las aguas residuales y de ahí a ríos, lagos y mares. En este contexto, ha crecido la preocupación de que estos contaminantes lleguen a los consumidores, ya que se ha observado una eliminación incompleta de determinados productos farmacéuticos en las plantas de tratamiento de aguas residuales [19]. Además, la presencia de hormonas en el medio ambiente acuático está causando graves alteraciones en la fauna marina. Por

ejemplo, se ha demostrado que estos compuestos inducen respuestas estrogénicas en peces a pesar de estar en muy bajas concentraciones, como feminización, disminución de la fertilidad o hermafroditismo [20].

1.1.2.1 Marco legal de los estrógenos analizados

En referencia a la presencia de hormonas en aguas medioambientales, en el 2013 la Directiva 2013/39/UE de la Comisión Europea estableció una lista de observación de sustancias que han de monitorizarse, dentro de la cual se encuentran el E2 y el EE2 [21]. Además, el año 2015 se publicó la Decisión de Ejecución 2015/495 en la que consta que en la lista de observación debe incluirse también la estrona a causa de su estrecha analogía química con el estradiol [22]. En este mismo documento aparecen los límites máximos aceptables de detección del método analítico utilizado, los cuales deben ser al menos tan bajos como la concentración prevista sin efecto específica para cada sustancia en la correspondiente matriz. En el caso de las hormonas estudiadas, el límite máximo de detección es 0,4 mg L⁻¹ para E1 y E2, y 0,035 mg L⁻¹ para EE2.

Por otra parte, la US-EPA publicó en 2016 la lista de contaminantes candidatos (Contaminant Candidate List, CCL-4) en la que se encuentran los cuatro estrógenos mencionados. La CCL-4 es un listado de contaminantes cuyo análisis se considera prioritario ya que se han encontrado o se prevén encontrar en aguas de consumo. En la misma lista se establece un nivel de referencia para la salud (Health Reference Level, HRL), una concentración límite para estos compuestos en aguas de consumo, a partir de la cual puede haber efectos adversos sobre la salud: 0,35 µg L⁻¹ para E1 y E3, 0,035 µg L⁻¹ para EE2 y 0,09 µg L⁻¹ para E2 [23].

1.2 Antecedentes en el análisis de los compuestos de interés

La presencia medioambiental de los contaminantes analizados y las consecuencias derivadas de su exposición justifican la necesidad de desarrollar métodos analíticos para su determinación.

Uno de los mayores problemas a la hora de identificar y cuantificar estos compuestos en muestras ambientales son las bajas concentraciones en las que se encuentran; de ahí que para su análisis normalmente sea necesario combinar técnicas de extracción y preconcentración de la muestra con técnicas analíticas de alta sensibilidad.

A continuación se presenta un resumen de las principales metodologías analíticas utilizadas para la determinación de compuestos fenólicos y de estrógenos en muestras medioambientales.

1.2.1 Análisis de fenoles

Como se ha comentado anteriormente, para analizar compuestos fenólicos en muestras ambientales suele ser necesario un paso previo de tratamiento de muestra, a fin de preconcentrarlos y eliminar posibles interferentes. Las dos técnicas más utilizadas con este fin son la extracción líquido-líquido (LLE) [26, 27, 31-33], que es también la técnica recomendada oficialmente por la US-EPA [5], y la extracción en fase sólida (SPE) [24, 25, 29, 30, 34]. Además de las metodologías tradicionales, se han utilizado estas técnicas en su versión miniaturizada (microextracción) [26, 27, 31-33] y en línea [24, 29], consiguiendo métodos más respetuosos con el medio ambiente, ya que reducen considerablemente la cantidad de disolventes necesaria para llevar a cabo el análisis.

Respecto a la identificación y cuantificación de los fenoles, la cromatografía líquida (LC) es la técnica utilizada más frecuentemente, combinada con detectores espectrofotométricos (UV) [24-28] y electroquímicos (EC) [28, 29], junto a la cromatografía de gases (GC) con detector de espectrometría de masas (MS) [30-33]. También se pueden encontrar en la literatura métodos basados en la electroforesis capilar (CE) [34, 35].

En la Tabla 1.1 aparece un resumen de metodologías analíticas utilizadas para determinar fenoles en aguas. Las abreviaturas de todas las técnicas citadas se encuentran en el apartado “Abreviaturas”, al inicio de esta tesis.

Tabla 1.1. Resumen de algunas metodologías analíticas empleadas para el análisis de fenoles en aguas.

Analitos	Muestras	Pretratamiento de la muestra	Sistema de análisis	Referencia
Ph, 2-CP, 2,4-DCP, 2,4,6-TCP	Río, grifo	On-line SPE	LC-UV-Vis	[24]
2-CP, 2,4-DCP	Río	SPE	LC-UV-Vis	[25]
Ph, 2-CP, 2,4-DCP, 2,4,6-TCP	Destilada	DLLME-SFO	HPLC-UV	[26]
2-NP, 4-NP	Mar	LLLME	cLC -UV-Vis	[27]
2-CP, 2,4-DCP, 2,4,6-TCP	Río	CPE	LC-UV-ECD	[28]
Ph, 2-NP, 4-NP, 2-CP	Residuales, río	On-line SPE	LC-DAD-ECD	[29]
2-CP, 2,4-DCP,	Río	SPE	GC-MS	[30]
2,4-DCP, 2,4,6-TCP	Subterráneas	LPME	GC-MS	[31]
Ph, 2-CP, 2,4-DCP, 2,4,6-TCP	Río, grifo, de consumo	LPME	GC-MS	[32]
2-CP, 2,4-DCP, 2,4,6-TCP	Río, grifo, pozo	DLLME	GC-ECD	[33]
Ph, 2-CP, 2,4-DCP, 2,4,6-TCP	Superficiales, reutilizada	SPE	CE-CL	[34]
Ph, 2,4-DCP	Destilada	-	CZE-UV	[35]

1.2.2 Análisis de estrógenos

Para el caso de las hormonas, los métodos de pretratamiento de muestras más utilizados son igualmente la SPE [36, 37, 39-41, 44-50, 52-56, 58] y la LLE [38, 42, 43, 51, 57]. De nuevo, también se ha reportado el uso de sus variantes de microextracción [38, 42, 44, 51] y métodos que llevan a cabo la extracción de la muestra en línea [42, 48, 50].

En cuanto a su determinación, la técnica más utilizada es la GC-MS [36-45], aunque también se utiliza la LC con diferentes detectores, como MS [46-49], UV [50, 51] y UV con arreglo de diodos (DAD) [52], así como técnicas analíticas no instrumentales como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) [53, 56], el radioinmuno ensayo (RIA) [58] y bioensayos como el ensayo con levadura bioluminiscente (YES) [56, 57].

En la Tabla 1.2 se muestra un resumen de algunas metodologías analíticas encontradas en la literatura para la determinación de estrógenos en aguas.

Tabla 1.2. Resumen de algunas metodologías analíticas utilizadas para el análisis de estrógenos en aguas.

Analitos	Muestras de agua	Pretratamiento de la muestra	Sistema de análisis	Referencia
E1, E2, EE2, E3	Residuales	SPE	GC-MS	[36]
E1, E2, EE2, E3	Residuales	SPE	GC-MS	[37]
E1, E2, EE2	Residuales, grifo	HF-MMLLE	GC-MS	[38]
E1, E2, EE2	Río	SPE	GC-MS, GC-MS/MS, LC-MS/MS	[39]

Tabla 1.2. (Continuación) Resumen de las metodologías analíticas descritas para el análisis de estrógenos en aguas.

Analitos	Muestras de agua	Pretratamiento de la muestra	Sistema de análisis	Referencia
E1, E2, E3	Superficiales	SPE	GC-MS	[40]
E1, E2, EE2, E3	Río	SPE	GC-MS	[41]
E1, E2, EE2, E3	Río	O-CLLE	GC-MS	[42]
E1, E2, EE2	Río	LLE	GC-MS	[43]
EE2	Residuales	SPE, MEPS	LVI-GC-MS	[44]
E1, E2, EE2, E3	Residuales, estuario	SPE	LVI-PTV-GC-MS	[45]
E1, E2, EE2, E3	Residuales	SPE	LC-MS/MS	[46]
E1, E2, EE2, E3	Residuales	SPE	LC-MS/MS	[47]
E1, E2, EE2, E3	Residuales	on-line SPE	LC-MS/MS	[48]
E1, E2, EE2, E3	Residuales, río	SPE	LC-MS	[49]
E1, E2, E3	Río	On-line SPE	HPLC-UV	[50]
E1, E2, EE2, E3	Río, grifo	DLLME-SFO	UPLC-UV	[51]
E1, E2, EE2, E3	Mineral, subterránea, río, grifo	SPE	LC-DAD	[52]
E2	Superficiales, residuales, costeras	SPE	ELISA	[53]
E2, EE2	Residuales, río	SPE	ELISA	[54]
E1, E2	Residuales, de consumo	SPE	ELISA	[55]
E2	Residuales	SPE	ELISA, YES assay	[56]
E2	Residuales	LLE	YES assay	[57]
E1, E2, E3	Residuales	SPE	RIA	[58]

1.3 Fundamentos de las técnicas cromatográficas

En química analítica es imprescindible el uso de técnicas de separación, ya que hacen posible la realización de determinaciones selectivas. Entre las técnicas de separación existentes, una de las más utilizadas es la cromatografía, que permite separar los componentes de mezclas complejas, así como su identificación y cuantificación. Generalmente, los componentes básicos para llevar a cabo una separación cromatográfica son una fase móvil, una columna (fase estacionaria), un sistema de introducción de muestra y un detector.

Esencialmente, la cromatografía es un método en el que la separación se produce como resultado de repetidos equilibrios de distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, la fase estacionaria y la fase móvil. Así, los solutos son transportados por la fase móvil a través de la fase estacionaria, separándose en función de la afinidad que tengan por esta; los compuestos más afines se retendrán más fuertemente y avanzarán más lentos, mientras que los que se retengan en menor medida avanzarán más rápido porque la fase móvil los transportará más fácilmente. De esta manera, se separan los compuestos [59].

Las técnicas cromatográficas se pueden clasificar en función del estado de la fase móvil. De este modo se diferencia entre cromatografía líquida (LC), cromatografía de gases (GC) y cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) [60].

1.3.1 Cromatografía líquida en fase reversa

La principal característica de la LC es que la fase móvil es un líquido, mientras que la fase estacionaria es sólida (columna cromatográfica). En función de la polaridad de las fases podemos diferenciar entre cromatografía de fase normal, cuando la fase estacionaria es polar y la fase móvil presenta una baja polaridad, y de fase reversa, que es la más utilizada actualmente, en la cual la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil.

Generalmente, para llevar a cabo una separación en fase reversa se utiliza como relleno para la columna cromatográfica una base de sílice químicamente unida a

cadenas de hidrocarburos de longitudes diferentes, como las C₈ o C₁₈ [61]. Además de las tradicionales columnas de partículas, en los últimos años se han desarrollado las columnas monolíticas, cuyas propiedades han permitido la implementación de técnicas cromatográficas de baja presión, como la cromatografía por inyección secuencial (sequential injection chromatography, SIC) [62] y la cromatografía multijeringa (multisyringe chromatography, MSC) [63]. En el capítulo 3 se detallan tanto las características de las columnas monolíticas como las de la MSC, utilizada en esta tesis para la determinación de fenoles.

En cuanto a la fase móvil, generalmente puede ser un único disolvente (isocrática), o bien una mezcla (gradiente) en la que la proporción de los componentes determinará la fuerza de elución. Al pasar la fase móvil a través de la columna, irá eluyendo los analitos retenidos, comenzando por los más polares (en el caso de fase reversa, ya que tendrán menor afinidad por la columna), para acabar con los menos polares, que se retendrán más fuertemente [64].

1.3.2 Cromatografía de gases

A diferencia de la LC, en la GC la elución se produce por el flujo de un gas inerte que actúa como fase móvil (gas portador). Los gases más utilizados como fase móvil para GC son el helio, el argón y el nitrógeno. Por tanto, en este tipo de cromatografía la fase móvil no interacciona con los analitos, sino que ejerce únicamente de transportador a través de la fase estacionaria.

Las columnas capilares son las más utilizadas en la GC. Se construyen de sílice fundida recubierta de un polímero protector. Pueden tener hasta 100 m de longitud, con un diámetro interno de 150 a 300 µm. En la Figura 1.3 se puede ver una fotografía de una columna capilar comercial de sílice para GC.



Figura 1.3. Columna capilar para GC.

Por otra parte, de entre los diferentes sistemas de inyección disponibles para introducir la muestra en la columna capilar, el más utilizado es el inyector Split/Splitless (Figura 1.4). Con él se puede llevar a cabo la inyección con división de flujo (Split), introduciendo 1-2 μL de la muestra [65] primero en una cámara de vaporización a alta temperatura, y transfiriendo después sólo una pequeña parte de ésta a la columna (0,1-1%) arrastrada por el gas portador, mientras que la parte mayoritaria se expulsa del inyector por la válvula de Split [66]. De esta forma se evita sobrepasar la capacidad de la columna [67]. También ofrece la opción de inyectar en modo Splitless, útil para el análisis de analitos a nivel de trazas. En este caso, la muestra es evaporada a alta temperatura en la cámara de vaporización y es introducida en su totalidad en la columna, cuya temperatura se mantiene a unos 20-25°C por debajo del punto de ebullición del disolvente, por lo que éste condensa al entrar en la columna, formando una barrera que actúa de trampa concentrando los analitos. Pasado un tiempo, se abre una válvula de purga en el inyector para eliminar el disolvente vaporizado remanente y se aumenta la temperatura de la columna para iniciar la separación [66]. Al no haber división de la muestra, aumenta considerablemente la sensibilidad del método. Ésta es

la técnica de inyección que se ha utilizado para el análisis de estrógenos en dos de los trabajos de esta tesis (capítulos 5 y 6).

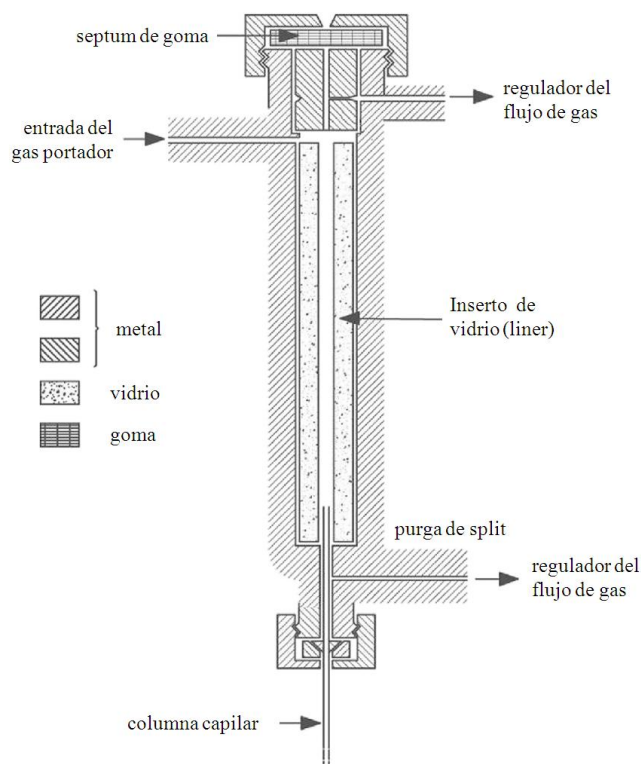


Figura 1.4. Esquema de un inyector Split/Splitless.

El volumen de inyección en una columna capilar está restringido hasta un máximo de 2 μL [65]. Sin embargo, es posible inyectar volúmenes mayores de muestra (large volume injection, LVI) mediante técnicas de eliminación del disolvente, con el objetivo de mejorar el análisis de trazas: al aumentar la muestra que introducimos en el sistema, aumentará proporcionalmente la cantidad de analito que llega al detector, consiguiendo áreas de pico mayores y límites de detección más bajos. Una de las opciones es la inyección en frío con programación de temperatura, que requiere el uso de un inyector del tipo vaporizador con temperatura programable (programmable temperature vaporization, PTV). Una descripción más profunda de esta técnica se encuentra en el tercer capítulo de esta tesis (3.4.2.1).

La GC es una técnica versátil con importantes ventajas, ya que los métodos son simples, rápidos y sensibles [66]. Sin embargo, tiene también una serie de limitaciones. Para llevar a cabo el análisis, la muestra debe estar en fase gaseosa antes de la inyección en la columna. Por tanto, esta técnica requiere que los compuestos a separar sean volátiles o volatilizables mediante la formación de derivados que sí lo sean. Además, deben ser térmicamente estables. Por esta razón, se utilizan reacciones de derivatización con la finalidad de convertir compuestos no volátiles en derivados, a la vez que se pueden modificar sus características cromatográficas, acortando o alargando sus tiempos de retención para conseguir separarlos de sustancias interferentes [68]. En función de los reactivos y la reacción que tiene lugar, encontramos diferentes técnicas de derivatización. La más utilizada es la sililación, que conlleva la sustitución de un hidrógeno activo unido a átomos electronegativos (grupos –OH, NH o –SH) por un grupo alquilsililo. De esta manera evitamos la formación de puentes de hidrógeno entre las moléculas, interacciones que provocan un aumento en el punto de ebullición del compuesto, obteniendo derivados más volátiles, termoestables, y menos polares. Los derivados con el grupo trimetilsilil (TMS) son los más comunes, usualmente introducidos por reactivos como el BSTFA (N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida), el BSA (N,O-Bis(trimetilsilil)acetamida) o el MSTFA (N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida) [69].

A continuación se muestra la ecuación general para una reacción de sililación (Ecuación 1.1), así como la estructura del BSTFA (Figura 1.5), el reactivo utilizado en la presente tesis.



Ecuación 1.1. Reacción general de sililación.

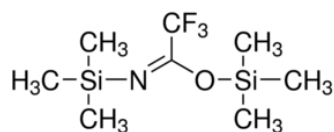


Figura 1.5. Estructura del reactivo de derivatización BSTFA.

Así, la derivatización es una etapa adicional en el tratamiento de muestra para el análisis por GC que conlleva un aumento del tiempo de análisis y del gasto de reactivos y muestra. A pesar de ello, las mejoras significativas que proporciona en selectividad y sensibilidad, así como el hecho de que posibilita el análisis de una mayor cantidad de compuestos, hace que siga siendo una etapa habitual en los análisis por GC. Normalmente, estas reacciones se llevan a cabo de manera manual (off-line). Sin embargo, actualmente se han desarrollado técnicas para realizar la reacción en línea (on-line) reduciendo el tiempo de pretratamiento de muestra y disminuyendo los errores experimentales [70]. Una de estas técnicas es la derivatización en el puerto (in-port derivatization), mediante la cual se introducen tanto el reactivo derivatizante como la muestra directamente en el inyector del cromatógrafo, donde tiene lugar la reacción. Esta técnica se explica más detalladamente en el capítulo 3 de la tesis (3.4.2.1.1).

1.4 Técnicas de preconcentración y extracción utilizadas

Por lo general, las muestras no se pueden analizar de manera directa, bien porque el analito está en una concentración muy baja o porque la matriz es muy compleja y contiene interferentes que pueden dificultar el análisis o incluso dañar el equipo. Por ello, suele ser necesaria una etapa de pretratamiento, sobre todo cuando se trabaja con matrices complejas como muestras ambientales, para conseguir eliminar potenciales interferentes, incrementar la robustez del método, aumentar la concentración del compuesto de interés o convertirlo en una especie apta para la detección. Para conseguirlo se utilizan diversas técnicas, entre las que destacan la extracción líquido-líquido (o su variante, la extracción líquido-líquido dispersiva) y la extracción en fase sólida.

1.4.1 Extracción líquido-líquido y microextracción líquido-líquido dispersiva

La extracción líquido-líquido (LLE) es una de las técnicas de tratamiento de muestra más utilizadas en química analítica. Se fundamenta en un proceso de transferencia de materia desde una fase líquida A a una segunda fase B, también líquida, que debe ser inmisible o sólo parcialmente miscible con la primera. El reparto del analito entre las dos fases se basa en diferencias de solubilidad, que, en definitiva, dependen de los momentos dipolares y la polarizabilidad de las moléculas. Se define el coeficiente de reparto (K) como la solubilidad del analito en el medio B dividida por la solubilidad en el medio A. Para que la extracción sea efectiva, K debe tener un valor elevado, ya que esto indicará que nuestro compuesto de interés es más soluble en la fase B, es decir, que tiene más afinidad por ésta, consiguiendo así extraerlo de la fase A.

Por tanto, un factor decisivo para obtener una extracción satisfactoria es la composición de las fases utilizadas. Normalmente, se utiliza una fase acuosa y otra orgánica, si bien se pueden emplear combinaciones de disolventes orgánicos inmiscibles. En la fase acuosa suele estar disuelto el soluto a separar, junto con ácidos, sales inorgánicas o sustancias orgánicas, que pueden provenir de la matriz de la muestra, del tratamiento previo o pueden haber sido añadidas de forma intencionada

para mejorar la extracción. Es importante conocer el pH de la fase acuosa, ya que es en muchas ocasiones un factor determinante dado que el soluto debe estar en la forma adecuada para transferirse a la segunda fase.

La segunda fase, la fase orgánica, también llamada extractante, puede ser un único disolvente o una mezcla. Debe ser muy poco soluble en agua y no reaccionar con ella; además, se valora que posea características como un bajo punto de ebullición, presión de vapor y viscosidad moderados, que no forme emulsiones, que sea químicamente estable y no tóxico. La transferencia del compuesto de interés desde la fase acuosa puede deberse a procesos de solvatación, formación de complejos o formación de aductos [71].

Una variante de la tradicional LLE es la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME). Esta técnica fue desarrollada por Rezaee et al. en 2006 [72]. Se basa en el uso de un tercer componente, llamado dispersante, el cual es soluble tanto en la fase acuosa como en la orgánica. Dicho dispersante se añade a la fase orgánica para aumentar su solubilidad en agua. A continuación, la mezcla de dispersante y extractante orgánico se inyecta rápidamente en la muestra acuosa con una jeringa, formándose una disolución turbia por la rápida dispersión del extractante en finas gotitas. De esta manera se consigue aumentar en gran medida la superficie de contacto entre las fases, con lo que se consiguen altas eficiencias en la extracción [73]. En los primeros trabajos desarrollados se utilizaban extractantes más densos que el agua, por lo que después era necesario centrifugar para a continuación extraer manualmente la fase sedimentada y proceder a su análisis. Como variante, si el disolvente es menos denso que el agua y queda en la parte superior, se consigue la separación de fases mediante flotación en lugar de centrifugación [74].

Las ventajas de la DLLME con respecto a la LLE clásica son claras: mientras que la técnica tradicional requiere consumir grandes cantidades de reactivos y tiempo, la DLLME es simple, rápida, y permite alcanzar elevados factores de preconcentración [75,76]. Además, es económica y más beneficiosa para el medio ambiente, ya que se utilizan cantidades menores de reactivos y muestra.

El funcionamiento de la DLLME se muestra paso a paso en la Figura 1.6.

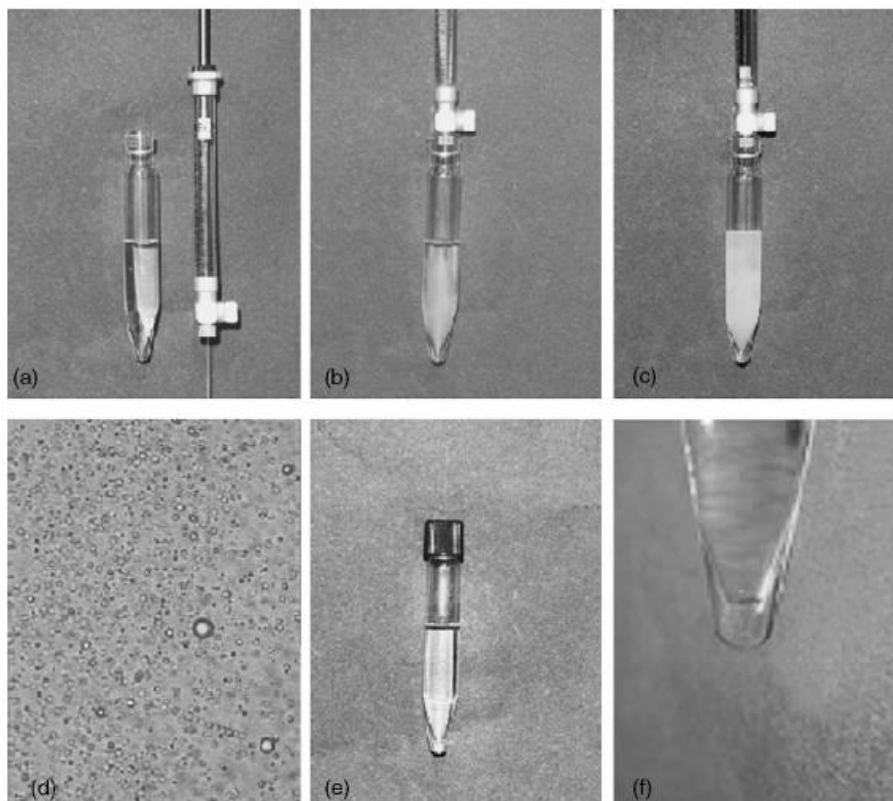


Figura 1.6. Fotografía original de Rezaee et al. [72], en la que aparecen los diferentes pasos en la DLLME: (a) antes de la inyección del dispersante (acetona) y el extractante (C_2Cl_4) en la disolución de la muestra, (b) inicio de la inyección, (c) final de la inyección, (d) fotografía realizada con un microscopio óptico, magnitud 1000, que muestra las finas partículas de C_2Cl_4 , (e) después de centrifugar y (f) imagen aumentada de la fase sedimentada ($5,0 \pm 0,2 \mu L$).

1.4.2 Extracción en fase sólida

Hoy en día, la extracción en fase sólida (SPE) es la técnica más utilizada para el pretratamiento de muestras líquidas. La SPE presenta una serie de ventajas frente a la LLE, como son la reducción del tiempo y coste por análisis, un menor consumo de reactivos y producción de desechos, y una menor exposición del analista a disolventes orgánicos, entre otras.

El fundamento de esta técnica es similar al de la LLE, ya que se basa en las diferencias de afinidad que presenta el analito por una fase sólida. De esta forma, para llevar a cabo la SPE se hace pasar la muestra a través de una fase estacionaria, previamente acondicionada, en la que algunos compuestos quedarán retenidos mientras otros pasarán inalterados. Normalmente, los compuestos retenidos son los analitos de interés, que serán posteriormente eluidos utilizando un disolvente apropiado, el cual puede ser suavemente evaporado si es necesario mejorar el factor de enriquecimiento del eluato. Así, la extracción elimina gran parte de la matriz de la muestra simplificando el análisis [77,78]. La fase estacionaria y el eluyente utilizados dependerán del analito, su concentración y la matriz en la que se encuentre. Los pasos básicos para llevar a cabo una SPE se encuentran esquematizados en la Figura 1.7.

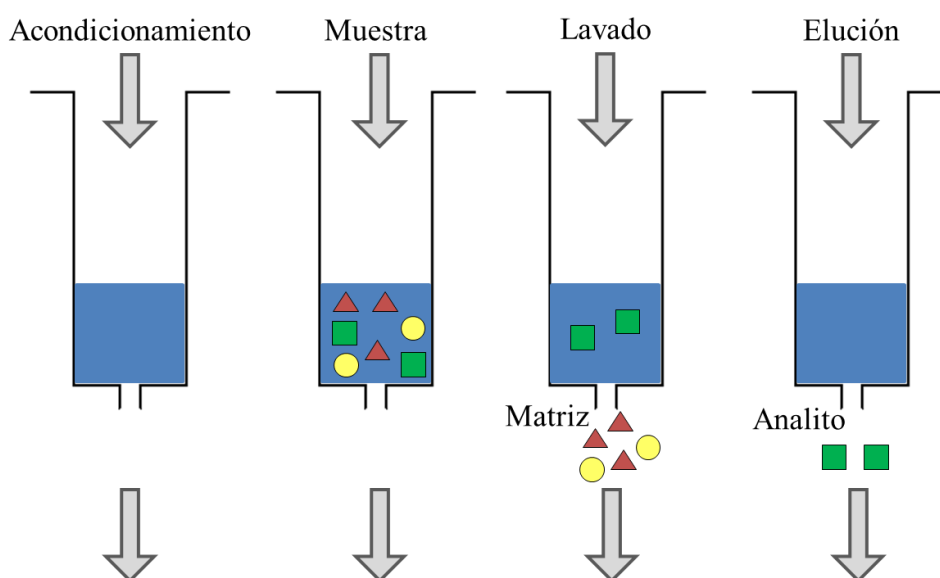


Figura 1.7. Pasos para realizar la SPE. A) Acondicionamiento de la columna; B) adición de la muestra; C) lavado de la columna; D) elución de los analitos.

A partir de la SPE tradicional se han desarrollado multitud de variantes, tanto por las posibilidades de automatización que ofrece la técnica [79], como por el desarrollo de nuevos materiales que pueden ser utilizados como adsorbentes, como por ejemplo carbones porosos [80] derivados de estructuras metalorgánicas (metal-organic frameworks, MOFs) [81], descritas en el capítulo 3 (3.3.2).

1.5 Introducción general a las técnicas de análisis en flujo

Las técnicas de análisis en flujo permiten el desarrollo de sistemas total o parcialmente automatizados para el manejo de fluidos. De esta manera, se pueden automatizar las técnicas de pretratamiento de muestra, e incluso análisis completos.

El uso de estos sistemas conlleva una serie de importantes ventajas, como la reducción al mínimo de la manipulación de la muestra por parte del analista, salvaguardando así su seguridad y evitando la contaminación de la misma, así como un menor consumo de reactivos y muestra y, con ello, una menor generación de residuos, haciendo que los análisis resulten menos perjudiciales para el medio ambiente. Por otra parte, también se consiguen mejoras en los resultados, pues son más precisos y reproducibles que con las técnicas tradicionales, a la vez que se ahorra tiempo y coste por análisis.

Por todos estos motivos, las técnicas de análisis en flujo son útiles tanto para análisis de rutina como para investigación. En concreto, se han realizado grandes esfuerzos para automatizar la preparación de muestras, puesto que normalmente es la parte más larga de un análisis y la que contribuye en mayor medida a la incertidumbre del mismo.

La primera técnica de flujo desarrollada fue el análisis en flujo segmentado (segmented flow analysis, SFA), propuesto por L. T. Skeggs en la década de los 50 [82]. Desde entonces las técnicas de flujo han ido evolucionando, desarrollándose entre otras el análisis por inyección en flujo (flow injection analysis, FIA) [83], el análisis por inyección secuencial (sequential injection analysis, SIA) [84], el análisis por inyección en flujo multiconmutado (multicommutation flow injection analysis, MCFIA) [85], el análisis por inyección en flujo multijeringa (multisyringe flow injection analysis, MSFIA) [86], el sistema en flujo multibomba (multipumping flow systems, MPFS) [87] y el laboratorio en válvula (lab-on-valve, LOV) [88].

Puesto que se pueden encontrar un gran número de publicaciones en las que se describe el surgimiento y evolución de las técnicas en flujo [89-93], a continuación se incluirá sólo una breve descripción de las técnicas utilizadas en esta tesis.

1.5.1 Análisis por inyección secuencial

J. Ruzicka y G. D. Marshall desarrollaron en 1990 la técnica de análisis por inyección secuencial (SIA) [84]. Esta técnica se basa en utilizar una bomba de pistón bidireccional con una jeringa que tiene una válvula de tres vías en la cabeza. Esto permite que los fluidos puedan ser aspirados o dispensados hacia las dos posiciones de la válvula (normalmente, hacia un reservorio del reactivo, o hacia el sistema de tuberías). En la configuración básica de un sistema SIA, la jeringa se conecta al puerto central de una válvula de selección mediante un bucle de carga. En otro de los puertos de la válvula de selección se encuentra el detector. Así, el fluido portador de la jeringa empuja la muestra para ser introducida en el sistema e impulsada hacia el detector. En la Figura 1.8 se puede ver la configuración básica de un sistema SIA.

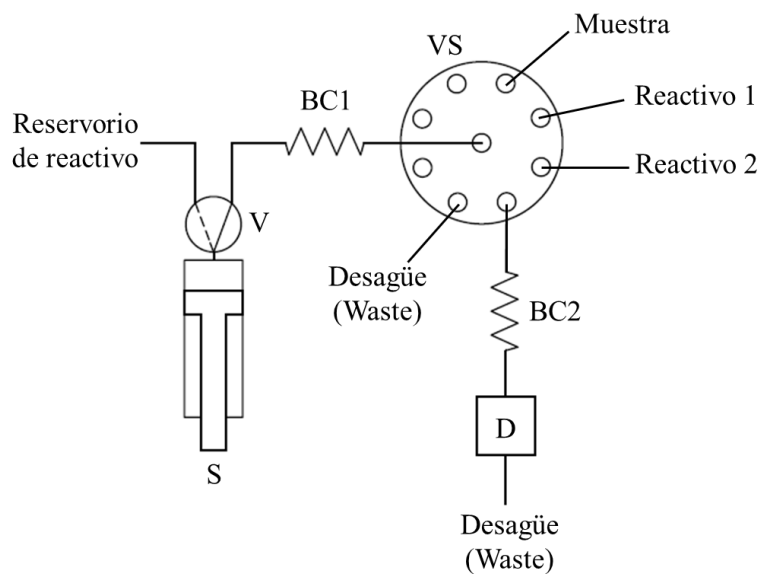


Figura 1.8. Representación esquemática de un sistema SIA. BC: Bucle de carga; D: Detector; S: Jeringa, V: Válvula solenoide de la cabeza de la jeringa; VS: Válvula de selección.

Al contrario que en las técnicas que se desarrollaron anteriormente, como SFA y FIA, en SIA el flujo no es continuo, sino discreto. Esta propiedad permite un gran ahorro en el consumo de muestra y reactivos, a la vez que proporciona mayor versatilidad y flexibilidad a la hora de modificar los métodos sin necesidad de alterar el

manifold (red de tuberías del sistema). Por otra parte, la técnica SIA resulta más robusta que las anteriores y soporta presiones más elevadas, lo que ha dado lugar al desarrollo de nuevas metodologías o la automatización de tratamientos de muestra que no eran factibles utilizando FIA o SFA. Además, para propulsar los líquidos se utilizan jeringas de vidrio que no se ven deterioradas por el contacto con productos químicos agresivos o disolventes, al contrario que lo que pasa con los tubos de Tygon de las bombas peristálticas utilizadas en FIA.

En cuanto a las desventajas de la técnica SIA, cabe destacar que ésta requiere del uso de ordenadores, provocando un incremento en los costes y complejidad instrumental. Además, las frecuencias de análisis obtenidas en sistemas SIA son menores que las obtenidas con FIA, al ser un método secuencial y con ello requerir un cambio continuo de la posición de una válvula de selección [94].

1.5.2 Análisis por inyección en flujo multijeringa

La técnica de análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA) fue desarrollada en 1999 por V. Cerdà [86] con el objetivo de combinar las ventajas de las técnicas FIA, SIA y MCFIA, evitando sus inconvenientes [95,96].

La base de esta técnica es el uso de una bureta automática que puede ser equipada con hasta cuatro jeringas que se mueven de manera simultánea, puesto que se encuentran sobre una barra metálica impulsada por un único motor paso a paso. Esto equivaldría a utilizar una bomba peristáltica multicanal en FIA sin utilizar sus frágiles tubos. Por tanto, la técnica MSFIA permite mezclar muestra y reactivos por confluencia, obteniendo así frecuencias de análisis elevadas y mejorando la eficiencia de la mezcla con respecto a la técnica SIA.

Además, en la cabeza de cada jeringa se encuentra una válvula solenoide de tres vías, gracias a la cual se pueden llevar a cabo operaciones similares a las de la técnica MCFIA sin parar el movimiento de las jeringas. También cuenta con la robustez y el bajo consumo que ofrece el SIA, puesto que las disoluciones sólo se encuentran en contacto con jeringas de cristal o tubos de teflón, y únicamente se utilizan las cantidades de reactivos y muestra requeridas. Dado que los instrumentos se controlan con

ordenador, los volúmenes y caudales de los fluidos son manejados de manera precisa, y las posiciones de las válvulas solenoides son fácilmente intercambiables [94].

En la Figura 1.9 se muestra el esquema de un típico *manifold* utilizado en MSFIA, mientras que en el capítulo 3 se puede encontrar una descripción más detallada de un módulo MSFIA.

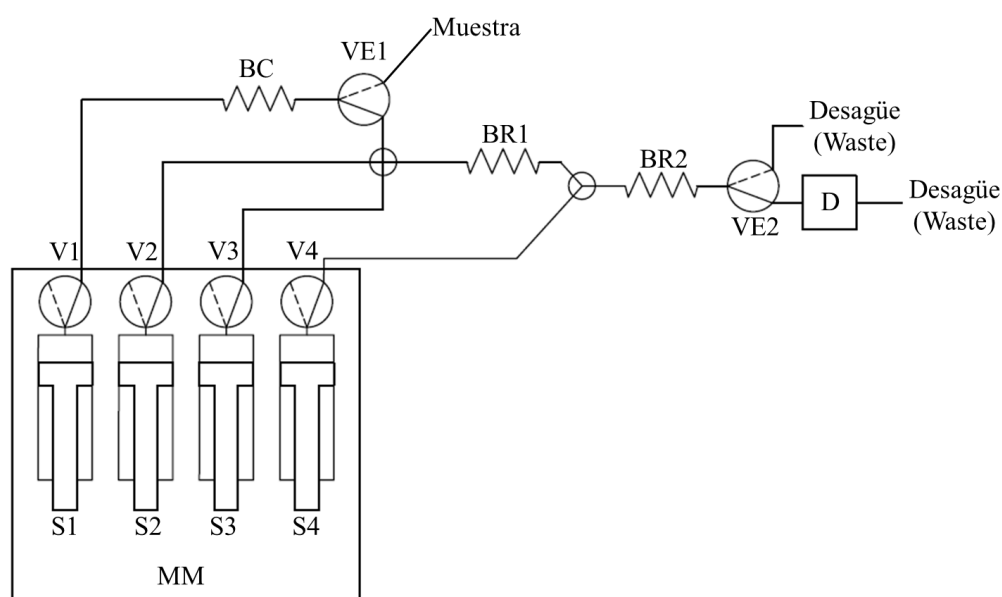


Figura 1.9. Representación esquemática de un sistema MSFIA. BC: Bucle de carga; BR: Bucle de reacción; D: Detector; MM: Módulo multijeringa; S: Jeringa, V: Válvula solenoide; VE: Válvula solenoide externa.

1.5.3 Laboratorio en válvula (lab-on-valve)

El concepto de laboratorio en válvula (lab-on-valve, LOV) fue propuesto en el año 2000 por J. Ruzicka [88]. Está basado en sustituir la tapa de una válvula de selección de un sistema SIA por una placa de metacrilato con conductos. Dentro de esta plataforma se pueden llevar a cabo los procedimientos analíticos necesarios para la preconcentración y posterior detección de los analitos.

Esta técnica presenta varias ventajas, como la gran miniaturización que se consigue en comparación con los sistemas SIA tradicionales, así como que la posición rígida permanente de sus canales asegura la repetitividad a la hora de manipular pequeños volúmenes (en el rango de los μL). Además, el LOV se puede utilizar para manejar materiales sólidos en suspensión y así crear microcolumnas (análisis por inyección de perlas - bead injection analysis, BIA) para realizar extracciones en fase microsólida ($\mu\text{-SPE}$) en los canales de la plataforma [97,98]. Una vez superada la vida útil de la columna, se puede renovar de manera automática, proporcionando una mayor reproducibilidad en el proceso de empaquetamiento de la misma.

En el capítulo 3 se puede encontrar una descripción técnica más detallada del LOV.

1.6 Química analítica verde

Se conoce como química verde o química sostenible (green chemistry) al movimiento actual que busca promover nuevas formas de diseñar, desarrollar e implementar productos y procesos químicos, a fin de reducir el impacto negativo que estas prácticas tienen para los seres humanos y para el medio ambiente. Se rige por doce principios, postulados por P. Anastas y J. Warner en 1998 [99], dirigidos mayoritariamente a los procesos de síntesis orgánica.

En el desarrollo y validación de metodologías analíticas se tienen en cuenta muchos parámetros críticos (exactitud, precisión, sensibilidad, coste...), pero los aspectos relativos a la seguridad del analista y al impacto ambiental no solían considerarse. A partir del concepto de química verde surgió en el año 2000 la idea de la química analítica verde (green analytical chemistry, GAC) [100], centrada en desarrollar métodos analíticos más respetuosos con el medio ambiente. Los objetivos clave que se han de conseguir son [101]:

1. Eliminar o reducir el uso de sustancias químicas (disolventes, reactivos, aditivos y otros).
2. Minimizar el consumo de energía.
3. Manejar adecuadamente los residuos analíticos.
4. Aumentar la seguridad del operador.

La consecución de estos objetivos implica la reducción de la muestra, los reactivos, los residuos, los riesgos... [102].

En este contexto, es evidente la importante aportación de las técnicas en flujo, que llevan implícita la miniaturización de las técnicas analíticas tradicionales. Como se ha mencionado en el apartado anterior, en general los sistemas en flujo reducen significativamente el consumo de reactivos y muestra, generando menos residuos. Esta reducción es especialmente notable con las técnicas utilizadas en esta tesis, SIA y MSFIA, ya que permiten realizar procedimientos multiconmutados en los que sólo se consumen reactivos cuando son necesarios, evitando el flujo continuo característico de

las técnicas FIA. Además, estos sistemas disminuyen la manipulación de muestra y reactivos por parte del analista, por lo que son métodos más seguros.

Por todo ello, podemos afirmar que los métodos desarrollados en esta tesis ofrecen alternativas a los métodos tradicionales de análisis de contaminantes, tanto para la etapa inicial de pretratamiento de la muestra mediante la miniaturización y automatización de las técnicas de extracción (DLLME, μ SPE), como para su detección y cuantificación (MSC, derivatización en línea), siguiendo las directrices de la química analítica verde y cumpliendo con la actual preocupación pública por el cuidado del medio ambiente.

1.7 Referencias

- [1] M. L. Barrico, C. Nabais, M. J. Martins, H. Freita. *Sources of phenolic compounds in two catchments of southern Portugal – Effect of season, land use and soil type*. Chemosphere 65 (2006) 482-488.
- [2] M. Cledera-Castro, A. Santos-Montes, R. Izquierdo-Hornillos. *Comparison of the performance of conventional microparticulates and monolithic reversed-phase columns for liquid chromatography separation of eleven pollutant phenols*. J. Chromatogr. A 1087 (2005) 57-63.
- [3] L. Renberg. *Analysis of organic micropollutants in water. Determination of phenolics in the aquatic environment*. Springer Netherlands, Killarney, Ireland (1982).
- [4] J. Michalowicz, W. Duda. *Phenols – Sources and Toxicity*. Pol. J. Environ. Stud. 16 (2007) 347-362.
- [5] Agencia de Protección Ambiental (EPA), *EPA method 604, Phenols, Part VIII, 40 CFR Part 136, U.S. Environmental Protection Agency* (1984).
- [6] Sección 307(a)(1) de la Ley Federal de Control de Contaminación del Agua (Federal Water Pollution Control Act). Última consulta el 11 de marzo de 2018 en: https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=a2de1d36a287c4634100124ab0c8d8c3&mc=true&node=se40.31.401_115&rgn=div8
- [7] U.S. Environmental Protection Agency. *Integrated Risk Information System (IRIS), Chemical Assessment Summary: Phenol; CASRN 108-95-2*. Última consulta el 11 de marzo de 2018 en: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0088_summary.pdf
- [8] U.S. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. *Toxicological profile for phenol*. Última consulta el 11 de marzo de 2018 en: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp115.pdf>

- [9] U.S. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. *Toxicological profile for nitrophenols: 2-nitrophenol, 4-nitrophenol*. Última consulta el 11 de marzo de 2018 en: <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp50.pdf>
- [10] U.S. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. *Toxicological profile for chlorophenols*. Última consulta el 11 de marzo de 2018 en: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp107.pdf>
- [11] R. M. Claramunt, M. P. Cabildo, C. Escolástico, J. A. Jiménez, M. D. Santamaría. *Fármacos y medicamentos*. UNED. Madrid, España (2003).
- [12] N. Olea, M. F. Fernández, P. Martín. *Disruptores endocrinos. El caso particular de los xenobióticos estrogénicos*. Rev. Salud Ambient. 1 (2001) 64-72.
- [13] J. A. Amado, J. Florez. *Farmacología Humana. Hormonas sexuales: estrógenos, gestágenos, andrógenos y anticonceptivos hormonales*. ElServier, Cantabria, Santander, 5ª edición (2014).
- [14] Formulario Modelo de la OMS (Organización Mundial de la Salud), 2004. Última consulta el 14 de marzo de 2018 en: <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s5422s/s5422s.pdf>
- [15] European Commission. *European Workshop on the impact of endocrine disrupters on human health and wildlife. Report of the Proceedings*. Weybridge, UK (1996).
- [16] IPCS (International Programme on Chemical Safety). *Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors*. World Health Organization, Geneva, Switzerland (2002).
- [17] Environmental Protection Agency (EPA). *Analytical Methods: Contaminants of Emerging Concern Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs)*. Última consulta el 10 de marzo de 2018 en: <https://www.epa.gov/cwa-methods/cwa-analytical-methods-contaminants-emerging-concern>

- [18] M. Petrovic, S. González, D. Barceló. *Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water*. Trends Anal. Chem. 22 (2003) 685-696.
- [19] T. X. Bui, H. Choi. *Adsorptive removal of selected pharmaceuticals by mesoporous silica SBA-15*. J. Hazard. Mater. 168 (2009) 602-608.
- [20] M. J. López de Alda, D. Barceló. *Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry*. J. Chromatogr. A 892 (2000) 391-406.
- [21] Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea. Recuperado de: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013L0039&from=EN>
- [22] Decisión de Ejecución (UE) 2015/495 de la Comisión de 20 de marzo de 2015. Diario Oficial de la Unión Europea. Recuperado de: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015D0495&from=EN>
- [23] U.S. Environmental Protection Agency. *Contaminant Information Sheets (CISs) for the Final Fourth Contaminant Candidate List (CCL 4)*. Office of Water (4607M) EPA 815-R-16-003. Última consulta el 11 de marzo de 2018 en: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-11/documents/815r16003.pdf>
- [24] H. Bagheri, A. Mohammadi, A. Salemi. *On-line trace enrichment of phenolic compounds from water using a pyrrole-based polymer as the solid-phase extraction sorbent coupled with highperformance liquid chromatography*. Anal. Chim. Acta 513 (2004) 445-449.
- [25] T. Saitoh, Y. Nakayama, M. Hiraide. *Concentration of chlorophenols in water with sodium dodecylsulfate- γ -alumina admicelles for high-performance liquid chromatographic analysis*. J. Chromatogr. A 972 (2002) 205-209.

- [26] L. E. Vera-Ávila T. Rojo-Portillo, R. Covarrubias-Herrera, A. Peña-Alvárez. *Capabilities and limitations of dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of floating organic drop for the extraction of organic pollutants from water samples*. Anal Chim Acta 805 (2013) 60–69.
- [27] L. Zhu, L. Zhu, H. Kee-Lee. *Liquid–liquid–liquid microextraction of nitrophenols with a hollow fiber membrane prior to capillary liquid chromatography*. J. Chromatogr. A 924 (2001) 407-414.
- [28] L. Calvo-Seronero, E. F. Laespada, J. L. Pérez-Pavon, B. Moreno-Cordero. *Cloud point preconcentration of rather polar compounds: application to the high-performance liquid chromatographic determination of priority pollutant chlorophenols*. J. Chromatogr. A 897 (2000) 171-176.
- [29] J. Patsias, E. Papadopoulou-Mourkidou. *Development of an automated on-line solid-phase extraction–high-performance liquid chromatographic method for the analysis of aniline, phenol, caffeine and various selected substituted aniline and phenol compounds in aqueous matrices*. J. Chromatogr. A 904 (2000) 171-188.
- [30] M. Kojima, S. Tsunoi, M. Tanaka, M. *High performance solid-phase analytical derivatization of phenols for gas chromatography–mass spectrometry*. J. Chromatogr. A 1042 (2004) 1-7.
- [31] C. Li-Wen, L. Maw-Rong. *Evaluation of liquid-phase microextraction conditions for determination of chlorophenols in environmental samples using gas chromatography–mass spectrometry without derivatization*. Talanta 76 (2008) 154-160.
- [32] H. Faraji, M. S. Tehrani, S. W. Husain. *Pre-concentration of phenolic compounds in water samples by novel liquid-liquid microextraction and determination by gas chromatography-mass spectrometry*. J Chromatogr A 1216 (2009) 8569–8574.
- [33] N. Fattahi Y. Assadi, M. R. M. Hosseini, E. Z. Jahromi. *Determination of chlorophenols in water samples using simultaneous dispersive liquid-liquid microextraction and derivatization followed by gas chromatography-electron-capture detection*. J Chromatogr A 1157 (2007) 23–29.

- [34] K. Tsukagoshi, T. Kameda, M. Yamamoto, R. Nakajima. *Separation and determination of phenolic compounds by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection*. J. Chromatogr. A 978 (2002) 213-220
- [35] M. Aguilar, A. Farran, V. Martí. *Analysis of phenoxyalkyl acid herbicides and chlorophenols by capillary zone electrophoresis*. Sci. Total Environ. 132 (1993) 133-140.
- [36] A. K. Sarmah, G. L. Northcott, F. D. L. Leusch, L. A. Tremblay. *A survey of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in municipal sewage and animal waste effluents in the Waikato region of New Zealand*. Sci. Total Environ. 355 (2006) 135-144.
- [37] M. Esperanza, M. T. Suidan, R. Marfil-Vega, C. González, G. A. Sorial, P. McCauley, R. Brenner. *Fate of sex hormones in two pilot scale municipal wastewater treatment plants: conventional treatment*. Chemosphere 66 (2007) 1535-1544.
- [38] S. Zorita, P. Hallgren, L. Mathiasson. *Steroid hormone determination in water using an environmentally friendly membrane extraction technique*. J. Chromatogr. A 1192 (2008) 1-8.
- [39] D. P. Grover, Z. L. Zhang, J. W. Readman, J. L. Zhou. *A comparison of three analytical techniques for the measurement of steroidal estrogens in environmental water samples*. Talanta 78 (2009) 1204-1210.
- [40] M. Velicu, R. Suri. *Presence of steroid hormones and antibiotics in surface water of agricultural, suburban and mixed-use areas*. Environ. Monit. Assess. 154 (2009) 349-359.
- [41] S. Nakamura, T. Hwee-Sian, S. Daishima. *Determination of estrogens in river water by gas chromatography-negative-ion chemical-ionization mass spectrometry*. J. Chromatogr. A 919 (2001) 275-282.
- [42] M. A. Soliman, J. A. Pedersen, J. A. Suffet. *Rapid gas chromatography-mass spectrometry screening method for human pharmaceuticals, hormones, antioxidants, and plasticizers in water*. J. Chromatogr. A 1029 (2004) 223-237.

