



**Universitat de les
Illes Balears**

**TESIS DOCTORAL
2014**

USO DEL ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO
MULTIJERINGA EN DETERMINACIONES ANALÍTICAS
ACOPLADO A TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Mailén Fernández Rodríguez



**Universitat de les
Illes Balears**

TESIS DOCTORAL

2014

Programa de Doctorado en Ciencias Experimentales y
Tecnología

**USO DEL ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO
MULTIJERINGA EN DETERMINACIONES ANALÍTICAS
ACOPLADO A TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS**

Mailén Fernández Rodríguez

Director: **Víctor Cerdà Martín**

Director: **Rafel Forteza Coll**

Doctora por la Universitat de les Illes Balears



Universitat de les Illes Balears

El Dr. Víctor Cerdà Martín, Catedrático de Química Analítica del Departamento de Química de la Universitat de les Illes Balears y el Dr. Rafel Forteza Coll, profesor titular del mismo Departamento como directores de esta Tesis Doctoral

HACEN CONSTAR:

Que el presente trabajo titulado: “Uso del análisis por inyección en flujo multijeringa en determinaciones analíticas acoplado a técnicas cromatográficas” ha sido realizado por Mailén Fernández Rodríguez en el grupo de Química Analítica Automatización y Medioambiente del Departamento de Química de la Universitat de les Illes Balears como requisito para optar al título de Doctora en Ciencias Experimentales y Tecnología.

Palma de Mallorca 27 de octubre de 2014.

Dr. Víctor Cerdà Martín

Dr. Rafel Forteza Coll

Lista de publicaciones derivadas de la tesis:

- ✓ Modulation of mobile phase composition in flow-injection/ sequential-injection chromatography exploiting multisyringe flow analysis.
Mailen Fernández & Manuel Miró & Hilda M. González & Víctor Cerdà.
Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008, Vol. 391, p. 817–825.
- ✓ Contribution of multi-commuted flow analysis combined with monolithic columns to low-pressure, high-performance chromatography.
M. Fernández, H.M. González-San Miguel, J.M. Estela, V. Cerdà.
Trends in Analytical Chemistry, 2009, Vol. 28, p. 336-346.
- ✓ Monolithic columns in flow analysis: a review of sic and msc techniques.
Mailen Fernández, Rafel Forteza & Víctor Cerdá.
Instrumentation Science and Technology, 2012, Vol. 40, p. 90–99.
- ✓ Multisyringe Chromatography (MSC): An Effective and Low Cost Tool for Water-Soluble Vitamin Separation.
Mailen Fernández, Rafael Forteza & Víctor Cerdá.
Analytical Letters 2012, Vol. 45, p. 2637-2647.
- ✓ Standardization of UV – visible data in a food adulteration classification problema.
Carolina V. Di Anibal, Itziar Ruisánchez, Mailén Fernández, Rafel Forteza, Víctor Cerdà and M. Pilar Callao.
Food Chemistry 2012, Vol. 134, 2326–2331.
- ✓ Online coupling lab on valve-dispersive liquid – liquid microextraction-multisyringe flow injection with gas chromatography-mass spectrometry for the determination of sixteen priority PAHs in water.
Sabrina Clavijo, Mailén Fernández, Rafael Forteza, Maria del Rosario Brunetto and Víctor Cerdà.
Analytical Methods 2014, Vol. 6, p. 3335-3344.

RESUMEN

En los últimos años, áreas como la salud y la industria han experimentado un gran desarrollo que lleva asociado la necesidad de implementar técnicas de control analítico cada vez más sensibles, rápidas, económicas y amigables con el medio ambiente. Por ello, numerosas investigaciones van encaminadas al desarrollo y puesta a punto de nuevos métodos de análisis alternativos a las costosas técnicas convencionales. El perfeccionamiento de estos métodos es uno de los principales retos de la Química analítica.

Con las nuevas tecnologías se busca la automatización de sistemas para minimizar los errores derivados de la manipulación humana. En este sentido, el análisis en flujo constituye una excelente herramienta. Numerosas publicaciones avalan la aplicabilidad de estas técnicas en diferentes campos de estudio.