- [43] C. N. Duong, J. S. Ra, J. Cho, S. D. Kim, H. K. Choi, J. H. Park, K. W. Kim, E. Inam, S. D. Kim. *Estrogenic chemicals and estrogenicity in river waters of South Korea and seven Asian countries*. Chemosphere 78 (2010) 286–293.
- [44] A. Prieto, S. Schrader, M. Moeder. *Determination of organic priority pollutants and emerging compounds in wastewater and snow samples using multiresidue protocols on the basis of microextraction by packed sorbents coupled to large volume injection gas chromatography-mass spectrometry analysis*. J. Chromatogr. A 1217 (2010) 6002–6011.
- [45] A. Vallejo, L. A. Fernández, M. Olivares, A. Prieto, N. Etxebarria, A. Usobiaga, O. Zuloaga. *Optimization of large volume injection-programmable temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry analysis for the determination of estrogenic compounds in environmental samples*. J. Chromatogr. A 1217 (2010) 8327–8333.
- [46] C. W. Cui, S. L. Ji, H. Y. Ren. *Determination of steroid estrogens in wastewater treatment plant of a contraceptives producing factory*. Environ. Monit. Asses 121 (2006) 409–419.
- [47] M. Kuster, M., M. J. López de Alda, M. D. Hernando, M. Petrovic, J. Martin-Alonso, D. Barceló. *Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestrogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain)*. J. Hydrol. 358 (2008) 112–123.
- [48] P. B. Fayad, M. Prevost, S. Sauve. *On line solid phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry optimized for the analysis of steroid hormones in urban wastewaters*. Talanta 115 (2013) 349–360.
- [49] W. Yan, L. Zhao, Q. Feng, Y. Wei, J.M. Lin. *Simultaneous determination of ten estrogens and their metabolites in waters by improved two-step SPE followed by LC–MS*. Chromatographia 69 (2009) 621–628.

- [50] S. Wang, W. Huang, G. Fang, J. He, Y. Zhang. *On-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for determination of estrogens in environment*. Anal. Chim. Acta 606 (2008) 194–201.
- [51] C. C. Chang, S. D. Huang. *Determination of the steroid hormone levels in water samples by dispersive liquid–liquid microextraction with solidification of a floating organic drop followed by high-performance liquid chromatography*. Anal. Chim. Acta 662 (2010) 39–43.
- [52] R. L. Pérez, G. M. Escandar. *Liquid chromatography with diode array detection and multivariate curve resolution for the selective and sensitive quantification of estrogens in natural waters*. Anal. Chem. Acta 835 (2014) 19–28.
- [53] N. Dorabawila, G. Gupta. *Endocrine-disrupter-estradiol-in Chesapeake bay tributaries*. J. Hazard. Mater 120 (2005) 67–71.
- [54] T. Hintemann, C. Schneider, H. F. Scholer, R. J. Schneider. *Field study using two immunoassays for the determination of estradiol and ethinylestradiol in the aquatic environment*. J. Water Res. 40 (2006) 2287–2294.
- [55] A. K. Faul, E. Julies, E. J. Pool. *Oestrogen, testosterone, cytotoxin and cholinesterase inhibitor removal during reclamation of sewage to drinking water*. Water SA 39 (2013) 499–506.
- [56] C. Mispagel, G. Allinson, M. Allinson, F. Shiraiishi, M. Nishikawa, M. R. Moore. *Observations on the estrogenic activity and concentration of 17 β -estradiol in the discharges of 12 wastewater treatment plants in Southern Australia*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 56 (2009) 631–637.
- [57] J. Nelson, F. Bishay, A. Roodselaar, M. Ikonomou, F. C. P. Law. *The use of in vitro bioassays to quantify endocrine disrupting chemicals in municipal wastewater treatment plant effluents*. Sci. Total Environ. 374 (2007) 80–90.

- [58] S. Surujlal-Naicker, F. Bux. *Application of radio-immunoassays to assess the fate of estrogen EDCs in full scale wastewater treatment plants*. J. Environ. Sci. Health 48 (2013) 37-47.
- [59] M. J. Gismera, M. C. Quintana, M. P. da Silva. *Introducción a la cromatografía líquida de alta resolución*. UAM Ediciones, Madrid, España (2009).
- [60] IUPAC, Analytical Chemistry Division. *Compendium of Analytical Nomenclature (The IUPAC 'Orange Book')*. Blackwell Science, Ltd., Oxford, UK, 3rd edition (1998).
- [61] E. E. Esquivel, L. I. Leal. *Métodos fisicoquímicos en Biotecnología. Cromatografía de fase reversa*. Universidad Autónoma de México. Instituto de Biotecnología. Cuernavaca, México (2004). Última consulta el 16 de marzo de 2018 en: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia_de_fase_reversa.pdf
- [62] D. Šatínský, P. Solich, P. Chocholous, R. Karlicek. *Monolithic columns—A new concept of separation in the sequential injection technique*. Anal. Chim. Acta 499 (2003) 205-214.
- [63] H. M. González, J. M. Alpízar, V. Cerdà. *Development of a new high performance low pressure chromatographic system using a multisyringe burette coupled to a chromatographic monolithic column*. Talanta 72 (2007) 296-300.
- [64] Crawford Scientific. *The CHROMacademy: Reversed Phase Chromatography*. Última consulta el 3 de abril de 2018 en: http://www.chromacademy.com/lms/sco5/Theory_Of_HPLC_Reverse_Phase_Chromatography.pdf
- [65] F. G. Kitson, B. S. Larsen, C. N. McEwen. *Gas chromatography and mass spectrometry: A practical guide*. Academic Press, California, Estados Unidos (1996).
- [66] D. Harvey. *Modern analytical chemistry*. Mc-Graw Hill, Carolina del Norte, Estados Unidos (1999).

- [67] J. Villen. *Uso del vaporizador con temperatura programada (PTV) para la introducción directa de elevados volúmenes de muestra en cromatografía de gases. Aplicación al análisis de alimentos*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid (1993).
- [68] X. Fuentes, M. J. Castiñeiras, J. M. Queraltó. *Bioquímica clínica y patología molecular, Volumen I*. Ed. Reverté, Barcelona, España (1998).
- [69] A. Braithwaite, F. J. Smith. *Chromatographic methods*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Países Bajos, 5a edición (1996).
- [70] K.S. Docherty, P. Ziemann, *On-line, inlet-based trimethylsilyl derivatization for gas chromatography of mono- and dicarboxylic acids*. J. Chromatogr. A 921 (2001) 265–275.
- [71] M. Valcárcel, A. Gómez. *Técnicas analíticas de separación*. Ed. Reverté, Barcelona, España (2010).
- [72] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R.M. Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani. *Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction*. J. Chromatogr. A 1116 (2006) 1-9.
- [73] B. Horstkotte, F. Maya, C. M. Duarte, V. Cerdà. *Determination of ppb-level phenol using in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction and liquid waveguide capillary cell spectrophotometry*. Microchim. Acta (2012) 91-98.
- [74] C. Henríquez. *Métodos automáticos de análisis para la determinación de parámetros de interés ambiental*. Tesis doctoral. Universitat de les Illes Balears (2013).
- [75] L. Kocúrová, I. S. Balogh, J. Šandrejová, V. Andruch. *Recent advances in dispersive liquid–liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review*. Microchem. J. 102 (2012) 11-17.
- [76] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji. *Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method*. J Chromatogr. A 1217 (2010) 2342-2357.

- [77] O. I. Trujillo. *Análisis de pesticidas por cromatografía de gas. Un modelo operacional*. Universidad Nacional de Colombia, Colombia (2006).
- [78] C. Cámara, P. Fernández, A. Martín-Esteban, C. Pérez-Conde, M. Vidal. *Toma y tratamiento de muestras*. Ed. Síntesis, Madrid, España (2004).
- [79] S. Wang, W. Huang, G. Fang, J. He, Y. Zhang. *On-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for determination of estrogens in environment*. *Anal. Chim. Acta* 606 (2008) 194–201.
- [80] A. Banerjee, R. Gokhale, S. Bhatnagar, J. Jog, M. Bhardwaj, B. Lefez, B. Hannoyer, S. Ogale. *MOF derived porous carbon–Fe₃O₄ nanocomposite as a high performance, recyclable environmental superadsorbent*. *J Mater. Chem.* 22 (2012) 19694–19699.
- [81] J. L. C. Rowsell, O. M. Yaghi. *Metal–organic frameworks: a new class of porous materials*. *Microporous Mesoporous Mater.* 73 (2004) 3–14.
- [82] L. T. Skeggs. *An automatic method for colorimetric analysis*. *Am. Chem. J. Clin. Pathol.* 28 (1957) 311-322.
- [83] J. Ruzicka, E. H. Hansen. *Flow injection analyses. I. New concept of fast continuous flow analysis*. *Anal. Chim. Acta* 78 (1975) 145-157.
- [84] J. Ruzicka, G. D. Marshall. *Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays*. *Anal. Chim. Acta* 237 (1990) 329-343.
- [85] B. F. Reis, M. F. Gine, E. A. G. Zagatto, J. L. F. C. Lima, R. A. Lapa. *Multiconmutation in flow analysis. Part I. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests*. *Anal. Chim. Acta* 293 (1994) 129-138.
- [86] V. Cerdà, J. M. Estela, R. Forteza, A. Cladera, E. Becerra, P. Altimira, P. Sitjar. *Flow techniques in water analysis*. *Talanta*, 50 (1999) 695-705.

- [87] R. A. S. Lapa, J. L. F. C. Lima, B. F. Reis, J. L. M. Santos, E. A. G. Zagatto. *Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities*. Anal. Chim. Acta 466 (2002) 125-132.
- [88] J. Ruzicka. *Lab-on-valve: Universal microflow analyzer based on sequential and bead injection*. Analyst 125 (2000) 1053-1060.
- [89] M. Trojanowicz. *Flow Injection Analysis. Instrumentation and applications*. World Scientific Pub. Co. Inc. Farrer Road, Singapore (2000).
- [90] M. Trojanowicz. *Advances in flow analysis*. Wiley-VHC, Weinheim, Germany (2008).
- [91] A. Cerdà, V. Cerdà. *An introduction to flow analysis*. Sciware S.L. edn. Barcelona, Spain (2009).
- [92] M. Almeida, J. M. Estela, V. Cerdà. *Multisyringe flow injection potentialities for hyphenation with different types of separation techniques*. Anal. Lett. 44 (2011) 360-373.
- [93] V. Cerdà, J. Avivar, A. Cerdà. *Laboratory automation based on flow techniques*. Pure Appl. Chem. 84 (2012) 1983-1998.
- [94] F. Maya. *Desarrollo de nuevas metodologías analíticas de interés medioambiental y clínico mediante la técnica de análisis por inyección en flujo multijeringa*. Tesis doctoral. Universitat de les Illes Balears (2010).
- [95] M. Miró, V. Cerdà, J. M. Estela. *Multisyringe flow injection analysis: characterization and applications*. Trends Anal. Chem. 21 (2002) 199- 210.
- [96] V. Cerdà, R. Forteza, J. M. Estela. *Potential of multisyringe flow-based multicommutated systems*. Anal. Chim. Acta 600 (2007) 35-45.
- [97] J. Ruzicka, L. Scampavia. *From flow injection to bead injection*. Anal. Chem. News Features 71 (1999) 257A-263A.

- [98] J. Wang, E. H. Hansen. *Sequential injection lab-on-valve: the third generation of flow injection analysis*. Trends Anal. Chem. 22 (2003) 225-231.
- [99] P. T. Anastas, J. C. Warner. *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford University Press, New York (1998).
- [100] J. Namieśnik. *Trends in environmental analytics and monitoring*. Crit. Rev. Anal. Chem. 30 (2000) 221-269.
- [101] Z. Migaszewski, J. Namieśnik. *The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices*. Trends Anal. Chem. 50 (2013) 78-84.
- [102] J. H. Clark. *Green separation processes. Green chemistry and environmentally friendly technologies*. Wiley-VCH, Weinheim, Alemania (2005).

CAPÍTULO 2

Objetivos

2.1 Objetivo general

Teniendo en cuenta las propiedades de los compuestos mencionados, así como su preocupante presencia en el medio ambiente, el objetivo general de esta tesis doctoral es desarrollar nuevos métodos sensibles, precisos y rápidos para la determinación de contaminantes emergentes y prioritarios en aguas.

Para ello se han diseñado sistemas automatizados utilizando técnicas de análisis en flujo, a fin de conseguir métodos simples con los que se minimiza el consumo de reactivos y la generación de residuos, siguiendo los principios de la llamada química analítica verde.

2.2 Objetivos específicos

Los objetivos específicos que se han planteado para esta tesis, clasificados de acuerdo a los capítulos correspondientes, son los siguientes:

1. Desarrollar un analizador totalmente automatizado para la determinación de compuestos fenólicos en aguas usando la técnica extracción líquido-líquido dispersiva con agitación magnética asistida en jeringa (in-syringe-MSA-DLLME) acoplada a la cromatografía multijeringa (MSC) como técnica cromatográfica alternativa de bajo coste (capítulo 4).
2. Desarrollar un sistema para la extracción y preconcentración de estrógenos en aguas residuales utilizando la técnica in-syringe-MSA-DLLME antes del análisis por GC-MS (capítulo 5).
3. Sintetizar y estudiar la aplicabilidad de micropartículas magnéticas obtenidas a partir de cristales de ZIF-67 para la extracción de estrógenos (capítulo 6).

4. Desarrollar un sistema automatizado para llevar a cabo una extracción en fase microsólida dispersiva en jeringa (in-syringe magnetic dispersive micro-solid phase extraction) de estrógenos en aguas residuales, utilizando como adsorbente los carbones magnéticos sintetizados (capítulo 6).

5. Desarrollar un sistema SIA-LOV para la preconcentración de estrógenos en aguas de mar previo a la detección por GC-MS, realizando la derivatización del extracto en línea (in-port derivatization) y utilizando la técnica de inyección de grandes volúmenes (large volume injection, LVI) (capítulo 7).

CAPÍTULO 3

Materiales y métodos

3.1 Instrumentación para las técnicas en flujo

3.1.1 Módulo multijeringa

El módulo multijeringa (BU4S, Crison Instruments, Barcelona, España) es el componente principal de un sistema MSFIA (Figura 3.1) [1]. Cada módulo tiene capacidad para cuatro jeringas. Las jeringas utilizadas en esta tesis (Hamilton, Bonaduz, Switzerland) son de vidrio y tienen un émbolo de aluminio con un pistón de politetrafluoroetileno, permitiendo el uso de reactivos agresivos. Cada émbolo se coloca en una barra externa que se desplaza gracias a un motor paso a paso. El recorrido del pistón puede ser de 5000, 16000 o 40000 pasos, dependiendo del modelo de bureta seleccionado. Todas las jeringas se mueven simultáneamente inyectando (*dispense*) o aspirando (*pick-up*) los líquidos a caudales que pueden ir desde los $\mu\text{L min}^{-1}$ a los mL min^{-1} , en función del número de pasos y del volumen de las jeringas que se utilicen.



Figura 3.1. Vista frontal del módulo multijeringa [2].

En la cabeza de cada jeringa hay instalada una válvula solenoide de tres vías (N-Research, Caldwell NJ, USA) que permite crear diversas modalidades de inyección y protocolos de multiconmutación. Cada válvula tiene dos posiciones, “on” y “off”, a

través de las cuales se puede conectar el canal de la jeringa a dos canales de entrada/salida diferentes, en función de la activación o no del solenoide (Figura 3.2). Estas jeringas permiten trabajar a presiones de hasta 2 bar (esta limitación depende de las válvulas solenoides implicadas), y responden en tiempos tan rápidos que facilitan la conmutación sin detener el flujo (35 ms). Además, mediante el uso de las válvulas solenoides los reactivos pueden ser devueltos a sus depósitos cuando no sean necesarios, disminuyendo así el consumo de reactivos y la generación de residuos respecto a los procedimientos tradicionales de técnicas de inyección en flujo.

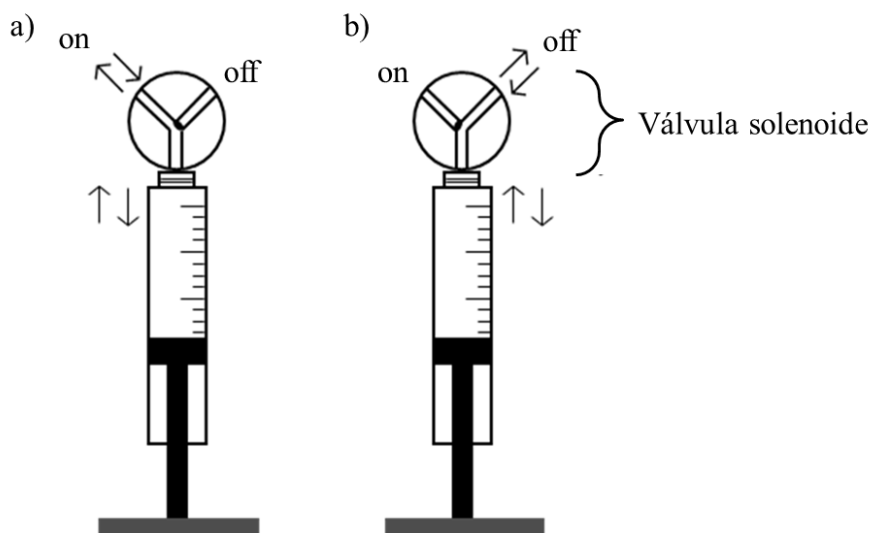


Figura 3.2. Funcionamiento de la válvula solenoide ubicada en el cabezal de cada jeringa. a) Válvula solenoide activada: posición "on"; b) válvula solenoide desactivada: posición "off".

Por otro lado, en la parte posterior de cada módulo multijeringa se encuentran cuatro salidas que permiten conectar y controlar otros dispositivos a través del ordenador, como motores, agitadores, microbombas, ventiladores, LEDs.. posibilitando el diseño de sistemas de flujo más complejos y con más aplicaciones. Uno de los dispositivos más utilizados son las válvulas solenoides externas (Figura 3.3), como las comercializadas por la empresa Takasago (Takasago Electric Inc, Japón), que funcionan

de la misma manera que las válvulas solenoides ubicadas en las cabezas de las jeringas, pero permiten trabajar a presiones mayores (hasta valores nominales de 6 bar, dependiendo del modelo utilizado).



Figura 3.3. Válvula solenoide externa [3].

3.1.2 Válvula de selección

En los sistemas desarrollados se han utilizado válvulas de selección de las marcas Crison Instruments y Sciware Systems S.L. (Sciware Systems S.L., Bunyola, Spain). La diferencia entre éstas es el número de posiciones de la válvula (8 puertos periféricos en el caso de Crison; 6, 8, 10 y hasta 27 puertos en el caso de Sciware Systems S.L.). Además, hemos comprobado experimentalmente que el módulo de Sciware Systems S.L. soporta una mayor presión en el sistema, por lo que se ha utilizado para los sistemas que debían cumplir dicha característica.

El funcionamiento de estos módulos de válvulas es el mismo. En la Figura 3.4 se puede ver una válvula de selección típica, hecha de PEEK (tapa) y PTFE (rotor), cuyos materiales son químicamente resistentes. El puerto central de la válvula se conecta con una bomba de pistón de tres vías, como una jeringa. La posición del rotor se controla a través del ordenador, por lo que podemos situarlo en cada uno de los puertos periféricos para conectarlos con el puerto central y así aspirar o dispensar secuencialmente los diferentes reactivos.

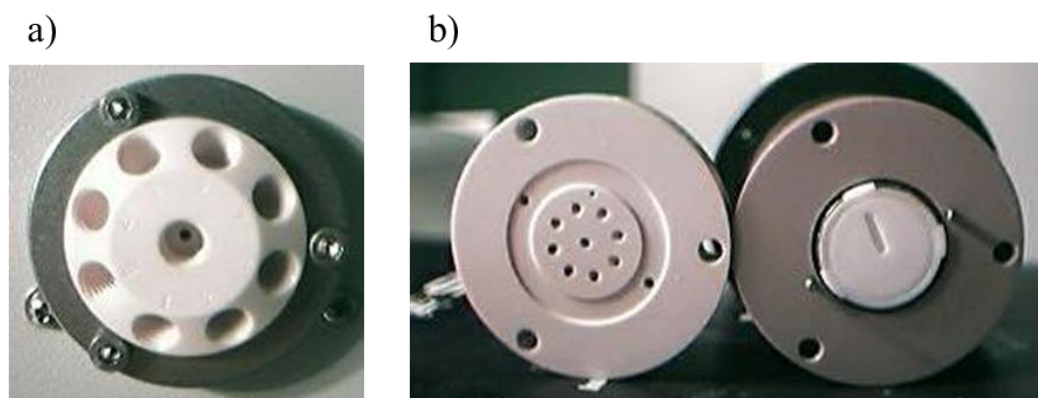


Figura 3.4. a) Tapa de la válvula de selección. b) Parte interna de la válvula y rotor.

3.1.3 Sistema de agitación magnética asistida (MSA)

Para llevar a cabo la microextracción líquido-líquido dispersiva con agitación magnética asistida dentro de la jeringa (in-syringe-MSA-DLLME, descrita en el apartado 3.3.1) y la extracción en fase microsólida dispersiva en jeringa (in-syringe magnetic D- μ -SPE, descrita en el apartado 3.3.2.) se ha utilizado un sistema de agitación desarrollado por Sciware Systems a partir de un dispositivo anterior [4].

Este sistema de agitación, esquematizado en la Figura 3.5, se compone de un agitador magnético y un sistema de agitación magnética (MSA). El agitador se introduce dentro de la jeringa para favorecer la mezcla de las fases y/o la dispersión de las partículas. Su movimiento se controla por ordenador a través del sistema MSA, formado por los siguientes elementos: un dispositivo de agitación externo que provoca el giro de la barra agitadora; un motor, que fuerza la rotación de este dispositivo; y un circuito, que controla tanto la puesta en marcha como las revoluciones del motor a través de una de las salidas posteriores del módulo multijeringa.

El dispositivo de agitación externo, que puede verse en la Figura 3.6, está diseñado para crear un campo magnético rotatorio alrededor de la jeringa. Consiste en un anillo de 30 mm de diámetro externo y 14 mm de diámetro interno que se coloca alrededor del cuerpo de vidrio de la jeringa. El anillo tiene insertados dos pequeños imanes enfrentados, colocados teniendo en cuenta su campo magnético, a fin de conseguir polaridades opuestas en los dos lados del mismo. De esta forma, la barra agitadora se

coloca según la polaridad de los imanes. Al disparar el motor, el anillo comienza a girar, y con él la barra agitadora.

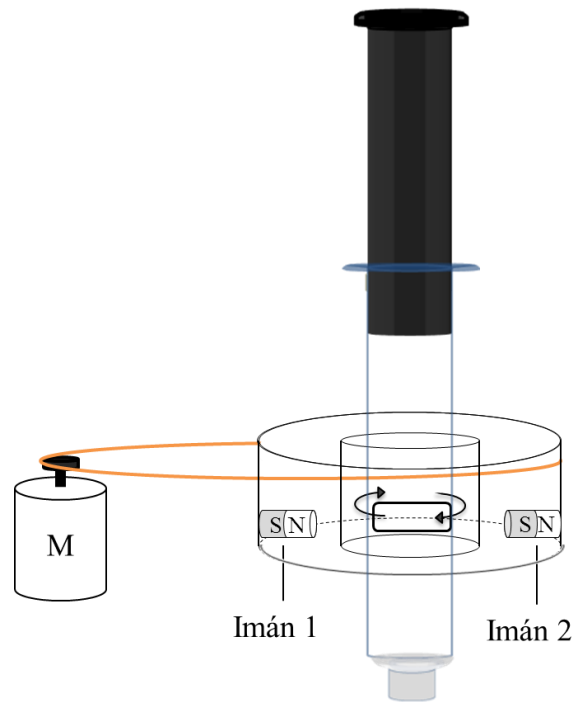


Figura 3.5. Esquema del sistema de agitación magnética asistida (MSA). M: Motor.



Figura 3.6. Fotografía del anillo de PEEK que actúa como dispositivo de agitación externo.

3.1.4 Lab-on-valve (LOV)

El concepto de laboratorio en válvula (lab-on-valve, LOV) [5] es conocido como la tercera generación de técnicas en flujo. Esta técnica facilita la integración de diversas unidades analíticas en la válvula, y tiene un gran potencial para el desarrollo de métodos de análisis miniaturizados.

La clave de la técnica es la sustitución de la tapa de una válvula de selección por un dispositivo microfluídico, haciendo que al cambiar la posición del rotor se una el canal central con los puertos periféricos a través de microcanales (Figura 3.7). El LOV se utiliza en combinación con técnicas como SIA o MSFIA, por lo que los fluidos son aspirados o dispensados secuencialmente de manera precisa a través de los microcanales del dispositivo. Estos microcanales se diseñan en función de la aplicación del sistema, por lo que pueden estar destinados a diferentes fines, como actuar como celda de flujo para una detección espectrofotométrica en línea [6], o contener una microcolumna para la extracción en fase sólida (SPE), como en el caso del trabajo realizado en esta tesis, explicado en el capítulo 7.

Los sistemas LOV tienen la ventaja de ser muy compactos. Además, se pueden automatizar todos los pasos del protocolo analítico, y la posición rígida y permanente de la estructura y de los canales asegura la repetibilidad a la hora de manipular los microvolúmenes de muestra y reactivos [5].

Concretamente, en el trabajo realizado en esta tesis doctoral se ha utilizado un LOV de 8 posiciones fabricado en Ultem, un material que soporta disolventes orgánicos. Seis de sus microcanales, destinados al paso de fluidos, tienen un diámetro interno de 1,5 mm y una longitud de 28,0 mm. Los dos canales restantes, con un diámetro interno de 3,0 mm, se han utilizado como reservorio para la resina y como microcolumna de SPE.

Como puede verse en la Figura 3.7., en la posición 8 del LOV es donde se encuentra el reservorio de la fase sólida, una jeringa de plástico que contiene una suspensión de resina C18 en MeOH, la cual puede ser aspirada a través del bucle de carga y posteriormente dispensada a la posición 5, en la que se forma la microcolumna para la μ -SPE. Esta metodología, conocida como inyección de perlas (bead injection, BI

[7]) permite el transporte de materiales sólidos en el sistema, pudiendo renovar la columna en línea de manera automatizada y reproducible cuando es necesario. A fin de contener la resina dentro del canal del LOV, se ha colocado a su salida una frita de vidrio de 35 μm de diámetro de poro, que permite el flujo de las disoluciones a la vez que retiene la microcolumna en el sistema.

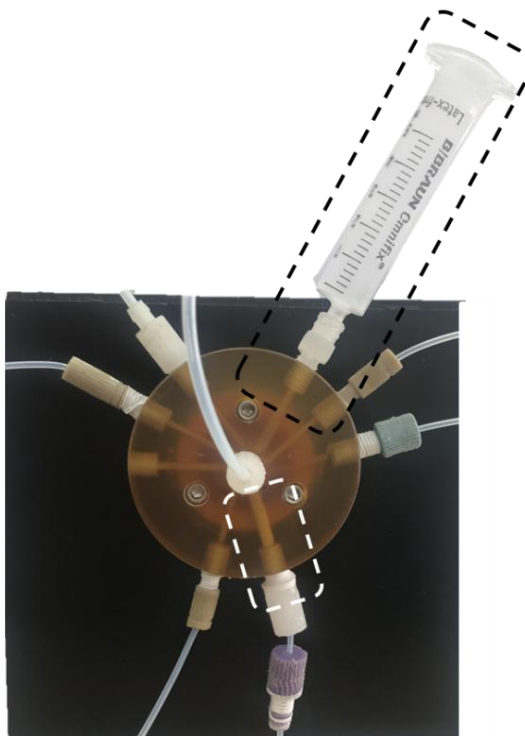


Figura 3.7. Fotografía del LOV utilizado en la que se encuentran marcados el canal 5, en el interior del cual se forma la microcolumna (abajo), y la jeringa que actúa como reservorio de la resina (arriba).

3.1.5 Conexiones, tuberías y otros elementos

Las redes de tuberías o *manifold* utilizadas en los sistemas se han fabricado con tubería de PTFE de diferentes diámetros internos (0,8 mm y 1,5 mm). Los tornillos y conectores están hechos de PEEK, a fin de que sean resistentes a disolventes orgánicos.

Cuando ha sido necesario, también se han utilizado cabezales ciegos de una vía para sustituir la válvula solenoide de la jeringa (capítulo 4) o cabezales ciegos sin salida (capítulo 6) fabricados en KEL-F.

En el analizador de compuestos fenólicos se ha incluido un desburbujador diseñado especialmente para realizar medidas espectrofotométricas en flujo y fabricado en Delrin. Este dispositivo está constituido por dos piezas que tienen dos canales grabados, uno interno y otro externo (Figura 3.8), entre los cuales va colocada una membrana de teflón. Al pasar la disolución con burbujas de aire por los canales, el aire atraviesa el filtro, mientras que el líquido continúa hacia el detector ya sin burbujas que interfieran en la detección espectrofotométrica.

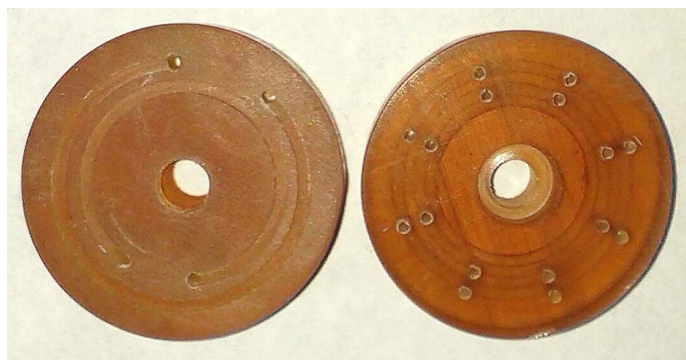


Figura 3.8. Piezas del desburbujador entre las que se coloca la membrana de teflón. A la izquierda, canales por donde pasa el líquido; a la derecha, pieza con salidas para el aire.

3.2 Software AutoAnalysis

Se ha utilizado el programa AutoAnalysis 5.0 para el control de los instrumentos, así como para la adquisición y procesamiento de los datos en el caso del trabajo descrito en el capítulo 4. Este programa ha sido desarrollado por el grupo de Química Analítica, Automatización y Medio Ambiente [8], y es comercializado por la empresa Sciware Systems S.L., Spin Off de la UIB.

AutoAnalysis ha sido programado en Delphi 5.0 y Visual C++. Se basa en la utilización de librerías de enlace dinámico (DLL's) de 32 bits, que permiten conectar y controlar una gran cantidad de instrumentos distintos, por lo que ofrece una gran flexibilidad y versatilidad para la automatización de métodos analíticos. Además, es una herramienta muy fácil de manejar para usuarios no especializados, ya que su interfaz es sencilla y su diseño muy intuitivo.

3.2.1 Configuración del sistema

El menú *Hardware* de AutoAnalysis permite configurar el sistema, conectando los instrumentos que lo forman para después utilizarlos para la elaboración del método analítico. Tal y como se muestra en la Figura 3.9, en la parte derecha de este menú están localizadas las conexiones e instrumentación disponibles, y en la zona central aparece la configuración actual. En este caso la configuración mostrada se corresponde con la utilizada en el método para la determinación de compuestos fenólicos (capítulo 4), y se compone de una bureta multijeringa y un módulo de válvulas que están conectados en serie a través de un canal CRISON, un segundo módulo de válvulas conectado a través de un canal VICI, y un espectrofotómetro OceanOptics conectado a través de un puerto USB directamente al ordenador.

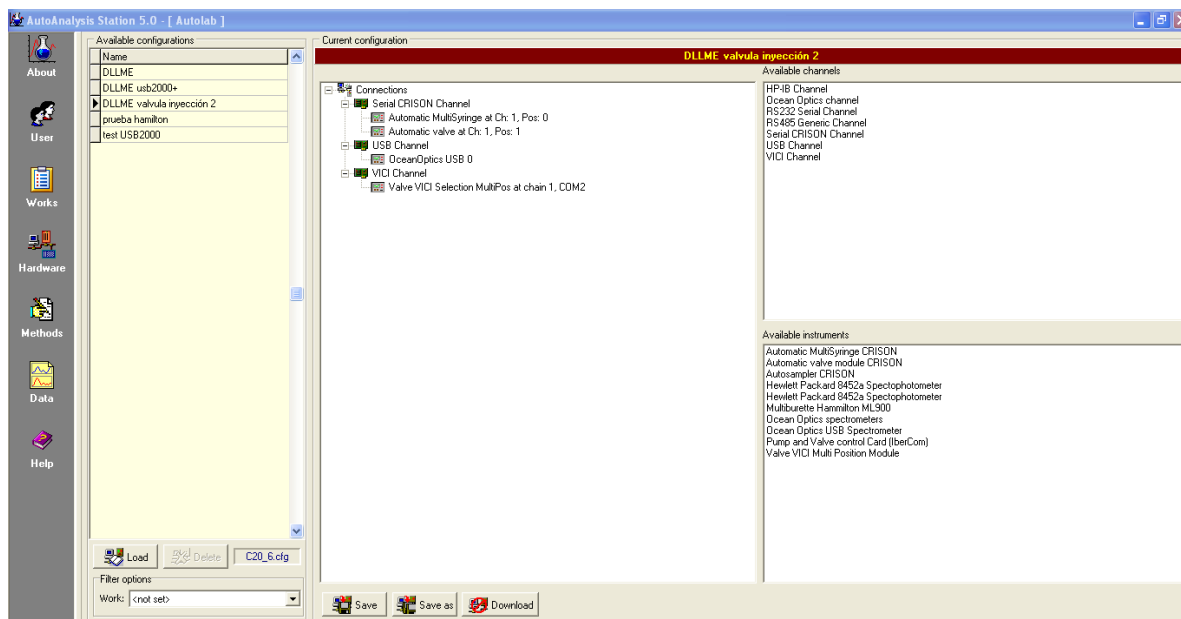


Figura 3.9. Menú *Hardware*, en el que se puede configurar el sistema conectando los distintos instrumentos que lo forman.

3.2.2 Edición del método

Tras realizar la configuración del sistema en el menú *Hardware*, tendremos los instrumentos que hemos conectado disponibles para diseñar el método, que se traduce como una secuencia de instrucciones ejecutadas por los instrumentos. Estas instrucciones se pueden realizar de manera exclusiva, de forma que hasta que no termine de ejecutarse cada instrucción no se iniciará la siguiente, o de forma no exclusiva, permitiendo que el método siga avanzando aunque la instrucción en curso no haya acabado. Cuando es posible, realizar las instrucciones de manera no exclusiva permite acortar el tiempo de análisis.

Para diseñar un método en el software AutoAnalysis disponemos del menú de edición *Methods* → *Editor* (Figura 3.10). En él podemos definir la secuencia de instrucciones deseada, además de funciones adicionales como controlar tiempos (con la función *Wait*) o repetir determinados pasos de la secuencia (con la función *Loop*). Otra función que resulta muy útil es la creación de procedimientos, que son una serie de instrucciones agrupadas bajo un mismo nombre que se definen una única vez y se

pueden utilizar varias veces en el mismo método o en métodos distintos; por ejemplo, se puede definir un procedimiento de limpieza de las jeringas que se ejecute siempre que sea necesario.

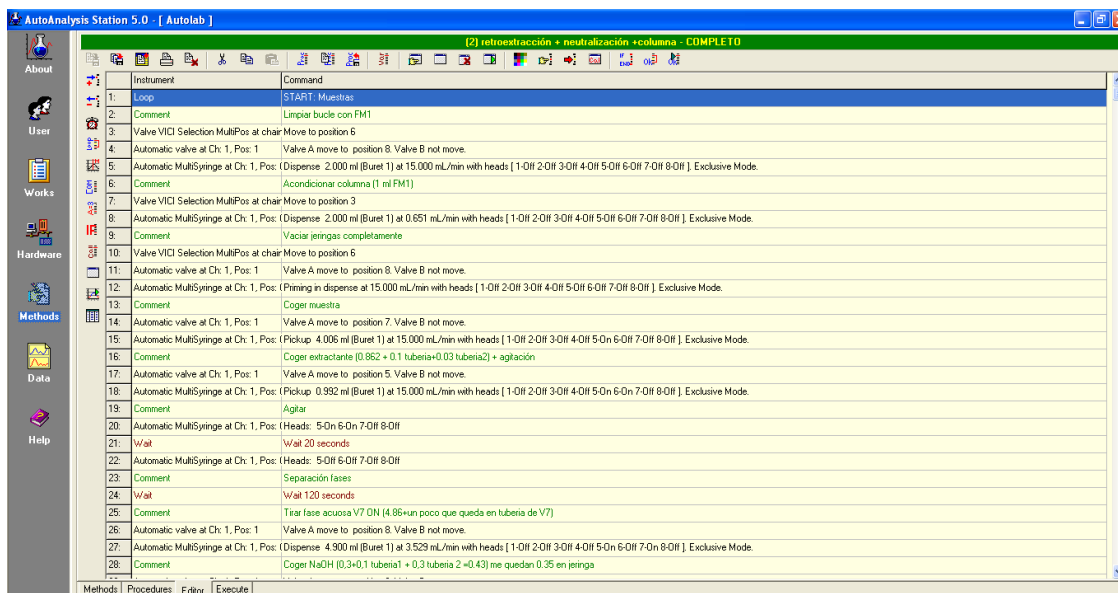


Figura 3.10. Menú de edición del método.

Una vez que tenemos el método diseñado podemos comprobar que no existe ningún error o incoherencia en el mismo (por ejemplo, una orden de aspirar un volumen mayor que el disponible en las jeringas) mediante un simulador virtual que verifica la secuencia sin poner en marcha los instrumentos instalados. Además, el método puede ser guardado para usarlo cuando sea necesario. Durante la ejecución de un método que incluya la detección en línea podemos ver la señal analítica a tiempo real, así como añadir marcas a distintos tiempos y cambiar la escala, gracias a la barra de herramientas que se encuentra en la parte superior (Figura 3.11).

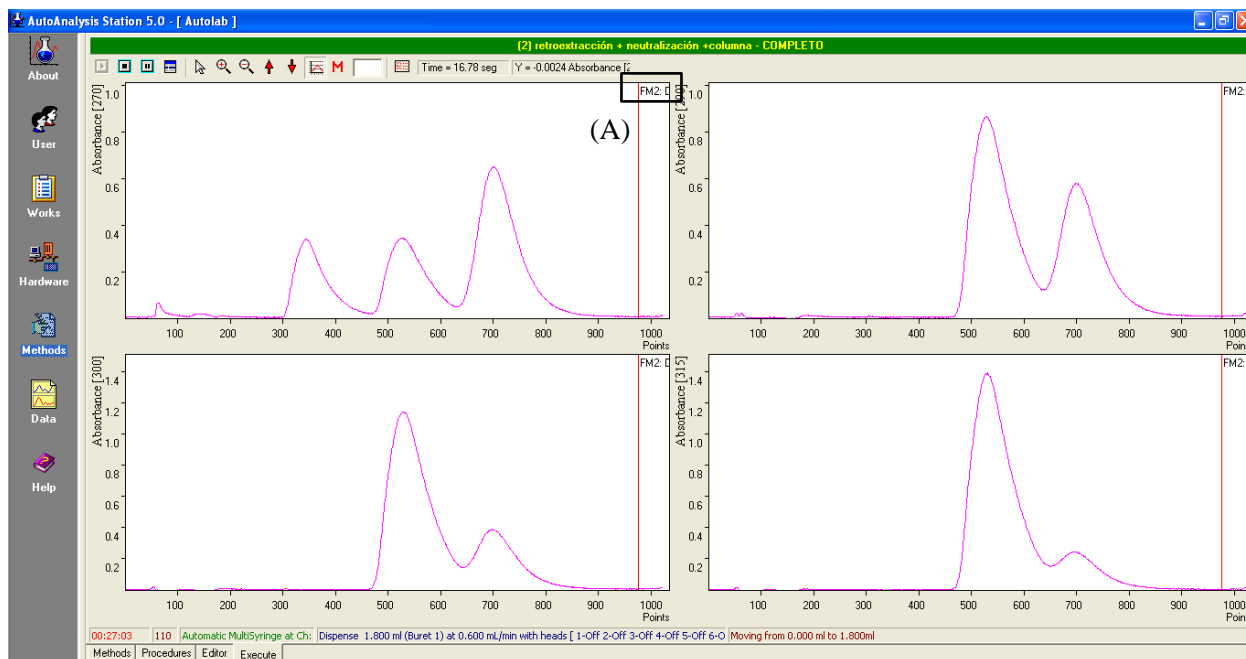


Figura 3.11. Señales analíticas obtenidas durante la determinación de compuestos fenólicos. (A) Marca que indica un cambio de fase móvil.

3.2.3 Tratamiento de los datos

Cuando en el sistema configurado incluimos un detector, la señal analítica que éste capta se registra en AutoAnalysis y se le asigna un valor numérico (como por ejemplo, altura o área de pico). El programa permite también guardar y procesar los datos: suavizar los picos, obtener primera y segunda derivada, eliminar burbujas de aire del espectro, corregir manualmente las alturas o áreas de pico calculadas, etc.

3.3 Automatización de las técnicas de pretratamiento de muestra utilizadas

3.3.1 Extracción líquido-líquido dispersiva en jeringa (in-syringe-DLLME)

La automatización de la técnica DLLME mejora su reproducibilidad, ya que implica trabajar con volúmenes considerablemente pequeños que se manejan de manera más reproducible en un sistema automático cerrado. Inicialmente, esta técnica se utilizaba únicamente con disolventes de extracción más densos que el agua, pero su automatización ha permitido el uso de otros disolventes, abriendo el campo a extractantes menos dañinos para el medio ambiente.

Anthemidis et al. presentaron en 2009 el primer trabajo basado en la automatización de la DLLME [9] utilizando un sistema SIA para la determinación de Pb y Cu por espectrometría de absorción atómica en llama. Este trabajo dio paso a otros, como el de Maya et al. [10] quienes desarrollaron un sistema en jeringa (in-syringe) en el que las jeringas de una bureta multijeringa actuaban como tanque de mezcla para la extracción y detección cromatográfica de benzo(a)pireno (Figura 3.12). Para llevar a cabo la extracción, primero aspiraban un pequeño volumen de disolvente orgánico menos denso que el agua, para después aspirar la muestra acuosa a una velocidad elevada, haciendo que se mezclen las dos fases. A continuación, a causa de la diferencia de densidad, las gotas de disolvente orgánico subían y se formaba un bolo en la cabeza de la jeringa, el cual era dispensado hacia el detector.

Desde entonces, los sistemas in-syringe-DLLME han seguido evolucionando, con innovaciones como el desarrollo de un dispositivo de agitación magnética asistida (cuyo funcionamiento se ha detallado en el apartado 3.1.3) que permite una mezcla más homogénea y reproducible entre las fases, dando lugar a sistemas in-syringe-MSA-DLLME, utilizados en la presente tesis para la extracción y preconcentración de fenoles (capítulo 4) y de estrógenos (capítulo 5).

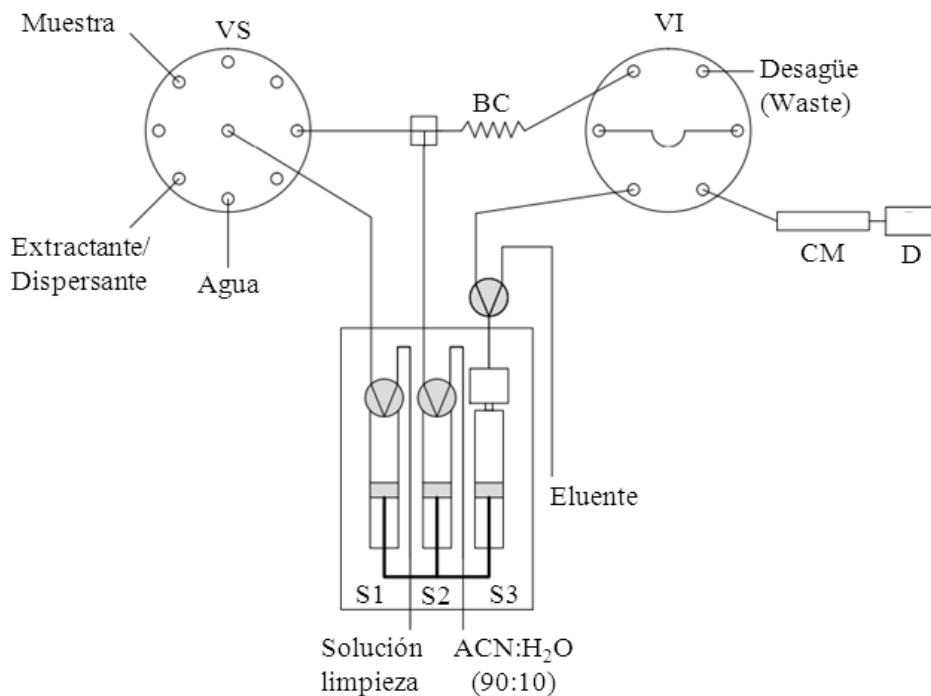


Figura 3.12. Sistema in-syringe-DLLME propuesto por Maya et al. [10]. BC: Bucle de carga; CM: columna monolítica; D: detector; VI: Válvula de inyección; VS: Válvula de selección.

El funcionamiento general de los sistemas in-syringe-MSA-DLLME se presenta de manera esquemática en la figura siguiente (Figura 3.13).

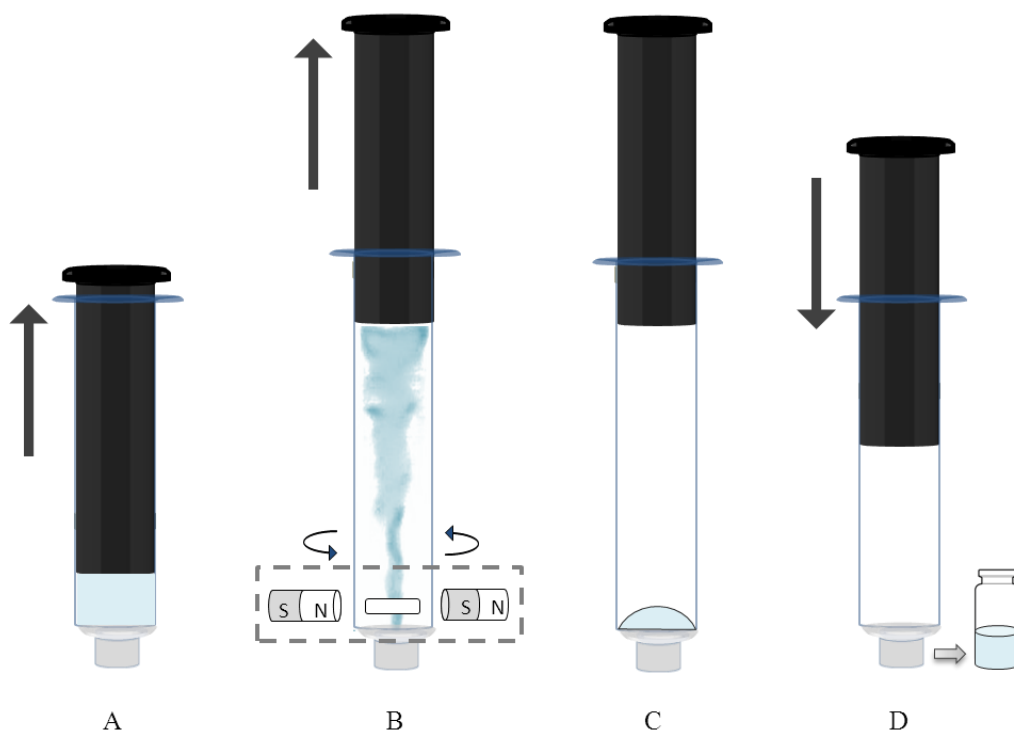


Figura 3.13. Procedimiento para llevar a cabo la in-syringe-MSA-DLLME (A) Carga de los disolventes (extractante y dispersante). (B) Al cargar la muestra acuosa con el sistema de agitación activado, los disolventes se dispersan a través de ésta debido al giro de la barra magnética provocado por el sistema MSA. (C) Al detener el sistema de agitación se produce la separación de fases. En el caso esquematizado, el disolvente orgánico utilizado es más denso que el agua, quedando a la salida de la jeringa. Si el disolvente fuera menos denso que el agua, el módulo multijeringa se podría posicionar al revés para que el bolo de disolvente quedara a la salida de la jeringa. (D) Al dispensar con la jeringa sale primero el bolo de disolvente orgánico, que se puede recolectar en un vial para su análisis, o bien enviar a otro punto del sistema o al detector.

3.3.2 Extracción en fase microsólida magnética dispersiva en jeringa (in-syringe magnetic D- μ -SPE)

En los últimos años, la extracción en fase microsólida (microsolid phase extraction, μ -SPE), una versión miniaturizada de la SPE[11], ha despertado un gran interés, dada la creciente tendencia a desarrollar métodos menos perjudiciales para el medio ambiente.

Una de las variantes de la μ -SPE con las que se trabaja actualmente es la μ -SPE dispersiva (D- μ -SPE), en la que el adsorbente no se encuentra inmovilizado, sino mezclado con la matriz de la muestra mediante ultrasonidos, vórtex, sonicación, o usando un emulsificador, lo cual ofrece mejores eficiencias de extracción porque aumenta la interacción entre el adsorbente y los analitos [12].

Un grupo de materiales que se está utilizando para este tipo de aplicaciones analíticas son las estructuras metal-orgánicas (metal-organic frameworks, MOFs [13]). Los MOFs son materiales cristalinos en los que se enlazan iones metálicos a través de moléculas orgánicas formando estructuras tridimensionales porosas. Presentan interesantes propiedades, tales como una elevada área superficial, estabilidad térmica y cavidades uniformes, cuyo tamaño puede ser controlado para obtener desde microporos a mesoporos. Zhou et al. [14] fueron los primeros en reportar el uso de este tipo de materiales para la extracción en fase sólida de hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Un enfoque que se está usando recientemente es sintetizar MOFs magnéticos para llevar a cabo la D- μ -SPE, ya que esta propiedad favorece su dispersión en la matriz. Esta estrategia ha facilitado el uso de MOFs en sistemas en flujo, dando lugar a la D- μ -SPE en jeringa (in-syringe magnetic D- μ -SPE). Este tipo de sistema, propuesto por Maya et al. en 2015 [15] se basa en la introducción de partículas magnéticas dentro de una de las jeringas de un sistema MSFIA que contiene una barra agitadora magnética, a la cual se pegan las partículas. Al cargar la muestra líquida dentro de la jeringa, se conecta el sistema MSA (explicado en el apartado 3.1.3), haciendo girar la barra agitadora y provocando la dispersión de las partículas por toda la fase acuosa. Al detener el sistema de agitación, las partículas magnéticas son nuevamente atraídas por la barra magnética y quedan depositadas en esta, permitiendo desechar únicamente la

muestra al dispensar con la jeringa. A continuación, se repite el mismo procedimiento con agua para limpiar los MOFs, así como para la elución de los analitos con un disolvente orgánico apropiado y para el reacondicionamiento de las partículas, siguiendo los mismos pasos que se llevan a cabo en una SPE tradicional.

Un esquema del funcionamiento del sistema in-syringe magnetic D- μ -SPE se muestra en la Figura 3.14.

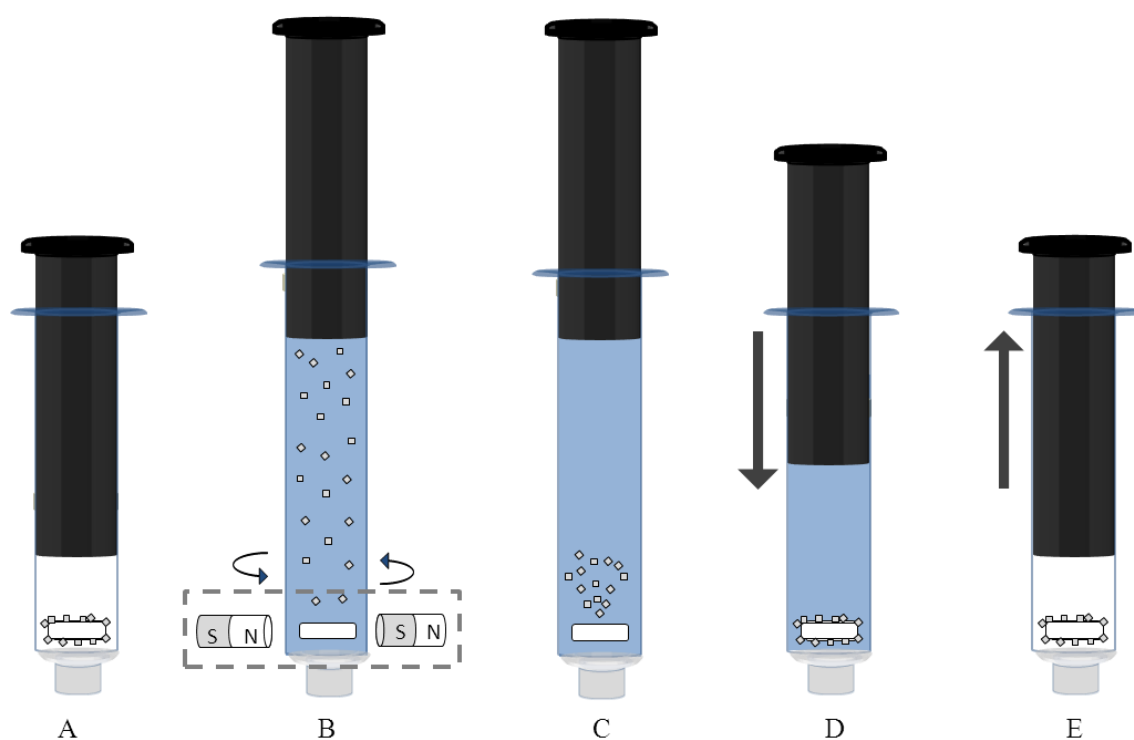


Figura 3.14. Procedimiento para llevar a cabo la in-syringe magnetic D- μ -SPE. (A) Las partículas introducidas en la jeringa son inmovilizadas sobre la barra magnética. (B) Al activar el sistema de agitación, las partículas se dispersan a través de la muestra. (C) Al detener el sistema de agitación, las partículas son atraídas de nuevo por la barra magnética. (D) La fase acuosa se descarta dispensándola hacia el desagüe, mientras que las partículas quedan retenidas en el interior de la jeringa. (E) Se carga el disolvente orgánico apropiado para redissolver y eluir los analitos. Entonces, se repiten los pasos (B), (C) y (D).

3.4 Instrumentación cromatográfica y métodos

3.4.1 Cromatografía multijeringa (MSC)

La combinación de las técnicas de flujo y la cromatografía ha dado lugar a sistemas automatizados en los que se pueden llevar a cabo todos los pasos del análisis de muestras complejas, desde el pretratamiento a la separación e identificación de sus componentes.

El desarrollo de estos procedimientos fue posible a partir de la aparición de las columnas monolíticas, un tipo de columna cromatográfica cuya principal característica es que están constituidas por monolito de estructura continua y porosa, en contraposición con las tradicionales columnas de partículas empaquetadas.

En 1990, Nakanishi y Soga dieron el primer paso para su fabricación preparando un material de sílice poroso y continuo con dos tamaños de poro diferentes, basándose en la tecnología sol-gel [16]. Ya en el 2000, Merck comenzó a comercializar columnas monolíticas de sílice funcionalizada con grupos octadecilo (C18).

El esqueleto continuo de las columnas monolíticas ofrece una serie de ventajas frente a las columnas de partículas empaquetadas. En su interior tienen dos tipos de poro, mesoporos (13 nm de diámetro medio) que proporcionan suficiente área efectiva para que la separación sea eficiente, y macroporos interconectados (2 μm de diámetro medio) que permiten que la fase móvil pase a través de ellos, ofreciendo así menos resistencia al paso de fluido y haciendo posible realizar la separación cromatográfica a caudales más altos, con lo que se reduce el tiempo por análisis, además de posibilitar el trabajo a presiones más bajas que las generadas utilizando una columna convencional [17]. En la Figura 3.15 se puede observar la estructura de una columna monolítica de sílice.

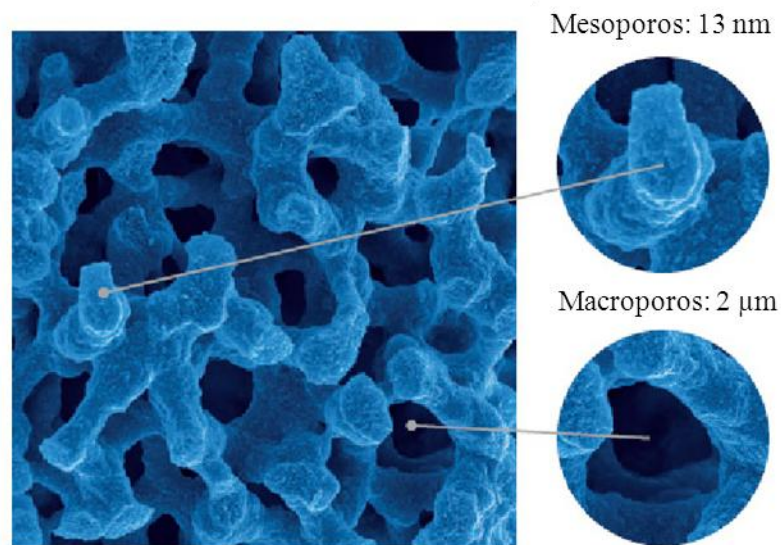


Figura 3.15. Estructura de una columna monolítica de sílice [18].

La posibilidad de realizar separaciones cromatográficas a baja presión fue la clave para la combinación de la cromatografía líquida con las técnicas de flujo. Así, en el año 2003 Šatínský et al. desarrollaron la cromatografía de inyección secuencial (sequential injection chromatography, SIC) [19] integrando una columna monolítica en un sistema SIA.

A partir de la idea propuesta con la SIC, González et al. [20] desarrollaron en 2007 la cromatografía multijeringa (multisyringe chromatography, MSC) combinando la técnica de inyección en flujo multijeringa (MSFIA) con una columna monolítica. Con el sistema desarrollado, que se muestra esquematizado en la Figura 3.16, realizaron el análisis cuantitativo de diversos fármacos: amoxicilina, ampicilina y cefalexina. Se obtuvo una precisión satisfactoria para todos los analitos, y una buena selectividad para la amoxicilina y sus productos de degradación. Para validar el método, compararon los resultados de la MSC con los obtenidos en un HPLC, y comprobaron que se trata de una buena alternativa que, además, presenta ventajas como un menor consumo de reactivos, lo cual lleva a una disminución del impacto ambiental y del coste por análisis.

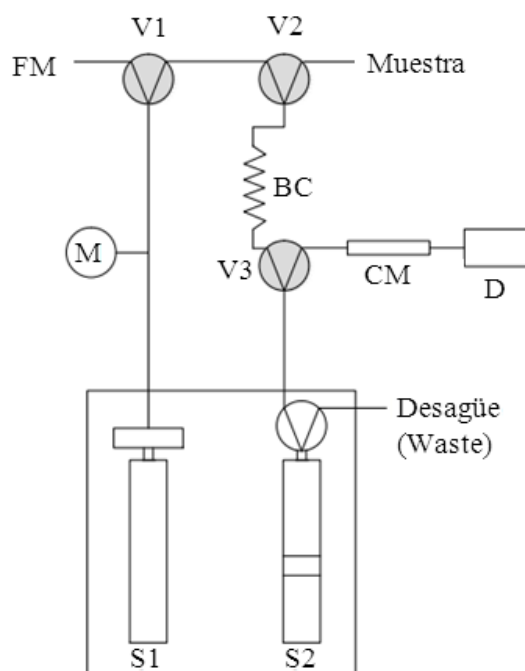


Figura 3.16. Sistema MSC para el análisis de fármacos [20]. BC: Bucle de carga, CM: Columna monolítica, D: Detector de fotodiodos en serie, FM: Fase móvil, M: Manómetro, V1-V3: Válvulas solenoides externas, S1-S2: Jeringas.

La gran ventaja del sistema MSC respecto al SIC es que es mucho más versátil, ya que se pueden utilizar hasta cuatro jeringas en un mismo módulo, lo que permite hacer el pre y post-tratamiento de la muestra, así como separaciones multi-isocráticas en las que se utilizan varias fases móviles en lugar de un gradiente, tal y como se ha realizado en el sistema para compuestos fenólicos (capítulo 4).

Por otro lado, el uso de estas técnicas se ve condicionado por la presión que pueden soportar, la cual es proporcional a la longitud de la columna, que a su vez está relacionada con la resolución. Típicamente, para realizar una MSC hay que sustituir las válvulas solenoides de las cabezas de las jeringas (que aguantan como máximo 2 bar de presión) por válvulas solenoides externas, que aguantan presiones mayores (hasta 6 bar). Aun así, la sobrepresión que se crea en el sistema es una limitación de esta técnica, por lo que el HPLC proporciona mejores prestaciones en cuanto a resolución y robustez, permitiendo analizar muestras más complejas y la determinación de un mayor número de analitos [21].

3.4.2 Instrumentación para cromatografía de gases

Durante el desarrollo de la tesis se ha utilizado un cromatógrafo de gases GC-MS (Agilent 7890A con espectrómetro de masas HP 5973C, Agilent Technologies) para la separación y determinación de los estrógenos.

Para el control de los parámetros instrumentales y el procesamiento de los datos se ha utilizado el software HPChemStation.

La separación de los analitos se ha realizado en una columna capilar DB5 (metil 5% fenil polisiloxano) de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 mm de espesor de película. Se ha utilizado helio a un caudal de 1 mL min^{-1} como gas portador.

La modalidad usada para el detector de masas ha sido la de impacto electrónico (70 eV). Las temperaturas de la fuente de iones, el analizador de cuadrupolo y la interfase se han mantenido a 230, 150 y 280 °C, respectivamente.

El MS está equipado con una librería NIST MS search 2.0. Los iones seleccionados para llevar a cabo el monitoreo de ion específico (SIM) han sido: 160, 199 y 284 para el patrón interno (IS, estrona 3-metil éter); 73, 218, 257 y 342 m/z para la estrona (E1); 73, 129, 285 y 416 m/z para el 17β -estradiol (E2), 285, 425 y 440 m/z para el 17α -etinilestradiol (EE2); y 73, 311, 345 y 414 m/z para el estiol (E3).

La rampa de temperatura utilizada comienza a 100 °C durante 1 min, aumenta hasta 200 °C a 20 °C min^{-1} , y finalmente hasta 280 °C a 5 °C min^{-1} , manteniéndose así 8 min. El tiempo total de análisis es de 30 min.

Para los trabajos que se encuentran en los capítulos 5 y 6, el inyector operaba en modo splitless durante 0,75 min con temperatura de inyección de 280 °C. La optimización de estos dos métodos se ha llevado a cabo con un cromatógrafo de gases GC-FID (Agilent 7890A).

Para el trabajo del capítulo 7 se ha utilizado un inyector de tipo vaporizador con temperatura programable (programmable temperature vaporization, PTV) con un liner

Splitless ultra-inerte (Agilent 5190-2293). La descripción de esta técnica y del método utilizado en la tesis se encuentra en el apartado siguiente (3.4.2.1).

3.4.2.1 Inyección de grandes volúmenes con vaporizador con temperatura programable (LVI-PTV)

Tradicionalmente, en GC con columnas capilares los volúmenes de inyección de la muestra varían de 1 a 2 μL , dependiendo de características como el diámetro de la columna. Sin embargo, cada vez más autores están investigando técnicas de inyección de grandes volúmenes (large volume injection, LVI), que pueden ir desde microlitros hasta un mililitro o más, con la finalidad de mejorar el análisis de analitos que se encuentran en muy bajas concentraciones, ya que al introducir más muestra en el sistema se aumenta proporcionalmente la señal en el detector, y con ello la sensibilidad del método.

La mayoría de análisis en los que se utiliza la LVI se evapora el disolvente de la muestra y se elimina del inyector antes de transferir los analitos a la columna. En este sentido, el método LVI se asemejaría a la evaporación de disolvente con corriente de nitrógeno, con la ventaja de que no hay que hacerlo fuera del sistema en una campana de gases, sino que tiene lugar dentro del mismo cromatógrafo. Además, evitamos la pérdida de analitos que se puede producir al evaporar con nitrógeno, puesto que éstos quedan retenidos en el inyector [22].

Una de las estrategias para realizar una LVI es el uso de un inyector de tipo vaporizador con temperatura programable (programmable temperature vaporization, PTV), desarrollado en la década de 1970 [23]. El PTV (Figura 3.17) es un inyector en frío, que permite controlar la temperatura de la cámara de inyección para que aumente de forma gradual. La jeringa introduce la muestra en el inyector, cuya temperatura se mantiene por debajo del punto de ebullición del disolvente. Transcurrido un tiempo preestablecido, el sistema se calienta de forma rápida y controlada y la muestra se vaporiza en la corriente de gas portador. El inyector PTV se puede utilizar en la modalidad Split (con división de flujo), en cuyo caso el gas portador se divide en dos

partes, una que va a la columna y otra que se desecha, o en modo Splitless (sin división de flujo) [24].

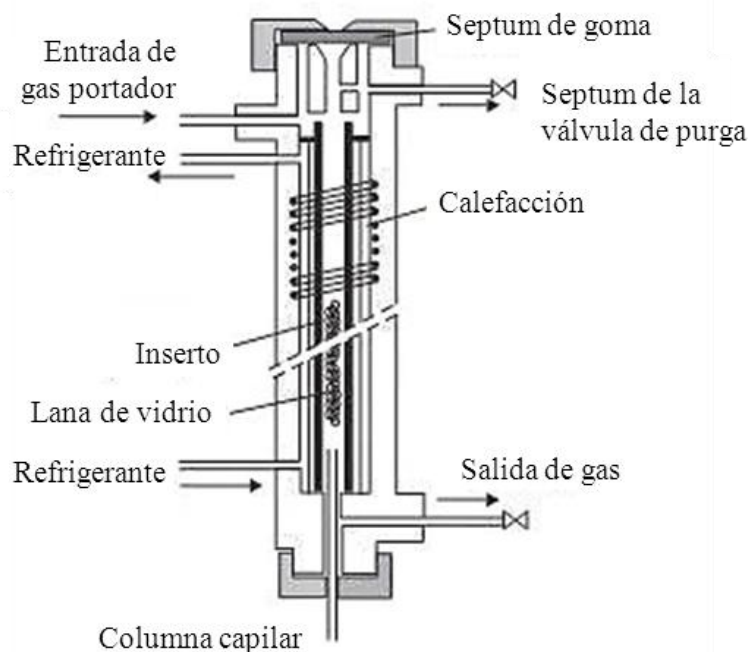


Figura 3.17. Inyector PTV. Para modificar rápidamente la temperatura, la cámara del inyector está envuelta por un elemento calefactor, y puede también ser enfriada por la circulación de un gas refrigerante (en el caso del trabajo expuesto en el capítulo 7, se ha utilizado nitrógeno con este fin).

3.4.2.1.1 In-port derivatization

Como ya se ha comentado en la introducción, es común que en GC sea necesaria una etapa de derivatización previa a la separación de los analitos, que lleva a un aumento del tiempo de análisis y del consumo de reactivos y muestra.

En este contexto, recientemente se han desarrollado diversas metodologías que llevan a cabo la derivatización de los analitos en línea, lo cual presenta importantes ventajas, como la reducción del tiempo de pretratamiento de muestra y de los errores experimentales causados por la manipulación manual de los reactivos derivatizantes [25].

La derivatización en el puerto (in-port derivatization) es una de estas estrategias de derivatización en línea, basada en introducir directamente tanto la muestra como el reactivo derivatizante en el inyector, donde la reacción tiene lugar en fase gas [26]. El reactivo y la muestra pueden ser introducidos de forma manual [27] o bien de forma automática, utilizando un automuestreador controlado por ordenador que inyecte secuencialmente el reactivo y la muestra. Esta segunda opción, que es la elegida para el trabajo que se presenta en esta tesis, ofrece resultados más reproducibles, ya que el analista no interviene en la inyección [28].

Adicionalmente, el hecho de utilizar un inyector PTV nos ha permitido optimizar diferentes variables que afectan a la derivatización, a fin de conseguir una mayor sensibilidad.

3.5 Detectores

3.5.1 Espectrofotómetro

3.5.1.1 Fundamentos de la detección espectrofotométrica

Se conoce como espectrofotometría al conjunto de técnicas que utilizan la luz para medir la concentración de los compuestos [29].

La ley de Beer establece la relación entre la luz que absorbe un gas o disolución y la concentración del analito, y la ley de Lambert, la relación entre la absorción de luz y el espesor de la cubeta [30]. Considerando ambas se obtiene la ley de Lambert-Beer, cuya ecuación se muestra a continuación (Ecuación 3.1):

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

Ecuación 3.1. Ley de Lambert-Beer.

Donde,

A = Absorbancia

ε = Absortividad molar

b = Longitud del paso óptico

c = Concentración del analito

En el método desarrollado en esta tesis para la cuantificación de fenoles se ha medido la absorbancia de estos compuestos en el ultravioleta. En la Figura 3.18. se puede observar una imagen de las diferentes regiones del espectro electromagnético. La región ultravioleta-visible (UV-Vis), que se extiende desde los 200 a los 800 nanómetros, es la región del espectro más usada para el análisis químico, ya que en esta región absorben tanto los iones de metales de transición (especialmente iones complejos formados por reactivos orgánicos), como compuestos orgánicos con enlaces dobles o, como los fenoles, con anillos aromáticos [30].

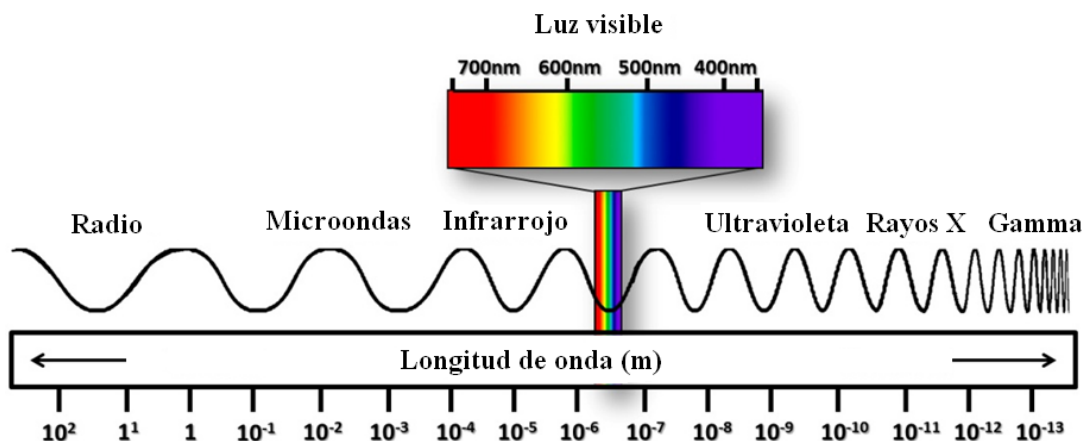


Figura 3.18. Espectro electromagnético.

3.5.1.2 Espectrofotómetro OceanOptics

En el sistema para la determinación de compuestos fenólicos (capítulo 4) se ha utilizado un detector espectrofotométrico miniaturizado para identificar y cuantificar los analitos (USB2000+ OceanOptics; rango de longitudes de onda: 196,6 - 430,4 nm). Se ha usado una lámpara de deuterio como fuente de radiación (OceanOptics DH-2000, Dunedin, USA) y una cubeta de flujo de 1 cm de paso óptico como celda de detección. La fuente de radiación y el espectrofotómetro se han conectado mediante una fibra óptica (OceanOptics, 600 μ m).

En la fotografía que aparece a continuación (Figura 3.19.) puede observarse el detector utilizado.



Figura 3.19. Detector USB2000+ de OceanOptics. [31].

3.5.2 Detector de ionización de llama (FID)

La combustión en un quemador de hidrógeno/oxígeno de la mayoría de compuestos orgánicos da como resultado una llama rica en iones y electrones. Si a través de la llama aplicamos un potencial de aproximadamente 300 V, se crea una pequeña corriente eléctrica que, amplificada mediante un electrómetro, sirve como señal analítica. Esta es la base de un detector de ionización de llama (FID), el tipo de detector más utilizado para GC [32].

El número de iones producidos es proporcional al número de átomos de carbono de la muestra. El FID es, por tanto, es un detector sensible a la masa, más que a la concentración, cuya respuesta se expresa en Coulombs/gramo de carbono [24]. Algunos grupos funcionales dan una señal muy baja o nula en este detector, como los grupos carbonilo, halógeno o amina, así como los gases no inflamables como el dióxido de carbono, el dióxido de azufre o el agua.

En la Figura 3.20. se muestra un esquema general de las partes de un detector FID.

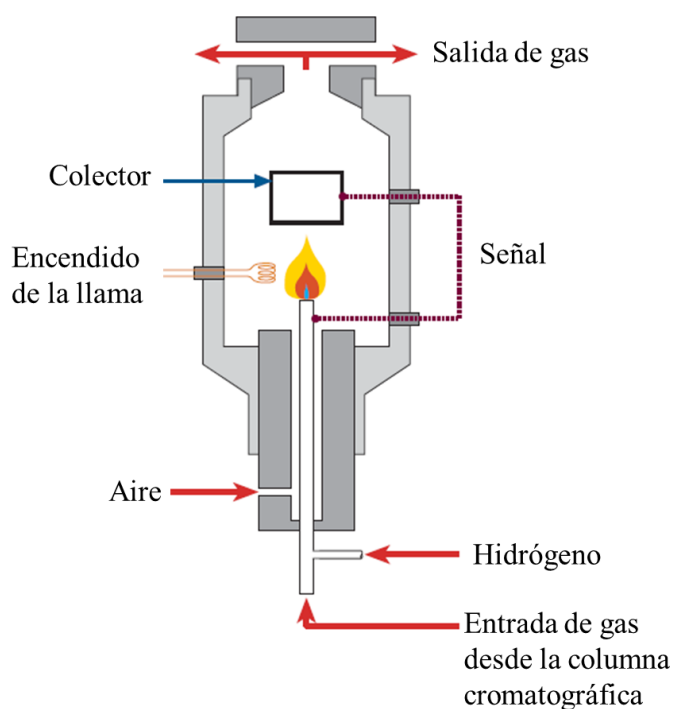


Figura 3.20. Detector de ionización de llama.

3.5.3 Espectrómetro de masas (MS)

La espectrometría de masas es una técnica analítica basada en obtener iones a partir de moléculas en fase gaseosa, los cuales son posteriormente separados en función de su masa y su carga al someterlos a un campo magnético.

Así, el proceso comprende cuatro etapas: la ionización de la muestra, la aceleración de los iones, la separación de los iones en función de su relación masa/carga (m/z), y su detección mediante la transformación del haz de iones en una señal eléctrica.

La combinación del detector de espectrometría de masas con un cromatógrafo de gases (GC-MS) proporciona una potente herramienta para el análisis de muestras complejas. En la GC-MS, el flujo que proviene de la columna es introducido directamente en la cámara de ionización del MS, eliminando la mayor parte del gas portador. Allí, las moléculas de gas portador remanente, disolvente y solutos son ionizadas y los iones son separados. Como cada soluto sufre una fragmentación

característica, el espectro de masas puede servir para identificar el compuesto. Además, se pueden seleccionar relaciones m/z específicas para monitorizar los compuestos de forma selectiva [33].

Un esquema simplificado de los componentes que forman un detector MS se puede observar en la Figura 3.21.

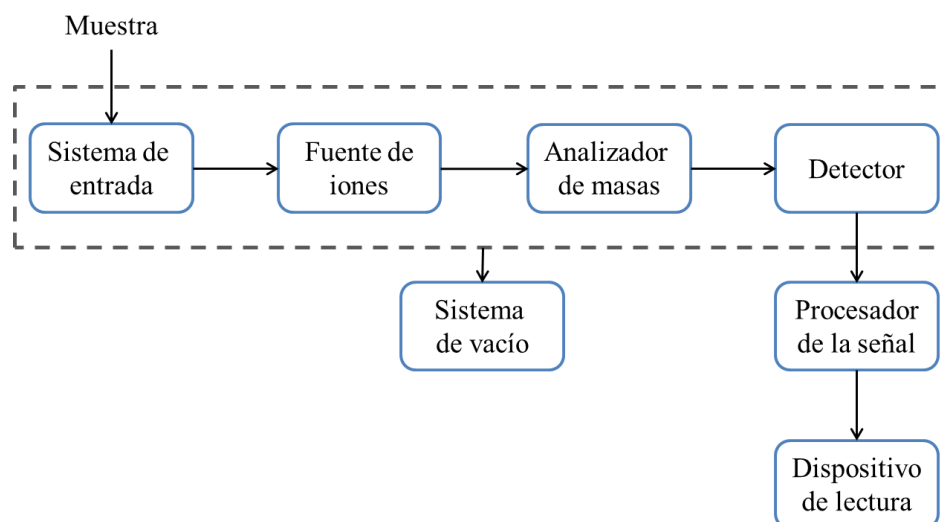


Figura 3.21. Esquema de los componentes de un espectrómetro de masas.

3.6 Optimización del método analítico

La optimización de un método analítico tiene como objetivo encontrar las mejores condiciones para llevar a cabo ese método, generalmente en términos de reproducibilidad y sensibilidad. Se puede realizar de forma univariante, estudiando cómo influye sobre la señal analítica un único factor mientras se mantienen los otros constantes, o de forma multivariante, diseñando experimentos en los que se varían simultáneamente varios factores, lo que permite extraer una gran cantidad de información realizando un número mínimo de experimentos y teniendo en cuenta la interacción entre factores [34, 35]. Generalmente, para optimizar un método se hace una combinación de ambas opciones.

3.6.1 Optimización multivariante

Como se ha mencionado anteriormente, la optimización multivariante permite conocer los factores que influyen significativamente sobre la variable respuesta, así como sus interacciones, y establecer las condiciones óptimas para el análisis.

En el diseño de experimentos multivariante, las variables o factores (n) se varían dentro de un dominio experimental determinado. Estos niveles se codifican como -1 (valor mínimo del factor) y $+1$ (valor máximo del factor), además de definir el valor central (codificado como 0). Estos puntos centrales permiten estudiar tanto la curvatura del sistema, que indica si dentro del diseño estudiado hay variables que ofrezcan una respuesta máxima, como el error de diseño (error puro) que define el intervalo de confianza.

Los datos obtenidos se pueden ajustar a un modelo de interacciones lineales, de segundo o de tercer orden. Como resultado, obtenemos información sobre la influencia de las variables experimentales estudiadas y de sus interacciones.

Generalmente, el primer paso de la optimización es la realización de un cribado o *Screening*, que puede hacerse de manera completa (2^n) o fraccionada (2^{n-k} , donde k es el número de factores reducidos) en función del número de experimentos totales a realizar y del criterio del analista. Gracias a este análisis inicial se pueden comprobar qué variables afectan significativamente a la respuesta, excluyendo del análisis multivariante los factores que no tienen un efecto significativo sobre la misma. Además, sirve para reajustar el dominio experimental de los factores significativos, para después diseñar un nuevo experimento [36]. El objetivo es ajustar los datos a una función tridimensional llamada superficie-respuesta que incluye términos cuadráticos y permite determinar los valores críticos de las variables independientes que dan la mejor respuesta, además de ilustrar gráficamente la relación entre variables y respuestas.

Entre los métodos de optimización que ofrecen este tipo de respuesta se encuentra el diseño central compuesto centrado en las caras (CCD) [37, 38], que es el resultado de superponer un diseño factorial (2^n) y un diseño de estrella ($2n + C_0$, siendo C_0 el número de réplicas del punto central), obteniendo un número total de combinaciones de factores

de $2^n + 2n + C_0$. Estas combinaciones definen los términos lineales, los términos cuadráticos y las interacciones del modelo junto con la estimación del error de los términos.

En la Figura 3.22 se representa la distribución espacial de un diseño del tipo CCD para tres factores.

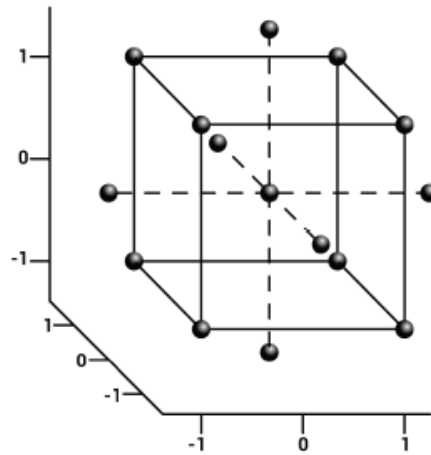


Figura 3.22. Diseño central compuesto para tres factores.

3.6.1.1 Función deseabilidad

La función deseabilidad (D), propuesta por Derringer y Suich en 1980 [39], se utiliza cuando se trabaja con más de una variable respuesta, ya que sirve para determinar superficies de respuesta individuales para cada factor.

La escala de la función deseabilidad va de $d=0$ (para la respuesta no deseable) a $d=1$ (para la respuesta completamente deseable). La deseabilidad D se calcula combinando los valores individuales de deseabilidad, aplicando la fórmula de media geométrica (Ecuación 3.2):

$$D = (d_1 \cdot d_2 \cdot d_m)^{1/m}$$

Ecuación 3.2. Cálculo de la deseabilidad D .

A continuación, se aplica un algoritmo a la función D para encontrar el nivel de cada factor al cual se obtiene un máximo de deseabilidad. A través de esta optimización simultánea se consiguen determinar el conjunto de valores de las variables que optimizan la función D.

La aplicación de la función deseabilidad ha demostrado ser de gran utilidad en química analítica, ya que es eficiente, económica y objetiva a la hora de optimizar sistemas con respuestas múltiples.

3.7 Referencias

- [1] V. Cerdà, J. M. Estela, R. Forteza, A. Cladera, E. Becerra, P. Altimira, P. Sitjar. *Flow techniques in water analysis*. Talanta 50 (1999) 695-705.
- [2] Página web de la empresa Sciware Systems S.L. Última consulta el 2 de mayo de 2018 en: <https://www.sciware-sl.com/>
- [3] Página web de la empresa Takasago Fluidic Systems. Última consulta el 10 de mayo de 2018 en: <http://www.takasago-fluidics.com/>
- [4] B. Horstkotte, R. Suarez, P. Solich, V. Cerdà. *In-syringe-stirring: A novel approach for magnetic stirring-assisted dispersive liquid-liquid microextraction*. Anal. Chim. Acta 788 (2013) 52-60.
- [5] J. Ruzicka. *Lab-on-valve: Universal microflow analyzer based on sequential and bead injection*. Analyst 125 (2000) 1053-1060.
- [6] I. Lahdesmaki, Y. K. Park, A. D. Carroll, M. Decuir, J. Ruzicka. *In-situ monitoring of H₂O₂ degradation by live cells using voltammetric detection in a lab-on-valve system*. Analyst, 132 (2007) 811-817.
- [7] Y. Yu, Y. Jiang, M. Chen, J. Wang. *Lab-on-valve in the miniaturization of analytical systems and sample processing for metal analysis*. Trends Anal. Chem. 30 (2011) 1649-1658
- [8] E. Becerra, A. Cladera, V. Cerdà. *Design of a very versatile software program for automating analytical methods*. Lab. Rob. Autom. 11 (1999) 131-140.
- [9] A. N. Anthemidis, K. I. G. Ioannou. *On-line sequential injection dispersive liquid-liquid microextraction system for flame atomic absorption spectrometric determination of copper and lead in water samples*. Talanta 79 (2009) 86-91.
- [10] F. Maya, J. M. Estela, V. Cerdà. *Completely automated in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction using solvents lighter than water*. Anal. Bioanal. Chem. 402 (2012) 1383-1388.

- [11] C. Basheer, A. A. Alnedhary, B. S. M. Rao, S. Valliyaveetil, H. K. Lee. *Development and application of porous membrane-protected carbon nanotube micro-solid-phase extraction combined with gas chromatography/mass spectrometry*. Anal. Chem. 78 (2006) 2853-2858.
- [12] P. Rocío-Bautista, C. Martínez-Benito, V. Pino, J. Pasán, J. H. Ayala, C. Ruiz-Pérez, A. M. Afonso. *The metal–organic framework HKUST-1 as efficient sorbent in a vortex-assisted dispersive micro solid-phase extraction of parabens from environmental waters, cosmetic creams, and human urine*. Talanta 139 (2015) 13–20.
- [13] J. L. C. Rowsell, O. M. Yaghi. *Metal–organic frameworks: a new class of porous materials*. Microporous Mesoporous Mater. 73 (2004) 3–14.
- [14] Y. Y. Zhou, X. P. Yan, K. N. Kim, S.W. Wang, M. G. J. Liu. *Exploration of coordination polymer as sorbent for flow injection solid-phase extraction on-line coupled with high-performance liquid chromatography for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental materials*. J. Chromatogr. A 1116 (2006)172–178.
- [15] F. Maya, C. Palomino-Cabello, J. M. Estela, V. Cerdà, G. Turnes-Palomino. *Automatic in-syringe dispersive microsolid phase extraction using magnetic metal–organic frameworks*. Anal. Chem. 87 (2015) 7545–7549.
- [16] K. Nakanishi, N. Soga. *Phase separation in silica sol-gel system containing polyacrylic acid I. Gel formation behavior and effect of solvent composition*. J. Non-Cryst. Solids 139 (1992) 1-13.
- [17] F. Maya. *Desarrollo de nuevas metodologías analíticas de interés medioambiental y clínico mediante la técnica de análisis por inyección en flujo multijeringa*. Tesis Doctoral. Universitat de les Illes Balears (2010).
- [18] Página web de la empresa Merck Millipore. Última consulta el 2 de mayo de 2018 en:

http://www.merckmillipore.com/ES/es/products/analytics-sample-prep/chromatography-for-analysis/analytical-hplc/chromolith-hplc-columns/Rk2b.qB.cMMAAAE_hPB3.Lxi,nav#comparación

- [19] D. Šatínský, P. Solich, P. Chocholous, R. Karlicek. *Monolithic columns—A new concept of separation in the sequential injection technique*. Anal. Chim. Acta 499 (2003) 205-214.
- [20] H. M. González, J. M. Alpízar, V. Cerdà. *Development of a new high performance low pressure chromatographic system using a multisyringe burette coupled to a chromatographic monolithic column*. Talanta 72 (2007) 296-300.
- [21] E. Björklund, F. Maya, S. A. Bak, M. Hansen, J. M. Estela, V. Cerdà. *Possibilities and limitations of the sequential injection chromatography technique for the determination of anticoccidial agents in water pharmaceutical formulations and feed*. Microchem. J. 98 (2011) 190-199.
- [22] Agilent Technologies. Manual: *Inyección de grandes volúmenes*. Última consulta el 4 de mayo de 2018 en:
<https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G3510-95020.pdf>
- [23] A. Vallejo, L. A. Fernández, M. Olivares, A. Prieto, N. Etxebarria, A. Usobiaga, O. Zuloaga. *Optimization of large volume injection-programmable temperature vaporization-gas chromatography–mass spectrometry analysis for the determination of estrogenic compounds in environmental samples*. J. Chromat. A 1217 (2010) 8327-8333.
- [24] R. L Grob. *Modern Practice of Gas Chromatography*. John Wiley & Sons, Inc., Estados Unidos, 3ª edición (1998).
- [25] K.S. Docherty, P. Ziemann, *On-line, inlet-based trimethylsilyl derivatization for gas chromatography of mono- and dicarboxylic acids*. J. Chromatogr. A 921 (2001) 265–275.

- [26] E. Bizkarguenaga, A. Iparragirre, P. Navarro, M. Olivares, A. Prietoa, A. Vallejo, O. Zuloaga. *In-port derivatization after sorptive extractions*. J. Chromatogr. A, 1296 (2013) 36–46.
- [27] P. Viñas, N. Martínez-Castillo, N. Campillo, M. Hernández-Córdoba. *Directly suspended droplet microextraction with in injection-port derivatization coupled to gas chromatography–mass spectrometry for the analysis of polyphenols in herbal infusions, fruits and functional foods*. J. Chromatogr. A 1218 (2011) 639-646.
- [28] A. Marsol-Vall, M. Balcells, J. Eras, R. Canela-Garayoa. *A rapid gas chromatographic injection-port derivatization method for the tandem mass spectrometric determination of patulin and 5-hydroxymethylfurfural in fruit juices*. J. Chromatogr. A 1453 (2016) 99-104.
- [29] D. C. Harris. *Análisis químico cuantitativo*. Editorial Reverté. Barcelona, España, 3ª edición (2003).
- [30] H. F. Walton, J. Reyes. *Análisis químico e instrumental moderno*. Editorial Reverté. Barcelona, España (2008).
- [31] Página web de la empresa OceanOptics. Última consulta el 10 de mayo de 2018 en: <https://oceanoptics.com/>
- [32] H. M. McNair, J. M. Miller. *Basic gas chromatography. Techniques in Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc., Estados Unidos (1998).
- [33] D. Harvey. *Modern Analytical Chemistry*. McGraw Hill, Estados Unidos (2000).
- [34] R. Leardi. *Experimental design in chemistry: A tutorial*. Anal. Chim. Acta 652 (2009) 161-172.
- [35] T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, A. Nyström, J. Pettersen, R. Bergman. *Experimental design and optimization*. Chemom. Intell. Lab. Syst. 42 (1998) 3-40.

[36] P. W. Araujo, R. G. Brereton. *Experimental design I. Screening*. Trends Anal. Chem. 15 (1996) 26-31.

[37] M. Almeida, R. Erthal, E. Padua, L. Silveira, L. Amélia. *Response Surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry*. Talanta 76 (2008) 965-977.

[38] P. W. Araujo, R. G. Brereton. *Experimental design II. Optimization*. Trends Anal. Chem. 15 (1996) 63-70.

[39] G. Derringer, R. Suich. *Simultaneous optimization of several response variables*. J. Quality Tech. 12 (1980) 214-219.

CAPÍTULO 4

**Desarrollo de un analizador
totalmente automatizado para
compuestos fenólicos en aguas**

4.1 Introducción y discusión

En este capítulo se presenta un sistema totalmente automatizado para la preconcentración, separación, detección y cuantificación de seis compuestos fenólicos (fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol), todos ellos catalogados como contaminantes prioritarios, en muestras de aguas ambientales.

El acoplamiento entre un sistema MSFIA y una columna monolítica ha permitido utilizar la cromatografía multijeringa (MSC) para realizar la separación cromatográfica en el mismo dispositivo donde tiene lugar el pretratamiento de la muestra, dando como resultado un analizador compacto en el que se desarrollan todos los pasos necesarios para el análisis. Como se ha mencionado en capítulos anteriores, la técnica MSC ofrece resultados similares a los obtenidos con sistemas comerciales, con la ventaja adicional de disminuir considerablemente el consumo de reactivos y muestra así como el coste del instrumental.

La preconcentración y extracción de los analitos se ha llevado a cabo mediante una microextracción líquido-líquido dispersiva con agitación magnética asistida dentro de la jeringa (in-syringe-MSA-DLLME), seguida de una retroextracción con NaOH y neutralización con ácido acético. Se ha comparado la eficiencia de diversos disolventes orgánicos como extractante (tributil fosfato, acetonitrilo, hexano y 1-clorobutano) y como dispersante (acetona, acetonitrilo, etanol, metanol, 1-propanol, 2-propanol), además de optimizarse el resto de condiciones que afectan a la extracción y retroextracción de los fenoles.

Para la realización de la MSC se ha utilizado como fase estacionaria una columna monolítica Chromolith Flash RP-18e (25 mm x 4,6 mm), y como fase móvil una mezcla de acetonitrilo, agua y ácido trifluoroacético en modo multiisocrático a $0,6 \text{ mL min}^{-1}$.

El sistema desarrollado proporciona elevados factores de preconcentración (entre 9,3 y 10,5 para todos los compuestos estudiados excepto el 2,4,6-TCP), mientras que sus límites de detección se encuentran entre 0,01 y 0,14 mg L^{-1} . Además, ha demostrado ser preciso, ofreciendo desviaciones estándar relativas (RSDs) de 5,2% o

menores ($n=7$). Su frecuencia de análisis es de 1,8 muestras por hora, una alta frecuencia teniendo en cuenta que se incluyen todos los pasos para el pretratamiento y el análisis de la muestra, además de la limpieza y reacondicionamiento del sistema. Adicionalmente, el método ha sido aplicado con éxito a diferentes matrices de agua de interés ambiental (agua de grifo, agua mineral, agua de pozo y lixiviados).

Entre las ventajas del sistema propuesto se encuentran la significativa reducción del coste del análisis, dado que un sistema HPLC es sustancialmente más caro que el sistema MSC utilizado para realizar la separación cromatográfica, además de la rapidez del método, que se lleva a cabo de manera totalmente automatizada, por lo que no es necesario que el analista esté presente mientras se realizan los análisis.

4.2 Artículo original

A continuación se adjunta el artículo original "Determination of priority phenolic pollutants exploiting an in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction-multisyringe chromatography system" de A. González, J. Avivar y V. Cerdà, publicado en Analytical and Bioanalytical Chemistry 407 (2015) 2013-2022.

Determination of priority phenolic pollutants exploiting an in-syringe dispersive liquid–liquid microextraction–multisyringe chromatography system

Alba González · Jessica Avivar · Víctor Cerdà

Received: 11 November 2014 / Revised: 22 December 2014 / Accepted: 5 January 2015 / Published online: 20 January 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract An automatic phenolic compounds analyzer is presented. The system performs online magnetic-stirring-assisted dispersive liquid–liquid microextraction before multisyringe chromatography (MSC) using a monolithic Chromolith Flash RP-18e column. The extraction behavior of the following phenolic pollutants: phenol, 2-nitrophenol, 4-nitrophenol, 2-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol, and 2,4,6-trichlorophenol, has been studied. A critical comparison of extractants (tributyl phosphate, acetonitrile, hexane, and 1-chlorobutane) and disperser solvents (acetone, acetonitrile, ethanol, methanol, 1-propanol, and 2-propanol) was made. Tributyl phosphate and acetonitrile were chosen as the extractant and the disperser solvent, respectively, since these showed the best performance. Phenols were online back-extracted into NaOH and neutralized before multi-isocratic chromatographic separation. The proposed analyzer can be applied for wide linear working ranges, i.e., between 40 and 20,000 $\mu\text{g L}^{-1}$. The precision of the developed system has been proved, with maximum values for the intraday and interday precision of 4.4 % and 5.2 %, respectively, expressed as relative standard deviation, and high preconcentration factors (9.3–10.5) for most of the compounds studied. The method developed was successfully applied to natural water samples.

Keywords Magnetic-stirring-assisted dispersive liquid–liquid microextraction · Multisyringe chromatography · Phenolic compounds · Environmental samples · Automation

A. González · V. Cerdà (✉)
Department of Chemistry, University of the Balearic Islands,
Carretera Valldemossa km 7.5, 07122 Palma de Mallorca, Spain
e-mail: victor.cerda@uib.es

J. Avivar
Sciware Systems S.L, 07193 Bunyola, Spain

Introduction

Phenolic compounds can be found in the environment directly from anthropogenic sources and from the transformation of synthetic or natural chemicals [1, 2]. Phenol is widely used as a disinfectant for medical and industrial applications [3]. Its principal sources are discharges from different industries. It is also used in the production of explosives, pesticides, and dyes [2]. The presence of chlorophenols in the environment is mainly related to the use of organic compounds such as pesticides and growth regulators, whose biodegradation leads to the formation of phenol, 2-chlorophenol (2-CP), and 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) [2]. 2-CP and 2,4-DCP are also used as herbicides [4]. Nitrophenols, particularly 2-nitrophenol (2-NP) and 4-nitrophenol (4-NP), can be formed in the reaction of phenol with nitrite ions in water under UV (sunlight) irradiation [5] and also during the production of pesticides, polymers, and drugs [6] in addition to other industrial activities. Given their toxicological [7–9] and organoleptic [10] effects, the United States Environmental Protection Agency has listed some phenolic compounds as priority pollutants [11]. Thus, the monitoring of phenolic pollutants is essential to notice and control illegal discharges from industry or contamination by pesticides.

Phenolic compounds have been determined using different strategies, mainly exploiting separation techniques, e.g., gas chromatography and liquid chromatography [12, 13]. Liquid chromatography is one of the most used techniques since derivatization of analytes is avoided [13, 14]. Moreover, the advent of monolithic columns made possible the development of low-pressure chromatographic techniques such as sequential injection chromatography [15] and multisyringe chromatography (MSC) [16] as a result of the implementation of monolithic columns in sequential injection analysis (SIA) and multisyringe flow injection analysis (MSFIA) [17] systems, respectively. These techniques are low-cost alternatives

to high-performance liquid chromatography (HPLC) providing a reduction of sample and organic solvent consumption, which leads to reduction of waste production [18]. Moreover, multi-isocratic chromatography can be easily implemented using MSC. Furthermore, the use of a multisyringe burette allows precolumn and postcolumn operations permitting the performance of the whole analytical protocol in a fully automated way within a single instrumental assembly.

Usually sample pretreatment is required before chromatographic separation, especially when dealing with environmental or biological samples, in order to attain analyte enrichment and matrix removal. Solid-phase extraction is the technique most commonly used for this purpose [14, 19]. However, recently there have been interesting developments in liquid–liquid extraction (LLE), such as the advent of dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) [20, 21] and the development of lab-in-syringe systems [22], which allow automatic LLE inside the syringe, saving time, reagents, and solvents, and consequently reducing the generation of residues. DLLME is based on the use of a ternary component (disperser solvent) miscible in both water and the extractant. The disperser is mixed with the immiscible extraction solvent and is injected into the aqueous sample, producing a cloudy solution of small droplets of the extractant, enhancing the contact surface area between the phases. DLLME has been automated by exploiting flow techniques. For example, Anthemidis and Ioannou [23] developed an SIA–DLLME system for the determination of lead and copper by exploiting flame atomic absorption spectrometry. DLLME has also been automated using MSFIA, e.g., for the determination of benzo[*a*]pyrene [24], chromium [25], and total phenol index [26]. The automation of DLLME improves its reproducibility and accuracy, since flow techniques allow the precise handling of small volumes. Furthermore, both DLLME and flow techniques reduce sample and reagent consumption, attaining improved environmentally friendly systems.

In this work a DLLME–MSC system for determination of six phenolic pollutants is presented. Several extractants and disperser solvents are studied. Multi-isocratic chromatography was implemented, and the potential of the proposed system as a powerful tool for screening of phenolic pollutants in environmental samples is studied.

Materials and methods

Reagents, samples and solutions

All solutions were prepared with distilled water (resistivity greater than $1.8 \times 10^5 \Omega \text{ cm}$) from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). HPLC-grade acetonitrile (ACN; Scharlau, Barcelona, Spain) was used to prepare the mobile phases. Acetic acid (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), sodium

chloride, sodium dihydrogen phosphate, and trifluoroacetic acid (Scharlau) were of analytical reagent grade. The other reagents used were tributyl phosphate (TBP), hexane, acetone, ethanol, 1-propanol, and 2-propanol from Scharlau and 1-chlorobutane and ammonium sulfate from Sigma-Aldrich.

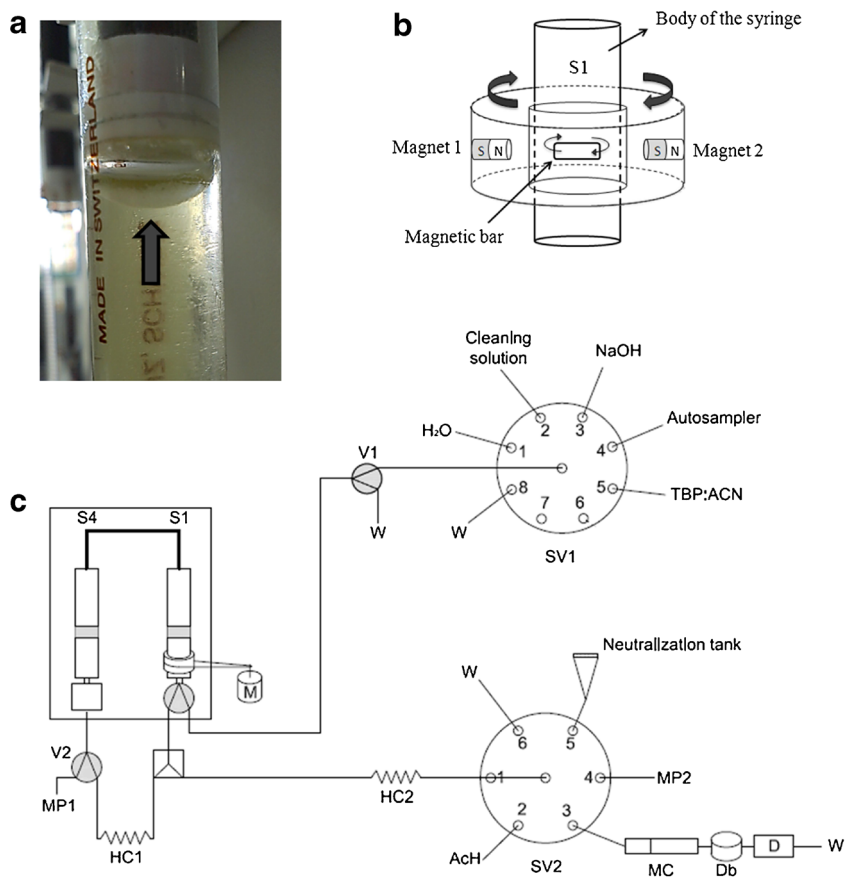
The phenolic compounds analyzed, i.e., phenol, 2-NP, 4-NP, 2-CP, 2,4-DCP, and 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP), were purchased from Sigma-Aldrich. Stock solutions of each phenolic compound were prepared by accurately weighing the appropriate mass of the phenolic compound and by dissolving it in HPLC-grade methanol (Scharlau) in order to obtain a final concentration of $1,000 \text{ mg L}^{-1}$. Working standard solutions containing either mixtures or individual compounds were prepared by dilution of the stock solutions in water.

The water samples analyzed were tap water from the laboratory, commercial mineral water, well water from a well in Son Reus, Palma (Spain, geographic coordinates, *X* 473247, *Y* 4388551), and a leachate sample from a demolition waste treatment plant in Santa Margalida (Spain, geographic coordinates, *X* 512401, *Y* 4398015). The pH was adjusted to 2 using 0.1 M HCl.

Magnetic-stirring-assisted DLLME–MSC system and software

The basic element of an MSFIA system is a multisyringe burette allowing the simultaneous movement of four syringes. Each syringe has a three-way solenoid valve (N-Research, Caldwell, NJ, USA) placed at the head which allows the injection of the reagents into the system only when required and their return to their reservoirs when they are not required. The proposed magnetic-stirring-assisted (MSA) DLLME–MSC system (Fig. 1c) comprises a multisyringe burette module (CRISON, Alella, Spain) placed upside down and equipped with two 5-mL glass syringes (S1 and S4; Hamilton, Bonaduz, Switzerland). This way the organic droplet of the extractant, which is less dense than water, stays at the top and the aqueous phase (Fig. 1a) can be discarded before back-extraction with NaOH. To enhance the extraction efficiency, an MSA system (Sciware Systems, Bunyola, Spain) was mounted on S1 (Fig. 1b), where the extraction and back-extraction occur. The MSA system allows homogeneous and rapid mixing of phases. It consists of a small magnetic bar (10-mm length, 3-mm diameter) placed inside the syringe, an external stirring support placed around the syringe's body, a motor connected to the external agitation support by a rubber band, which forces the rotation of the external agitation support, and a circuit that controls both the starting/stopping and the motor revolutions through one of the multisyringe outputs. The external stirring support is a ring (14-mm inner diameter, 30-mm outer diameter) with two small magnets facing each other creating a rotating magnetic field around the body of the syringe. When the motor is switched on, the ring starts to

Fig. 1 **a** Extractant drop after phase separation. **b** The agitation system. **c** Manifold. *ACN* acetonitrile, *D* detector, *Db* debubbler, *HC* holding coil, *M* magnetic-stirring-assisted system, *MC* monolithic column, *MP* mobile phase, *S* syringe, *SV* selection valve, *TBP* tributyl phosphate, *V* solenoid valve, *W* waste



rotate and with it the magnetic bar inside the syringe, mixing the phases. A schematic depiction of the MSA system is shown in Fig. 1.

The system has two switching selection valves (SV1 and SV2), two external solenoid valves (V1 and V2), a monolithic column, a debubbler (Sciware Systems), and a spectrophotometric detector. S1 is connected to an external solenoid valve (V1; MTV-3-N 1/4 UKG; Takasago, Nagoya, Japan) that drives the flow to waste (“on” position) or to the eight-port selection valve (SV1; CRISON) (“off” position), which has the extraction and back-extraction reagents located on its peripheral ports, as follows: water (port 1), cleaning solution (10:90 v/v acetone:H₂O; port 2), 0.1 M NaOH (port 3), autosampler (port 4), extractant–disperser solution (port 5), and waste (port 8). The second syringe (S4) is used to perform the multi-isocratic separation by dispensing two different mobile phases through the monolithic column. As the valves of the multisyringe module can handle up to 2 bar, the valve of S4 was replaced by a Kel-F one-way connector (Sciware Systems) and an external solenoid valve (V2) (Takasago) which can withstand up to 6 bar. The “on” position of V2 connects S4 to the mobile phase 1 reservoir, and the “off” position connects it to a holding coil connected to a second, six-port selection valve (SV2; VICI Valco, Schenkon, Switzerland) whose port configuration is as follows: a

neutralization tank (port 5), a Chromolith Flash RP-18e monolithic column (25 mm × 4.6-mm inner diameter) protected with a Chromolith RP-18e guard column (5 mm × 4.6-mm inner diameter) (Merck, Darmstadt, Germany) (port 3), 0.5 M acetic acid (port 2), mobile phase 2 (port 4), and waste (port 6).

The detection system was a USB2000+ spectrophotometer equipped with a 1-cm flow cell (Ocean Optics, Dunedin, FL, USA). Measurements were recorded simultaneously at 270, 290, 300, and 315 nm. The manifold was constructed with polytetrafluoroethylene tubing (0.8-mm inner diameter).

Instrumental control, data acquisition, and data processing were done with AutoAnalysis 5.0 (Sciware Systems). The distinctive feature of this software based on dynamic link libraries at 32 bits is the possibility of using a single and versatile application without further modification for whatever instrumentation and detection system needed. It involves a basic protocol which allows the implementation of specific and individual dynamic link libraries, addressing the configuration of the assembled flow analyzer.

MSA-DLLME-MSC procedure and calculations

The analytical procedure is detailed in Table 1. DLLME is performed in S1 using a mixture of TBP and ACN (10:90 v/v) as the extractant and the disperser solvent, respectively. S1 is

Table 1 Detailed analytical procedure of the magnetic-stirring-assisted dispersive liquid–liquid microextraction–multisyringe chromatography (MSA–DLLME–MSC) system for determination of phenolic compounds

Step description	Multisyringe burette movement	SV1 (port)	SV2 (port)	S1	S4 (V2)	Motor	V1
1 Start loop							
2 Fill HCs with MP1	Dispense 1 mL	8	6	Off	Off	Off	Off
3 Precondition the column	Dispense 2 mL	8	3	Off	Off	Off	Off
4 Empty S1 and S4	Dispense 2 mL	8	6	Off	Off	Off	Off
5 Load sample	Pick up 4.006 mL	4	6	Off	On	Off	Off
6 Load organic phase (with agitation)	Pick up 0.862 mL	5	6	Off	On	On	Off
7 Agitation	-	5	6	Off	Off	On	Off
8 Wait 20 s	-	5	6	Off	Off	On	Off
9 Stop agitation	-	5	6	Off	Off	Off	Off
10 Discard aqueous phase	Dispense 4.86 mL	8	6	Off	On	Off	On
11 Load NaOH with agitation	Pick up 0.35 mL	3	6	Off	On	On	Off
12 Agitation	-	5	6	Off	Off	On	Off
13 Wait 40 s	-	5	6	Off	Off	On	Off
14 Stop agitation	-	5	6	Off	Off	Off	Off
15 Deliver NaOH into HC2	Dispense 0.2 mL	8	6	On	On	Off	Off
16 Dispense NaOH into the neutralization tank	Dispense 0.1 mL	8	5	On	Off	Off	Off
17 Dispense the rest of NaOH from HC2 into the neutralization tank with MP1	Dispense 0.2 mL	8	5	Off	Off	Off	Off
18 Load CH ₃ COOH	Pick up 0.1 mL	8	2	Off	Off	Off	Off
19 Neutralization	Dispense 0.1 mL	8	5	Off	Off	Off	Off
20 Load neutralized extract	Pick up 0.385 mL	8	5	Off	Off	Off	Off
21 Inject extract and MP1	Dispense 6.9 mL	8	3	Off	Off	Off	Off
22 Rinse S4 with MP2 and S1 with cleaning solution	Priming pick up, dispense, pick up	2	4	Off	On	Off	Off
23 Second elution with MP2	Dispense 6.2 mL	8	3	Off	Off	Off	Off
24 Syringe cleaning procedure							
25 Repeat loop (×3)							
26 Sample change procedure							

HC holding coil, MP mobile phase, S syringe, SV selection valve, V three-way solenoid valve

coupled to an external solenoid valve (V1). Its “off” position connects S1 to the central port of SV1. First, the sample is loaded into S1, followed by the mixture of TBP and ACN at a high flow rate (15 mL min⁻¹) and with the MSA system activated. As a result, a cloudy solution is formed inside S1. Agitation is maintained for 20 s, and then it is stopped. After phase separation has been achieved, the aqueous phase is discarded to waste with S1 in the “off” position and V1 in the “on” position in order to avoid cross-contamination. To combine the DLLME with the chromatographic separation, a back-extraction with NaOH is performed. NaOH is aspirated from port 3 of SV1 with the MSA system activated. Agitation is maintained for 40 s, and then NaOH is dispensed via S1 in the “on” position to holding coil 2 and S4 pushes it to the neutralization tank in port 5 of SV2. There, NaOH is neutralized with acetic acid. After neutralization, the resulting solution is injected onto the monolithic column using S4. Thus,

the sample is injected into the chromatographic column, followed by 6 mL of mobile phase 1. Then S4, holding coil 1, and holding coil 2 are filled with mobile phase 2 to dispense 6.2 mL of mobile phase 2 to elute the phenolic compounds still retained on the column. All solutions pass through the debubbler before reaching the detector. Finally, a cleaning procedure is performed. It consists in filling S1 with cleaning solution (10:90 v/v acetone:H₂O) before rinsing it twice with Milli-Q water, while S4 is simultaneously rinsed with mobile phase 1.

The limit of detection (LOD) was calculated according to IUPAC [27, 28] as three times the standard deviation of ten blanks divided by the slope of each calibration curve, the limit of quantification was calculated as ten times the standard deviation of ten blanks divided by the slope of each calibration curve, and relative bias in percent were calculated by dividing the

difference between the mean of the results and the reference value by the reference value [29].

Optimization of experimental conditions

To optimize the operational conditions of the proposed system, a series of experiments were conducted using a multivariate optimization technique. Multivariate designs provide relevant knowledge of the effect of variables within the entire experimental domain selected, and the variance of the estimate of the response at every point of the domain is better than that obtained by univariate methods [30]. First, a preliminary study with wide ranges was performed to find out which variables had a significant effect on the response and to select the appropriate ranges to study. Then, a screening of the independent variables and their possible interactions was performed by a two-level full factorial design (2^k). The evaluation of the screening results allows the identification of the variables with a significant influence on the analytical response and allows to discard those with negligible effects [31]. Then, a face-centered central composite design was applied in order to find the critical values of the significant variables. Three center points were included to identify any irregularities, such as the loss of linearity in the center of the interval in both studies. The statistical software program Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) was used for the entire multivariate analysis.

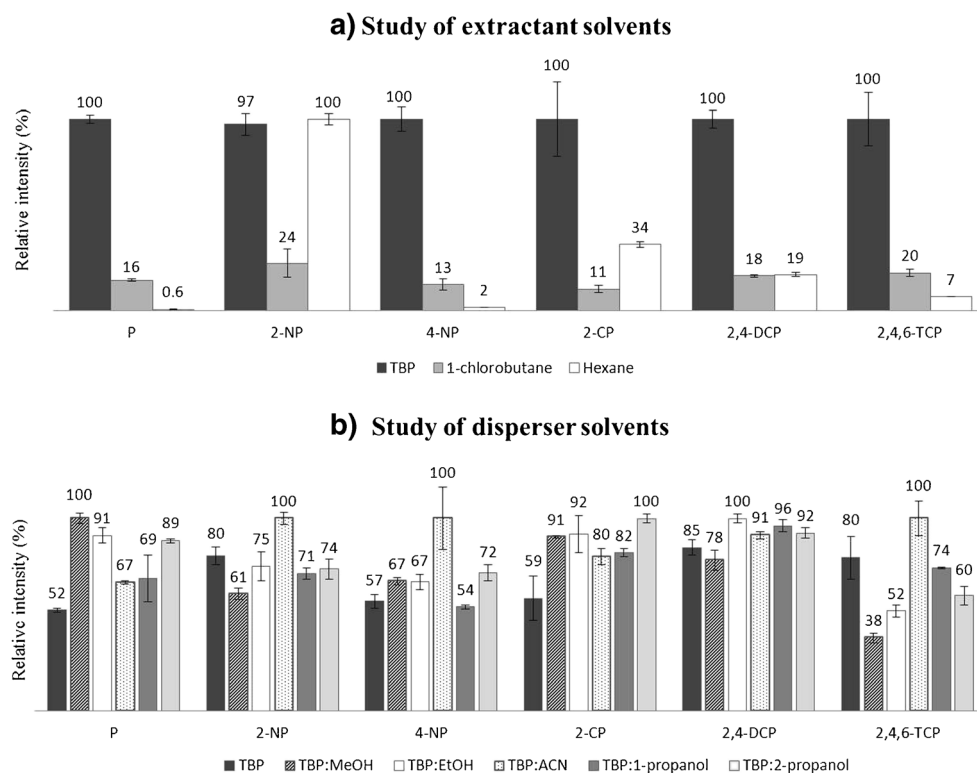
Results and discussion

Study of extractants and disperser solvents

The selection of the extractant and the disperser solvent was performed off-line with aqueous solutions containing each phenolic compound at 10 mg L^{-1} (pH 2–3). The extractants studied were: ACN adding 10 g of ammonium sulfate to 50 mL of sample [32], 1-chlorobutane [33, 34], hexane [35], and TBP [21]. For ACN with ammonium sulfate, the absorbance of the extraction blank was too high, so this option was discarded. The results obtained with the other extractants are shown in Fig. 2a. Results are expressed as relative intensity (%), with 100 % for the solvent providing the highest absorbance. TBP showed the best performance for most of the phenolic compounds studied but for 2-NP, for which hexane was slightly better. Taking into account these results, we selected TBP as the extractant.

Then, mixtures of TBP with different disperser solvents were tested, i.e., methanol [36], ethanol [36], ACN [26, 36], acetone [36, 37], 1-propanol [26], and 2-propanol. The TBP–acetone mixture was discarded because of the high absorbance of the extraction blank. As can be seen from Fig. 2b, TBP–ACN showed the best performance in general, and especially for those phenols giving a lower absorbance signal; therefore, it was selected for further assays.

Fig. 2 Results of the study of extractants (a) and disperser solvents (b) expressed as relative intensity with error bars. 2-CP 2-chlorophenol, 2,4-DCP 2,4-dichlorophenol, 2-NP 2-nitrophenol, 4-NP 4-nitrophenol, P phenol, 2,4,6-TCP 2,4,6-trichlorophenol



Multivariate optimization of the DLLME and back-extraction

A multivariate optimization of the parameters affecting the DLLME and the back-extraction was performed. First, a preliminary study with wide ranges was conducted to find out which variables had a significant effect on the response and to select the appropriate ranges to study. The volume of NaOH had a significant positive effect. However, because of the limitations of the system (chromatographic separation) it was fixed at 0.3 mL. Thus, the percentage of TBP, the volume of the organic phase, and the concentration of NaOH were selected as variables for the multivariate study.

A full factorial screening (2^k), including three center points, with adjusted ranges was performed. The curvature and the three variables were significant; therefore, according to the results obtained (ANOVA table, Pareto chart), the studied ranges were readjusted to the following to apply a response surface face-centered central composite design: TBP percentage, 10–40 %; volume of the organic phase, 0.5–1 mL; NaOH concentration, 0.1–1 mol L⁻¹. The desirability graph was studied to obtain the optimum values. The critical values were set to the lowest percentage of TBP studied (10 %), 0.832 mL of the organic phase, and 0.1 M NaOH.

Effect of the ionic strength

The effect of the ionic strength was studied by adding different amounts of NaCl (from 0 to 1 mol L⁻¹) to the aqueous samples. An increase of the extraction efficiency was obtained when the NaCl concentration increased from 0 to 0.5 mol L⁻¹, but no significant differences were observed when concentrations up to 1 mol L⁻¹ were added. Thus, 0.5 M NaCl was selected for further assays.

Effect of agitation time

The influence of agitation time was examined. No signal improvement was observed when the DLLME agitation time was increased from 20 to 40 s. Thus, the extraction agitation time was fixed at 20 s. For back-extraction, a higher response was obtained when the agitation time was increased from 20 to 40 s, but no signal improvement was observed when it was increased to 60 s. Therefore, the back-extraction time was set at 40 s.

Chromatographic separation

Multi-isocratic chromatographic separation was performed at a flow rate of 0.6 mL min⁻¹, the maximum flow rate showing no back-pressure problems. Different proportions of ACN in water were tested. A 16:84 (v/v) ACN:H₂O mixture was selected as mobile phase 1 to elute phenol, 2-NP, 2-CP, and 4-NP. Then, a second mobile phase, 35:65 (v/v) ACN:H₂O,

was used to elute 2,4-DCP and 2,4,6-TCP. Two mobile phases were required to perform the separation of the phenolic compounds studied in a reasonable time.

The effect of adding trifluoroacetic acid was studied, and with the addition of 0.1 % trifluoroacetic acid better resolution was achieved. A chromatogram obtained with the optimum conditions detailed above is shown in Fig. 3.

Quantification of phenolic compounds

As can be seen in Fig. 3, 2-CP and 2-NP were coeluted. We did not succeed in separating these two phenols with the column that our system permitted given its short length. However, both could be quantified by using one of the AutoAnalysis tools which allows to simultaneously measure up to four different wavelengths. This also allowed us to measure each phenol at the wavelength where better sensitivity is obtained. The quantification wavelengths are summarized in Table 2.

Thus, to quantify 2-CP and 2-NP, we used two wavelengths, i.e., 270 and 300 nm. At 270 nm both phenolic compounds absorb, but at 300 nm only 2-NP absorbs. The mathematical procedure followed was as follows: On the one hand, if both phenolic compounds are present in the sample, 2-NP is quantified at 300 nm. Then its concentration is interpolated in the curve obtained for 2-NP at 270 nm to reveal the area corresponding to this compound. Finally, the difference between the total area and the area associated with 2-NP at 270 nm corresponds to 2-CP. This way, both compounds are quantified. On the other hand, if no peak is observed at 300 nm, all the peak area measured at 270 nm corresponds to 2-CP, and its concentration can be calculated directly.

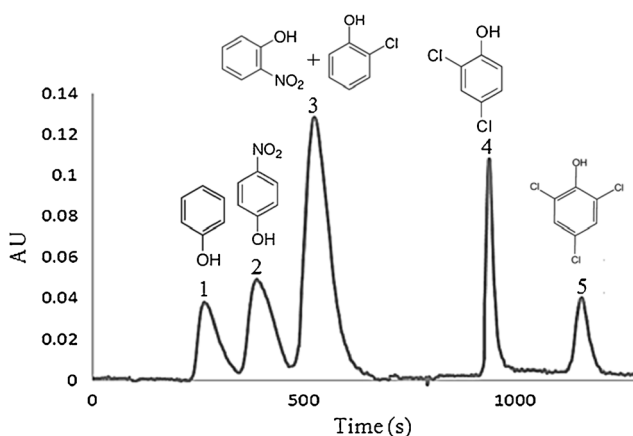


Fig. 3 Chromatogram obtained for an aqueous sample with 0.5 M NaCl, pH 2, and spiked with the six phenolic compounds studied at 2.5 mg L⁻¹. The chromatographic separation conditions were as follows: MP1, ACN:H₂O (16:84 v/v) with 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA); MP2, ACN:H₂O (35:65 v/v) with 0.1 % TFA; flow rate, 0.6 mL min⁻¹. 1) P, 2) 4-NP, 3) 2-NP plus 2-CP, 4) 2,4-DCP, 5) 2,4,6-TCP, AU absorbance units

Table 2 Figures of merit of the proposed MSA-DLLME-MSC method

	P	2-NP	4-NP	2-CP	2,4-DCP	2,4,6-TCP
Quantification wavelength (nm)	270	270	300	270	290	290
LOD (mg L ⁻¹)	0.10	0.04	0.08	0.01	0.09	0.14
LOQ (mg L ⁻¹)	0.33	0.12	0.27	0.04	0.30	0.46
Linear range (mg L ⁻¹)	0.33–20	0.12–20	0.27–20	0.04–20	0.30–20	0.46–20
Calibration curve	$y = 1.0049x - 0.11187$	$y = 2.7981x - 0.2645$	$y = 1.0678x + 0.0307$	$y = 6.8747x + 0.7961$	$y = 1.4691x + 0.1093$	$y = 1.1056x - 0.0658$
Sensitivity (AU·L mg ⁻¹)	1.0049	2.7981	1.0678	6.8747	1.4691	0.712
Determination coefficient (R^2)	0.9998	0.9995	0.9926	0.9997	0.9999	0.9948
Intraday precision (%) ($n=7$)	2.2	3.5	4.0	3.3	4.4	3.1
Interday precision (%) ($n=5$)	4.8	4.4	5.2	3.6	5.13	5.2
Injection frequency (h ⁻¹)	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
Extraction efficiency (%)	82	-	82	-	92 ^a	49
Experimental preconcentration factor	9.4	-	9.3	-	10.5	5.6

AU absorbance units, 2-CP 2-chlorophenol, 2,4-DCP 2,4-dichlorophenol, LOD limit of detection, LOQ limit of quantification, 2-NP 2-nitrophenol, 4-NP 4-nitrophenol, P phenol, 2,4,6-TCP 2,4,6-trichlorophenol

^a Calculated using the area corresponding to 2-CP at 270 nm.

Figures of merit of the proposed MSA-DLLME–MSC system

To evaluate the performance of the proposed MSA-DLLME–MSC method, its figures of merit were studied, and they are listed in Table 2.

Intraday precision is expressed as the relative standard deviation (RSD) obtained when analyzing a 5 mg L⁻¹ standard containing the six phenolic compounds studied in seven consecutive determinations on the same day. As can be seen, RSDs of 4.4 % or less were obtained. Interday precision corresponds to the RSD of a 5 mg L⁻¹ standard containing the six phenolic compounds studied analyzed on five different days. For all the analytes, an RSD of 5.2 % or less was obtained.

For the preconcentration factor, first the theoretical preconcentration factor was calculated, assuming 100 % extraction and back-extraction efficiency, by the relation of the initial sample volume and the final NaOH volume where all the phenolic compounds are back-extracted. Thus, the theoretical preconcentration factor was 11.43. Then, 1 mL of a solution of NaOH containing each phenol at 11.43 mg L⁻¹ was neutralized and injected into the chromatographic part of the system. Its response was compared with the signal of a solution containing each phenol at 1 mg L⁻¹ analyzed with the proposed system. The relation of these two absorbance values gives the efficiency of extraction and back-extraction of each phenolic compound shown in Table 2 as the extraction efficiency. Then, the experimental preconcentration factor was calculated by multiplying the extraction efficiency of each phenolic compound and the theoretical preconcentration factor. As can be seen from Table 2, high preconcentration factors

between 9.3 and 10.5 were achieved for most of the phenolic compounds studied, except for 2,4,6-TCP (5.6). Compared with previously reported manual methods dealing with liquid–liquid microextraction of phenolic compounds, better extraction efficiencies are achieved for most of the common phenolic compounds studied, except for 2,4,6-TCP. Fattahi et al. [38] reported extraction efficiencies of 28.7, 62, and 75.15 % for 2-CP, 2,4-DCP, and 2,4,6-TCP, respectively, Faraji et al. [39] reported extraction efficiencies of 21, 34, 63, and 86 % for phenol, 2-CP, 2,4-DCP, and 2,4,6-TCP, respectively, and Vera-Ávila et al. [36] reported extraction efficiencies of 13.1, 38.2, 76.9, and 86.2 % for phenol, 2-CP, 2,4-DCP, and 2,4,6-TCP, respectively. Furthermore, higher precision is achieved with the present method, i.e., RSDs between 6.4 and 10.4 % in comparison with RSDs of 5.2 % or less obtained with the proposed system. These methods report better LODs because of greater sample consumption and the use of more sensitive but more expensive detectors. In addition, with the proposed method, the consumption of organic solvents is reduced between three and ten times in comparison with manual methods [36, 37].

Regarding other automatic methods determining 2-NP and 4-NP [33, 34], better extraction efficiencies are achieved with the present method with a similar consumption of organic solvents: i.e., approximately 50 % in comparison with approximately 80 % with the present method.

The linear working range has been established from the limit of quantification to the highest concentration of the standard analyzed, being possible to quantify simultaneously concentrations within the range 0.33–20 mg L⁻¹ for phenol,

Table 3 Application of the MSA-DLLME–MSC method to environmental samples and addition–recovery test at two spiking levels

Sample	Phenolic compound added (mg L ⁻¹)	Recovery											
		P		2-NP		4-NP		2-CP		2,4-DCP		2,4,6-TCP	
		mg L ⁻¹	%	mg L ⁻¹	%	mg L ⁻¹	%	mg L ⁻¹	%	mg L ⁻¹	%	mg L ⁻¹	%
Tap water	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	0.5	0.54±0.03	108	0.55±0.05	110	0.51±0.08	102	0.54±0.05	108	0.54±0.06	108	0.49±0.05	98
	1	0.89±0.04	89	0.97±0.04	97	0.910±0.007	91	0.83±0.08	83	0.94±0.03	94	0.98±0.02	98
Mineral water	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	0.5	0.46±0.07	92	0.50±0.04	100	0.445±0.006	89	0.51±0.04	102	0.51±0.03	102	0.49±0.02	98
	1	1.08±0.06	108	0.96±0.08	96	0.94±0.03	94	0.94±0.08	94	0.91±0.03	91	0.91±0.04	91
Well water	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	0.5	0.486±0.011	97	0.46±0.04	92	0.471±0.013	94	0.54±0.05	108	0.490±0.011	98	0.45±0.02	90
	1	1.06±0.05	106	0.89±0.06	89	0.915±0.018	92	0.91±0.08	91	0.95±0.04	95	1.00±0.05	100
Leachate	0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	0.5	0.526±0.019	105	0.480±0.009	96	0.466±0.005	93	0.480±0.003	96	0.51±0.02	102	0.48±0.04	96
	1	1.060±0.008	106	1.03±0.08	103	1.008±0.015	101	0.92±0.09	92	0.96±0.09	96	1.07±0.04	107

Sample conditions, pH 2 (acidified with 0.1 M HCl)

0.12–20 mg L⁻¹ for 2-NP, 0.04–20 mg L⁻¹ for 4-NP, 0.22–20 mg L⁻¹ for 2-CP, 0.30–20 mg L⁻¹ for 2,4-DCP, and 0.46–20 mg L⁻¹ for 2,4,6-TCP. The LODs achieved are similar to those obtained with previously reported automated methods. For example, Cladera et al. developed an SIA system [33] and an MSFIA system [34] for determination of nitrophenols based on LLE and spectrophotometric detection with similar LODs for 2-NP and 4-NP but lower extraction efficiencies as detailed above. Another MSFIA system exploiting nitrophenols solid-phase extraction and a detector similar to the one used in this work (USB2000, Ocean Optics) [19] obtained LODs four times higher, i.e., 0.17 and 0.04 mg L⁻¹ for 2-NP and 4-NP, respectively. Moreover, higher accuracy is accomplished with the present method.

The injection frequency is 1.8 samples per hour. This frequency is high since it has to be taken into account that it includes the time necessary for performing the extraction and back-extraction, the neutralization, and the chromatographic separation, in addition to system cleaning and reconditioning of the monolithic column. All these steps will take several working days if the analysis is performed in a classic manual approach.

Application to water samples

To investigate the applicability of the proposed method to environmental water samples, it was applied to water samples from different sources. Addition of NaCl to adjust the ionic strength was not necessary since the salinity of the samples was sufficient. Thus, samples were acidified to pH 2 with 0.1 M HCl. The samples analyzed did not contain the phenolic compounds studied, i.e., no signal was observed when analyzing them either with the proposed system or with a commercial HPLC system (PerkinElmer) equipped with an XTerra RP18 column (150 mm × 3.9-mm inner diameter and 5- μ m particle size). Samples were spiked with different amounts of phenolic compounds. The results are shown in Table 3 together with the recoveries obtained. The range of mean recoveries was 83–110 % for tap water, 89–108 % for mineral water, 89–108 % for well water, and 92–107 % for the analyzed leachate. Accuracy is normally studied as two components: trueness and precision [29]. Thus, the accuracy of the proposed method is proved given the good intraday and interday precision obtained and the low relative bias obtained (11 % or less in most samples) in the spiking-recovery test.

Moreover, to evaluate the possible matrix effect, the slopes of the calibration curves obtained with the standards and the natural water samples were statistically compared with a *t* test. The results showed that there were no significant differences between the slopes since all experimental *t* values obtained were lower than the critical *t* value at the 95 % confidence level. Thus, the applicability of the method to these kinds of matrices is validated.

Conclusions

In conclusion, a fast and simple method to determine six phenolic pollutants in environmental samples has been described. The low cost of the MSC system compared with an HPLC system makes this system a useful screening tool to determine phenolic compounds. In addition, the coupling of DLLME and MSC helped reduce reagent consumption and thus waste generation and the environmental impact per analysis. The use of MSC allowed the integration of the whole protocol in a single analyzer, permitting background operations and the easy implementation of multi-isocratic chromatographic separation. After a careful study of extractants and disperser solvents, TBP and ACN were selected, and we obtained high preconcentration factors and extraction efficiencies for most of the phenolic compounds studied. The coupling of DLLME and the chromatographic separation was achieved by stripping the phenolic compounds with NaOH and its neutralization. The method developed has proved to be accurate and reproducible, given the low RSDs obtained and the satisfactory recoveries achieved when applying it to environmental water samples and a leachate sample.

Acknowledgments The authors acknowledge financial support from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) through project CTQ2013-47461-R cofinanced by FEDER funds. The Conselleria d'Economia, Hisenda, I Innovació of the Government of the Balearic Islands is acknowledged for a grant to competitive groups (43/2011), also cofinanced by FEDER funds. J.A. acknowledges the Torres Quevedo Program of MINECO cofinanced by European Funds for financial support through PTQ-2012-05755.

References

1. Barrico ML, Nabais C, Martins MJ, Freitas H (2006) Sources of phenolic compounds in two catchments of southern Portugal – effect of season, land use and soil type. *Chemosphere* 65:482–488
2. Michalowicz J, Duda W (2007) Phenols – sources and toxicity. *Pol J Environ Stud* 16:347–362
3. Office of Environmental Health Hazard Assessment (2000) Chronic toxicity summary. Phenol. CAS Registry Number: 108-95-2. http://oehha.ca.gov/air/chronic_rels/pdf/108952.pdf. Accessed 4 Nov 2014
4. Cernakowa M, Zemanovicowa A (1998) Microbial activity of soil contaminated with chlorinated phenol derivatives. *Folia Microbiol* 43:411–416
5. Patnaik P, Khoury J (2004) Reaction of phenol with nitrite ion: pathways of formation of nitrophenols in environmental waters. *Water Res* 38:206–210
6. Pcurull E, Marce R, Borrull B (1996) Determination of phenolic compounds in natural waters by liquid chromatography with ultraviolet and electrochemical detection after on-line trace enrichment. *J Chromatogr A* 738:1–9
7. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2008) Toxicological profile for phenol. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp115.pdf>. Accessed 4 Nov 2014
8. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (1999) Toxicological profile for chlorophenols. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp107.pdf>. Accessed 4 Nov 2014

9. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (1992) Toxicological profile for nitrophenols. <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp50.pdf>. Accessed 4 Nov 2014
10. Renberg L (1982) In: Bjørseth A, Angeletti G (eds) Analysis of organic micropollutants in water, 1st edn. Springer, Dordrecht
11. US Environmental Protection Agency (1984) EPA method 604, phenols, part VIII, 40 CFR part 136. http://www.epa.gov/region9/qa/pdfs/40cfr136_03.pdf. Accessed 4 Nov 2014
12. Simoes NG, Cardoso VV, Ferreira E, Benoliel MJ, Almeida CMM (2007) Experimental and statistical validation of SPME-GC-MS analysis of phenol and chlorophenols in raw and treated water. *Chemosphere* 68:501–510
13. Cledera-Castro M, Santos-Montes A, Izquierdo-Hornillos R, Gonzalo-Lumbreras R (2007) Comparison of the performance of different reversed-phase columns for liquid chromatography separation of 11 pollutant phenols. *J Sep Sci* 30:699–707
14. Oliveira HM, Segundo MA, Lima JLFC, Cerdà V (2009) Multisyringe flow injection system for solid-phase extraction coupled to liquid chromatography using monolithic column for screening of phenolic pollutants. *Talanta* 77:1466–1472
15. Šatínský D, Solich P, Chocholous P, Karlicek R (2003) Monolithic columns—a new concept of separation in the sequential injection technique. *Anal Chim Acta* 499:205–214
16. Gonzalez HM, Alpizar JM, Cerdà V (2007) Development of a new high performance low pressure chromatographic system using a multisyringe burette coupled to a chromatographic monolithic column. *Talanta* 72:296–300
17. Cerdà V, Estela JM, Forteza R, Cladera A, Becerra E, Altimira P, Sitjar P (1999) Flow techniques in water analysis. *Talanta* 50:695–705
18. Cerdà V, Ferrer L, Avivar J, Cerdà A (2014) Flow analysis: a practical guide. Elsevier, Amsterdam
19. Manera M, Miró M, Estela JM, Cerdà V (2007) Multi-syringe flow injection solid-phase extraction system for on-line simultaneous spectrophotometric determination of nitro-substituted phenol isomers. *Anal Chim Acta* 582:41–49
20. Rezaee M, Assadi Y, Hosseini MRM, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S (2006) Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. *J Chromatogr A* 1116:1–9
21. Hu X, Wu J, Feng Y (2010) Molecular complex-based dispersive liquid–liquid microextraction: Analysis of polar compounds in aqueous solution. *J Chromatogr A* 1217:7010–7016
22. Maya F, Horstkotte B, Estela JM, Cerdà V (2014) Automated in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction. *Trends Anal Chem* 59:1–8
23. Anthemidis AN, Ioannou KIG (2009) On-line sequential injection dispersive liquid–liquid microextraction system for flame atomic absorption spectrometric determination of copper and lead in water samples. *Talanta* 79:86–91
24. Maya F, Estela JM, Cerdà V (2012) Completely automated in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction using solvents lighter than water. *Anal Bioanal Chem* 402:1383–1388
25. Henriquez C, Horstkotte B, Solich P, Cerdà V (2013) In-syringe magnetic-stirring-assisted liquid–liquid microextraction for the spectrophotometric determination of Cr(VI) in waters. *Anal Bioanal Chem* 405:6761–6769
26. Horstkotte B, Maya F, Duarte CM, Cerdà V (2012) Determination of ppb-level phenol index using in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction and liquid waveguide capillary cell spectrophotometry. *Microchim Acta* 179:91–98
27. Long GL, Winefordner JD (1983) Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. *Anal Chem* 55:712–724
28. Miller JC, Miller JN (1993) Statistics for analytical chemistry. Horwood, Chichester
29. Magnusson B, Örnemark U (eds) (2014) Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical methods—a laboratory guide to method validation and related topics, 2nd edn. https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf
30. Leardi R (2009) Experimental design in chemistry: a tutorial. *Anal Chim Acta* 652:161–172
31. Lundstedt T, Seifert E, Abramo L, Thelin B, Nyström A, Pettersen J, Bermang R (1998) Experimental design and optimization. *Chemom Intell Lab Syst* 42:3–40
32. Podolina EA, Rudakov OB, Khorokhordina EA, Kharitonova LA (2008) Use of acetonitrile for the extraction of dihydric phenols from salt aqueous solutions followed by HPLC determination. *J Anal Chem* 63:468–471
33. Cladera A, Miró M, Estela JM, Cerdà V (2000) Multicomponent sequential injection analysis determination of nitro-phenols in water by on-line liquid-liquid extraction and preconcentration. *Anal Chim Acta* 421:155–166
34. Miró M, Cladera A, Estela JM, Cerdà V (2001) Dual wetting-film multi-syringe flow injection analysis extraction. Application to the simultaneous determination of nitrophenols. *Anal Chim Acta* 438: 103–116
35. González-Barreiro C, Cancho-Grande B, Araujo-Nespereira P, Cid-Fernández JA, Simal-Gándara J (2009) Occurrence of soluble organic compounds in thermal waters by ion trap mass detection. *Chemosphere* 75:34–47
36. Vera-Avila LE, Rojo-Portillo T, Covarrubias-Herrera R, Peña-Alvarez A (2013) Capabilities and limitations of dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of floating organic drop for the extraction of organic pollutants from water samples. *Anal Chim Acta* 805:60–69
37. Zhou C, Tong S, Chang Y, Jia Q, Zhou W (2012) Ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction with back-extraction coupled with capillary electrophoresis to determine phenolic compounds. *Electrophoresis* 33:1331–1338
38. Fattahi N, Assadi Y, Hosseini MRM, Jahromi EZ (2007) Determination of chlorophenols in water samples using simultaneous dispersive liquid-liquid microextraction and derivatization followed by gas chromatography-electron-capture detection. *J Chromatogr A* 1157:23–29
39. Faraji H, Tehrani MS, Husain SW (2009) Pre-concentration of phenolic compounds in water samples by novel liquid-liquid microextraction and determination by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216:8569–8574

4.3 Información adicional

4.3.1 Espectros de absorción de los compuestos fenólicos

Los espectros de absorción en medio ácido de los fenoles estudiados en el presente trabajo se muestran a continuación (Figuras 4.1 a 4.6).

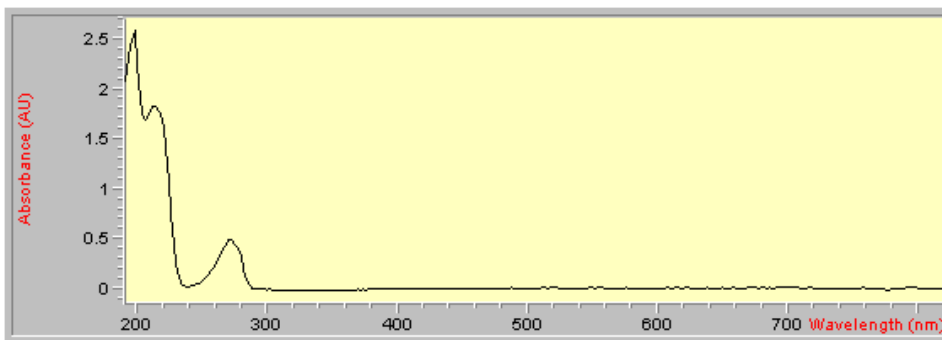


Figura 4.1. Espectro del fenol (Ph) en medio ácido.

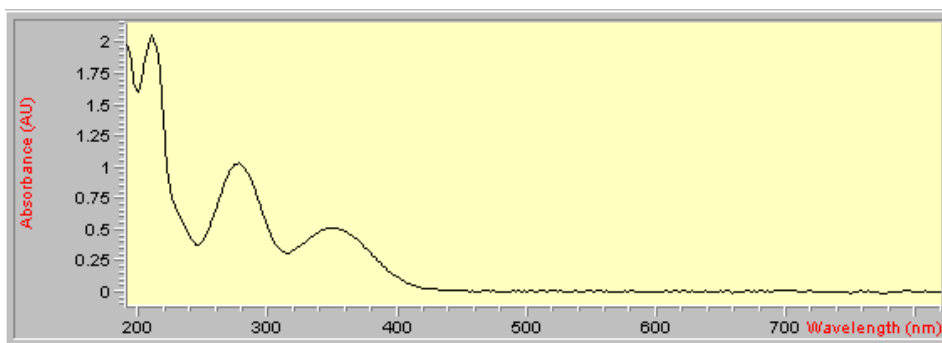


Figura 4.2. Espectro del 2-nitrofenol (2-NP) en medio ácido.

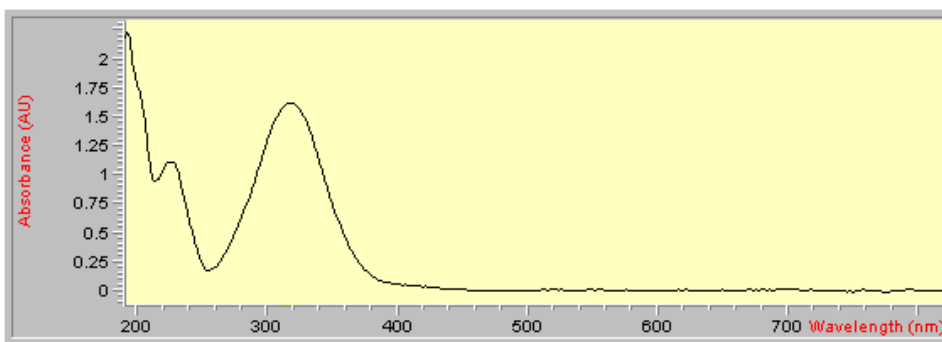


Figura 4.3. Espectro del 4-nitrofenol (4-NP) en medio ácido.

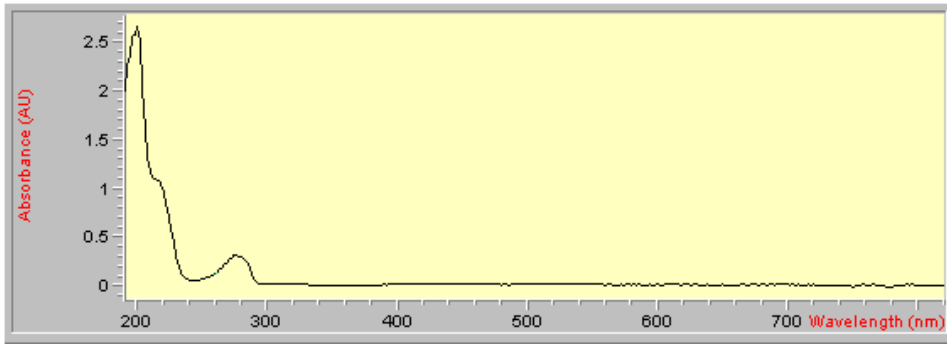


Figura 4.4. Espectro del 2-clorofenol (2-CP) en medio ácido.

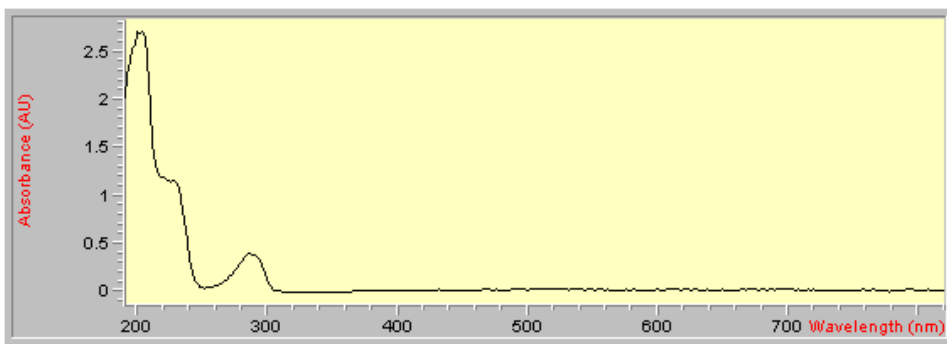


Figura 4.5. Espectro del 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) en medio ácido.

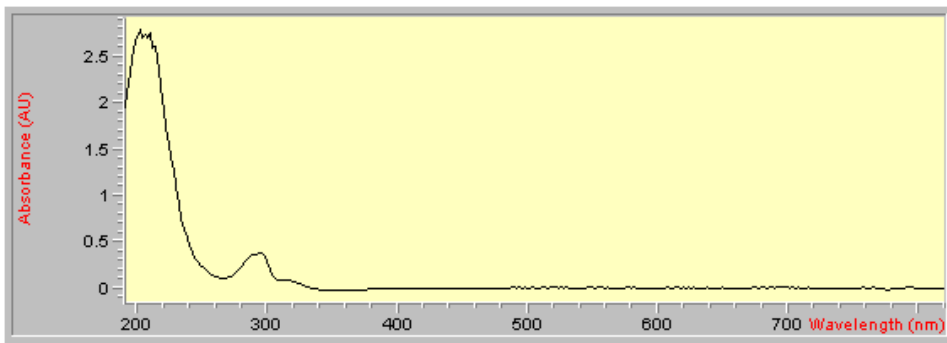


Figura 4.6. Espectro del 2,4,6-triclorofenol (2,4,6-TCP) en medio ácido.

CAPÍTULO 5

**Desarrollo de un sistema de
microextracción líquido-líquido
dispersiva en jeringa previo a la
detección por GC-MS para la
determinación de estrógenos
en agua residual**

5.1. Introducción y discusión

En este capítulo se presenta un procedimiento para la extracción, preconcentración y determinación de cuatro estrógenos listados como contaminantes emergentes por la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos: estrona, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol y estriol.

Para ello, se ha desarrollado un sistema en línea con el que se ha llevado a cabo una microextracción líquido-líquido dispersiva con agitación magnética asistida dentro de la jeringa (in-syringe-MSA-DLLME). El uso de esta técnica para el tratamiento de muestra permite una mezcla homogénea y eficiente de los reactivos dentro del mismo cuerpo de la jeringa, a la vez que reducimos el volumen de reactivos y muestra necesarios y la intervención del analista, dando lugar a un método rápido y preciso.

Tras el pretratamiento, el extracto obtenido ha sido derivatizado e inyectado en un GC-MS para la cuantificación de los analitos. A fin de maximizar la eficiencia de la extracción se ha realizado un estudio de los parámetros que tienen una influencia significativa. Así, se ha evaluado de forma univariante la actuación de diferentes disolventes orgánicos como extractantes y dispersantes, seleccionando finalmente el cloroformo y la acetona. A continuación se han optimizado de forma multivariante los volúmenes de dichos disolventes, el pH de la muestra y el tiempo de agitación. Una vez fijadas estas variables, se ha estudiado el efecto de la fuerza iónica, de nuevo de forma univariante.

Por otro lado, se ha realizado un estudio de la reacción de derivatización, necesaria para determinar por cromatografía de gases compuestos polares como los estrógenos, ya que bajo determinadas condiciones la reacción del 17 α -etinilestradiol es incompleta y da lugar a un derivado con el mismo tiempo de retención y espectro de masas que el derivado de la estrona, lo que puede llevar a una sobreestimación de esta. Tras el estudio, se ha comprobado que una combinación del reactivo sililante BSTFA con piridina en proporción 3:1 ofrece resultados satisfactorios.

Para la separación cromatográfica se ha utilizado una columna DB5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm). El inyector ha operado a una temperatura de 280 °C y en modo

Splitless. Se ha utilizado una rampa de temperatura, dando lugar a un tiempo total de análisis de 30 min. El flujo de helio como gas portador ha sido de 1 mL min^{-1} .

El procedimiento sugerido ofrece una elevada sensibilidad, dados los bajos límites de detección obtenidos, entre 11 y 82 ng L^{-1} , además de una precisión satisfactoria, con RSDs menores al 7,11%.

En cuanto al tiempo necesario de pretratamiento de la muestra, todo el proceso se ha llevado a cabo en 11 minutos, incluyendo el lavado del sistema, lo que es una gran ventaja respecto a los métodos tradicionales de extracción. Adicionalmente, el hecho de utilizar cloroformo como extractante ha permitido eliminar uno de los pasos más comunes en este tipo de procedimientos, el secado del extracto bajo corriente de nitrógeno previo a la derivatización, con lo que se reduce todavía más el tiempo total de análisis.

El método se ha aplicado con éxito al análisis de muestras ambientales con matrices complejas, como lo es el agua de entrada y salida de una depuradora.

Finalmente, cabe destacar que éste es el primer método propuesto para la extracción y preconcentración automatizada de estrógenos previa a detección por cromatografía de gases.

5.2 Artículo original

A continuación se adjunta el artículo original "Estrogens determination in wastewater samples by automatic in-syringe dispersive liquid–liquid microextraction prior silylation and gas chromatography" de A. González, J. Avivar y V. Cerdà, así como su material suplementario, publicados en *Journal of Chromatography A* 1413 (2015) 1-8.



Estrogens determination in wastewater samples by automatic in-syringe dispersive liquid–liquid microextraction prior silylation and gas chromatography



Alba González^a, Jessica Avivar^b, Víctor Cerdà^{a,*}

^a Group of Analytical Chemistry, Automation and Environment, Department of Chemistry, University of the Balearic Islands, E-07122 Palma de Mallorca, Spain

^b Sciware Systems, S.L. Spin-off of the University of the Balearic Islands, E-07193 Bunyola, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 April 2015

Received in revised form 7 August 2015

Accepted 10 August 2015

Available online 19 August 2015

Keywords:

In-syringe magnetic stirring-assisted

dispersive liquid–liquid microextraction

(in-syringe-MSA-DLLME)

Gas chromatography (GC)

Estrogens

Wastewater samples

Automation

ABSTRACT

A new procedure for the extraction, preconcentration and simultaneous determination of the estrogens most used in contraception pharmaceuticals (estrone, 17 β -estradiol, estriol, and 17 α -ethynylestradiol), cataloged as Contaminants of Emergent Concern by the Environmental Protection Agency of the United States (US-EPA), is proposed. The developed system performs an in-syringe magnetic stirring-assisted dispersive liquid–liquid microextraction (in-syringe-MSA-DLLME) prior derivatization and gas chromatography (GC–MS). Different extraction (carbon tetrachloride, ethyl acetate, chloroform and trichloroethylene) and disperser solvents (acetone, acetonitrile and methanol) were tested. Chloroform and acetone were chosen as extraction and disperser solvent, respectively, as they provided the best extraction efficiency. Then, a multivariate optimization of the extraction conditions was carried out. Derivatization conditions were also studied to ensure the conversion of the estrogens to their respective trimethylsilyl derivatives. Low LODs and LOQs were achieved, i.e. between 11 and 82 ng L⁻¹, and 37 and 272 ng L⁻¹, respectively. Good values for intra and inter-day precision were obtained (RSDs \leq 7.06% and RSD \leq 7.11%, respectively). The method was successfully applied to wastewater samples.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Endocrine-disrupting compounds (EDCs) were defined in 1996 by the European Commission as “exogenous substances that cause adverse health effects in an intact organism, or its progeny, consequent to changes in endocrine function” [1]. These have become of increasing health and environmental concern in recent years, as they can disturb the normal endocrine system and alter the normal reproduction and development of animals and also humans.

From the various groups of substances that have endocrine-disrupting properties, natural estrogens such as estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3) and the synthetic estrogen ethynylestradiol (EE2) have received special attention as they have been cataloged as Contaminants of Emergent Concern by the Environmental Protection Agency of the United States (US-EPA) [2]. These estrogens primarily released unintentionally to the terrestrial and aquatic environment arrive in the first step to sewage treatment plants (STPs) and from there into surrounding

environmental water bodies such as rivers, lakes and the sea. Anthropogenic income of these estrogens into the environment is mainly through the widespread use of contraceptives or treatments for menopausal disorders formulated with these estrogens. Moreover, the fact that pharmaceuticals have been designed to have a biological effect even at low levels, combined with a continuous release from our society that makes them pseudo-persistent, has lead to research activities around the globe on the environmental occurrence of these compounds. For example, it has been demonstrated that these compounds induce estrogenic responses in fish at very low concentrations, such as feminization, decreased fertility or hermaphroditism [3].

Many techniques have been used for the determination of estrogens, including radioimmunoassay [4], enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [5], liquid chromatography (LC) [6,7] and gas chromatography (GC) [8,9]. Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) is one of the preferred techniques as it permits the simultaneous analysis of both synthetic and natural estrogenic steroids given its better capabilities for the separation and identification of these compounds. Nonetheless, sample clean-up and analytes preconcentration are usually required prior chromatographic separation especially when dealing with

* Corresponding author.

E-mail address: victor.cerda@uib.es (V. Cerdà).

environmental or biological samples, in order to attain analyte enrichment and matrix removal. Traditionally, the most common preconcentration technique used for these compounds is solid phase extraction (SPE) [8,10]. However, dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) [11] is an attractive pretreatment technique that allows reduction of sample and solvents consumption, high preconcentration factors and simplicity of operation [12], also providing the analytes in a small organic droplet more suitable to be injected in chromatographic systems. This microextraction technique is based on the use of a disperser solvent, which is miscible in both water and extraction solvent. Both the disperser and extraction solvent are mixed with the aqueous sample producing a cloudy solution. This way the contact surface area between the organic droplets and the aqueous phase is increased, and better extraction efficiencies are achieved.

Modern analytical strategies tend toward automation and miniaturization with integration of sample pretreatment in the chromatographic systems as far as possible. In this context, the use of flow analysis techniques as front end to chromatographic systems has provided a number of enhanced analytical methods affording high throughput, decrease of the human exposure to hazardous chemical sample pretreatments and more environmentally friendly procedures obtained due to process downscaling [13,14]. DLLME can be automated in a lab-in-syringe system [15–17]. In-syringe-DLLME permits improving its reproducibility and accuracy, since it allows the precise handling of small volumes [18]. Furthermore, magnetic-stirring assisted (MSA) systems can be implemented on the syringe attaining homogeneous and fast mixing. Thus, by in-syringe-MSA-DLLME the sample pretreatment is simplified, reducing the steps of the analytical protocol and the intervention of the analyst.

Therefore, in this work we propose an in-syringe-MSA-DLLME for the extraction and preconcentration of four estrogens prior derivatization and GC–MS. Several extraction and disperser solvents have been studied. The applicability of the proposed system to wastewater samples is evaluated.

2. Experimental

2.1. Chemicals, solutions and wastewater samples

All solutions were prepared in GC-grade methanol (Scharlau, Barcelona, Spain) or in distilled water from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA) (resistivity $> 1.8 \times 10^5 \Omega \text{ cm}$). Sodium chloride (Scharlau) was of analytical reagent grade. Several extraction and disperser solvents were evaluated, i.e. carbon tetrachloride, ethyl acetate, chloroform, trichloroethylene, acetone, acetonitrile, methanol (Scharlau) and pyridine (Sigma–Aldrich).

Estrone (E1), β -estradiol (E2), 17α -ethynylestradiol (EE2), estriol (E3) and estrone 3-methyl ether (internal standard, IS) were purchased from Sigma–Aldrich (Madrid, Spain). Stock solutions of estrogens were prepared by accurately weighing the appropriate mass of each compound and by dissolving it in methanol obtaining a final concentration of 500 mg L^{-1} . Stock solutions were kept in the dark at -20°C . Working standard solutions containing either mixtures or individual compounds were prepared daily by dilution of the stock solutions in chloroform (for the direct injection of the solution into the gas chromatograph), or in water containing 3 mol L^{-1} NaCl and adjusted to pH 8 using NaOH 0.1 mol L^{-1} .

Different derivatization reagents were tested, i.e. N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA), BSTFA with trimethylchlorosilane (BSTFA+TMSC, 1%) and N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA), all purchased from Sigma–Aldrich.

Wastewater samples collected from the inlets (sample 1 and 2) and outlets (sample 3, 4 and 5) of the sewage treatment plant

of Palma de Mallorca (Balearic Islands, Spain) were stored at 4°C in plastic bottles. Due to the presence of solid particles, samples were centrifuged and the supernatant liquid was filtered through $0.22 \mu\text{m}$ nylon filters before analysis. They were adjusted to pH 8 using NaOH 0.1 mol L^{-1} and in a final solution containing 3 mol L^{-1} NaCl.

2.2. In-syringe-MSA-DLLME system and software

The basic element of the pretreatment system (Fig. 1) is an automatic burette (CRISON, Alella, Spain) coupled to a selection valve (SV). Multisyringe burettes can be equipped with four syringes that are moved simultaneously and unidirectional for either liquid delivering (dispense) or aspirating (pick up). Each syringe has a three-way solenoid valve (V) (N-Research, Caldwell, NJ, USA) placed at the head allowing multicommutation operation. The ratio of flow-rates between channels can be modified by using syringes of appropriate cross-sectional dimensions. The step motor shows a speed range of 1024–20 s for total displacement, corresponding to 40,000 steps. Thus, the multisyringe module allows precise handling of microliters and a wide flow rate range (0.057 – 30 mL min^{-1} , depending on the syringe volume 1–10 mL). In this work, the automatic burette is equipped with a 5 mL glass syringe (S) (Hamilton, Switzerland) where the dispersive liquid–liquid microextraction takes place. Besides, multisyringe burettes have four backside ports which enable the control of other instruments either directly or via a relay allowing remote software control, e.g. MSA system. The MSA system (Sciware Systems, Bunyola, Spain) is composed of a small magnetic bar (10 mm length, 3 mm diameter) placed inside the syringe, an external stirring support (Fig. S1) placed around the syringe's body, a motor (Fig. S1) connected with the external agitation support by a rubber band which forces the rotation of the external agitation support, and a circuit that controls both the start/stop and the motor revolutions (Fig. S1) through one of the multisyringe outputs. The external stirring support is a ring (14 mm i.d., 30 mm o.d.) with two small magnets facing each other creating a rotating magnetic field around the syringe's body. When the motor is switched on, the ring starts to rotate and with it the magnetic bar inside the syringe, mixing the phases.

The manifold is composed of poly(tetrafluoroethylene) (PTFE) tubes of 0.8 mm i.d. for reagents and sample aspiration.

A picture of the in-syringe-MSA-DLLME system is shown in Fig. S1. A multisyringe holder was used to place the burette module upside down (Fig. S1) to have the organic droplet of the extraction solvent, which is denser than water, at the head of the syringe. This way the organic droplet can be dispensed to a fraction collector while the aqueous phase stays in the syringe. The MSA system is mounted on the syringe to achieve homogeneous and rapid mixing of phases and increase the extraction efficiency.

Besides, the “off” position of the syringe is connected to the central port of a selection valve containing the reagents used to carry out the DLLME and the cleaning of the system on its peripheral ports, as follows: water (port 1), cleaning solution (acetone:H₂O 10:90, v/v) (port 2), autosampler (port 3), chloroform (extraction solvent, port 4), acetone (disperser solvent, port 7) and waste (port 8), as can be seen in Fig. 1.

A fraction collector, equipped with amber chromatographic vials containing 300 μL inserts, is connected to the syringe on its “on” position.

Instrumental control was done with the software AutoAnalysis 5.0 (Sciware Systems). This software based on DLLs (dynamic link libraries) at 32 bits is very versatile and simple permitting the implementation of whatever instrumentation needed without further modifications.

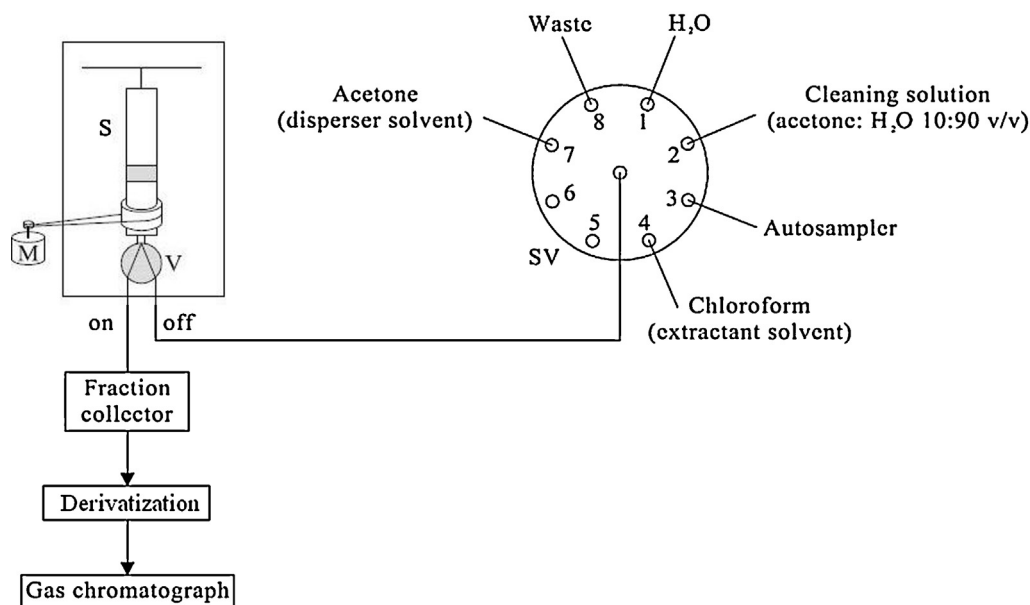


Fig. 1. Automatic in-syringe-MSA-DLLME system for estrogens extraction and preconcentration prior GC analysis. M, motor; S, syringe; SV, selection valve; V, three-way solenoid valve.

2.3. GC analysis

The separation and detection of the target compounds are carried out by GC-FID (Agilent 7890 A, Agilent Technologies, USA) for the optimization, and by GC-MS (Agilent 7890 with mass spectrometer HP 5973C, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) for the determination of the analytical parameters and samples analysis. System control and data acquisition are achieved with HP ChemStation Software.

2 μ L of derivatives are injected and separated on a 30 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.25 mm film thickness DB5 (methyl 5% phenyl polysiloxane) gas chromatographic column. The injection port is operated in pulsed splitless mode with an injection temperature of 280 $^{\circ}$ C. Helium (99.999%) is employed as carrier gas at the flow rate of 1.0 mL min $^{-1}$. The MS is operated in the electron impact (EI) mode (70 eV).

The gas chromatographic temperature program is as follows: initial temperature 100 $^{\circ}$ C, held 1 min, increased to 200 $^{\circ}$ C at a rate of 20 $^{\circ}$ C min $^{-1}$, then increased to 280 $^{\circ}$ C at a rate of 5 $^{\circ}$ C min $^{-1}$ and held 8 min, with a total run of 30 min and 7 min of solvent delay. The EI ion source, the quadrupole mass analyzer, and the interface temperatures are maintained at 230, 150, and 280 $^{\circ}$ C, respectively. The MS is equipped with the mass spectral library NIST MS search 2.0. It was tuned to m/z 69, 219, and 502 for the EI corresponding to perfluorotributylamine. It was operated in the total ion current mode, scanning from m/z 50 to 550 for identification purposes.

The mass peaks that offer the highest intensity for each compound were selected in order to obtain the highest sensitivity, and the acquisition was carried out in the selected ion monitoring mode. Quantitative ions for each analyte were set as follows: IS: 160, 199, 284; E1: 73, 218, 257, 342; E2: 73, 129, 285, 416; EE2: 285, 425, 440; E3: 73, 311, 345, 414 m/z .

2.4. In-syringe-MSA-DLLME and derivatization procedure prior GC

A scheme of the main steps of the procedure is depicted in Fig. 2. Prior analysis, ionic strength and samples pH are adjusted to 3 mol L $^{-1}$ using NaCl and pH 8 using NaOH 0.1 mol L $^{-1}$, respectively. Afterwards, the automatic analytical procedure detailed in Table 1 is performed. Thus, in-syringe-MSA-DLLME is carried out in the syringe (S) using 250 μ L of chloroform and 200 μ L of acetone as extraction and disperser solvent, respectively. The “off” position of the three-way solenoid valve (V) of the syringe is connected to the central port of the selection valve (SV) for sequential aspiration of the required solutions. A schematic depiction of the automatic in-syringe-MSA-DLLME procedure is depicted in Fig. 2 (step 2). First, the disperser (port 7) and extraction solvent (port 4) are loaded into S followed by the sample (port 3) at 2 mL min $^{-1}$ with the magnetic assisted system activated. After 50 s, agitation is stopped, and after 120 s the cloudy solution is separated in two phases. Then, the organic droplet is collected in a fraction collector with V in its

Table 1

Detailed analytical procedure of the in-syringe-MSA-DLLME method for estrogens determination. S, syringe; SV, selection valve; V, solenoid valve located at the head of S.

		Multisyringe burette movement	SV (port)	V
1	Starting loop			
2	Emptying S	Dispense 5 mL	8	Off
3	Disperser solvent loading	Pick-up 0.2 mL	7	Off
4	Extractant solvent loading	Pick-up 0.250 mL	4	Off
5	Sample loading (with agitation)	Pick-up 4.55 mL	3	Off
6	Agitation	–	8	Off
7	Wait 50 s	–	8	Off
8	Stop agitation	–	8	Off
9	Dispense organic droplet	Dispense 0.160 mL	8	On
10	Syringe cleaning procedure		8	Off
11	Repeat loop ($\times 3$)			Off

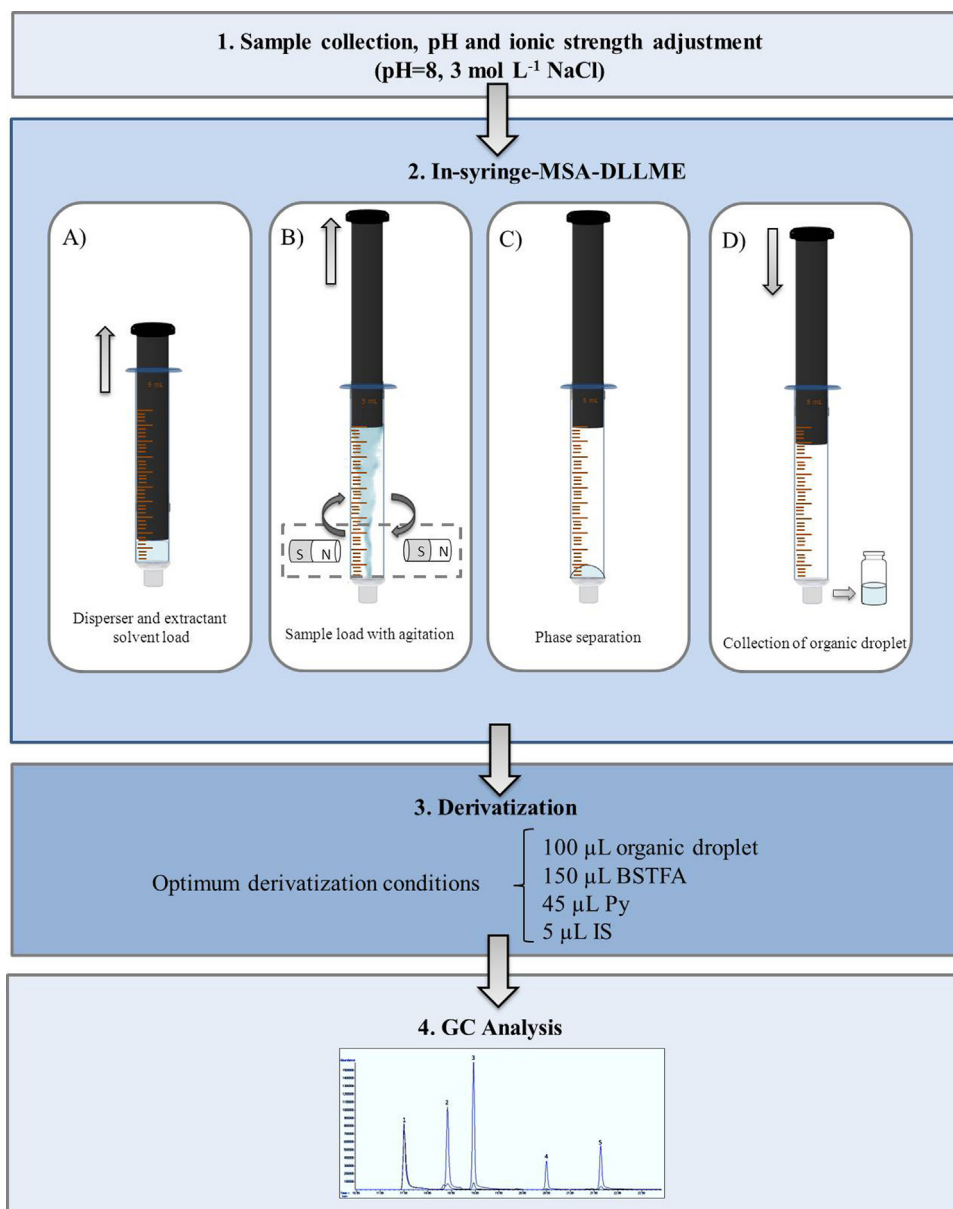


Fig. 2. Scheme of the main steps of the analytical procedure for estrogens determination. (1) Sample collection and conditioning. (2) In-syringe-MSA-DLLME procedure: (A) disperser and extractant solvent load; (B) sample load with agitation; (C) phase separation; and (D) collection of organic droplet. (3) Derivatization. (4) GC analysis.

“on” position. Finally, a cleaning procedure is performed. It consists on rinsing S with Milli-Q water (port 1) prior filling it with cleaning solution (acetone:H₂O 10:90, v/v, port 2), pure acetone (port 7) and again with Milli-Q water (port 1) three more times.

Then, 100 µL of the organic droplet are manually collected using a micropipette and derivatized inside an amber vial adding 150 µL of BSTFA, 45 µL of Py and 5 µL of IS. After 30 min, derivatized samples are injected into the gas chromatograph.

2.5. Data processing

Limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) values were calculated according to the IUPAC [19,20], as three times the standard deviation of ten blanks divided by the slope of each calibration curve, and ten times the standard deviation of ten blanks divided by the slope of each calibration curve, respectively.

Enrichment factor (EF) was calculated as the ratio of C_{org}/C_0 , where C_{org} is the concentration of analytes in the organic phase

after DLLME, and C_0 the original concentration in the aqueous phase. Extraction recovery (ER) was calculated according to Eq. (1), where V_{org} is the volume of the organic droplet after DLLME and V_{sample} is the volume of the aqueous phase.

$$ER = \frac{V_{org} \cdot C_{org}}{V_{sample} \cdot C_0} \cdot 100 \quad (1)$$

3. Results and discussion

3.1. In-syringe-DLLME

3.1.1. Study of extraction and disperser solvents

A study of extraction and disperser solvents was performed. An aqueous sample with a mixture of the studied estrogens (pH 3) [21,22] was extracted and analyzed using GC-FID.

First, the following extraction solvents were tested: carbon tetrachloride [23], ethyl acetate, chloroform [21,23] and trichloroethylene. As can be seen in Fig. 3A the extraction

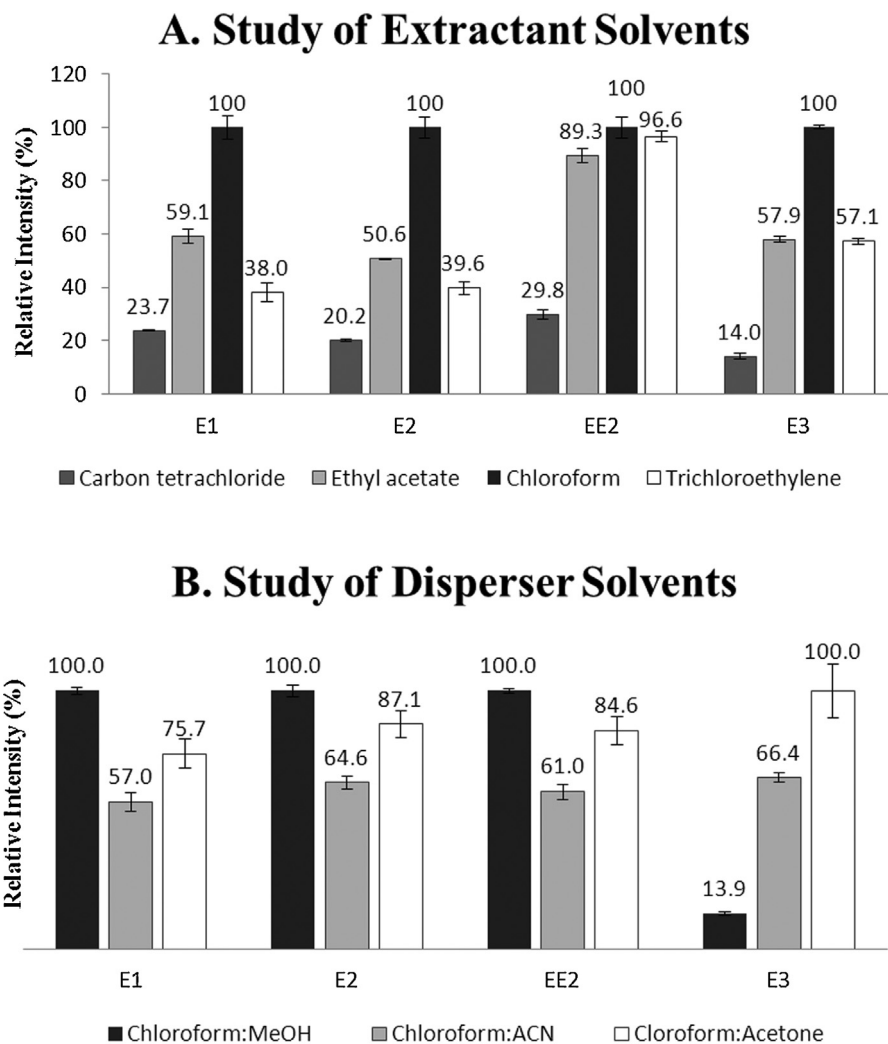


Fig. 3. Results of the study of extractants (A) and disperser solvents (B) with error bars. Results are expressed as relative intensity (%) giving the 100% to the solvent showing the best performance and relating the rest to it.

efficiencies achieved with chloroform were higher than with the other solvents for all the estrogens. Therefore, chloroform was selected as extraction solvent. Results are expressed as relative intensity (%) giving the 100% to the solvent showing the best performance and relating the rest to it.

Then, three different disperser solvents mixed with chloroform were studied: acetone [22,23], acetonitrile [12,21] and methanol [6]. As can be seen in Fig. 3B, methanol showed the best performance for three of the four estrogens, but the lowest extraction efficiency for E3, the estrogen with lower sensitivity. Thus, taking into account these results, acetone was selected as dispersive solvent for further assays, since its performance is similar to methanol and it showed the best extraction efficiency for E3. Furthermore, avoiding methanol the overall procedure is simplified since there is no need to dry the extract prior derivatization.

3.1.2. Multivariate optimization of the in-syringe-MSA-DLLME

Once the extraction and the disperser solvents were selected, a series of experiments were conducted using the multivariate optimization technique. The statistical software Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa, USA) was employed for the entire multivariate optimization. Multivariate designs provide relevant knowledge on the effect of variables within the entire experimental domain selected, and the variance of the estimated response in every point of the domain

is better than that obtained by univariate methods [24]. First, a full factorial screening (2^k), including three center points, was performed to find out the parameters that had a significant effect upon the response. The peak area of each estrogen was used as response signal. In order to evaluate the best conditions for all the estrogens studied the responses were transformed into a single one using the mathematical-statistical equations indicated by Derringer and Suich [25] for the evaluation of multiple responses. The individual desirability function of each estrogen was calculated according to Eq. (2), where y_i represents the analytical signal; L represents the lower signal and H the upper signal obtained. Then, the overall desirability (D) was calculated (Eq. (3)) by determining the geometric mean of individual desirability (d_i). The variables studied were volume of chloroform, volume of acetone, pH of the sample and agitation time. The experimental domain studied is presented in Table S1 (Supporting Information). To carry out this study, the sample volume used was fixed at 3.6 mL.

$$d_i = \frac{(y_i - L)}{(H - L)} \quad (2)$$

$$D = (d_1 \times d_2 \times d_3 \times \dots \times d_k)^{1/k} \quad (3)$$

All the estrogens had the same tendency and as can be seen in the Pareto chart of the overall desirability (Fig. S2), the volume of acetone and chloroform, the pH and the curvature were significant,

Table 2
Figures of merit of the proposed in-syringe-MSA-DLLME-GC-MS method.

	E1	E2	EE2	E3
Quantitation ions (<i>m/z</i>)	73, 218, 257, 342	73, 129, 285, 416	285, 425, 440	73, 311, 345, 414
Retention time (min)	18.4	18.9	20.5	21.6
LOD (ng L ⁻¹)	16.86	11.07	81.52	24.07
LOQ (ng L ⁻¹)	56.18	36.89	271.75	80.24
Linear range (ng L ⁻¹)	56–10,000	37–50,000	272–50,000	80–50,000
Calibration curve	$y = 2.2474x + 0.0242, (n = 5)$	$y = 1.2819x + 0.0001, (n = 6)$	$y = 0.1777x - 0.0003, (n = 6)$	$y = 0.5826x + 0.0007, (n = 6)$
Determination coefficient (<i>R</i> ²)	0.9983	0.9925	0.9987	0.9925
Intra-day precision (%) (<i>n</i> = 10)	3.16	5.28	4.29	7.06
Inter-day precision (%) (<i>n</i> = 7)	5.75	6.63	4.57	7.11
Extraction time (min) ^a	11	11	11	11
Enrichment factor	11	21	29	14
Extraction recovery (%)	39	72	101	49

^a Extraction time including system cleaning.

indicating that optimum values could be found in the studied range. Thus, ranges were readjusted according to the screening results for applying a response surface face centered central composite design (CCD) to attain the critical values of the studied variables. Volume of chloroform and acetone had a negative effect. Thus, their ranges (Table S1) were readjusted to: 250–400 μL ; and 200–500 μL , respectively. The pH of the sample had a positive effect, so it was fixed to pH 8 (the highest value of the studied range) in order to ensure that the estrogens are not in their dissociate form. Agitation time was not significant in the studied range (40–120 s) so the range was decreased to 0–60 s to check if the agitation was necessary. Then, the CCD was performed and the desirability graphic was studied (Fig. S3) to obtain the critical values. As can be seen in the desirability chart, the optimum values (Table S1) were 250 μL of chloroform, 200 μL of acetone and 50 s of agitation time which were used in further assays. The separation time of the layers was set at 2 min. No bubble formation or clogging of the syringe was observed.

3.1.3. Effect of the ionic strength

The influence of the salting-out effect is commonly studied since sometimes it produces an improvement of the extraction efficiency [6,22]. Thus, NaCl was added in different concentrations up to 5 mol L⁻¹. An important increase of E3 extraction efficiency was observed when concentrations up to 3 mol L⁻¹ were added. For the rest of estrogens the response decreased slightly by adding NaCl. This reduction was not as significant as the improvement of E3, the estrogen that showed less sensitivity at the GC analysis. Therefore, 3 mol L⁻¹ was selected for further experiments.

3.2. Derivatization conditions

Estrogens require derivatization prior GC analysis. Silylation is one of the most common methods performed when the analytes contain active hydrogen atoms (as, in this case, –OH), since it enhances volatility and the derivatives have the stability necessary to carry out a GC–MS analysis with the optimal sensitivity and resolution [26]. Therefore, 100 μL of the organic drop obtained with the in-syringe-DLLME system were transferred using an automatic pipette to an amber glass vial containing a 300 μL insert, and different derivatization conditions were tested. All the derivatization reactions were performed in a capped vial. Estrone 3-methyl ether was used as internal standard. It was added after the extraction procedure to correct instrumental drift of the GC–MS. The IS did not affect the derivatization since it does not contain active hydrogen atoms.

Derivatization of the estrogens with MSTFA and BSTFA at 60 °C [8,26] was carried out using different solvents: ethyl acetate, dichloromethane and pyridine. BSTFA showed a better performance than MSTFA. We also noticed that with ethyl acetate and

dichloromethane the derivatization of EE2 was incomplete, and various silylated compounds were obtained. EE2's main derivative using these solvents, a mono-TMS-EE2, has the same retention time and mass spectrum as TMS-E1. However, using pyridine the derivatization of EE2 was facilitated leading to the generation of its completely silylated product (di-TMS-EE2) [9]. Different proportions of BSTFA:pyridine were tested. A sufficient amount of pyridine (Py) was circa 1/3 of total volume of the derivatization reagent. Thus, 150 μL of BSTFA, 45 μL of Py and 5 μL of IS were added to 100 μL of sample for further assays. GC-FID chromatograms of the TMS derivatives of EE2 formed in the absence and presence of pyridine are shown in Fig. S4.

The influence of a catalyst was also studied. Using BSTFA:TMSC (99:1) as derivatization agent, the derivatization time is 30 min, while without catalyst derivatization requires more than 120 min. Thus, BSTFA:TMSC (99:1) was used as derivatization reagent.

Finally, reaction conditions were optimized. Effect of temperature, time and ultrasonication were studied. The ultrasonic bath did not have a significant effect upon the derivatization rate. Derivatization was also carried out at room temperature (20 °C) and at 65 °C, a statistical *t* test at the 95% confidence level showed that there were no significant differences between them. Therefore, room temperature and 30 min were selected for further assays. Stability of derivatized products was also studied and these were stable during four days, obtaining an RSD lower than 7% for all the estrogens.

3.3. Method validation

In order to evaluate the performance of the proposed method, its figures of merit were studied and listed in Table 2.

The linear working range has been established from the LOQ to the highest standard analyzed. As can be seen in Table 2, a wide range of concentrations can be quantified, i.e. 56–10,000 ng L⁻¹ of E1, 37–50,000 ng L⁻¹ of E2, 272–50,000 ng L⁻¹ of EE2 and 80–50,000 ng L⁻¹ of E3, with RSDs between 3.6 and 12.3%.

Precision was evaluated analyzing sample 1 (inlet of the sewage treatment plant of Palma de Mallorca) spiked with 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ of each estrogen. Intra-day precision is expressed as the RSD obtained when analyzing this sample in 10 consecutive determinations within the same day (*n* = 10). As can be seen RSDs \leq 7.06% were obtained. Inter-day precision corresponds to the RSD of this sample analyzed during seven different days (*n* = 7). For all the analytes a RSD \leq 7.11% was attained.

Enrichment factors from 11 to 29 were attained.

In Fig. 4 is shown the chromatogram of the direct injection of a solution of 1 mg L⁻¹ of the estrogens studied in chloroform and the chromatogram of the injection of the extract after performing the in-syringe-MSA-DLLME with an aqueous sample spiked with 1 mg L⁻¹ of estrogens.

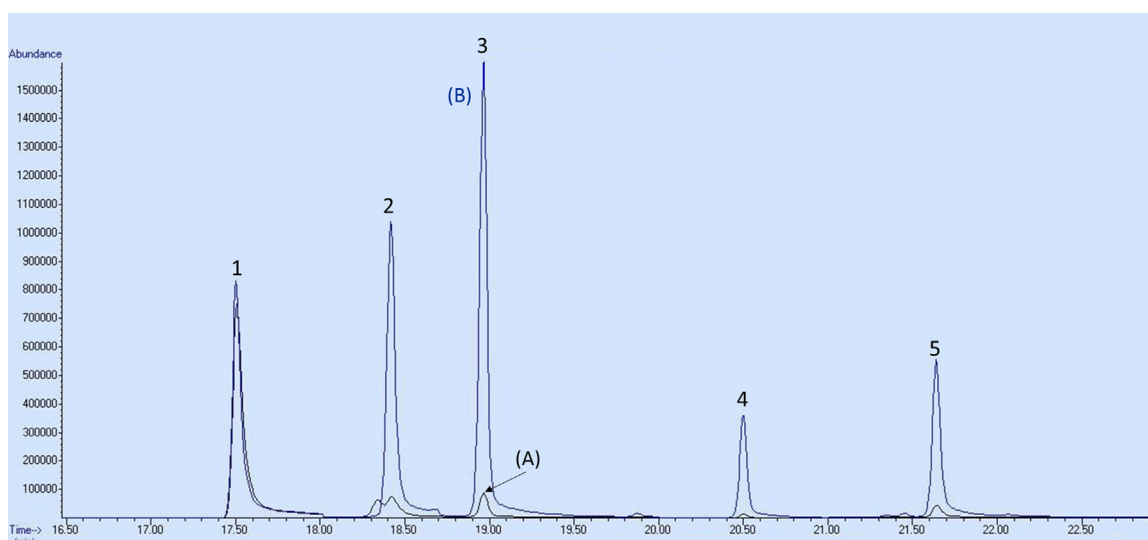


Fig. 4. GC–MS chromatogram obtained for (A) the direct injection of a solution of 1 mg L^{-1} of the studied estrogens in chloroform; (B) the injection of the extract after performing the in-syringe-MSA-DLLME with an aqueous sample with 3 mol L^{-1} NaCl, pH 8, and spiked with 1 mg L^{-1} of the studied estrogens. (1) IS, and derivatized forms of (2) E1, (3) E2, (4) EE2 and (5) E3.

Table 3

Comparison of the proposed method with previously reported methods for estrogens determination.

Method	Sample volume (mL)	Type of sample	LOD (ng)				RSD (%)					Reference
			E1	E2	EE2	E3	E1	E2	EE2	E3	n	
SPE-GC-MS	1000	Distilled water	2.0	3.0	20.0	12.0	3–5	4–5	2–3	16–22	n=3	[7]
SPE-GC-MS	3000	Distilled water	0.09	0.09		0.84	4.25	1.71		3.62	n=3	[9]
SPE-GC-MS	200	River water	0.06	0.04	0.05	0.02	9.8	7.4	7.1	13	n=5	[26]
DLLME-HPLC	5	Distilled water/wastewater	2.5	0.5	0.4	0.6	4.8–5.4	4.7–5.3	5.6–5.8	3–4	n=6	[19]
DLLME-SFO-UPLC	5	River water/tap water	5–8	4–7	6–8.5	13.5–15.5	10–14	8–14	7–10	10–12	n=7	[6]
In-syringe-MSA-DLLME-GC-MS	4.55	Wastewater	0.08	0.05	0.37	0.11	5.75	6.63	4.57	7.11	n=7	Present work

In order to evaluate the proposed method, a comparison of methods for estrogens determination has been listed in Table 3. As can be seen previously reported GC–MS methods for estrogens determination perform the clean-up of the sample by solid phase extraction (SPE). The advantage of this technique over in-syringe DLLME is that larger amounts of sample can be preconcentrated

achieving lower detection limits. However, these involve longer procedures and a higher volume of the final organic solvent (eluent) needing to evaporate the eluent to dryness before derivatization and injection in the GC–MS. As can be seen in Table 3, LODs achieved are lower [8] or similar [10,27] to previously reported SPE-GC methods expressed in mass. However, if comparing in concentration

Table 4

Application of the in-syringe-MSA-DLLME-GC-MS method to wastewater samples and add-recovery test at two levels of spike. Sample conditions: pH 8, 3 mol L^{-1} NaCl. R, recovery (%).

	Added ($\mu\text{g L}^{-1}$)	E1		E2		EE2		E3	
		Found ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R (%)	Found ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R (%)	Found ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R (%)	Found ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R (%)
S1 (Inlet 1)	0	n.d.	–	n.d.	–	n.d.	–	n.d.	–
	1	1.024 ± 0.011	102	0.95 ± 0.11	95	1.16 ± 0.15	116	0.99 ± 0.04	99
	5	5.1 ± 0.7	102	4.25 ± 0.03	85	5.3 ± 0.7	105	4.6 ± 0.4	92
S2 (Inlet 2)	0	n.d.	–	n.d.	–	n.d.	–	n.d.	–
	1	1.04 ± 0.04	104	0.99 ± 0.09	99	1.10 ± 0.04	110	1.03 ± 0.11	103
	5	5.49 ± 0.18	110	4.2 ± 0.2	84	5.7 ± 0.2	113	5.5 ± 0.4	110
S3 (Outlet 1)	0	n.d.	–	n.d.	–	n.d.	–	n.d.	–
	1	1.03 ± 0.07	103	0.99 ± 0.02	99	1.16 ± 0.09	116	1.12 ± 0.03	112
	5	4.88 ± 0.09	98	4.73 ± 0.11	95	5.5 ± 0.4	110	5.06 ± 0.03	101
S4 (Outlet 2)	0	n.d.	–	n.d.	–	n.d.	–	n.d.	–
	1	1.14 ± 0.09	114	1.07 ± 0.02	107	1.10 ± 0.04	110	1.01 ± 0.11	101
	5	5.3 ± 0.4	106	5.3 ± 0.3	106	4.8 ± 0.4	97	4.6 ± 0.7	92
S5 (Outlet 3)	0	n.d.	–	n.d.	–	n.d.	–	n.d.	–
	1	1.02 ± 0.03	102	1.042 ± 0.003	104	1.16 ± 0.09	116	0.97 ± 0.18	97
	5	5.3 ± 0.2	105	5.0 ± 0.4	101	5.7 ± 0.9	114	4.8 ± 0.7	97

n.d.: non-detected.

better LODs are achieved using SPE due to the larger sample volume that can be preconcentrated. Comparing to previously reported methods exploiting DLLME for estrogens determination, these use HPLC instead of GC. Thus, as can be seen better LODs have been achieved [6,22] with the present method. The proposed method also showed a good precision, similar to previous works. Regarding to the time necessary to perform the clean-up and preconcentration of the sample, all the process can be carried out in 11 min, including the extraction, the collection of the organic drop and the system cleaning. Taking into account only the extraction time (agitation and phase separation), it takes less than 3 min, lower than the time reported in previous DLLME methods which ranged from 3 [6] to 20 min [22] just for centrifuging and phase separation. Moreover, the preconcentration and sample clean-up process is performed automatically, being this the first automated method reported for estrogens determination which results in good reproducibility and accuracy, and in a method that can perform the sample pretreatment unattended what results in a significant time saving.

3.4. Application to wastewater samples

The applicability of the proposed method was studied by analyzing five wastewater samples from the inlets (sample 1 and 2) and outlets (sample 3, 4 and 5) of a sewage treatment plant in Palma de Mallorca (Balearic Islands, Spain). No estrogens were found in the samples. Thus, these samples were spiked at two different levels, i.e. $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (low level) and $5 \mu\text{g L}^{-1}$ (high level) of each estrogen. As can be seen in Table 4, the recoveries ranged from 85 to 116% for Inlet 1, 84 to 113% for Inlet 2, 95 to 116% for Outlet 1, 92 to 114% for Outlet 2 and 97 to 116% for Outlet 3.

Furthermore as explained previously sample 1 was used to test the accuracy of the method, showing a good intra-day and inter-day precision. Therefore, the applicability of the proposed method to this kind of samples is validated.

4. Conclusions

A fast and simple method to determine estrogens in wastewater samples has been described. To the best of our knowledge this is the first method for estrogens determination with automatic extraction and preconcentration prior GC–MS, what results in a good precision, accuracy and time saving. After a wide study, chloroform and acetone were selected as extraction and disperser solvents, respectively. Simultaneous, quick and efficient optimization was allowed by exploiting multivariate design combined with the concepts of multiple response treatments and desirability function. DLLME has proved to be a suitable pretreatment technique when using gas chromatography avoiding the need to dry the extract before derivatization and injection. BSTFA + 1% TMSC:pyridine 3:1 enhanced the derivatization rate ensuring the conversion of the studied estrogens to their trimethylsilyl derivatives and allowing the simultaneous determination of E1 and EE2. The proposed method has proved

to be a useful tool to determine estrogens in wastewater samples given the good precision and recoveries obtained.

Acknowledgments

The authors acknowledge financial support from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) through project CTQ2013-47461-R cofinanced by FEDER funds. J.A. acknowledges the Torres Quevedo Program of MINECO cofinanced by European Funds for financial support through PTQ-2012-05755. Authors acknowledge María Trinidad García Barceló and the Son Anglada Laboratory for their support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.08.031>.

References

- [1] European Commission, European Workshop on the Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife. Report of the Proceedings, Weybridge, UK, 1996, Report EUR 17549.
- [2] Environmental Protection Agency (EPA), Analytical Methods: Contaminants of Emerging Concern Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs). <http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/ppcp/> (accessed 16.04.15).
- [3] M.J. López De Alda, D. Barceló, J. Chromatogr. A 892 (2000) 391–406.
- [4] A.P. Scott, R.M. Inbaraj, E.L.M. Vermeirssen, Gen. Comp. Endocrinol. 105 (1997) 62–70.
- [5] J.H. Willman, T.B. Martins, T.D. Jaskowski, H.R. Hill, C.M. Litwin, Clin. Diagn. Lab. Immunol. 6 (1999) 615–616.
- [6] C.C. Chang, S.D. Huang, Anal. Chim. Acta 662 (2010) 39–43.
- [7] P. Keski-Rahkonen, R. Desai, M. Jimenez, D.T. Harwood, D.J. Handelsman, Anal. Chem. (2015), <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01042>.
- [8] R. Jeannot, H. Sabik, E. Sauvard, T. Dagnac, J. Chromatogr. A 974 (2002) 143–159.
- [9] K. Zhang, Y. Zuo, Anal. Chim. Acta 554 (2005) 190–196.
- [10] M. Velicu, R. Suri, Environ. Monit. Assess. 154 (2009) 349–359.
- [11] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R.M. Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, J. Chromatogr. A 1116 (2006) 1–9.
- [12] B. Socas-Rodríguez, J. Hernández-Borges, M. Asensio-Ramos, A.V. Herrera-Herrera, J.A. Palenzuela, M.A. Rodríguez-Delgado, Electrophoresis 35 (2014) 2479–2487.
- [13] M. Trojanowicz, Advances in Flow Analysis, 1st ed., Wiley, Weinheim, 2008.
- [14] V. Cerdà, L. Ferrer, J. Avivar, A. Cerdà, Flow Analysis: A Practical Guide, 1st ed., Elsevier Science, Netherlands, 2014.
- [15] F. Maya, J.M. Estela, V. Cerdà, Anal. Bioanal. Chem. 402 (2012) 1383–1388.
- [16] A. González, J. Avivar, V. Cerdà, Anal. Bioanal. Chem. 407 (2015) 2013–2022.
- [17] S. Clavijo, M.R. Brunetto, V.J. Cerdà, Sep. Sci. 37 (2014) 974–981.
- [18] S. Clavijo, J. Avivar, R. Suárez, V. Cerdà, Trends Anal. Chem. 67 (2015) 26–33.
- [19] G.L. Long, J.D. Winefordner, Anal. Chem. 55 (1983) 712–724.
- [20] J.C. Miller, J.N. Miller, Statistics for Analytical Chemistry, Ellis Horwood, Chichester, UK, 1993.
- [21] G. D'Orazio, M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, S. Fanali, M.A. Rodríguez-Delgado, J. Chromatogr. A 1344 (2014) 109–121.
- [22] C.Q. Wu, D.Y. Chen, Y.S. Feng, H.M. Deng, Y.H. Liu, A.J. Zhou, Anal. Lett. 45 (2012) 1995–2005.
- [23] M.R. Hadjmohammadi, S.S. Ghoreishi, Acta Chim. Slov. 58 (2011) 765–771.
- [24] R. Leardi, Anal. Chim. Acta 652 (2009) 161–172.
- [25] G. Derringer, R.J. Suich, Qual. Technol. 12 (1980) 214–219.
- [26] A. Shareef, M.J. Angove, J.D. Wells, J. Chromatogr. A 1108 (2006) 121–128.
- [27] S. Nakamura, T.H. Sian, S. Daishima, J. Chromatogr. A 919 (2001) 275–282.

5.2.1 Material suplementario (Supplementary Material)

Figure S1. In-syringe-MSA-DLLME system and components

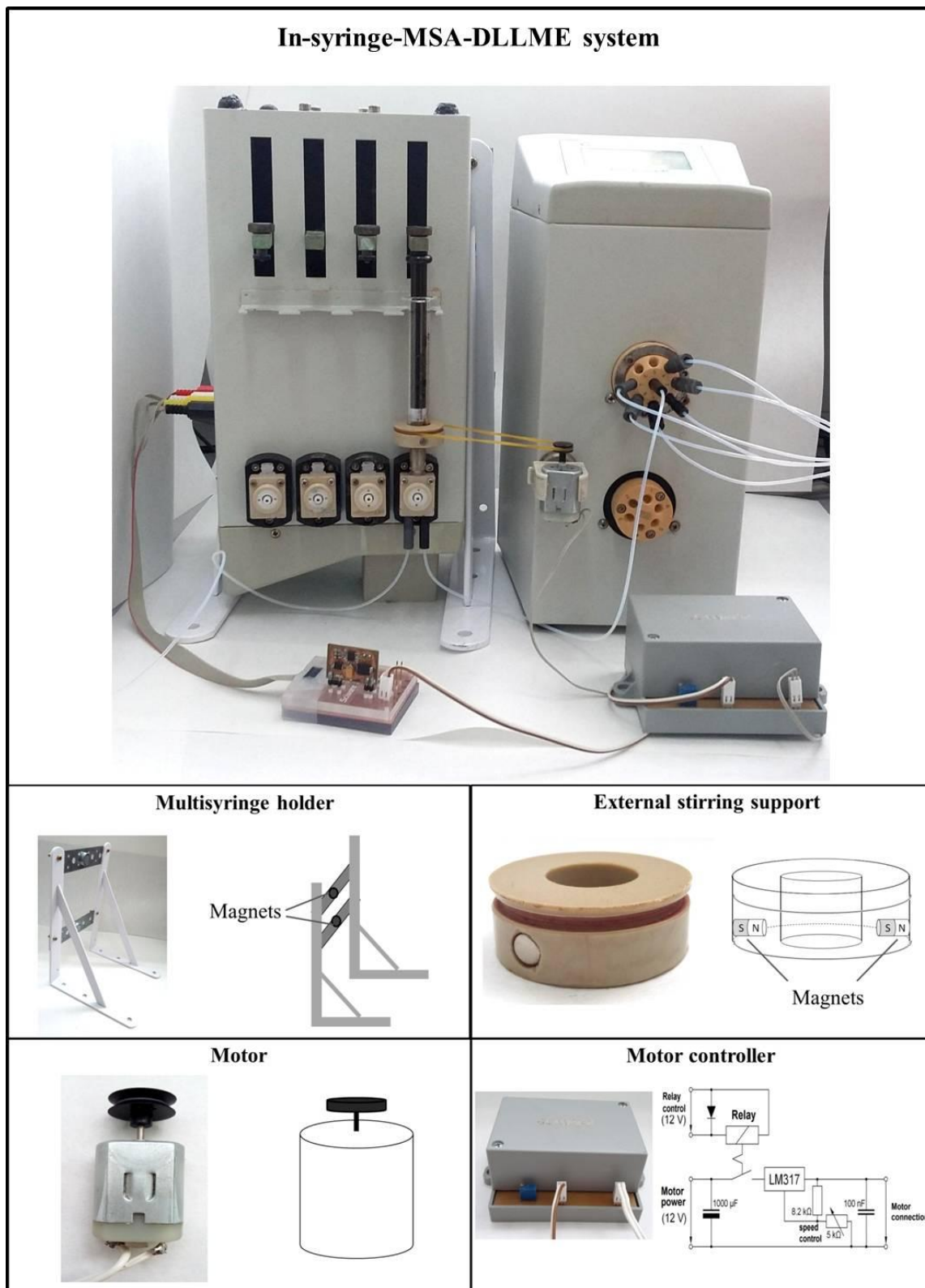


Table S1. Variables and ranges studied in the screening and the central composite design and optimum values.

	Volume of chloroform (μL)	Volume of acetone (μL)	pH	Agitation time (s)
Screening	300-500	300-900	3-8	40-120
Central Composite Design	250-400	200-500	8	0-60
Optimum values	250	200	8	50

Figure S2. Pareto chart of the overall desirability (D) for the estimated effects for the variables affecting the dispersive liquid-liquid microextraction.

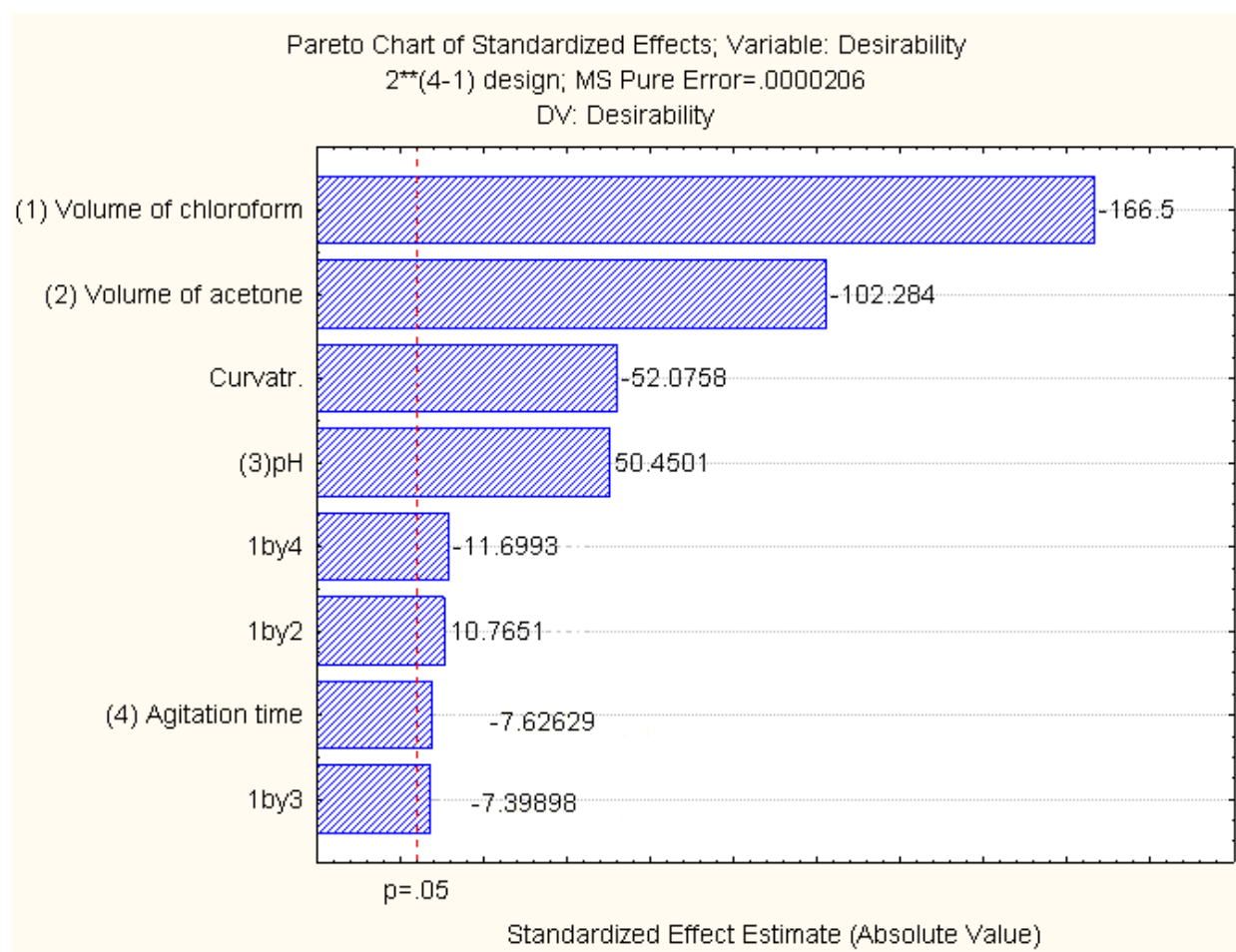


Figure S3. Desirability chart for all the estrogens and the calculated overall desirability (D) in the face centered central composite design. E1: estrone, E2: 17 β -estradiol, EE2: 17 α -ethynylestradiol, E3: estriol.

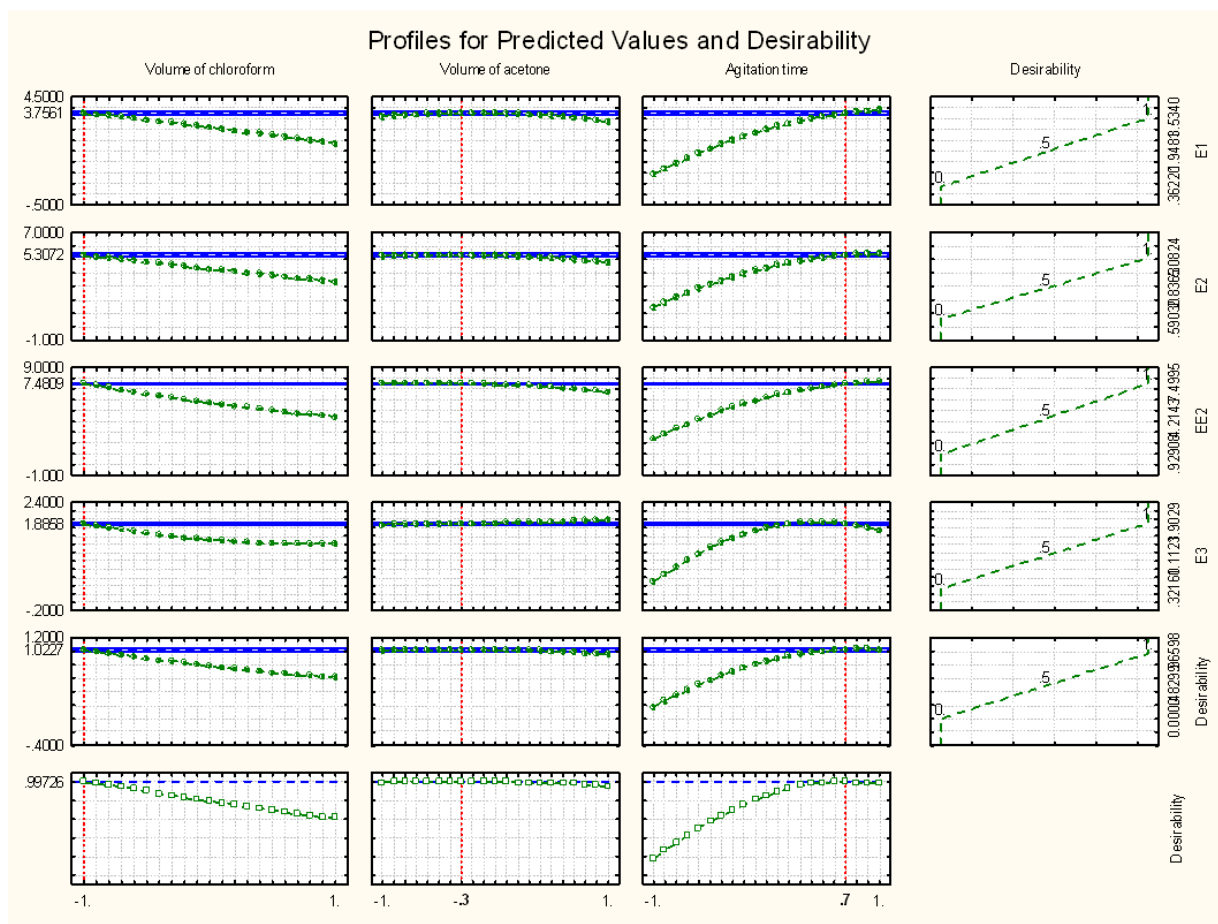
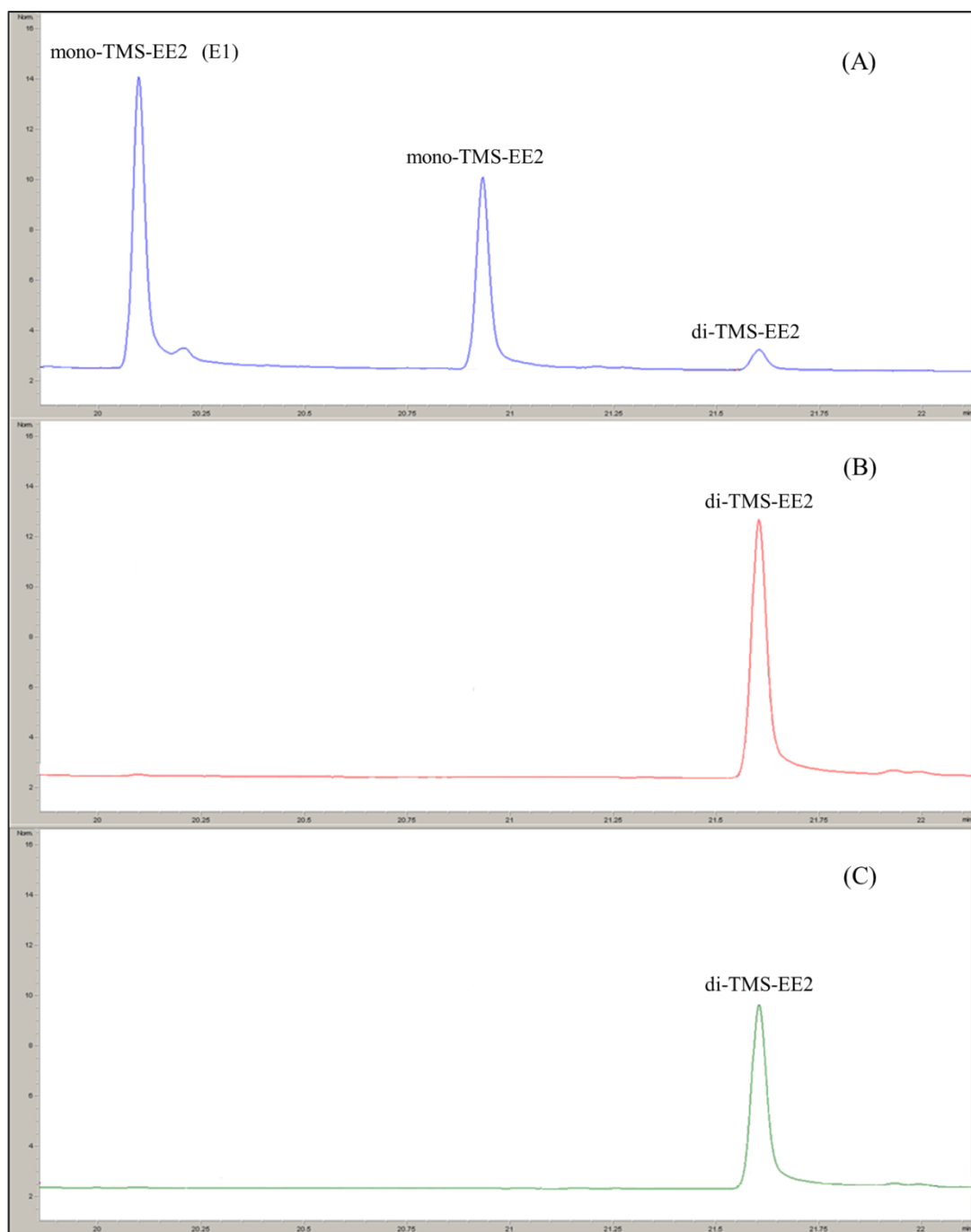


Figure S4. GC-FID chromatograms of the TMS derivatives of EE2 in different conditions: A) In absence of pyridine. Derivatization reagent: 200 μ l BSTFA. B) Derivatization reagent: 150 μ l BSTFA: 50 μ l pyridine (3:1) C) Derivatization reagent: 100 μ l BSTFA:100 μ l pyridine (1:1).



CAPÍTULO 6

Desarrollo de un sistema de extracción en fase microsólida dispersiva en jeringa basado en el uso de micropartículas magnéticas para la determinación de estrógenos

6.1 Introducción y discusión

En este capítulo se presenta el desarrollo del primer sistema para la determinación de estrógenos en muestras ambientales basado en una extracción en fase microsólida dispersiva en jeringa (in-syringe magnetic dispersive micro-solid phase extraction, D- μ -SPE) previa al análisis por GC-MS utilizando micropartículas de carbones magnéticos como adsorbente.

Tal como se ha explicado en capítulos anteriores, las estructuras metalorgánicas (metal-organic frameworks, MOFs) son un grupo de materiales cristalinos que se están utilizando cada vez más en química analítica debido a sus interesantes propiedades, tales como sus elevadas áreas superficiales y su estabilidad. Su estructura se basa en la unión de iones metálicos con moléculas orgánicas, formando cavidades cuyo tamaño se puede controlar para obtener desde micro a mesoporos. Además, se pueden sintetizar MOFs con propiedades magnéticas, facilitando su implementación como adsorbente para la D- μ -SPE puesto que se puede forzar su dispersión a través de la matriz de la muestra.

Las micropartículas magnéticas han sido obtenidas al llevar a cabo la síntesis y posterior combustión de partículas ZIF-67, un subtipo de MOFs con estructura zeolítica y ligandos tipo imidazolato.

Tras sintetizar y caracterizar los carbones mediante difracción de rayos X, microscopía e isothermas de adsorción, se ha realizado el estudio y selección del eluyente, seguido de una optimización multivariante del resto de variables que influyen en la microextracción: volumen de eluyente, efecto de la fuerza iónica, pH de la muestra, y tiempos de agitación para la extracción y elución.

Una vez obtenido el extracto, éste ha sido derivatizado e inyectado en un GC-MS para la separación y cuantificación de los analitos, bajo las condiciones especificadas en el capítulo anterior.

La repetitividad y reproducibilidad del sistema han sido estudiadas obteniéndose resultados satisfactorios, con RSDs entre 2,7 y 5,9% para los estudios intra-day, y entre 4,6 y 9,5% para los estudios inter-day.

Finalmente, cabe mencionar que el uso de las micropartículas magnéticas ha permitido automatizar la μ -SPE evitando algunos de los inconvenientes más comunes en este tipo de sistemas, como la obstrucción de los canales que conduce a sobrepresiones.

6.2 Artículo original

A continuación se adjunta el artículo original "In-syringe dispersive μ -SPE of estrogens using magnetic carbon microparticles obtained from zeolitic imidazolate frameworks" de A. González, J. Avivar, F. Maya, C. Palomino Cabello, G. Turnes Palomino y V. Cerdà, así como su material suplementario, publicados en *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409 (2017) 225-234.

In-syringe dispersive μ -SPE of estrogens using magnetic carbon microparticles obtained from zeolitic imidazolate frameworks

Alba González¹ · Jessica Avivar² · Fernando Maya¹ · Carlos Palomino Cabello¹ · Gemma Turnes Palomino¹ · Víctor Cerdà^{1,2}

Received: 22 July 2016 / Revised: 16 September 2016 / Accepted: 27 September 2016 / Published online: 4 November 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Herein, we propose for the first time the use of magnetic porous carbons (MPCs) derived from zeolitic imidazolate frameworks (ZIFs) for the automated in-syringe magnetic dispersive micro-solid phase extraction (D- μ -SPE) of environmental pollutants prior to their analysis using GC-MS. MPCs with dual porosity are obtained from the direct combustion of the ZIF-67, obtaining robust and magnetic porous carbons on the micrometer scale. As proof of concept, this material has been applied for the automated D- μ -SPE of estrogens (estrone, 17 β -estradiol, and 17 α -ethynylestradiol) cataloged as Contaminants of Emergent Concern by the Environmental Protection Agency of the United States (US-EPA). The automation of the system provided a good precision given the low relative standard deviations (RSDs) obtained, ranging from 2.70 to 5.90 % for intra-day precision and from 4.6 to 9.55 % for inter-day precision. Furthermore, the clean-up and preconcentration of the sample is easy and quick, as the in-syringe magnetic D- μ -SPE is carried out in less than 20 min. The high porosity, magnetism, and good stability of the MPCs facilitated the automation of the SPE in dispersive mode enabling the analysis of samples with a complex matrix without

backpressure or problems related with the clogging of the instrumentation conduits. The applicability of the method to wastewater samples has been demonstrated given the good recoveries attained ranging from 86 to 115 %.

Keywords Dispersive microsolid phase extraction · Magnetic porous carbons · Zeolitic imidazolate frameworks · Automation · Gas chromatography–mass spectrometry · Estrogens

Introduction

Estrogens are a group of natural and synthetic steroid hormones with endocrine-disrupting properties. Estrogens cause adverse health effects in organisms or its progeny, as consequence of changes in their endocrine function [1, 2]. Therefore, some of these compounds as estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), and 17 α -ethynylestradiol (EE2) have been cataloged as Contaminants of Emerging Concern by the Environmental Protection Agency of the United States (US-EPA) [3].

During recent years, the determination of contaminants like synthetic and natural hormones in sewage treatment plant effluents and surface waters is more demanded, since this kind of pollutants arising from domestic and industrial sources have been found in sewage treatment plant effluents in Asia, Europe, and North America [4]. In municipal sewage effluents, these have been identified as responsible for the majority of moderate and serious pollution incidences in the freshwater environment [5, 6].

Different techniques have been used for the determination of estrogens [7–9]. Among them, gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) is one of the most desirable techniques for this purpose as it allows simultaneous separation

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-016-9988-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Víctor Cerdà
victor.cerda@uib.es

¹ Group of Analytical Chemistry, Automation and Environment, Department of Chemistry, University of the Balearic Islands, Carretera de Valldemossa km 7,5, 07122 Palma de Mallorca, Spain

² Sciware Systems, S.L. Spin-off of the University of the Balearic Islands, 07193 Bunyola, Spain

and identification of both synthetic and natural estrogens [4, 10]. However, a previous step of sample clean-up and analyte preconcentration is required prior to sample injection into the chromatograph in order to attain matrix removal and subsequently the enrichment of the analyte and the improvement of the method sensitivity. This is of great interest when dealing with complex matrix samples, such as wastewaters, where the analytes of interest are present at low concentration and the components of the sample matrix can damage the chromatographic instruments. Liquid-liquid extraction (LLE) [11] and solid-phase extraction (SPE) [2, 12] have been widely used for this purpose. SPE is preferred over LLE, since SPE is faster and more environmentally friendly than LLE. In this sense, advances are being made, e.g., with the development of new materials such as porous carbons [13], porous polymers [14], or metal-organic frameworks (MOFs) and related compounds [15, 16], which are being studied as sorbents for pollutants extraction and preconcentration.

Zeolitic imidazolate frameworks (ZIFs) are a subclass of MOFs composed of tetrahedrally coordinated metallic centers linked by imidazole-based ligands [17, 18]. Their excellent properties such as high porosity and water stability make them suitable for the extraction of organic pollutants from aqueous samples. For example, the use of ZIF-8 ($\text{Zn}(\text{MeIm})_2$, MeIm = 2-methylimidazole) crystals has been explored for the extraction of phthalate esters [19, 20], benzotriazoles [21], and estrogens [22] from water samples. An interesting approach in the use of ZIFs for SPE application is the direct carbonization of ZIF-67 (CoMeIm) in an inert atmosphere, obtaining highly stable and magnetic porous carbons (MPCs) [23]. MPCs derived from ZIF-67 enable magnetic solid-phase extraction [24], a variation of the classical SPE that has received much attention as the sorbent can be readily isolated from the sample using a magnet after stirring [25]. Furthermore, problems with the column blocking and pressure are avoided. Magnetic solid-phase extraction can be automated using flow analysis techniques, in packed format [26] and more recently in dispersive mode [27]. Automation by flow analysis techniques affords high throughput, decreasing the human exposure to hazardous chemicals, and developing more environmental friendly procedures obtained due to process downscaling [28, 29].

Herein, we propose for the first time the combination of in-syringe magnetic dispersive micro-solid phase extraction (magnetic D- μ -SPE) with GC-MS for the determination of estrogens. MPCs have been synthesized from micrometric ZIF-67 crystals, and their applicability for the sample clean-up and preconcentration of estrogens has been studied. Experimental parameters involved in the extraction process have been optimized, and different eluents have been tested. The applicability of the proposed system to wastewater samples has also been evaluated.

Experimental

Chemicals, solutions, and samples

All solutions were prepared in distilled water from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA) (resistivity $>18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) or in GC-grade methanol (Scharlau, Barcelona, Spain).

Cobalt chloride (CoCl_2) was purchased from Scharlau, and polyvinylpyrrolidone (PVP) and 2-methylimidazole (MeIm) were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Chloroform, trichloroethylene, and acetonitrile (Scharlau) were tested as eluents. Sodium chloride (NaCl) of analytical reagent grade (Scharlau) was used to adjust the ionic strength of the samples and standards. Estrone (E1), β -estradiol (E2), 17α -ethynylestradiol (EE2), and estrone 3-methyl ether (internal standard, IS) were purchased from Sigma-Aldrich. Stock solutions of estrogens were prepared by accurately weighing the appropriate mass of each compound and by dissolving it in methanol obtaining a final concentration of 500 mg L^{-1} . Stock solutions were kept in the dark at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Working standard solutions containing either mixtures or individual compounds were prepared daily by dilution of the stock solutions in chloroform (for the direct injection of the solution into the gas chromatograph), or in water containing 3 mol L^{-1} NaCl and adjusted to pH 4.6 using NaOH 0.1 mol L^{-1} . *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with trimethylchlorosilane (BSTFA + TMSC, 1 %) was used as derivatization reagent, and pyridine as a solvent, both purchased from Sigma-Aldrich.

Wastewater samples collected from the inlets (samples 1 and 2) and outlets (samples 3 and 4) of the sewage treatment plant of Palma de Mallorca (Balearic Islands, Spain) were stored at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ in plastic bottles. Due to the presence of solid particles, samples were centrifuged, and the supernatant liquid was filtered through $0.22\text{-}\mu\text{m}$ nylon filters before analysis. They were adjusted to pH 4.6 using NaOH 0.1 mol L^{-1} and prepared in a final solution containing 3 mol L^{-1} NaCl.

Synthesis and characterization of the zeolitic imidazolate framework-derived dual magnetic porous carbons

The preparation of magnetic porous carbons (MPCs) with dual porosity is divided in two main steps, i.e., the synthesis of ZIF-67 particles and their subsequent carbonization. In a first step, ZIF-67 particles were prepared according to a previously reported method [30]. CoCl_2 (519 mg), PVP (600 mg), and MeIm (2630 mg) were dissolved in 80 mL of methanol under stirring. The obtained solution was left at room temperature for 12 h without stirring. The resulting bright purple powder was separated by centrifugation, washed three times with methanol, and dried at $80 \text{ }^\circ\text{C}$. In a second step, ZIF-67 crystals were carbonized under a nitrogen flow at

800 °C for 3 h (heating rate 2 °C min⁻¹). After the calcination treatment, the bright purple powder is converted into a black magnetic powder corresponding to the MPCs. The MPCs were washed several times with acetone and water before use.

Powder X-ray diffraction data were collected using CuK α ($\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$) radiation on a Siemens D5000 diffractometer. Particle morphology was analyzed by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) using a Hitachi S-3400N microscope operated at 15 kV and a Hitachi ABS microscope operated at 100 kV, respectively. Nitrogen adsorption isotherms were measured at 77 K using a TriStar 3020 (Micromeritics) gas adsorption analyzer. The samples were previously outgassed under a dynamic vacuum (ca. 10⁻⁵ mbar) overnight at 393 K. Ultrahigh purity N₂ (99.992 %) was supplied by Air Products. Data were analyzed using the Brunauer–Emmett–Teller (BET) model to determine the specific surface area.

In-syringe magnetic D- μ -SPE system and software

A schematic depiction of the in-syringe magnetic D- μ -SPE system is shown in Fig. 1. An automatic burette (CRISON, Alella, Spain) coupled to a selection valve (SV) (Sciware Systems, Bunyola, Spain) are the basic elements of the pre-treatment system. The automatic burette is equipped with a 5-mL glass syringe (S) (Hamilton, Switzerland) where the D- μ -SPE takes place. The syringe has a three-way solenoid valve (N-Research, Caldwell, NJ, USA) placed at the head enabling multicommutation operations. The step motor shows a speed range of 1024–20 s for total displacement, corresponding to 40,000 steps. Thus, the module allows precise handling of microliters and a wide flow rate range (0.057–30 mL min⁻¹, depending on the syringe volume 1–10 mL). The burette is placed upside down using a homemade burette holder.

A magnetic stirring-assisted system (MSA) [31] is mounted on the syringe to allow a rapid dispersion of the MPC particles. The MSA system (Sciware Systems) is composed of a small magnetic bar (10 mm length, 3 mm diameter) placed inside the syringe, an external stirring support placed

around the syringe's body (14 mm i.d., 30 mm o.d.) with two small magnets facing each other creating a rotating magnetic field, a motor connected with the external agitation support by a rubber band, which forces the rotation of the external support when activated, and a circuit controlled through one of the burette external outputs that controls both the start/stop and the motor revolutions. A schematic depiction of the MSA system can be found elsewhere [32]. When the motor is switched on, the ring starts to rotate and with it the magnetic bar inside the syringe, forcing the dispersion of the magnetic particles through the sample. Once the extraction is done, the motor is switched off, and the particles are attracted by the magnetic bar. Thus, the aqueous sample can be discarded while the particles remain inside the syringe (Fig. 2 and Video S1 in the Electronic Supplementary Material, ESM).

The “off” position of the three-way solenoid valve of the syringe is connected to the central port of a selection valve (SV), as can be seen in Fig. 1. The peripheral ports of the SV contain the fraction collector equipped with amber chromatographic vials containing 300- μ L inserts and the reagents used to carry out the in-syringe magnetic D- μ -SPE and the cleaning of the system, as follows: water (port 1), fraction collector (port 2), sample (port 3), air (port 4), chloroform (eluent, port 5), acetone (port 6), and waste (port 8).

The manifold is composed of poly(tetrafluoroethylene) (PTFE) tubing of 0.8 mm i.d. for reagents and sample aspiration. Instrumental control was done with the software AutoAnalysis 5.0 (Sciware Systems). This software permits the automatic control of the flow manifold used including the agitation system through a very simple interface for non-specialized users.

Automated in-syringe magnetic D- μ -SPE and derivatization procedure prior GC analysis

First, 10 mg of the magnetic particles (MPCs) are weighed and introduced inside the syringe (S). Afterwards, in-syringe magnetic D- μ -SPE is carried out. The detailed procedure of the in-syringe magnetic D- μ -SPE is depicted in Table 1. Thus, the selection valve (SV) is positioned in its port 3 and 4.5 mL of

Fig. 1 Schematic depiction of the in-syringe magnetic D- μ -SPE system for estrogens extraction and preconcentration prior GC analysis. *M* motor, *S* syringe, *SV* selection valve, *V* three-way solenoid valve

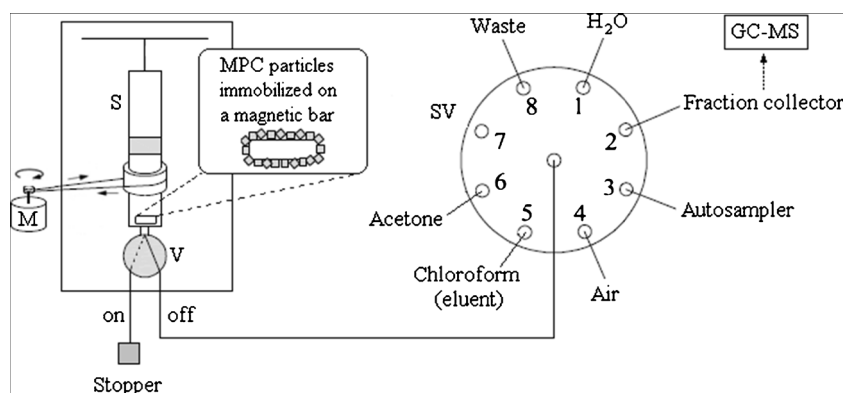
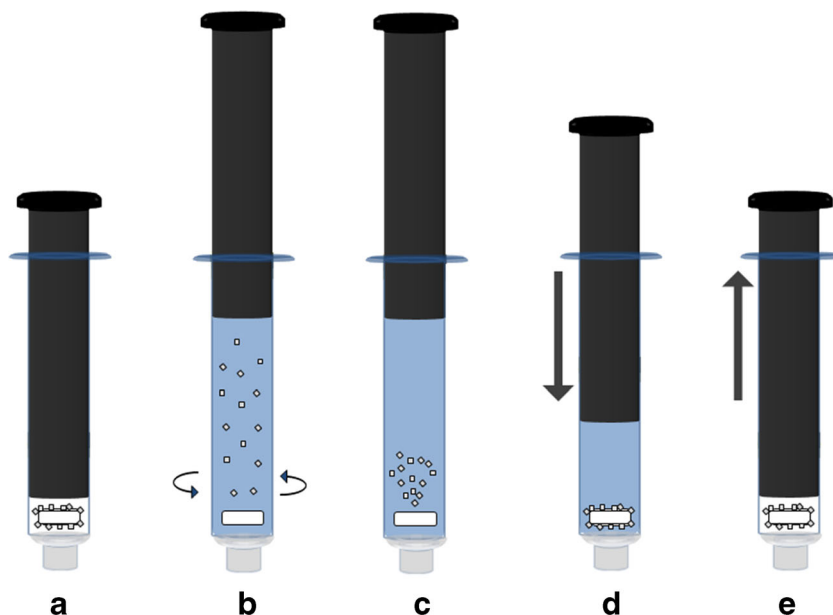


Fig. 2 Scheme of the in-syringe magnetic D- μ -SPE procedure: particles are immobilized on the magnetic bar (a). When the agitation system is activated, particles are dispersed through the sample (b). When the agitation system is stopped, particles are attracted by the magnetic bar (c). The aqueous sample is dispensed to the waste while the particles are retained inside the syringe (d). The eluent is loaded (e). The steps (b), (c), and (d) are repeated, dispensing the eluent to the fraction collector



the sample are loaded into the syringe at 2.5 mL min^{-1} through the “off” position of the three-way solenoid valve (V) located at the head of the syringe. Then, the magnetic-

assisted system is activated and the MPC particles are dispersed throughout the sample. During agitation, V is in its “on” position, which is closed with a stopper to prevent

Table 1 Detailed analytical procedure of the in-syringe magnetic D- μ -SPE method for estrogens extraction

		Multisyringe	SV (port)	(V)
1	Start loop			
2	Empty S	Dispense 4.9 mL	8	Off
3	Load sample	Pick up 4.5 mL	3	Off
4	Stir	–	3	On
5	Wait 12 min	–	3	On
6	Stop stirring	–	3	On
7	Wait 2 min	–	3	On
8	Dispense sample	Dispense 4.5 mL	8	Off
9	Load water	Pick up 4.5 mL	1	Off
10	Stir	–	1	On
11	Wait 1 min	–	1	On
12	Stop stirring	–	1	On
13	Wait 1 min	–	1	On
14	Dispense water	Dispense 4.5 mL	8	Off
15	Load air	Pick up 3 mL	4	Off
16	Dispense air	Dispense 3 mL	8	Off
17	Load eluent (chloroform)	Pick up 0.3 mL	5	Off
18	Load air	Pick up 0.6 mL	4	Off
19	Stir		4	On
20	Wait 6 min		4	On
21	Stop stirring		4	On
22	Wait 4 min		4	On
23	Dispense eluent	Dispense 0.9 mL	2	Off
24	MPC and syringe rinsing procedure			
25	Repeat loop ($n = 3$)			

S syringe, SV selection valve, V three-way solenoid valve

particles going out the syringe because of the agitation movement. After 12 min, the agitation is stopped, and the particles are attracted by the magnetic bar. After 2 min, the sample is clear again and can be discarded by setting V in its “off” position and SV in the port 8 (waste). Next, the syringe is filled with water at 5 mL min^{-1} (port 1 of the SV) and the MSA system is activated during 1 min to remove non-retained species from the matrix of the sample. Again, MSA is stopped and after 1 min the water is discarded (SV port 8). Then, SV is positioned in port 4 (air), and 3 mL of air are aspirated and then dispensed to the waste (port 8) to dry the particles and the central tubing. Afterwards, the elution of estrogens is performed. Then, 300 μL of the eluent (chloroform, port 5) are loaded into S, followed by 600 μL of air to push the chloroform that stays in the central tubing. Afterwards, the MSA system is activated for 6 min. After 4 min without agitation, the chloroform droplet is dispensed in a fraction collector (port 2 of the SV). Then a cleaning procedure of the system and the particles is performed. It consists on rinsing S and the particles with acetone (port 6) and then with water (port 1). Finally, 100 μL of the organic droplet are manually collected using a micropipette and derivatized inside an amber vial using the conditions optimized in our previous work [32], i.e., 150 μL of BSTFA, 45 μL of Py, and 5 μL of IS at room temperature. After at least 30 min, derivatized samples are injected into the GC-MS.

GC analysis

A GC-MS (Agilent 7890 with mass spectrometer HP 5973C, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) was used for the determination of the analytical parameters and samples analysis. The MS is operated in the electron impact (EI) mode (70 eV). System control and data acquisition are achieved with HP ChemStation Software. Helium (99.999 %) is employed as carrier gas at the flow rate of 1.0 mL min^{-1} . Furthermore, 1 μL of derivatives is injected and separated on a $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm i.d.} \times 0.25 \text{ mm}$ film thickness DB5 (methyl 5 % phenyl polysiloxane) GC column with the following temperature program: initially from $100 \text{ }^\circ\text{C}$ (holding 1 min) at a rate of $20 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ to $200 \text{ }^\circ\text{C}$, then increasing at a rate of $5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ to $280 \text{ }^\circ\text{C}$ and holding for 8 min, with a total run of 30 min and 7 min of solvent delay. The injection port is operated in pulsed splitless mode with an injection temperature of $280 \text{ }^\circ\text{C}$. The EI ion source, the quadrupole mass analyzer, and the interface temperatures are maintained at 230, 150, and $280 \text{ }^\circ\text{C}$, respectively.

The MS is equipped with the mass spectral library NIST MS search 2.0. It was tuned to m/z 69, 219, and 502 for the EI corresponding to perfluorotributylamine. It was operated in the total ion current mode, scanning from m/z 50 to 550 for identification purposes. The mass peaks that offer the highest intensity for each compound were selected in order to obtain

the highest sensitivity, and the acquisition was carried out in the selected ion monitoring mode. Quantitative ions for each analyte were set as follows: IS: 160, 199, 284; E1: 73, 218, 257, 342; E2: 73, 129, 285, 416; and EE2: 285, 425, 440 m/z .

Optimization experiments were carried out with a GC-FID (Agilent 7890 A, Agilent Technologies, USA).

Results and discussion

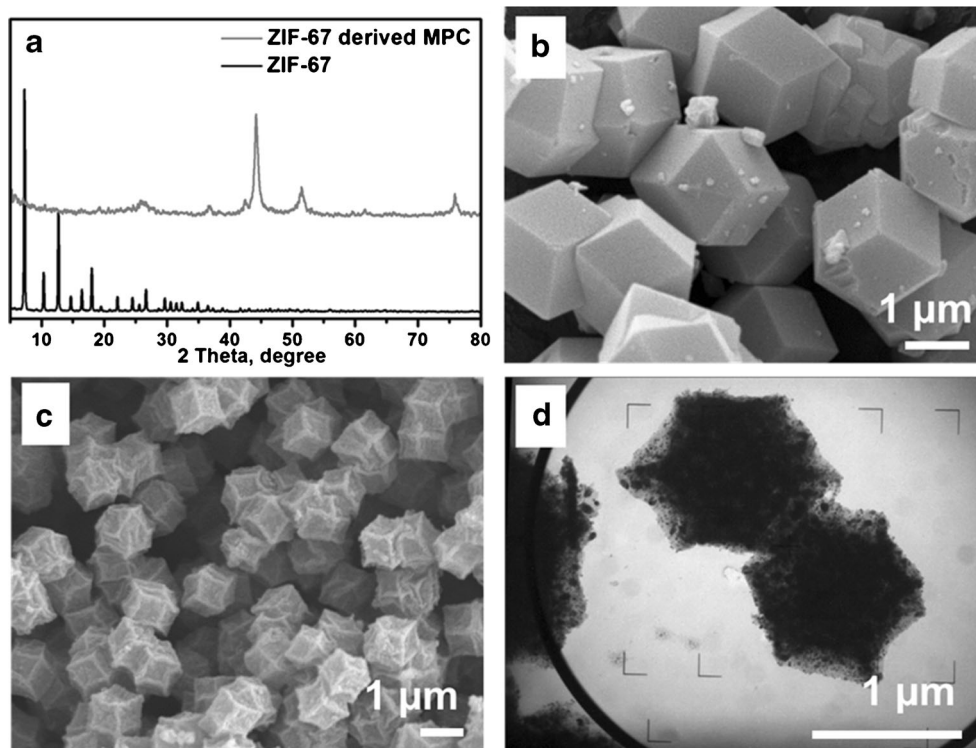
Characterization of the MPCs

As stated above, the preparation of magnetic porous carbons (MPCs) was based on a previously reported method [30]. ZIF-67, a Co-based ZIF, was selected as the precursor and it was carbonized directly in the absence of any additional carbon source.

The powder X-ray diffraction pattern (XRD) of the prepared ZIF-67 crystals (Fig. 3a) showed good crystallinity and was in good agreement with previous reports [30]. After the carbonization process, the characteristic peaks of the ZIF-67 are no longer present in the XRD pattern, while new diffraction lines are now observed at higher diffraction angles (Fig. 3a). The new XRD peaks are assigned to carbon with a graphitic structure ($2\theta < 30$), Co face-centered-cubic (*fcc*) nanocrystals ($2\theta > 40$), and CoO nanoparticles due to the oxidation of the Co nanocrystals present on the surface of the carbon ($2\theta = 36$). The obtained carbons have magnetic properties. The morphology of the obtained materials was investigated by using scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). As revealed by SEM images, the ZIF-67 crystals obtained as precursor material for the preparation of MPC have rhombic dodecahedron shape and micrometric size (Fig. 3b; examples at different magnifications are shown in Figs. S1 to S4 in the ESM). The MPC particles obtained from ZIF-67 have a distorted, bumpy surface as showed by SEM (Fig. 3c and ESM Figs. S5 and S6). From the TEM images (Fig. 3d and ESM Fig. S7), we can observe the presence of the Co and CoO nanoparticles dispersed in the carbon matrix.

Nitrogen adsorption and desorption isotherms at 77 K for the prepared MPC are depicted in Fig. 4. The precursor ZIF-67 is highly microporous, and after carbonization part of the microporous structure partially collapses. However, part of the micropores remain after carbonization, as shown by the nitrogen adsorption at lower P/P_0 values (< 0.1). Besides that, the measured isotherms showed hysteresis, which is attributed to the presence of interparticle mesoporosity. The precursor ZIF-67 crystals grow partially interconnected (ESM Figs. S2 to S4) as small aggregates, which persist after the carbonization (ESM Fig. S6), which could be a possible explanation for the observed hysteresis loop. A surface area of $233 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ was measured from the MPCs. The presence of dual porosity in the

Fig. 3 X-ray diffraction patterns of the ZIF-67 sample and the MPCs obtained from ZIF-67 (a). SEM images of the ZIF-67 crystals (b) and the ZIF-67-derived MPC (c). TEM micrograph of the ZIF-67 derived MPC (d)



obtained MPC can be beneficial to extract organic molecules with a size larger than the micropores of MPC.

Selection of the eluent

Chloroform, trichloroethylene and acetonitrile were tested as eluents. An aqueous solution containing 5 mg L^{-1} of a mixture of the studied estrogens was processed with the proposed in-syringe magnetic D- μ -SPE system. Results are showed in Fig. 5 where the relative intensity for each eluent and analyte is represented. Relative intensity is calculated assigning

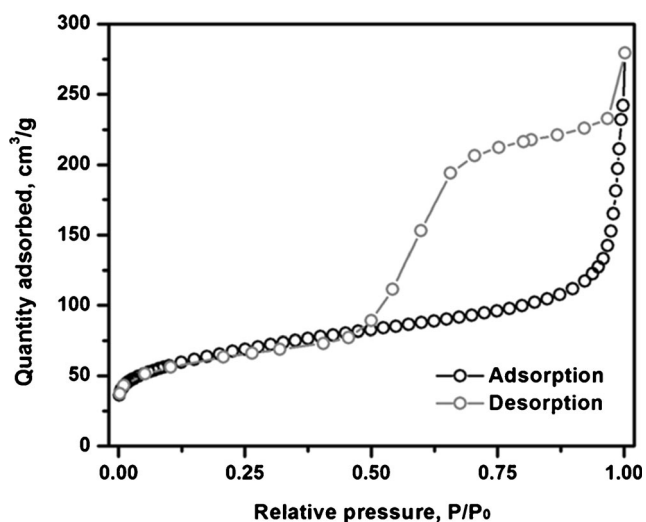


Fig. 4 Nitrogen adsorption and desorption isotherms of the prepared MPC

100 % to the maximum area for each estrogen and relating the others to this value. Chloroform was selected as eluent for further assays since it provided the highest extraction efficiencies in all cases.

In-syringe magnetic D- μ -SPE optimization

After the selection of chloroform as eluent, a series of experiments were conducted to optimize the variables of the system using both univariate and multivariate optimization techniques.

Multivariate designs are useful to get relevant information about the effect of the variables within the experimental domain selected, and the variance of the estimated response in every point of the domain is better than that obtained by

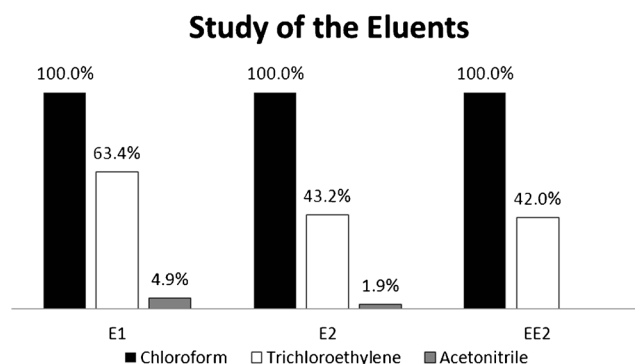


Fig. 5 Selection of the solvent for the elution of the selected estrogens from the MPC. Results are expressed as relative intensity (%) assigning 100 % to the solvent showing the best elution performance

Table 2 Figures of merit of the proposed in-syringe magnetic D- μ -SPE automated system combined with GC-MS detection

	E1	E2	EE2
Quantitation ions (m/z)	73, 218, 257, 342	73, 129, 285, 416	73, 285, 300, 425, 440
Retention time (min)	18.27	18.81	20.35
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2.2	3.8	2.6
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	7.5	12.8	8.8
Linear range ($\mu\text{g L}^{-1}$)	7.5–1000	12.8–1000	8.8–1000
Calibration curve	$y = 0.077x + 0.023$	$y = 0.045x$	$y = 0.066x - 9 \cdot 10^{-5}$
Correlation coefficient	0.99	0.97	0.97
Intra-day precision (%) ($n = 8$)	2.7	5.9	5.6
Inter-day precision (%) ($n = 5$)	4.6	9.5	7.7

univariate methods [33]. The statistical software Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa, USA) was used for the multivariate analysis design and data processing. First, a half-fraction factorial screening (2^{k-1}), including three center points, was performed to find out the parameters that had a significant effect upon the analytical response. The variables studied were the volume of chloroform (300–1000 μL), the concentration of NaCl in the sample (influence of salting-out effect) (0.5–3 mol L^{-1}), the pH of the sample (4–8), the extraction time (5–15 min), and the elution time (5–15 min). The sample volume was fixed at 3.6 mL to carry out this study. Peak areas of the estrogens divided by the peak area of the IS were used as response signal. Data were adjusted to a two-way interaction model achieving a R^2 higher than 0.99 for all the tested estrogens. The curvature was significant for E1 and EE2. In order to evaluate the best conditions for all the estrogens, the desirability function was obtained (ESM Fig. S9). As can be seen, all the analytes showed the same tendency, and all the variables had a significant effect upon the signal. The volume of chloroform had a negative effect. The average analytical signals decreased about 40 % in the studied range when increasing the volume, so it was fixed at 300 μL (the lowest value of the studied range) as it could not be further lowered because of system limitations. The concentration of NaCl had a positive effect (60 % increase when increasing NaCl concentration), so it was also fixed to the highest studied value, 3 mol L^{-1} . The ranges of the other variables were readjusted according to the screening results to apply a response surface face-centered central composite design (CCD) and attain their critical values. pH of the sample and extraction and elution times had negative effects. Thus, their ranges were readjusted to 3–5, 1–6 min, and 1–6 min, respectively. Then, the CCD was performed and the desirability chart was studied (ESM Fig. S10). As can be seen, a maximum for the pH (4.6) was achieved so this optimum value was selected for further assays. However, the extraction and elution time did not adjust to a quadratic model so we decided to study their influence in a univariate approach (ESM Fig. S11). First, the extraction time was fixed at 6 min (the maximum value studied during the optimization, as the desirability graphic showed that it had

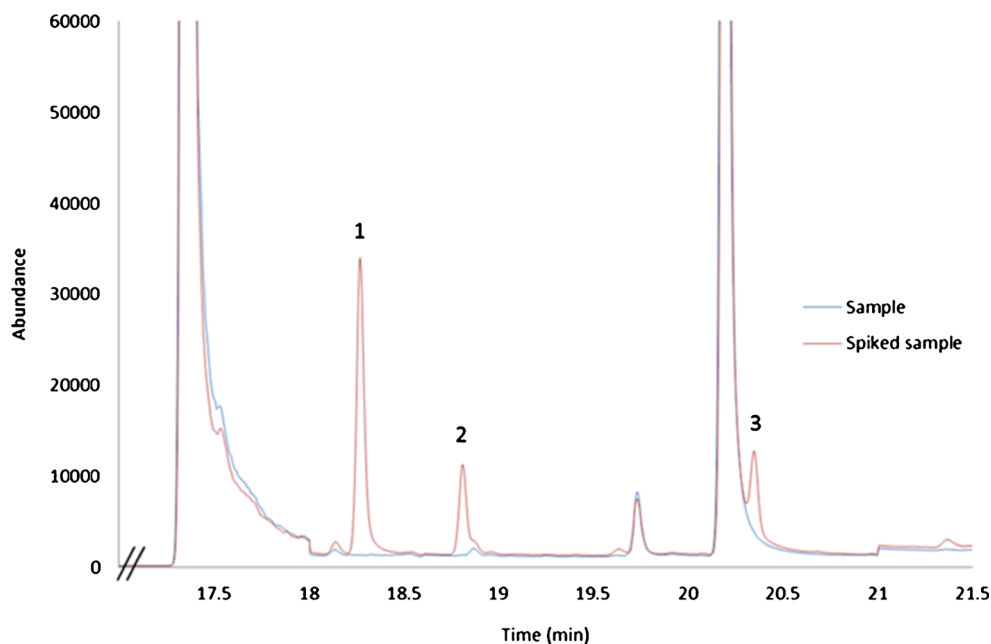
a positive effect) and different elution times up to 12 min were tested. Data showed that the signal decreased after 6 min of elution time, probably due to readsorption of the estrogens on the particles, so the elution time was fixed at 6 min. Then, extraction times were evaluated up to 15 min. A maximum signal was achieved at 12 min. Thus, an extraction time of 12 min was selected for further assays.

Method evaluation

In order to evaluate the performance of the proposed method, its figures of merit were studied (Table 2). The linear working range was established from the LOQ to the highest standard analyzed. The studied estrogens can be quantified in a wide range of concentrations, i.e., 7.5–1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ of E1, 12.8–1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ of E2, and 8.8–1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ of EE2. These results are obtained using a sample volume of 4.5 mL. However, the extraction step can be performed several consecutive times [27], increasing further the enrichment of the analytes in the solid support prior to the elution step, and concomitantly increasing the sensitivity of the method.

Precision was evaluated analyzing sample 1 (inlet of the sewage treatment plant of Palma de Mallorca) spiked with 0.1 mg L^{-1} of each estrogen. Intra-day precision is expressed as the relative standard deviation (RSD) obtained when analyzing sample 1 in eight consecutive determinations within the same day. Despite of the high complexity of the matrix of the sample, RSDs of 5.89 % or less were obtained for the studied estrogens, demonstrating the high reproducibility of the proposed technique for the SPE of estrogens in samples with a complex matrix. Inter-day precision corresponds to the RSD of sample 1 analyzed during five different days. For all the analytes, RSDs ≤ 9.55 % were obtained. Furthermore, better precision is attained in the present method comparing with previous described methods for estrogens determination. For example, Socas-Rodríguez et al. [34] reported similar LODs but higher RSDs (19 %) exploiting magnetic nanoparticles as sorbent, and Wang et al. [22] obtained RSDs ≤ 13.9 % using ZIF-8. López de Alda et al. [2] achieved RSDs up to 19 % using a C18 column for distilled water. Moreover, they

Fig. 6 GC-MS chromatogram obtained for sample 1 (blue) and sample 1 spiked with 0.25 mg L^{-1} of the derivatized studied estrogens (red). 1 estrone (E1), 2 17β -estradiol (E2), and 3 17α -ethynylestradiol (EE2)



reported limited applicability of their methodology to more complex samples such as wastewater samples.

Regarding to the time necessary to perform the clean-up and preconcentration of the sample, all the process can be carried out in less than 60 min, including the extraction, the elution, the collection of the organic drop, and the system and particles cleaning. Moreover, no carry-over was observed with the detailed cleaning procedure. Taking into account only the D- μ -SPE time (extraction, time for the particles to be attracted by the magnet, discard of the sample, and elution with chloroform), it takes less than 20 min, which is lower than the time reported in previous solid phase microextraction methods which ranged from 27 [35] to 68 min [36]. Moreover, the fact that the whole procedure is performed automatically results in a low reagent consumption and simple method that can perform the sample pretreatment unattended, what results in a significant time saving for the analyst. All these features prove that the developed method suits the demand of green analytical procedures.

Application to wastewater samples

Four wastewater samples from the inlets (samples 1 and 2) and outlets (samples 3 and 4) of a sewage treatment plant in Palma de Mallorca (Balearic Islands, Spain) were analyzed to evaluate the applicability of the proposed method to this kind of sample matrix. Figure 6 shows an example of a chromatogram of sample 1 with and without spiking. No estrogens were detected in the samples, which were subsequently spiked at two different levels with each of the studied estrogens (0.1 mg L^{-1} (level 1) and 0.25 mg L^{-1} (level 2)). Results for sample analysis are shown in Table 3. The recoveries obtained

for the spiked samples are between 89 and 109 % for sample 1 (inlet 1), 86–109 % for sample 2 (inlet 2), 95–110 % for sample 3 (outlet 1), and 90–115 % for sample 4 (outlet 2).

Besides, the accuracy of the method was tested using sample 1, and as can be seen in Table 2, good intra-day and inter-day precisions were obtained. This confirms the applicability of the proposed method to this kind of complex sample matrix. The use of ZIFs-derived MPCs also offers some other advantageous features, such as their simple and automated dispersion and collection from the sample matrix both in the extraction and elution steps and the possibility of performing the overall extraction process in a closed syringe container.

Table 3 Recoveries of estrogens from wastewater samples with the proposed in-syringe magnetic D- μ -SPE GC-MS method. Levels of spike: level 1 = 0.1 mg L^{-1} , level 2 = 0.25 mg L^{-1} . Sample conditions: pH 4.6, 3 mol L^{-1} NaCl added

Sample	Analyte	Recovery (%)	
		Level 1	Level 2
Sample 1 (inlet 1)	E1	109	100
	E2	93	89
	EE2	92	100
Sample 2 (inlet 2)	E1	109	102
	E2	104	105
	EE2	86	106
Sample 3 (outlet 1)	E1	110	104
	E2	96	98
	EE2	105	95
Sample 4 (outlet 2)	E1	105	97
	E2	105	115
	EE2	90	105

Conclusions

In this work, we present an automatic, simple, and time-saving system for the safe handling of complex and potentially toxic samples (wastewaters) enabling the extraction and preconcentration of estrogens, as proof of concept of application of MPCs for the D- μ -SPE extraction of organic pollutants. To the best of our knowledge, this is the first reported method for estrogens determination based on automatic D- μ -SPE using magnetic porous carbons derived from ZIFs as sorbents. The developed integrated system allows the use of the synthesized magnetic porous carbons for the in-syringe magnetic D- μ -SPE by their dispersion throughout the aqueous sample and their magnetic collection after the extraction. Several extraction parameters affecting magnetic D- μ -SPE have been optimized using both univariate and multivariate optimization techniques to obtain the maximum extraction efficiency. The automatic in-syringe magnetic D- μ -SPE technique has been successfully used as a front end to GC-MS avoiding the need to dry the eluate before derivatization and injection. The applicability of the method to complex matrices as wastewater samples has been demonstrated given the low RSDs and good recoveries obtained.

We envision the use of advanced magnetic porous materials in combination with modern flow-based techniques as an approach with a large potential for the handling and sample pretreatment of complex samples. Further work in this topic will be directed toward the preparation of other novel carbon structures using ZIFs as templates, the modification of their surface properties, as well as their implementation in other extraction modes developing novel approaches for chemical analysis in the environmental field.

Acknowledgments The Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) and the European Funds for Regional Development (FEDER) are gratefully acknowledged for financial support through Project CTQ2013-47461-R. A.G. also acknowledges financial support from MINECO for her predoctoral fellowship (DI-15-07998). Authors acknowledge the Son Anglada Laboratory for their support.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- European Commission. European Workshop on the impact of endocrine disrupters on human health and wildlife. Report of the Proceedings. Weybridge, UK. 1996.
- López De Alda MJ, Barceló D. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2000;892:391–406.
- Environmental Protection Agency (EPA). Analytical Methods: Contaminants of Emerging Concern Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs): <http://www.epa.gov/cwa-methods/cwa-analytical-methods-contaminants-emerging-concern>. Accessed 22 July 2016.
- Zhang K, Zuo Y. Pitfalls and solution for simultaneous determination of estrone and 17 α -ethinylestradiol by gas chromatography–mass spectrometry after derivatization with N, O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide. *Anal Chim Acta*. 2005;554:190–6.
- Quinn B, Gagne F, Costello M, McKenzie C, Wilson J, Mothersill C. The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquat Toxicol*. 2004;66:279–92.
- EPA. Urban waste water discharges in Ireland: a report for the years 1998 and 1999. Environmental Protection Agency, Jonhstown Castle, Wexford, Ireland, ISBN 1-84095-047-1. 2000.
- Scott AP, Inbaraj RM, Vermeirssen ELM. Use of a radioimmunoassay which detects C21steroids with a 17,20 β -dihydroxyl configuration to identify and measure steroids involved in final Oocyte maturation in female plaice (*Pleuronectes platessa*). *Gen Comp Endocrinol*. 1997;105:62–70.
- Willman JH, Martins TB, Jaskowski TD, Hill HR, Litwin CM. Heterophile antibodies to bovine and caprine proteins causing false-positive human immunodeficiency virus type 1 and other enzyme-linked immunosorbent assay results. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999;6:615–6.
- Chang CC, Huang SD. Determination of the steroid hormone levels in water samples by dispersive liquid–liquid microextraction with solidification of a floating organic drop followed by high-performance liquid chromatography. *Anal Chim Acta*. 2010;662:39–43.
- Jeannot R, Sabik H, Sauvard E, Dagnac T. Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2002;974:143–59.
- Duong CN, Ra JS, Cho J, Kim SD, Choi HK, Park JH, et al. Estrogenic chemicals and estrogenicity in river waters of South Korea and seven Asian countries. *Chemosphere*. 2010;78:286–93.
- Wang S, Huang W, Fang G, He J, Zhang Y. On-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for determination of estrogens in environment. *Anal Chim Acta*. 2008;606:194–201.
- Banerjee A, Gokhale R, Bhatnagar S, Jog J, Bhardwaj M, Lefez B, et al. MOF derived porous carbon–Fe₃O₄ nanocomposite as a high performance, recyclable environmental superadsorbent. *J Mater Chem*. 2012;22:19694–9.
- Wang H, Zhang H, Lv Y, Svec F, Tan T. Polymer monoliths with chelating functionalities for solid phase extraction of metal ions from water. *J Chromatogr A*. 2014;1343:128–34.
- Rowsell JLC, Yaghi OM. Metal–organic frameworks: a new class of porous materials. *Microporous Mesoporous Mater*. 2004;73:3–14.
- Furukawa H, Cordova KE, O’Keeffe M, Yaghi OM. The chemistry and applications of metal-organic frameworks. *Science*. 2013;341:1230444.
- Park KS, Ni Z, Cote AP, Choi JY, Huang R, Uribe-Romo FJ, et al. Exceptional chemical and thermal stability of zeolitic imidazolate frameworks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:10186–91.
- Phan A, Doonan CJ, Uribe-Romo FJ, Knobler CB, O’Keeffe M, Yaghi OM. Synthesis, structure, and carbon dioxide capture properties of zeolitic imidazolate frameworks. *Acc Chem Res*. 2010;43:58–67.

19. Maya F, Palomino Cabello C, Clavijo S, Estela JM, Cerdà V, Turnes G. Zeolitic imidazolate framework dispersions for the fast and highly efficient extraction of organic micropollutants. *RSC Adv.* 2015;5:28203–10.
20. Liu X, Sun Z, Chen G, Zhang W, Cai Y, Kong R, et al. Determination of phthalate esters in environmental water by magnetic Zeolitic Imidazolate Framework-8 solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2015;1409:46–52.
21. Jiang JQ, Yang CX, Yan XP. Zeolitic imidazolate framework-8 for fast adsorption and removal of benzotriazoles from aqueous solution. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2013;5:9837–42.
22. Wang Y, Jin S, Wang Q, Lu G, Jiang J, Zhu D. Zeolitic imidazolate framework-8 as sorbent of micro-solid-phase extraction to determine estrogens in environmental water samples. *J Chromatogr A.* 2013;1291:27–32.
23. Torad NL, Hu M, Ishihara S, Sukegawa H, Belik AA, Imura M, et al. Direct synthesis of MOF-derived nanoporous carbon with magnetic Co nanoparticles toward efficient water treatment. *Small.* 2014;10:2096–107.
24. Hao L, Wang C, Wu Q, Li Z, Zang X, Wang Z. Metal–organic framework derived magnetic nanoporous carbon: novel adsorbent for magnetic solid-phase extraction. *Anal Chem.* 2014;86:12199–205.
25. Liu X, Wang C, Wu Q, Wang Z. Metal-organic framework-templated synthesis of magnetic nanoporous carbon as an efficient adsorbent for enrichment of phenylurea herbicides. *Anal Chim Acta.* 2015;870:67–74.
26. Huang YF, Jiang Y, Yan XP. Magnetic immobilization of amine-functionalized magnetite microspheres in a knotted reactor for on-line solid-phase extraction coupled with ICP-MS for speciation analysis of trace chromium. *J Anal At Spectrom.* 2010;25:1467–74.
27. Maya F, Palomino Cabello C, Estela JM, Cerdà V, Turnes Palomino G. Automatic in-syringe dispersive microsolid phase extraction using magnetic metal–organic frameworks. *Anal Chem.* 2015;87:7545–9.
28. Trojanowicz M. *Advances in flow analysis.* 1st ed. Weinheim: Wiley; 2008.
29. Cerdà V, Ferrer L, Avivar J, Cerdà A. *Flow analysis: a practical guide.* 1st ed. Netherlands: Elsevier Science; 2014.
30. Tang J, Salunkhe RR, Liu J, Torad NL, Imura M, Furukawa S, et al. Thermal conversion of core–shell metal–organic frameworks: a new method for selectively functionalized nanoporous hybrid carbon. *J Am Chem Soc.* 2015;137:1572–80.
31. Horstkotte B, Suárez R, Solich P, Cerdà V. In-syringe-stirring: a novel approach for magnetic stirring-assisted dispersive liquid–liquid microextraction. *Anal Chim Acta.* 2013;788:52–60.
32. González A, Avivar J, Cerdà V. Estrogens determination in wastewater samples by automatic in-syringe dispersive liquid–liquid microextraction prior silylation and gas chromatography. *J Chromatogr A.* 2015;1413:1–8.
33. Leardi R. *Experimental design in chemistry: a tutorial.* *Anal Chim Acta.* 2009;652:161–72.
34. Socas-Rodríguez B, Hernández-Borges J, Salazar P, Martín M, Rodríguez-Delgado MA. Core-shell polydopamine magnetic nanoparticles as sorbent in micro-dispersive solid-phase extraction for the determination of estrogenic compounds in water samples prior to high-performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis. *J Chromatogr A.* 2015;1397:1–10.
35. Naing NN, Li SFY, Lee HK. Evaluation of graphene-based sorbent in the determination of polar environmental contaminants in water by micro-solid phase extraction-high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2016;1427:29–36.
36. Kanimozhi S, Basheer C, Narasimhan K, Liu L, Koh S, Xue F, et al. Application of porous membrane protected micro-solid-phase extraction combined with gas chromatography–mass spectrometry for the determination of estrogens in ovarian cyst fluid samples. *Anal Chim Acta.* 2011;687:56–60.

6.2.1 Material suplementario (Supplementary Material)

El material suplementario publicado se encuentra a continuación.

Analytical and Bioanalytical Chemistry

Electronic Supplementary Material

In-syringe dispersive μ -SPE of estrogens using magnetic carbon microparticles obtained from zeolitic imidazolate frameworks

Alba González, Jessica Avivar, Fernando Maya, Carlos Palomino Cabello,
Gemma Turnes Palomino, Víctor Cerdà

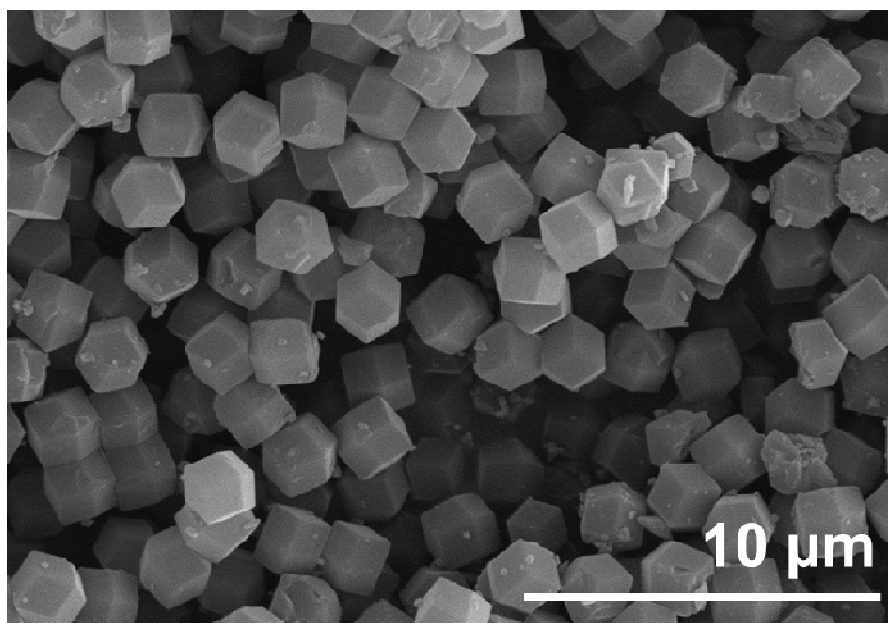


Fig. S1 SEM image of the prepared ZIF-67 crystals

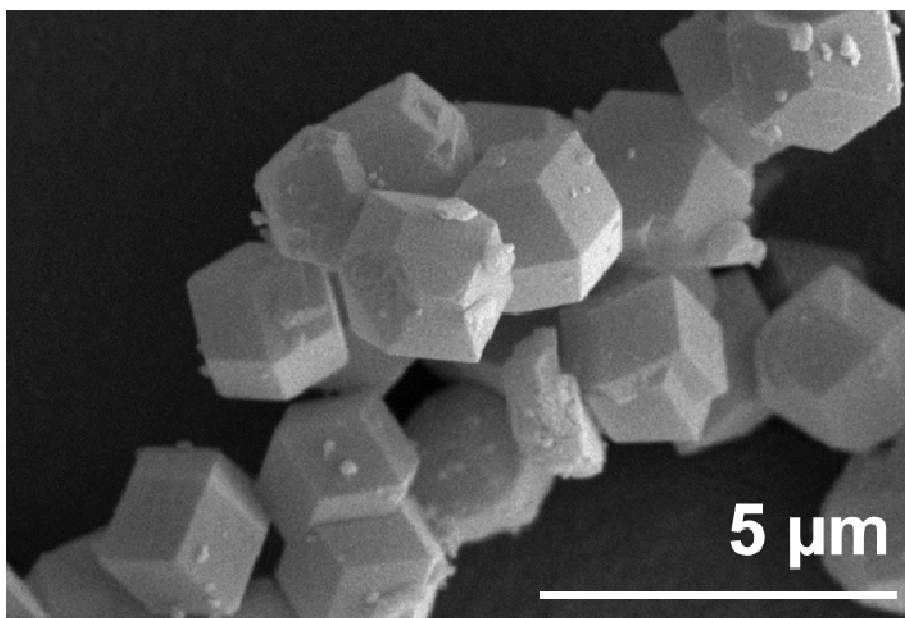


Fig. S2 SEM image of the prepared ZIF-67 crystals

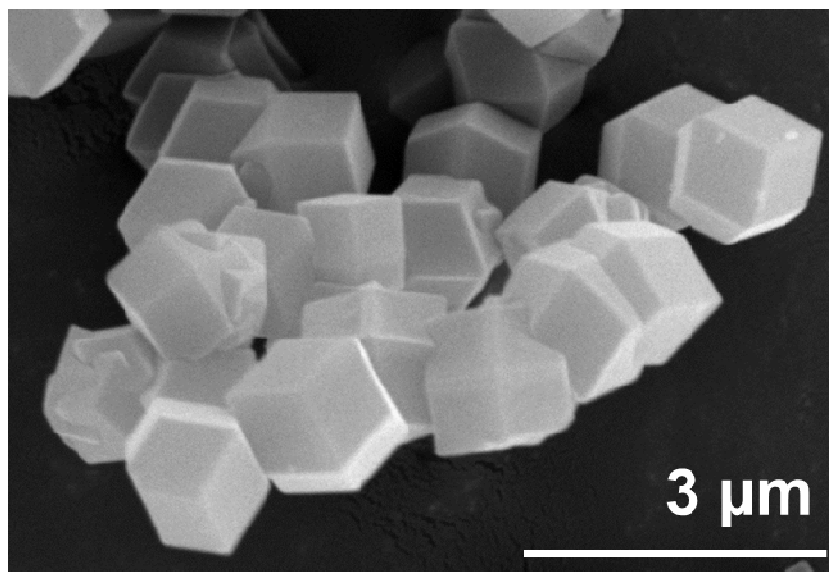


Fig. S3 SEM image of the prepared ZIF-67 crystals

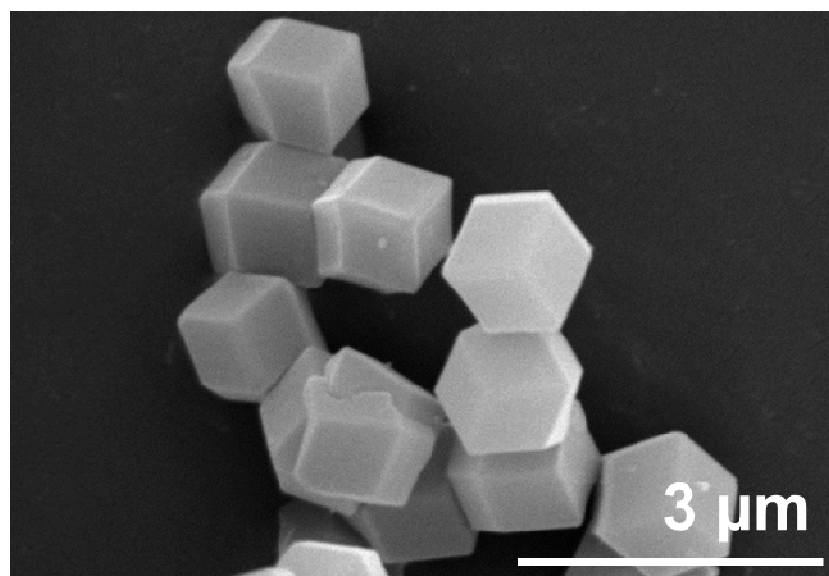


Fig. S4 SEM image of the prepared ZIF-67 crystals

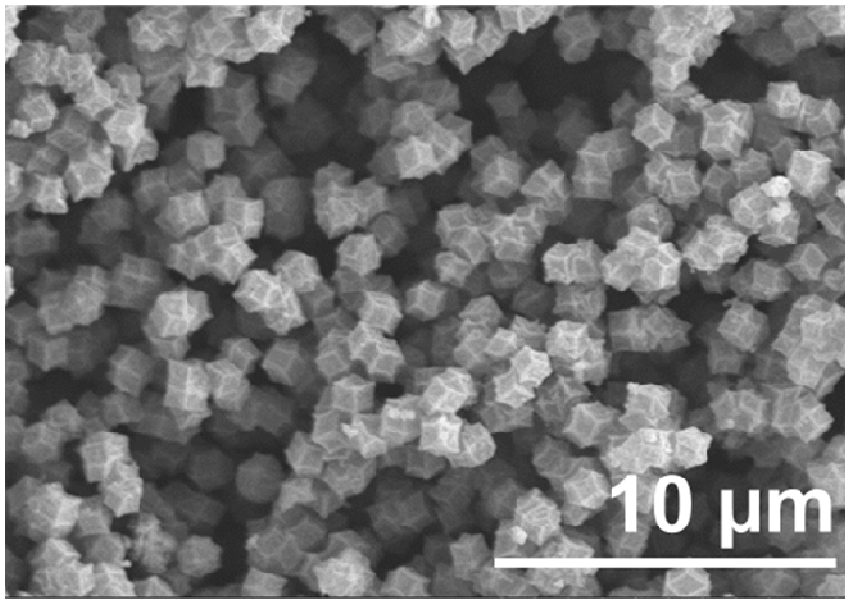


Fig. S5 SEM image of the prepared MPC

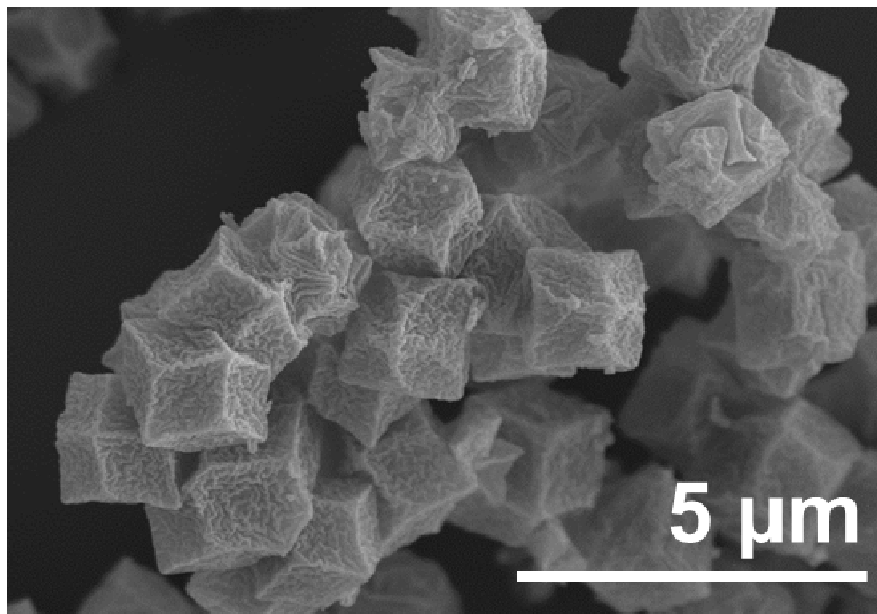


Fig. S6 SEM image of the prepared MPC

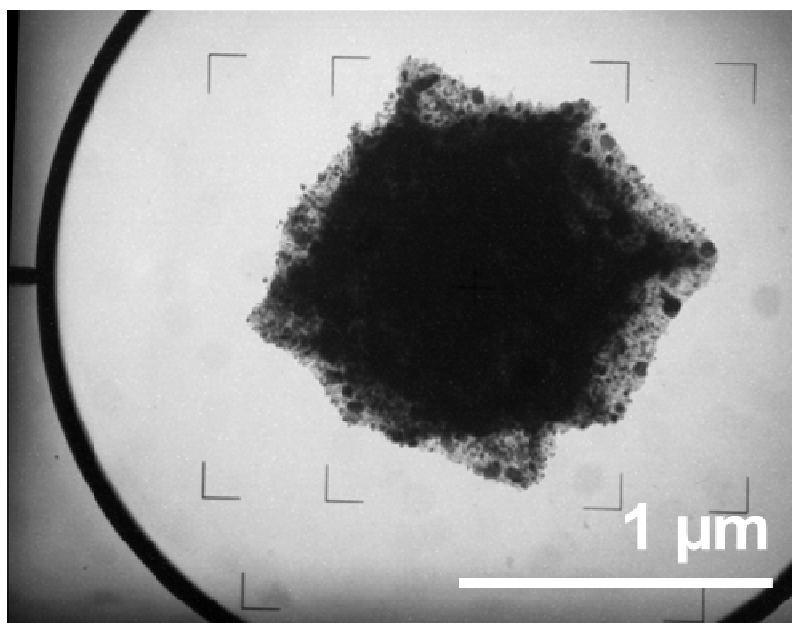


Fig. S7 TEM image of the prepared MPC

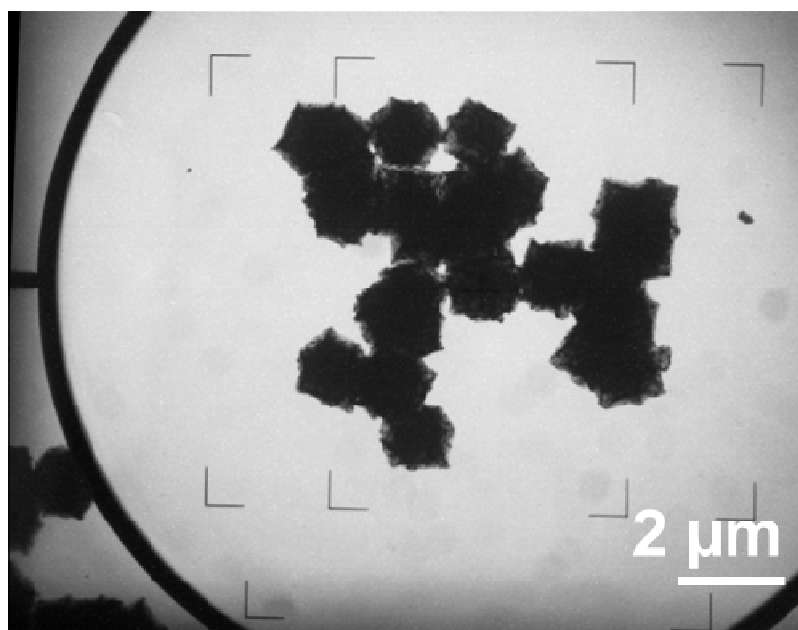


Fig. S8 TEM image of the prepared MPC

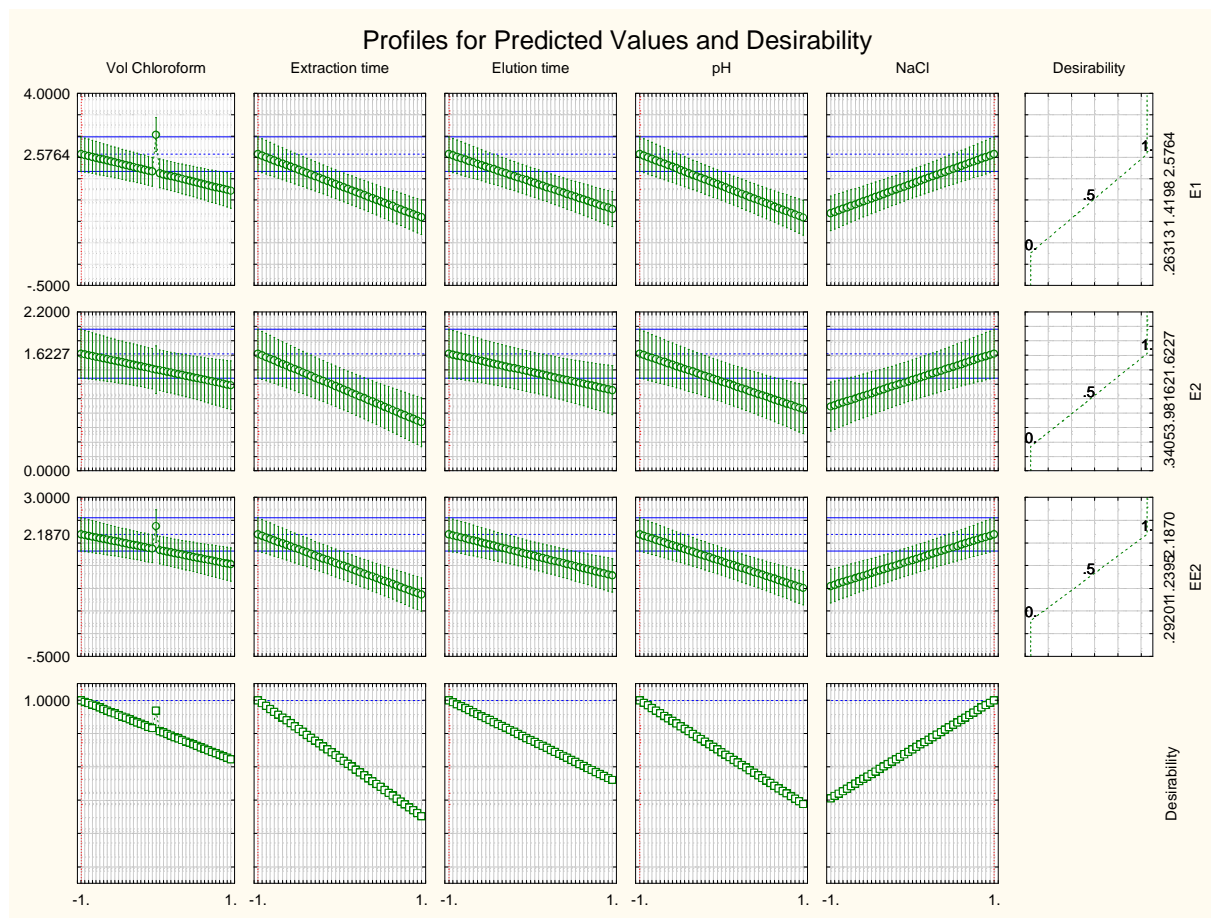


Fig. S9 Desirability chart for all the studied estrogens in the half-fraction factorial screening. Plotting from left to right: the volume of chloroform, the extraction time, the elution time, pH and NaCl concentration; from up to down: the response signal for E1, E2 and EE2 and finally the desirability function aiming to find the best response for all the studied estrogens. The red line shows the critical value for each variable according to the desirability. The green line shows the experimental data and the blue line the best value obtained according to the goals established. E1: estrone, E2: 17 β -estradiol, EE2: 17 α -ethynylestradiol

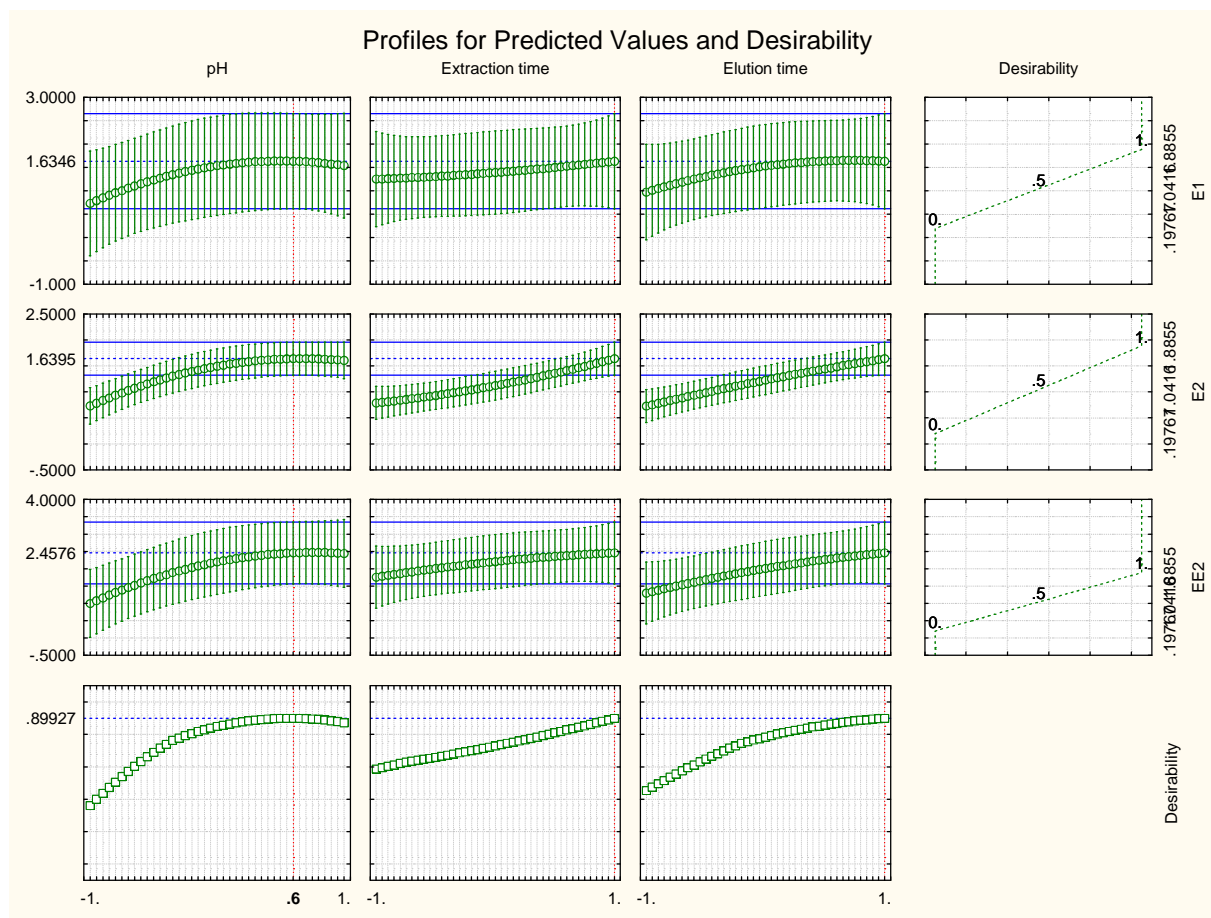


Fig. S10 Desirability chart for all the estrogens in the face centered central composite design. Plotting from left to right: pH, the extraction time and the elution time; from up to down: the response signal for E1, E2 and EE2 and finally the desirability function aiming to find the best response for all the studied estrogens. The red line shows the critical value for each variable according to the desirability. The green line shows the experimental data and the blue line the best value obtained according to the goals established. E1: estrone, E2: 17 β -estradiol, EE2: 17 α -ethynylestradiol

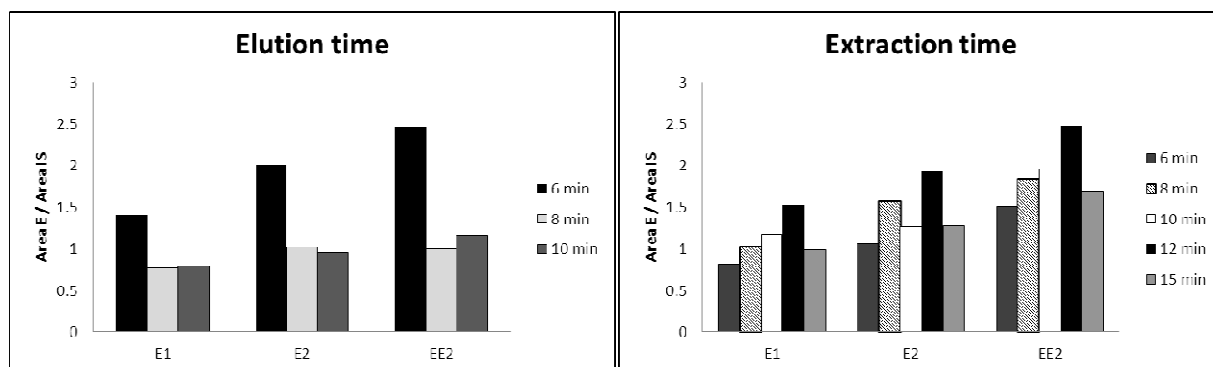


Fig. S11 Univariate optimization of the extraction and elution time of the studied estrogens. E1: estrone, E2: 17 β -estradiol, EE2: 17 α -ethynylestradiol

CAPÍTULO 7

**Desarrollo de un sistema SIA-LOV
combinado con derivatización en el
inyector-LVI-PTV-GC-MS para el
análisis de estrógenos en agua de mar**

7.1 Introducción y discusión

En este capítulo se presenta el primer procedimiento para la determinación de estrógenos en agua de mar que combina la técnica SIA-LOV para el pretratamiento de la muestra con una derivatización del extracto en el inyector y análisis por LVI-PTV-GC-MS.

El hecho de llevar a cabo la extracción en fase microsólida con un sistema SIA-LOV da como resultado un método rápido, simple y respetuoso con el medio ambiente, ya que se reducen considerablemente los volúmenes de disolventes orgánicos, y con ello, los residuos generados. Además de este bajo consumo de disolventes, la cantidad de resina necesaria para realizar la extracción es del orden de los miligramos, y la microcolumna formada en el sistema puede reutilizarse hasta 50 veces antes de ser renovada, por lo que representa un método mucho más económico que los pretratamientos manuales tradicionales.

Como se ha comentado anteriormente, este tipo de analitos requieren de una derivatización previa al análisis por cromatografía de gases. Así, una vez obtenido el extracto, se ha realizado la reacción correspondiente mediante la técnica de derivatización en el inyector (in-port derivatization). De este modo, se han disminuido aún más los tiempos de tratamiento de muestra y el gasto de reactivos, a la vez que se consigue un método más seguro para el analista, puesto que los agentes derivatizantes no son manipulados en cada análisis, sino que se encuentran permanentemente en un vial del automuestreador del cromatógrafo.

Para la determinación de los estrógenos se ha llevado a cabo una inyección de grandes volúmenes (large volumen injection, LVI) utilizando un inyector de tipo vaporizador con temperatura programable (programmable temperature vaporization, PTV). Adicionalmente, el uso de este inyector ha permitido la optimización de diferentes variables que afectan a la reacción de derivatización, como son la temperatura inicial del inyector o la presión de venteo.

Los parámetros analíticos del método han sido estudiados, consiguiendo resultados satisfactorios en términos de sensibilidad y precisión, con límites de detección del orden

de las partes por billón ($0,05 - 0,31 \mu\text{g L}^{-1}$) y RSDs menores al 7% para la repetitividad y 8,8% para la reproducibilidad.

Finalmente, el método ha sido aplicado con éxito a muestras reales de agua de mar, obteniendo recuperaciones de entre el 91 y el 110%.

7.2 Artículo original

A continuación se adjunta el artículo original "Estrogens determination exploiting a SIA-LOV system prior in-port derivatization-large volume injection-programmable temperature vaporization-gas chromatography" de A. González, S. Clavijo y V. Cerdà, así como su material suplementario, enviados el 7 de marzo de 2018 para su publicación en Talanta.

Manuscript Number: TAL-D-18-00770

Title: Estrogens determination exploiting a SIA-LOV system prior in-port derivatization-large volume injection-programmable temperature vaporization-gas chromatography

Article Type: Research Paper

Keywords: Estrogens; automation; microsolid phase extraction; in-port derivatization; programmable temperature vaporization; gas chromatography-mass spectrometry

Corresponding Author: Professor Victor Cerdà, PhD

Corresponding Author's Institution: University of the Balearic Islands

First Author: Alba González

Order of Authors: Alba González; Sabrina Clavijo; Victor Cerdà, PhD

Abstract: In this work, we present a method for the clean-up, preconcentration and quantification of the four most widely found estrogens (estrone E1, estradiol E2, estriol E3 and ethynyl estradiol EE2) in seawater samples. A sequential injection analysis-lab on valve system (SIA-LOV) has been developed to perform the microsolid phase extraction (μ SPE) of the analytes in a fully automated way. After testing different resins and solvents, C18 resin with acetonitrile (ACN) as eluent have been chosen as they provided the best results. Several parameters affecting the extraction have been studied and optimized. Besides, extraction column lifetime has also been checked as it is indicative of the number of consecutive analysis that the column is able to perform before replacing it. Results showed that the same column can be used up to 50 times. Then, the derivatization of the extracts has been performed unattended by exploiting an in-port derivatization of the analytes with N-methyltrimethylsilyltrifluoroacetamide (BSTFA) prior their quantification using large volume injection with programmable temperature vaporization gas chromatography (LVI-PTV-GC-MS).

Opposed Reviewers:

Estrogens determination exploiting a SIA-LOV system prior in-port derivatization-large volume injection-programmable temperature vaporization-gas chromatography

Alba González¹, Sabrina Clavijo¹, Víctor Cerdà^{1,2}.

¹*Sciware Systems, S.L. Spin-off from the University of the Balearic Islands, C/ Pi 37, 07193, Illes Balears, Spain*

²*Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of the Balearic Islands, Carretera de Valldemossa km 7.5, E-07122 Palma de Mallorca, Illes Balears, Spain*

* Corresponding author: E-mail: victor.cerda@uib.es; Telephone: +34 971173261

ABSTRACT

In this work, we present a method for the clean-up, preconcentration and quantification of the four most widely found estrogens (estrone E1, estradiol E2, estriol E3 and ethynyl estradiol EE2) in seawater samples. A sequential injection analysis-lab on valve system (SIA-LOV) has been developed to perform the microsolid phase extraction (μ SPE) of the analytes in a fully automated way. After testing different resins and solvents, C18 resin with acetonitrile (ACN) as eluent have been chosen as they provided the best results. Several parameters affecting the extraction have been studied and optimized. Besides, extraction column lifetime has also been checked as it is indicative of the number of consecutive analysis that the column is able to perform before replacing it. Results showed that the same column can be used up to 50 times. Then, the derivatization of the extracts has been performed unattended by exploiting an in-port derivatization of the analytes with N-methyltrimethylsilyltrifluoroacetamide (BSTFA) prior their quantification using large volume injection with programmable temperature vaporization gas chromatography (LVI-PTV-GC-MS).

Keywords: Estrogens; automation; microsolid phase extraction; in-port derivatization; programmable temperature vaporization; gas chromatography-mass spectrometry

1. INTRODUCTION

During recent years the presence of estrogens in the aquatic environment has raised great concern. Some natural estrogens, as estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), and estriol (E3), and synthetic ones, like 17 α -ethynylestradiol (EE2), have been catalogued as Contaminants of Emerging Concern by the Environmental Protection Agency of the United States (US-EPA) [1] since they have endocrine-disrupting properties and can cause adverse health effects in organisms or its progeny, as consequence of changes in their endocrine function [2,3].

Many techniques have been used for the determination of estrogens, i.e. enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [4], radioimmunoassay [5], and chromatography [6,7]. Among them, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) is one of the preferred techniques as it allows the simultaneous separation and identification of both natural and synthetic estrogenic steroids [8]. However, before the injection in the chromatograph a previous step of sample clean-up and analytes preconcentration is mandatory in order to attain matrix removal and also a preconcentration of the analytes, which are expected to be in very low concentrations in the environment. Liquid-liquid extraction (LLE) and solid phase extraction (SPE) are widely used for this purpose. Usually, LLE methods require the use of large volumes of volatile organic solvents, while SPE is faster and more environmentally friendly. For this reason, SPE is preferred over LLE. Both off-line [9] and on-line [10,11] SPE methods have been reported for the determination of estrogens in water samples. Furthermore, the combination of SPE with flow analysis techniques offers important advantages as the minimizing of the sample and reagents consumption (green chemistry) and also the improvement in the precision of the method. Besides, a significant decrease of time and cost per analysis is achieved. Within this context, a lab on valve system (SIA-LOV) has

been developed to carry out the μ SPE of the studied analytes. LOV technique is especially suitable when dealing with SPE pretreatment, because it permits the use of smaller amounts of resin (compared with conventional SPE) and its automated transport in the system to renew the microcolumn when necessary with a high degree of repeatability [12].

As it is widely known, estrogens are non-volatile compounds; hence derivatization is needed for their quantification using gas chromatography. Typically, derivatization reactions are carried out off-line, requiring additional time before sample analysis and leading to experimental errors such as contamination of the samples or a loss of sample due to evaporation and re-suspension steps [13]. On-line derivatization [14] can reduce the time needed to process the sample, decrease the amount of reagents used and increase the efficiency and speed of the analysis [15]. In-port derivatization is one of these on-line approaches, which involves introducing both the derivatization reagent and the sample directly into the GC inlet, where the reaction takes place in gas-phase. The reagent and sample can be injected manually, what requires the presence of the analyst to start each analysis [16], or using a software-controlled autosampler that allows the sequential injection of the sample and reagents, giving better repeatability results since no analyst intervention is needed [13]. In the present work, the second option has been exploited. Moreover, in order to study the variables affecting the derivatization reaction, the injection has been carried out by using programmable temperature vaporization technique (PTV-GC-MS) [17]. During the injection, the inlet is kept cool while solvent vaporization occurs. Solvent vapours are separated from analytes through venting of the vapour in the liner, and then the inlet is heated up quickly to transfer the sample into the column using a temperature controlled program. Besides, this technique enables injecting up to hundreds of microliters of the extract

(Large Volume Injection, LVI) instead to the conventional 1 to 2 μL , increasing method sensitivity.

Therefore, the aim of this work is to accomplish a μSPE exploiting a SIA-LOV system prior in-port derivatization-LVI-PTV-GC-MS analysis to carry out the extraction, preconcentration and determination of estrogens in seawater samples. Several parameters affecting both the μSPE and the chromatographic analysis have been studied and optimized. The applicability of the proposed method to seawater samples has been evaluated.

2. EXPERIMENTAL

2.1 Chemicals, solutions, samples and materials

All solutions were prepared in distilled water from a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA) (resistivity $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) or in GC-grade methanol (Scharlau, Barcelona, Spain).

Hexane, acetone and acetonitrile (Scharlau) were tested as eluents. Sodium chloride (NaCl) of analytical reagent grade (Scharlau) was used to adjust the ionic strength of the standards. Estrone (E1), β -estradiol (E2), 17α -ethynylestradiol (EE2), estradiol (E3) and estrone 3-methyl ether (internal standard, IS) were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Stock solutions of estrogens were prepared by accurately weighing the appropriate mass of each compound and by dissolving it in methanol obtaining a final concentration of 1000 mg L^{-1} . Stock solutions were kept in the dark at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Working standard solutions containing either mixtures or individual compounds were prepared daily by dilution of the stock solutions in acetonitrile (for the direct injection of the solution into the gas chromatograph), or in

water containing 23.9 g/L NaCl and adjusted to pH= 6.0 using NaOH 0.1 mol L⁻¹ and HCl 0.1 mol L⁻¹. For the derivatization, N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with trimethylchlorosilane (BSTFA+TMCS, 1%) was used as derivatization reagent, and pyridine (Py) as a solvent, both purchased from Sigma-Aldrich. Derivatization solution was prepared daily by mixing 150 µL BSTFA+TMCS, 45 µL of Py and 5 µL of IS into an amber vial, which was placed in the chromatograph autosampler to perform the in-port derivatization.

Resins tested were obtained from SPE cartridges of BOND ELUT C18 sorbent (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) and OASIS HLB sorbent (Waters Corporation, Milford, MA, USA).

Seawater samples collected from four different locations in Mallorca (Balearic Islands, Spain) were stored at 4 °C in amber glass bottles. Due to the presence of solid particles, samples were filtered through 0.22 µm nylon filters before analysis. Finally, they were adjusted to pH= 4.6 using NaOH 0.1 mol L⁻¹ and HCl 0.1 mol L⁻¹.

2.2 SIA-LOV manifold and software

A schematic depiction of the developed SIA-LOV system is shown in Figure 1. The basic elements of the pretreatment system were an automatic burette (SM) (CRISON, Alella, Spain) equipped with a 5-mL glass syringe (S) (Hamilton, Switzerland) and coupled through a holding coil to the central port of a LOV (Sciware Systems, Bunyola, Spain) mounted atop of an eight-port selection valve (SV) (Sciware Systems). In order to support organic solvents, the LOV is fabricated from Ultem encompassing eight microchannels (1.5mm i.d. and 28.0mm length, excepting the resin reservoir and column channels made of 3.0mm i.d.). One of the LOV channels (port 5) served as microcolumn position. The column is filled in with 0.05 mg of C18 resin, loaded from a

suspension of the resin in MeOH contained in a 3 mL plastic syringe (resin reservoir) mounted vertically in port 8. To prevent the resin from escaping, the outlet of the column channel was furnished with a 35 μ m pore diameter glass frit, allowing the solutions to flow while retaining the resin. The rest of the LOV peripheral ports contained the reagents used to carry on the μ SPE, as follows: water (port 1), MeOH (port 2), air (port 3), sample (port 4), ACN (port 6) and waste (port 7).

The manifold is composed of poly(tetrafluoroethylene) (PTFE) tubes with 0.8 mm i.d., excepting the holding coil, with 1.5 mm i.d., for reagents and sample aspiration. Instrumental control is performed with the software AutoAnalysis (Sciware Systems), which permits the automatic control of the flow manifold used through a very simple interface.

2.3 Automated SIA-LOV procedure

The analytical procedure is detailed in Table 1. First, the LOV is positioned in port 1 and 2.0 mL of water are loaded at 2.0 mL min⁻¹ into the holding coil (HC). Then, the μ SPE is performed by loading 2.0 mL of the sample (port 4) into the HC at 2.0 mL min⁻¹ and dispensing them to the column (port 5) at 1.5 mL min⁻¹. After, the washing of the column to eliminate possible interferences is carried out by aspirating 2.0 mL of water (port 1) at 2.0 mL min⁻¹ and dispensing them on the column (port 5) at 1.0 mL min⁻¹. To discard the water inside the LOV channels before the elution, 1 mL of air is picked-up through port 3 at 1.0 mL min⁻¹ and dispensed to the column (port 5) at 0.6 mL min⁻¹. Afterwards, the elution is performed by aspirating 0.2 mL of ACN (port 6) at 2.0 mL min⁻¹ and sending them to the column (port 5) at 1.0 mL min⁻¹. The extract is pushed with 0.15 mL of ACN through the LOV column channel to collect it into a chromatographic vial. Finally, the reconditioning of the column is carried out by

sequentially aspirating and passing through the column 1.0 mL of MeOH (port 2) and 1.0 mL water (1 mL) at 0.6 mL min⁻¹. The collected extracts are evaporated to dryness under a nitrogen stream, redissolved with 0.2 mL of ACN and placed in the GC-MS autosampler to carry out the in-port derivatization prior LVI-PTV-GC-MS analysis.

2.4 In-port derivatization-LVI-PTV-GC-MS analysis

A GC-MS (Agilent 7890 with mass spectrometer HP 5973C) equipped with a Programmable Temperature Vaporization injector and an ultra-inert splitless liner (Agilent 5190-2293) was used for the determination of the analytical parameters and samples analysis. The MS operated in the electron impact (EI) mode (70 eV). The EI ion source, the quadrupole mass analyzer, and the interface temperatures were maintained at 230, 150, and 280 °C, respectively. System control and data acquisition were achieved with HP ChemStation Software. Helium (99.999%) was employed as carrier gas at the flow rate of 1.0 mL min⁻¹.

As mentioned above, in-port derivatization and large volume injection were simultaneously performed. Thus, sandwich injection was carried out by sequentially aspirating 25 µL of the derivatization solution and 25 µL of the sample, allowing an air gap of 2 µL between them. Then, LVI-PTV was operated in solvent vent mode and with the following optimized conditions: Injector initial temperature was set at 100 °C, and a vent pressure of 10 psi was applied. The solvent was purged out with a vent flow of 25 mL min⁻¹ within 1 min. Then, the injector temperature increased at 300 °C min⁻¹ to 300 °C and held during 5 min. Analytes were separated on a 30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 mm film thickness DB5 (methyl 5% phenyl polysiloxane) GC column with the following temperature program: start at 100 °C for 1 min, increase at 20 °C min⁻¹ to 200 °C, then

increase at 5 °C min⁻¹ to 280 °C and held for 8 min, with a total run of 30 min and 7 min of solvent delay.

The MS is equipped with the mass spectral library NIST MS search 2.0. It was tuned to *m/z* 69, 219, and 502 for the EI corresponding to perfluorotributylamine. It was operated in the total ion current mode, scanning from *m/z* 50 to 550 for identification purposes. The mass peaks that offer the highest intensity for each compound were selected in order to obtain the highest sensitivity, and the acquisition was carried out in the selected ion monitoring mode. Quantitative ions for each analyte were set as follows: IS: 160, 199, 284; E1: 73, 218, 257, 342; E2: 73, 129, 285, 416; EE2: 73, 285, 300, 425, 440; E3: 73, 129, 147, 311, 345 *m/z*.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Selection of the resin and eluent

Selection of the resin and eluent was performed on-line with aqueous solution containing 0.5 mg L⁻¹ of each estrogen. A poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone) sorbent (Oasis HLB) [18] and an octadecyl sorbent (BOND ELUT C18) [19] were compared, while hexane, acetone and acetonitrile were studied as eluent solvents. 30 mg of each resin (prepared in 1 mL MeOH as a suspension) were aspirated from the resin reservoir and dispensed into the column channel. The column was conditioned using 1 ml of MeOH followed by 1 mL of water; the flow rate used to propel solutions towards the column was set at 0.6 mL min⁻¹. Afterwards, 5 mL of the aqueous solution were dispensed through the column. Next, the analytes were eluted using 0.5 mL of each tested solvent, and the collected eluate was evaporated to dryness and then redissolved into 0.5 mL of the corresponding solvent. Finally, 100 µL of the extract were manually

derivatized inside an amber vial adding 150 μL of BSTFA, 45 μL of Py and 5 μL of IS. After 30 minutes, the derivatized samples were injected into the gas chromatograph.

Hexane was discarded for system limitations, as it was too dense. Among acetonitrile and acetone, the first one had a better performance, since when using acetone the chromatograms showed lack of reproducibility. Taking into account these results, ACN was selected as eluent.

Regarding the resin, both OASIS and C18 showed extraction capacity. To evaluate the results, the signals obtained with each resin (peak area) were statistically compared with a t-test. The results showed that there were no significant differences at the 95% confidence level for E1 and EE2. However, for E2 and E3 the differences between the signals were statistically significant, obtaining higher peak areas when using C18 resin. Moreover, with C18 the achieved RSDs were lower than with OASIS (RSD < 5.4% and 9.6%, respectively). Thus, C18 sorbent with ACN as eluent were finally chosen.

3.2 μSPE optimization

The main variables affecting the μSPE procedure were tested in order to study their influence on the clean-up and preconcentration efficiency. The selected variables and their initial value were: amount of sorbent (30 mg), sample pH (6), sample volume (5 mL), sample loading flow-rate (0.6 mL min^{-1}), washing solution volume (5 mL), washing solution flow-rate (0.6 mL min^{-1}), eluent solvent volume (0.5 mL) and eluent solvent flow rate (0.6 mL min^{-1}). Once each variable was optimized (following the presented sequence) it was fixed for further studies. Sample solution was prepared dissolving 23.9 g/L of NaCl in Mili-Q water (seawater salinity) [20] and spiking 0.5 mg L^{-1} of each estrogen. Peak areas of the estrogens divided by the peak area of the IS were used as response signal (Relative Peak Area, RPA).

3.2.1 Amount of sorbent

Different amounts of resin were tested, i.e. 30, 50 and 80 mg. As can be seen in Figure 2A, 50 mg showed the best performance for all the analytes. Thus, 50 mg of C18 sorbent were chosen as optimum.

3.2.2 Washing solution composition, volume and flow rate

First, the composition of the washing solution was studied, using real sea samples filtered and spiked with 0.5 mg L^{-1} of each estrogen. Pure water and water with 2%, 5% and 10% of ACN were tested. The results showed that the addition of ACN provided no significant improvement with respect to matrix effects, as the peak areas obtained when washing the column with pure water after real samples extraction were equal to those obtained with Mili-Q standards. Thus, water was selected as washing solution.

Next, its volume and flow rate were also optimized. Volumes of 2, 4, 6 and 8 mL were studied. As can be seen in Figure 2B, 8 mL of water showed the best performance. However, we compared the areas obtained with 8 mL and 2 mL (as 2 mL is the more convenient volume for us, since it shortens the procedure) using a t-test. The results showed that, at the 95% confidence level, there were no significant differences between the signals. For this reason, we selected 2 mL as the optimum volume of washing solution.

Then, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 and 1.5 mL min^{-1} were tested as washing solution flow rate. As it is shown in Figure 2C, 0.6 mL min^{-1} gave the higher peak areas, but there were statistically equal to those areas obtained with 0.8 mL min^{-1} and 1.0 mL min^{-1} . Therefore, 1.0 mL min^{-1} was selected as optimum washing solution flow rate in order to achieve a higher frequency of analysis.

3.2.3 Sample pH, volume and flow rate

The influence of the pH of the sample was studied. Sample pH was adjusted to 4.5, 6.0 and 8.0 using NaOH 0.1 mol L⁻¹ and HCl 0.1 mol L⁻¹. Optimum pH was set at pH= 6 since it gave the best performance, as it is shown in Figure 2D. Then, different sample volumes (2, 4, 6, 8, 10, 15 and 20 mL) were tested (Figure 2E). As expected, the signals increased when increasing sample volume. Nonetheless, when normalizing the results (dividing each area by its corresponding sample volume) we can observe that the effect is not significant. Therefore, 2 mL of sample were selected for further essays to decrease the analysis time. In case that lower detection limits were needed for the samples, sample volume can be get increased until 20 mL, the highest volume tested. Next, sample flow rates between 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 and 1.5 mL min⁻¹ were checked (Figure 2F). There were no significant differences between the signals; hence 1.5 mL min⁻¹ was used in further essays to decrease analysis time.

3.2.4 Eluent volume and flow rate

Different ACN volumes (0.2, 0.4 and 0.6 mL) and flow rates (0.6, 0.8, 1.0, 1.2 and 1.5 ml min⁻¹) were evaluated. As it is shown in Figure 2G, the highest signals were obtained when using 0.2 mL of ACN. Then, 0.2 mL was set as optimum ACN volume. Regarding flow rate, no significant differences were found in the peak areas (Figure 2H). However, the reproducibility decreases when increasing flow rate. Thus, 1.0 mL min was chosen as a compromise solution.

3.3 Resin durability

Column lifetime is indicative of the number of analysis that can be performed without changing the column, and it is also related to the repeatability of the method. Results obtained revealed that the column can be used up to fifty times with a RSD<11%.

3.4 In-port derivatization-LVI-PTV optimization

3.4.1 Injection volume

Different volumes were tested to perform the large volume injection, i.e. 20, 50 and 100 μL , under the following chromatographic conditions (given by the tool “Solvent Elimination Calculation” from ChemStation Software): 90°C for injector initial temperature, 570 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ for injector heating rate, 44 mL/min for vent flow, 0.3 psi for vent pressure and 0.2 min for vent time. Results showed peak areas were comparable when injecting 50 and 100 μL . However, when injecting 50 μL peaks were well defined and more reproducible than with 100 μL , probably due to a saturation caused when injecting the highest volume. Taking into account these results, 50 μL was chosen as optimum injection volume.

3.4.2 Multivariate optimization

Multivariate designs were used to study the parameters affecting the analytical signal [21]. The statistical software Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa, USA) was employed for the entire multivariate optimization. First, a full factorial screening (2k) was performed, including three center points per block, to find out which parameters had a significant effect upon the response. RPA were used as response signal.

In order to evaluate the best conditions for all the analytes, individual responses were transformed into a single one using the mathematical-statistical equations indicated by Derringer and Suich [22]. The individual desirability function of each

estrogen was calculated according to Equation 1, where y_i represents the analytical signal; L represents the lower signal and H the upper signal obtained. Then, the overall desirability (D) was calculated by determining the geometric mean of individual desirability (d_i) (Equation 2).

$$d = \frac{y_i - L}{H - L} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$D = (d_1 \times d_2 \times d_3 \dots d_k)^{1/k} \quad (\text{Eq. 2})$$

The variables and ranges studied were: vent flow (25-100 mL min⁻¹), injector initial temperature (60-100 °C), injector heating rate (300-900 °C min⁻¹), vent pressure (2-10 psi) and vent time (0.5-1 min).

As can be seen in the screening desirability chart (Figure S1, Supporting Information), all the estrogens had the same tendency. According to the results obtained, the studied ranges were readjusted to apply a response surface face-centered central composite design (CCD) and attain their critical values. Pareto charts showed that injector heating rate and vent time had no significant effect upon the signal; hence they were fixed at their optimum value showed in the desirability graphic (300 °C min⁻¹ and 1 min, respectively). Vent flow had a negative effect, so it was fixed at 25 mL min⁻¹ as it could not be further lowered because of system limitations. Regarding injector initial temperature and vent pressure, they showed a positive effect. Thus, their ranges were increased to 80-120 °C and 8-12 psi, respectively. Then, CCD design was carried out. As it is shown in the obtained desirability chart (Figure S2), the optimum values were 100 °C for injector initial temperature and 10 psi for vent pressure, which were used in further assays. The experimental domains studied and optimum values obtained are presented in Table S1.

3.5 Method evaluation

In order to evaluate the performance of the proposed method, its figures of merit were studied and listed in Table 2.

Linear working range has been established from the LOQ to the highest standard analyzed. As can be seen in Table 2, the studied estrogens can be quantified in a wide range of concentrations, i.e. 0.3–500 $\mu\text{g L}^{-1}$ of E1, 0.4–500 $\mu\text{g L}^{-1}$ of E2, 1.1–500 $\mu\text{g L}^{-1}$ of EE2 and 0.2–500 $\mu\text{g L}^{-1}$ of E3. These ranges have been obtained using a sample volume of 2 mL; however, higher sample volumes have been tested and it can be increased until 20 mL to increase the enrichment of the analytes and concomitantly the sensitivity of the method.

Precision was evaluated analysing sample 1 (seawater from Port de Sóller in Mallorca) spiked with 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ of each estrogen. Intra-day precision corresponds to the RSD obtained when analysing the sample in 7 consecutive determinations within the same day ($n=7$). As it is shown in the table, RSDs $\leq 7.0\%$ were achieved. Inter-day precision is expressed as the RSD of the sample analyzed during six different days ($n = 6$). For all the analytes, RSDs of 8.8% or less were attained.

A comparison with previously reported methods for estrogens determination has been listed in Table 3. As can be seen, lower [7] or similar LODs [23-26] have been achieved; LODs are expressed in mass since the volume of sample used in the proposed method is considerably lower. Moreover, the recoveries achieved when applying the developed method to the analysis of real samples are much better than the ones obtained with previous SPE-LVI-PTV-GC-MS methods [23,24].

On the other side, the presented μ SPE procedure can perform the sample treatment unattended, which results in a significant time saving for the analyst, and consumes lower amounts of reagents (from 5 [25] to 10 times [7] less reagent consumption) and also smaller amounts of resin (50 mg that can be used to perform up to 50 extractions, instead of the single-use C18 commercial cartridges containing 500 mg of sorbent). All these features prove that the method suits the demand of green analytical procedures, while the good recoveries and precision obtained ensures the applicability of the method to the analysis of environmental samples.

3.6 Application to seawater samples

The applicability of the proposed method was evaluated by analysing four seawater samples from different locations in Mallorca, Balearic Islands, Spain (Sample 1: Port de Sóller; Sample 2: Portitxol; Sample 3: Ca'n Pere Antoni; Sample 4: Son Moll, Cala Ratjada). Figure 3 shows an example of a chromatogram of a sample with and without spiking. No estrogens were detected in the samples, which were subsequently spiked at two different levels with each of the studied analytes, i.e. $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (low level) and $50 \mu\text{g L}^{-1}$ (high level). Results are shown in Table 4. As can be seen, recoveries ranged from 96 to 105% for Sample 1, 91 to 108% for Sample 2, 92 to 110% for Sample 3 and 92 to 107% for Sample 4. Furthermore, as explained previously, Sample 1 was used to study the accuracy of the method, showing a satisfactory intra-day and inter-day precision. Therefore, the applicability of the method to this kind of samples is validated.

4. CONCLUSION

A SIA-LOV-in-port derivatization-LVI-PTV-GC-MS method has been developed to carry out the analysis of estrogens in seawater samples. To the best of our knowledge this is the first method for estrogens determination combining an automated sample

pretreatment with on-line derivatization of the extract and LVI-PTV-GC-MS analysis. Performing the μ SPE using a SIA-LOV system has proved to be rapid and environmentally friendly, since the amount of organic solvents needed is drastically reduced compared to traditional SPE procedures. Besides, due to the small amount of resin used and its long durability, the method has proved to be more economical than batch methods which utilize ten times more resin for only one extraction. Furthermore, the renewal of the extraction microcolumn is carried out in a fully automated way; hence no intervention of the analyst is required, resulting in a simple and reproducible method which can be performed unattended. After the automatic extraction and preconcentration, a large volume injection technique with programmable temperature vaporizer in combination with GC-MS has been exploited. In-port derivatization has been carried out prior separation, representing an important saving in terms of reagents consumption, sample preparation time and time per analysis. Several parameters affecting both the preconcentration and the chromatographic analysis have been studied and optimized, and the method has proved to be a useful tool to determine estrogens in seawater samples given the good precision and recoveries obtained.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) through Project CTQ-2016-77155-R co-financed by The Spanish Agencia Estatal de Investigación and FEDER funds. (AEI/FEDER, UE). S. Clavijo acknowledges to the Torres Quevedo Program of the MINECO co-financed with European Funds for the financial support through the PTQ-2015-08038. A.G. also acknowledges financial support from MINECO for her predoctoral fellowship (DI-15-07998). Authors acknowledge Joana Miralles for her support.

Tables

Table 1. Detailed analytical procedure of the SIA-LOV procedure to perform the automatic μ SPE of the estrogens. S: Syringe; SV: Selection valve.

		Syringe	SV
1	Start Loop		
2	Load water	Pick up 2.0 mL	1
3	Load sample	Pick up 2.0 mL	4
4	Dispense sample to the column	Dispense 2.0 mL	5
5	Load water	Pick up 2.0 mL	1
6	Wash column	Dispense 2.0 mL	5
7	Load air	Pick up 1.0 mL	3
8	Dry column and channel	Dispense 1.0 mL	5
9	Load ACN	Pick up 0.35 mL	6
10	Elution	Dispense 0.35 mL	5
11	Load MeOH	Pick up 1.0 mL	2
12	Dispense MeOH	Dispense 1.0 mL	5
13	Load water	Pick up 1.0 mL	1
14	Dispense water	Dispense 1.0 mL	5
15	Repeat Loop (n=3)		

Table 2. Figures of merit of the proposed SIA-LOV system combined with in-port derivatization-LVI-PTV-GC-MS analysis.

	E1	E2	EE2	E3
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.10	0.12	0.31	0.05
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.34	0.39	1.05	0.17
Linear range ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.3-500	0.4-500	1.1-500	0.2-500
Calibration curve	$y = 1.646x + 0.018$	$y = 1.439x$	$y = 0.540x + 0.012$	$y = 3.372x$
Correlation coefficient	0.999	0.975	0.998	0.998
Intra-day precision (%) (n=7)	5.6	6.8	6.0	7.0
Inter-day precision (%) (n=6)	6.7	8.8	6.3	7.8

Table 3. Comparison of the proposed method with previously reported methods for estrogens determination.

Method	Sample volume (mL)	Reagent consumption per extraction (mL)	LOD (ng)			RSD (%)			Recovery (%)			Reference			
			E1	E2	E3	E1	E2	EE2	E3	E1	E2		EE2	E3	
SPE-LVI-PTV-GC-MS	100	28	0.3	0.06	0.05	0.6	3.0-10.0	2.0-8.0	2.0-9.0	1.0-8.0	77-129	74-106	76-230	76-100	[23]
SP-LVI-PTV-GC-MS	1000	25	0.12	0.1	0.11	0.6	5.7-9.5	6.3-8.0	2.2-6.6		54-65	61-68	61-77		[24]
SPE-GC-MS	1000	41	10	2	5	10	3.0-5.0	4.0-5.0	2.0-3.0	16.0-22.0	94-98	99-109	96-100	82-98	[7]
SPE-GC-MS	3000	21	0.09	0.09	0.84	4.3	4.3	1.7		3.6	101	97		95	[25]
SPE-GC-MS	200	23	0.06	0.04	0.05	0.02	9.8	7.4	7.1	13.0	127	90	87	112	[26]
μSPE-in port derivatization-LVI-PTV-GC-MS	2	4.35	0.2	0.24	0.62	0.1	5.6	6.8	6.0	7.0	92-110	94-106	92-104	91-105	Present work

Table 4. Recoveries of estrogens from seawater samples with the proposed method. Levels of spike: Level 1= 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, Level 2= 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Sample conditions: pH= 6.

Sample	Analyte	Recovery (%)	
		Level 1	Level 2
Sample 1	E1	99	96
	E2	103	102
	EE2	98	104
	E3	105	100
Sample 2	E1	103	108
	E2	105	99
	EE2	98	104
	E3	95	91
Sample 3	E1	110	92
	E2	106	94
	EE2	102	95
	E3	98	93
Sample 4	E1	107	104
	E2	106	95
	EE2	92	98
	E3	97	102

Figure captions

Figure 1. Schematic depiction of the developed SIA-LOV system for estrogens extraction and preconcentration prior in-port derivatization-LVI-PTV-GC-MS analysis.

HC: Holding Coil; S: Syringe; SM: Syringe Module; SV: Selection Valve

Figure 2. Results of the LOV-SPE optimization. A) Amount of C18; B) Washing solution volume ; C) Washing solution flow rate; D) Sample pH; E) Sample volume; F) Sample flow rate; G) ACN volume; H) ACN flow rate.

Figure 3. Chromatogram obtained for sample 2 (red) and sample 2 spiked with $50 \mu\text{g L}^{-1}$ of the studied estrogens (blue). (1) E1, (2) E2, (3) EE2 and (4) E3.

Figure 1.

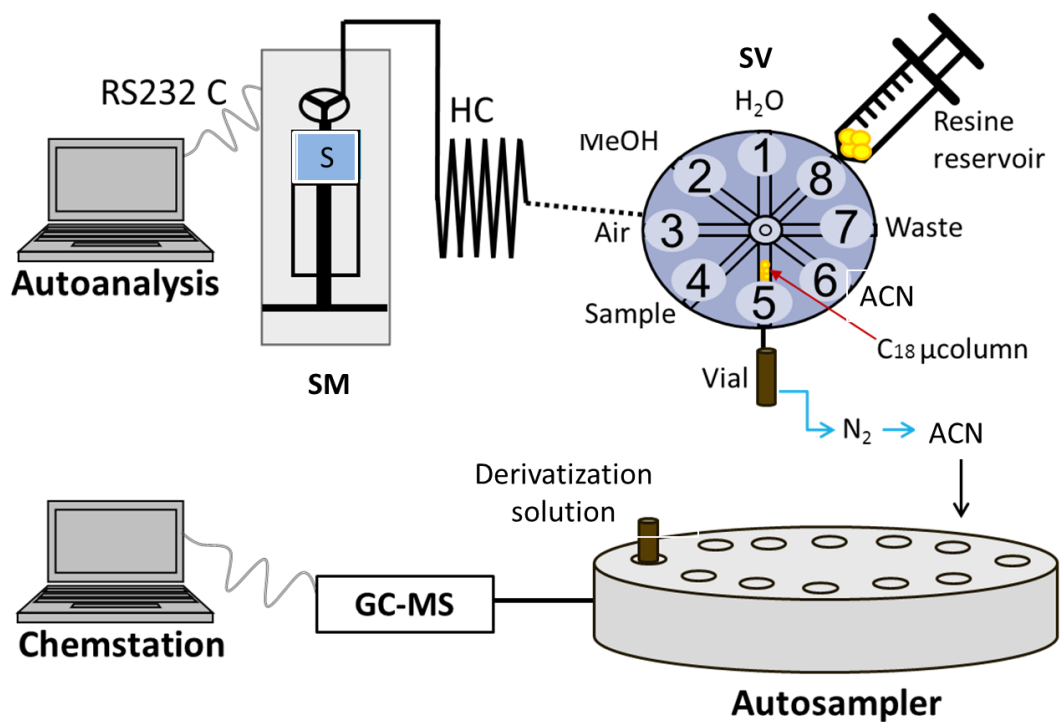


Figure 2.

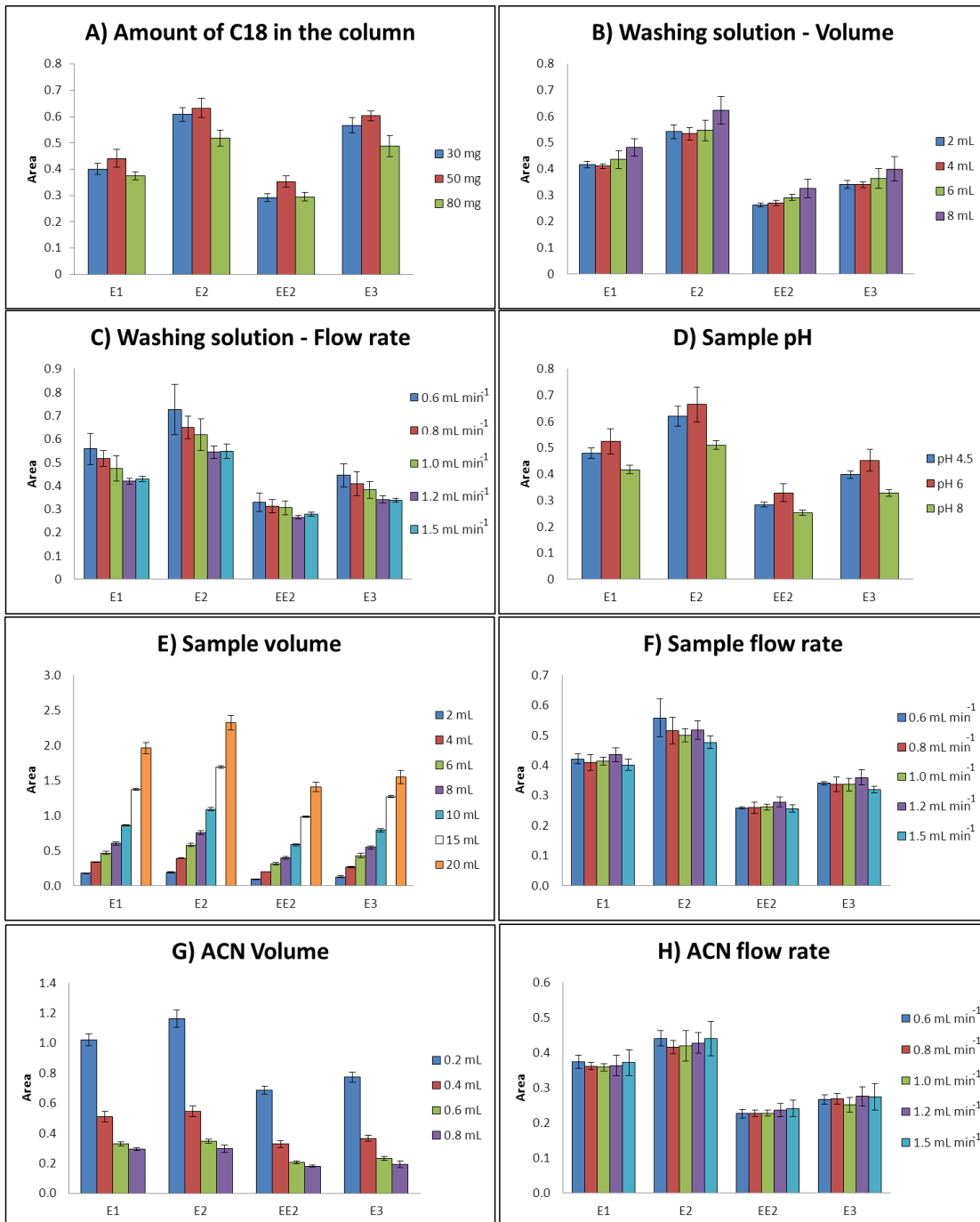
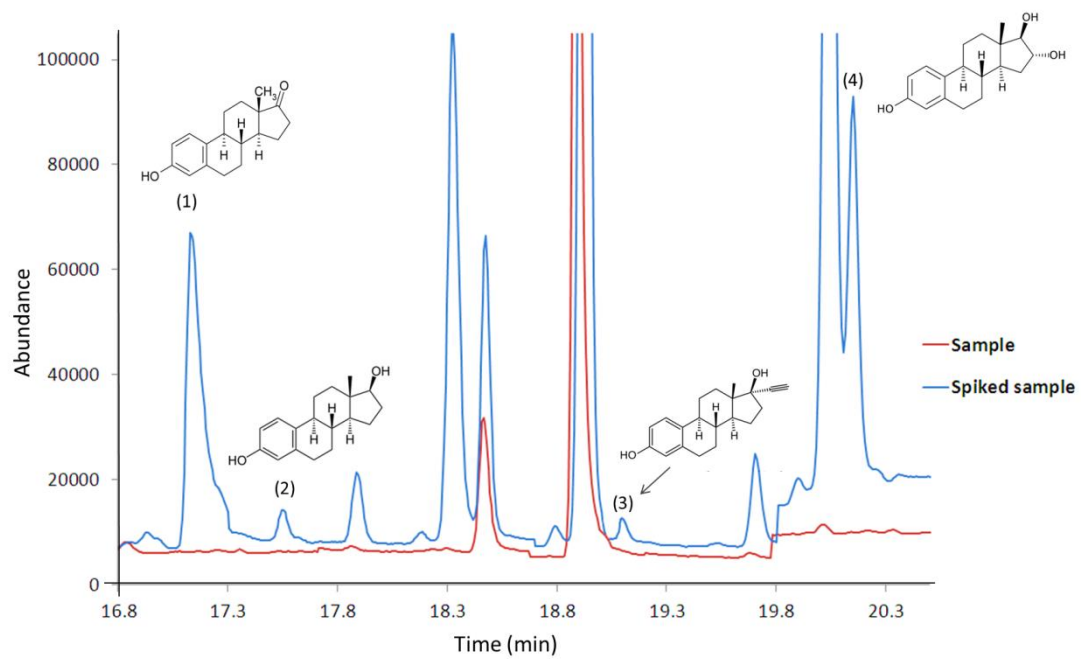


Figure 3.



References

- [1] Environmental Protection Agency (EPA), Analytical Methods: Contaminants of Emerging Concern Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs): <http://www.epa.gov/cwa-methods/cwa-analytical-methods-contaminants-emerging-concern>. Accessed 15 January 2018.
- [2] European Commission, European Workshop on the impact of endocrine disrupters on human health and wildlife. Report of the Proceedings, Weybridge, UK, 1996.
- [3] M.J. López De Alda, D. Barceló, Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 391-406.
- [4] J.H. Willman, T.B. Martins, T.D. Jaskowski, H.R. Hill, C.M. Litwin, Heterophile antibodies to bovine and caprine proteins causing false-positive human immunodeficiency virus type 1 and other enzyme-linked immunosorbent assay results, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6 (1999) 615–616.
- [5] A.P. Scott, R.M. Inbaraj, E.L.M. Vermeirssen, Use of a radioimmunoassay which detects C21 steroids with a 17, 20beta-dihydroxyl configuration to identify and measure steroids involved in final oocyte maturation in female plaice (*Pleuronectes platessa*), *Gen. Comp. Endocrinol.* 105 (1997) 62–70.
- [6] C.C. Chang, S.D. Huang, Determination of the steroid hormone levels in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of a floating

organic drop followed by high-performance liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta* 662 (2010) 39–43.

[7] R. Jeannot, H. Sabik, E. Sauvard, T. Dagnac, Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 974 (2002) 143–159.

[8] K. Zhang, Y. Zuo, Pitfalls and solution for simultaneous determination of estrone and 17 α -ethinylestradiol by gas chromatography–mass spectrometry after derivatization with N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, *Anal. Chim. Acta* 554 (2005) 190–196.

[9] A. Stafiej, K. Pyrzynska, F. Regan, Determination of anti-inflammatory drugs and estrogens in water by HPLC with UV detection, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 985 – 991.

[10] S. Wang, W. Huang, G. Fang, J. He, Y. Zhang, On-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for determination of estrogens in environment, *Anal. Chim. Acta* 606 (2008) 194–201.

[11] A. González, J. Avivar, F. Maya, C. Palomino-Cabello, G. Turnes-Palomino, V. Cerdà, In-syringe dispersive μ -SPE of estrogens using magnetic carbon microparticles obtained from zeolitic imidazolate frameworks, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 225–234.

[12] J. Avivar, L. Ferrer, M. Casas, V. Cerdà, Lab on valve-multisyringe flow injection system (LOV-MSFIA) for fully automated uranium determination in environmental samples, *Talanta* 84 (2011) 1221–1227.

[13] A. Marsol-Vall, M. Balcells, J. Eras, R. Canela-Garayoa, A rapid gas chromatographic injection-port derivatization method for the tandem mass spectrometric determination of patulin and 5-hydroxymethylfurfural in fruit juices, *J. Chromatogr. A* 1453 (2016) 99-104.

-
- [14] K.S. Docherty, P. Ziemann, On-line, inlet-based trimethylsilyl derivatization for gas chromatography of mono- and dicarboxylic acids, *J. Chromatogr. A* 921 (2001) 265–275.
- [15] E. Bizkarguenaga, A. Iparragirre, P. Navarro, M. Olivares, A. Prieto, A. Vallejo, O. Zuloaga, In-port derivatization after sorptive extractions, *J. Chromatogr. A* 1296 (2013) 36–46.
- [16] P. Viñas, N. Martínez-Castillo, N. Campillo, M. Hernández-Córdoba, Directly suspended droplet microextraction with in injection-port derivatization coupled to gas chromatography–mass spectrometry for the analysis of polyphenols in herbal infusions, fruits and functional foods, *J Chromatogr. A* 1218 (2011) 639-646.
- [17] W. Vogt, K. Jacob, H.W. Obwexer, Sampling method in capillary column gas-liquid chromatography allowing injections of up to 250µl, *J. Chromatogr. A* 174 (1979) 437-439.
- [18] A. Salvador, C. Moretton, A. Piram, R. Faure, On-line solid-phase extraction with on-support derivatization for high-sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry of estrogens in influent/effluent of wastewater treatment plants, *J. Chromatogr. A* 1145 (2007) 102-109.
- [19] L. Mao, C. Sun, H. Zhang, Y. Li, D. Wu, Determination of environmental estrogens in human urine by high performance liquid chromatography after fluorescent derivatization with p-nitrobenzoyl chloride, *Anal. Chim. Acta* 522 (2004) 241-246.
- [20] D.R. Kester, I.W. Duedall, D.N. Connors, R.M. Pytkowicz, Preparation of artificial seawater, *Limnol. Oceanogr* 12 (1967) 176-179.

-
- [21] R. Leardi, Experimental design in chemistry: A tutorial, *Anal. Chim. Acta* 652, 2009, 161-172.
- [22] G. Derringer, R.J. Suich, Simultaneous optimization of several response variables, *Qual. Technol.* 12 (1980) 214-219.
- [23] A. Vallejo, L.A. Fernández, M. Olivares, A. Prieto, N. Etxebarria, A. Usobiaga, O. Zuloaga, Optimization of large volume injection-programmable temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry analysis for the determination of estrogenic compounds in environmental samples, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 8327-8333.
- [24] R. Hu, L. Zhang, Z. Yang, Picogram determination of estrogens in water using large volume injection gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 349-359.
- [25] M. Velicu, R. Suri, Presence of steroid hormones and antibiotics in surface water of agricultural, suburban and mixed-use areas, *Environ. Monit. Assess.* 154 (2009) 349-359.
- [26] S. Nakamura, T. Hwee-Sian, S. Daishima, Determination of estrogens in river water by gas chromatography-negative-ion chemical-ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 919 (2001) 275-282.

7.2.1 Material suplementario (Supplementary Material)

El material suplementario enviado para su publicación se encuentra a continuación.

Supplementary material

Estrogens determination exploiting a SIA-LOV system prior to in-port derivatization-large volume injection-programmable temperature vaporization-gas chromatography

Alba González¹, Sabrina Clavijo¹, Víctor Cerdà^{1,2}.

¹*Sciware Systems, S.L. Spin-off from the University of the Balearic Islands, C/ Pi 37, 07193, Illes Balears, Spain*

²*Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of the Balearic Islands, Carretera de Valldemossa km 7.5, E-07122 Palma de Mallorca, Illes Balears, Spain*

* Corresponding author: E-mail: victor.cerda@uib.es; Telephone: +34 971173261

Table S1. Variables and ranges studied in the screening and the central composite design and optimum values.

	Vent flow (mL min ⁻¹)	Injector Ti (°C)	Injector heating rate (°C min ⁻¹)	Vent pressre (psi)	Vent time (min)
Screening	25-100	60-100	300-900	2-10	0.5-1
Central Composite Design	25	80-120	300	8-12	1
Optimum values	25	100	300	10	1

Figure S1. Screening desirability chart for all the estrogens and the calculated overall desirability (D). Plotting from left to right: vent flow, injector initial temperature, injector heating rate, vent pressure and vent time; from up to down: the response signal for E1, E2, EE2 and E3, and finally the desirability function aiming to find the best response for all the studied estrogens. E1: estrone, E2: 17 β -estradiol, EE2: 17 α -ethynylestradiol.

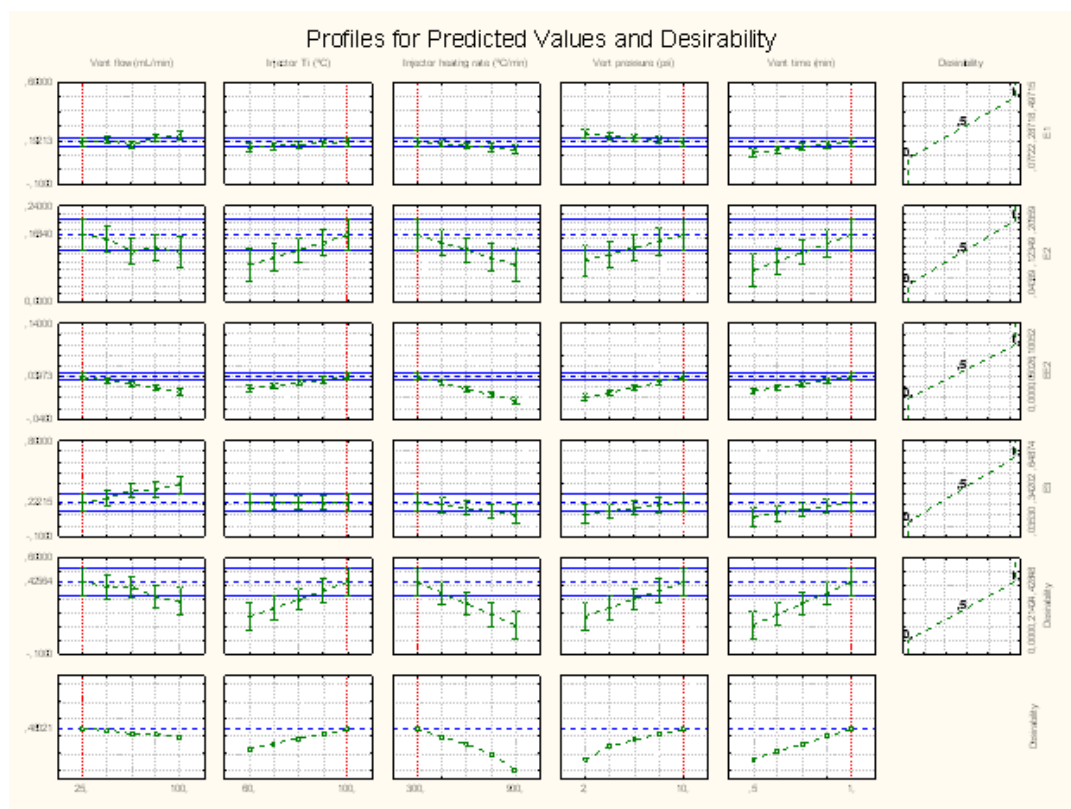
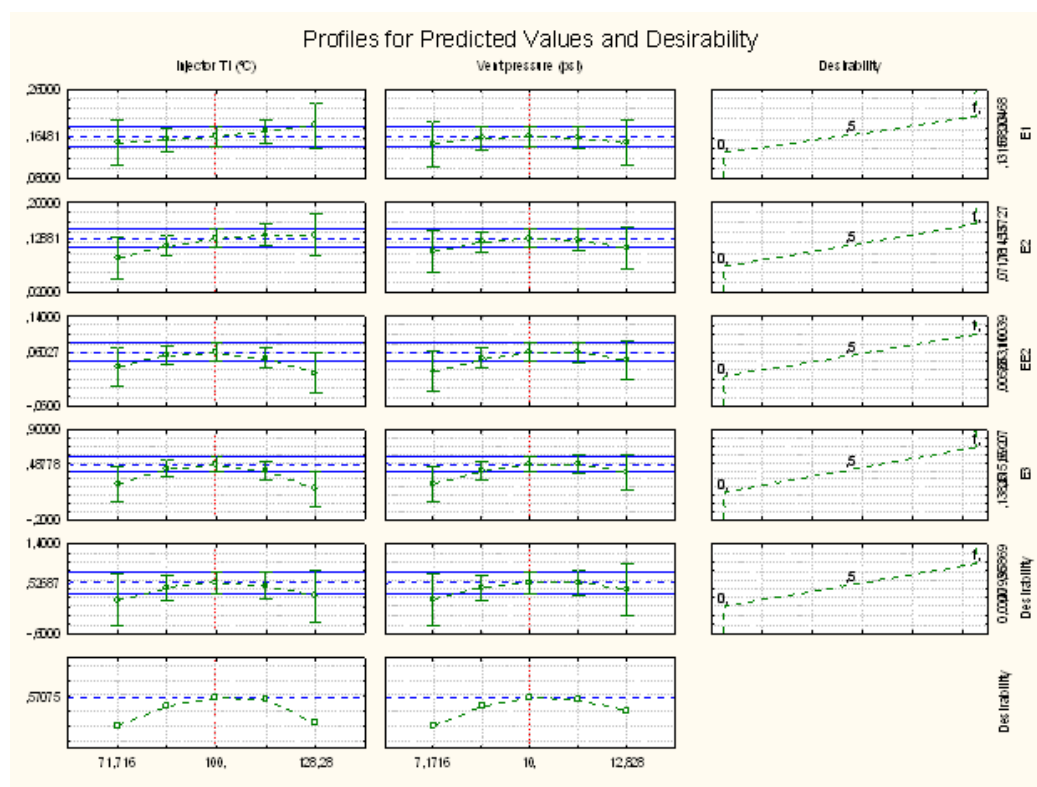


Figure S2. Desirability chart for all the estrogens and the calculated overall desirability (D) in the face centered central composite design. Plotting from left to right: injector initial temperature and vent pressure; from up to down: the response signal for E1, E2, EE2 and E3, and finally the desirability function aiming to find the best response for all the studied estrogens. E1: estrone, E2: 17 β -estradiol, EE2: 17 α -ethynylestradiol, E3: estriol.



CAPÍTULO 8

Conclusiones

Conclusiones

En la presente tesis doctoral se han desarrollado nuevas metodologías para el análisis de contaminantes emergentes y prioritarios en muestras de interés ambiental.

Los métodos propuestos han demostrado ser una excelente alternativa para la determinación de compuestos fenólicos y estrógenos. En todos los casos se ha conseguido llevar a cabo el pretratamiento de la muestra de forma automatizada, simplificando así una etapa del análisis normalmente imprescindible y que conlleva un gran consumo de tiempo. Además, al ser procedimientos miniaturizados se reducen considerablemente los volúmenes de reactivos y muestras necesarios, con lo que se abarata el coste por análisis a la vez que se producen cantidades menores de residuos, resultando en métodos más sostenibles.

En este contexto, se han utilizado diferentes técnicas de microextracción para el desarrollo de los protocolos analíticos, tales como DLLME, μ -SPE y LOV. A fin de conseguir la mayor eficiencia posible en esta etapa, y con ello una mejor sensibilidad de los métodos, se han utilizado técnicas de optimización univariantes y multivariantes para estudiar el efecto de una gran cantidad de variables que afectan significativamente al proceso de extracción, como pueden ser el tipo y volumen de disolvente orgánico, el tipo y cantidad de resina o las características de la muestra.

Por otro lado, el uso de la cromatografía ha proporcionado la resolución necesaria para determinar estos analitos. En el desarrollo de los métodos se ha trabajado para mejorar los análisis cromatográficos tradicionales, acoplando el sistema de pretratamiento con la separación cromatográfica, o bien disminuyendo el número de etapas y el tiempo necesario para llevar a cabo el análisis por GC-MS.

Así, se ha desarrollado un sistema para la determinación de seis compuestos fenólicos catalogados como contaminantes prioritarios. La cromatografía multijeringa, una técnica más económica y sencilla que los sistemas HPLC tradicionales, ha demostrado ser una herramienta útil para el análisis de fenoles. Además, esta técnica

ofrece la posibilidad de trabajar a bajas presiones, lo que permite su combinación con un sistema in-syringe-MSA-DLLME. Este acoplamiento ha hecho posible automatizar todas las etapas del análisis (preconcentración, separación, detección y cuantificación), dando lugar a un único analizador compacto con el que se pueden monitorizar estos analitos de forma precisa en diferentes matrices de aguas ambientales: agua de grifo, agua mineral, agua de pozo y lixiviados.

Por otro lado, se han propuesto tres métodos para el análisis de diversos estrógenos listados como contaminantes emergentes.

En el primero de ellos, se hace uso de nuevo de la técnica in-syringe-MSA-DLLME para la extracción y preconcentración en línea de los analitos, seguida de la separación y cuantificación por cromatografía de gases. En este caso, se han aprovechado las posibilidades que ofrece el sistema MSFIA diseñado y las características del extractante seleccionado para evitar uno de los pasos más comunes para el análisis por cromatografía de gases, el secado del extracto bajo corriente de nitrógeno. De este modo, se reduce aún más el tiempo necesario para llevar a cabo el protocolo analítico. El método se ha aplicado con éxito al análisis de muestras complejas: aguas de entrada y salida de una estación depuradora de aguas residuales.

En segundo lugar, se han sintetizado y caracterizado micropartículas a partir de la combustión de cristales de ZIF-67, un subtipo de MOFs con estructura zeolítica, las cuales se han utilizado como fase sólida para el desarrollo de un sistema in-syringe dispersive μ -SPE. Las características magnéticas de estas micropartículas han permitido utilizar el sistema MSA para forzar su dispersión a través de la matriz de la muestra, además de mantener las partículas en el interior de la jeringa cuando descartamos la muestra tras la extracción, de modo que puedan ser reutilizadas. A continuación, el extracto ha sido directamente derivatizado e inyectado en un GC-MS para la separación y cuantificación de los compuestos. El procedimiento se ha utilizado satisfactoriamente para la determinación de estrógenos en aguas residuales.

El tercer protocolo analítico desarrollado para estrógenos se basa en la utilización de un sistema SIA-LOV para su extracción en fase microsólida en agua de mar. Como en los casos anteriores, estos analitos requieren de una reacción de derivatización previa

a su análisis por cromatografía de gases. En este caso, se ha llevado a cabo una derivatización en el inyector mediante la técnica in-port derivatization, seguida de una inyección de grandes volúmenes utilizando un inyector de tipo vaporizador con temperatura programable (LVI-PTV). El hecho de realizar la reacción de derivatización dentro del inyector supone una considerable disminución del uso de los agentes derivatizantes y del tiempo necesario para que se dé la reacción, además de evitar la manipulación de estos reactivos en cada análisis, por lo que es un método más rápido y seguro para el analista.

En resumen, se han desarrollado varios sistemas automatizados para determinar contaminantes de interés ambiental. El alto grado de automatización de los procedimientos propuestos supone ventajas como la reducción del coste y tiempo por análisis, así como del consumo de reactivos y muestra, con lo que se disminuye el impacto ambiental. La exactitud y precisión de los métodos propuestos han sido comprobadas, y se han aplicado con éxito a muestras reales.

Conclusions

In the present doctoral thesis new automated methodologies for the analysis of emergent and priority pollutants in environmental samples have been developed.

The proposed methods have proved to be useful alternatives for the determination of phenolic and estrogenic compounds. All the sample pretreatments have been carried out in an automated way, simplifying this time-consuming step of the analysis which is normally essential. In addition, since they are miniaturized procedures, the volumes of reagents and sample are drastically reduced which decreases the cost per analysis and waste generation, resulting in more environmentally-friendly methods.

In this context, different microextraction techniques such as DLLME, μ -SPE and LOV have been used to carry out the analytical protocols. In order to achieve the highest efficiency in this stage and increase the sensitivity of the methods, univariate and multivariate optimization techniques have been exploited to study several factors affecting the extraction, i.e. extraction solvent and its volume, kind and amount of resin or sample characteristics.

Besides, chromatographic techniques have provided the resolution needed to determine these analytes. During the methods development, work has been done to improve the traditional chromatographic analysis either coupling the pretreatment system with the chromatographic separation or by decreasing the number of steps and the time required to perform the GC-MS analysis.

Thus, a system for the determination of six phenolic compounds catalogued as priority pollutants has been developed. Multisyringe chromatography, a simpler and more affordable technique than HPLC, has proved to be a great tool for phenols quantification. Moreover, this approach allows low pressure separations, which permits its combination with an in-syringe-MSA-DLLME system. This coupling has allowed the integration of all the analytical steps (extraction and preconcentration, separation, detection and quantification) in a single analyser which lets the precise monitoring of

the analytes of interest in different matrices: tap water, mineral water, well water and leachate.

Furthermore, three methodologies for the analysis of estrogenic compounds listed as emergent pollutants are proposed.

For the first estrogens method, an in-syringe-MSA-DLLME system has been used for the on-line extraction and preconcentration of the analytes prior to their separation and quantification by gas chromatography. The characteristics of the designed system and of the selected extractant solvent have been exploited to avoid the stage of drying the extract before GC-MS determination. In this way, the time needed to carry out the analytical protocol is further reduced. The method has been successfully applied for the analysis of complex samples, i.e. wastewater samples from the inlets and outlets of a sewage treatment plant.

On the other hand, magnetic carbon microparticles obtained from the combustion of ZIF-67 crystals, a subclass of MOFs with zeolitic structure, have been synthesized and characterized. These microparticles have been used as solid phase in an in-syringe dispersive μ -SPE system. Since these microparticles are magnetic, a MSA system has been used to force their dispersion through the sample, as well as to maintain them inside the syringe while discarding the aqueous sample after the extraction, so they can be reused. Next, the extract has been directly derivatized and injected into the GC-MS. This procedure has been satisfactorily applied for estrogens determination in wastewater samples.

Finally, the last analytical procedure developed for estrogens determination is based in a SIA-LOV system, which has been used to perform their microsolid phase extraction in seawater samples. As in the previously presented methods, these analytes require a derivatization reaction before their GC-MS analysis. In this case, an on-line derivatization has been performed using in-port derivatization technique, followed by a large volume injection using a programmable temperature vaporization injector (LVI-PTV). The fact of carrying out the derivatization reaction on-line has led to a significant decrease of the amount of derivatization agents used, and also of the time needed for the

reaction to occur. Besides, the manipulation of these reagents before each analysis is avoided, resulting in a faster and safer method.

To sum up, several automated systems for the determination of pollutants of environmental interest have been developed. The high degree of automation of the proposed procedures provides great advantages such as a noteworthy decrease of the cost and time per analysis with minimal reagents and sample consumption, thus reducing the environmental impact. The methods have proved to be accurate and precise, and they have been successfully applied to real environmental samples.

ANEXO

Otras publicaciones

1. From thermometric to spectrophotometric kinetic-catalytic methods of analysis. A review.

Autores: V. Cerdà, A. González, K. Danchana

Revista: Talanta

Año: 2017

Volumen: 167

Páginas: 733-746

DOI: 10.1016/j.talanta.2017.02.004

Índice de impacto: 4,162

2. Microsequential injection lab-on-valve system for the spectrophotometric bi-parametric determination of iron and copper in natural waters.

Autores: A. González, R. B. R. Mesquita, J. Avivar, T. Moniz, M. Rangel, V. Cerdà, A. O. S. S. Rangel

Revista: Talanta

Año: 2017

Volumen: 167

Páginas: 703-708

DOI: 10.1016/j.talanta.2017.02.055

Índice de impacto: 4,162

3. Determination of herbicides in environmental water samples by simultaneous in-syringe magnetic stirring-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and silylation followed by GC-MS.

Autores: R. Suárez, S. Clavijo, A. González, V. Cerdà

Revista: Journal of Separation Science

Año: 2018

Volumen: 41

Páginas: 1096-1103

DOI: 10.1002/jssc.201700875

Índice de impacto: 2,557

4. A High Performance Liquid Chromatographic method for the simultaneous determination of four flavonols in food supplements and pharmaceutical formulations.

Autores: M. S. Sammani, S. Clavijo, A. González, V. Cerdà

Revista: Analytical Methods

Año: 2018

Estado: Enviado para su publicación

Índice de impacto: 2,073

5. Development of an on-line lab-on-valve micro-solid phase extraction system coupled with high performance liquid chromatography with photo diode array detection for the determination of flavonoids in citrus juices.

Autores: M. S. Sammani, S. Clavijo, A. González, V. Cerdà

Revista: Food Chemistry

Año: 2018

Estado: Enviado para su publicación

Índice de impacto: 4,946

Comunicaciones en congresos

1. Phenolic pollutants chromatographic separation exploiting a monolithic column coupled to a fully automated clean-up and preconcentration system.

Autores: A. González, J. Avivar, V. Cerdà

Congreso: 20th International Symposium on Separation Sciences

Año: 2014

Localización: Praga (República Checa)

Tipo de comunicación: Póster

2. In-syringe magnetic stirring-assisted dispersive liquid–liquid microextraction of phenolic pollutants prior multisyringe chromatography analysis.

Autores: A. González, J. Avivar, V. Cerdà

Congreso: 19th International Conference on Flow Injection Analysis

Año: 2014

Localización: Fukuoka (Japón)

Tipo de comunicación: Póster

3. Determination of estrogens in water samples by automatic in-syringe dispersive liquid–liquid microextraction coupled to gas chromatography.

Autores: A. González, J. Avivar, V. Cerdà

Congreso: Flow Analysis XIII

Año: 2015

Localización: Praga (República Checa)

Tipo de comunicación: Póster

4. Desarrollo de nuevos métodos automáticos para la determinación de contaminantes emergentes y prioritarios.

Autores: A. González, J. Avivar, V. Cerdà

Congreso: IV Jornadas Doctorales del Grupo 9 de Universidades

Año: 2016

Localización: Pamplona (España)

Tipo de comunicación: Póster

5. In-syringe dispersive μ -SPE of estrogens using magnetic carbons obtained from zeolitic imidazolate frameworks.

Autores: A. González, J. Avivar, F. Maya, C. Palomino Cabello, G. Turnes Palomino, V. Cerdà

Congreso: 20th International Conference on Flow Injection Analysis and Related Techniques

Año: 2016

Localización: Palma de Mallorca (España)

Tipo de comunicación: Póster

6. Micro-SI system for the spectrophotometric bi-parametric determination of iron and copper in soil leachates.

Autores: A. González, R. B. R. Mesquita, J. Avivar, T. Moniz, M. Rangel, V. Cerdà, A. O. S. S. Rangel

Congreso: 20th International Conference on Flow Injection Analysis and Related Techniques

Año: 2016

Localización: Palma de Mallorca (España)

Tipo de comunicación: Oral

7. Fully automated estrogens determination exploiting a SIA-LOV system coupled to large volume injection-programmable temperature vaporization-gas chromatography.

Autores: S. Clavijo, A. González, V. Cerdà

Congreso: 19th International Symposium on Advances in Extraction Techniques

Año: 2017

Localización: Santiago de Compostela (España)

Tipo de comunicación: Oral

8. SIA-LOV system coupled to large volume injectionprogrammable temperature vaporization-gas chromatography for the fully automated determination of estrogenic compounds.

Autores: A. González, S. Clavijo, V. Cerdà

Congreso: 21th International Conference on Flow Injection Analysis and Related Techniques

Año: 2017

Localización: San Petersburgo (Rusia)

Tipo de comunicación: Póster

TESIS DOCTORAL

Diseño y desarrollo de sistemas microfluídicos
automáticos para la determinación de contaminantes
de interés ambiental

Alba González López

2018



Universitat
de les Illes Balears



Universitat
de les Illes Balears