En la última década ha sido desarrollado un nuevo método cromatográfico acoplado la técnica de análisis por inyección en flujo multijeringa a una columna monolítica. Asimismo, se han desarrollado sistemas en flujo acoplados a técnicas cromatográficas que permiten automatizar la determinación analítica con la menor intervención posible, mejorando la reproducibilidad del método.

En esta tesis se presentan dos revisiones exhaustivas que abarcan las principales características y aplicaciones de la cromatografía multijeringa. Además se han desarrollado cuatro métodos analíticos para la determinación de vitaminas hidrosolubles e hidrocarburos policíclicos aromáticos. Estas metodologías han sido automatizadas mediante el uso del análisis por inyección en flujo multijeringa, obteniendo un importante ahorro de reactivos y la consecuente reducción de coste por análisis y de generación de residuos.

La determinación de vitaminas se ha realizado por cromatografía multijeringa con detección UV. El método se ha aplicado a muestras reales y los resultados han sido comparados con los obtenidos por métodos de cromatografía convencional. Los policíclicos aromáticos, en muestras acuosas, han sido preconcentrados utilizando microextracción líquido- líquido dispersiva automatizada mediante un sistema de análisis por inyección en flujo multijeringa acoplado a cromatografía líquida y de gases.

Los trabajos presentados en esta tesis son:

- 1 Contribución de análisis en flujo multiconmutado a cromatografía de alta resolución- baja presión.
- 2 Columnas monolíticas en el análisis en flujo: revisión de las técnicas SIC y MSC
- 3 Estudio de la composición de la fase móvil en cromatografía de inyección secuencial explotando el análisis en flujo multijeringa.
- 4 Cromatografía multijeringa (MSC): una herramienta efectiva y económica para la separación de las vitaminas solubles en agua.
- 5 Acoplamiento en línea de microextracción líquido- líquido dispersiva con inyección en flujo multijeringa y determinación por cromatografía de gases- espectrometría de masas en el análisis de hidrocarburos policíclicos aromáticos en agua.
- 6 Determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos usando microextracción líquido- líquido dispersiva previo a la cromatografía de alta resolución.

ABSTRACT

Due to the necessity of more sensitive and economic analytical methodologies, numerous investigations are developed in order to have automated methods that minimize errors of human manipulation. In this sense, the flow analysis is an excellent tool. In this thesis two comprehensive revisions are presented which cover key features and applications of multisyringe chromatography.

Furthermore, four analytical methods for the determination of water soluble vitamins and polycyclic aromatic hydrocarbons have been developed. These methodologies have been automated by using multisyringe flow injection analysis to obtain significant savings in reagents and the consequent reduction in cost per analysis and generation of waste.

The determination of vitamins has been developed by multisyringe chromatography with UV detection. The method was applied to real samples and the results were compared with those obtained by conventional chromatography methods. Polycyclic aromatic hydrocarbons have been preconcentrated using automated dispersive liquid-liquid microextraction system based on multisyringe injection analysis coupled to liquid and gas chromatography. The method was applied in aqueous samples.

The works presented are listed below

1 Monolithic columns in flow analysis: a review of SIC and MSC techniques.

2 Contribution of multi-commuted flow analysis combined with monolithic columns to low-pressure, high-performance chromatography.

3 Modulation of mobile phase composition in flow-injection/ sequential injection chromatography exploiting multisyringe flow analysis.

4 Multisyringe Chromatography (MSC): An Effective and Low Cost Tool for Water-Soluble Vitamin Separation.

5 Online coupling lab on valve-dispersive liquid-liquid microextraction multisyringe flow injection with gas chromatography-mass spectrometry for the determination of sixteen priority PAHs in water.

6 Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons using dispersive liquid-liquid microextraction previous to high resolution chromatography.

ÍNDICE

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	- 1 -
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	- 7 -
A. TÉCNICAS DE ANÁLISIS EN FLUJO.....	- 9 -
I. <i>Introducción</i>	- 9 -
II. <i>Evolución de las técnicas de análisis en flujo</i>	- 9 -
III. <i>Análisis por Inyección en Flujo Multijeringa</i>	- 15 -
IV. <i>Nueva generación de análisis en flujo</i>	- 18 -
B. MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	- 21 -
I. <i>Técnicas de extracción</i>	- 22 -
I.1 <i>Extracción en fase sólida</i>	- 23 -
I.2 <i>Microextracción líquido-líquido dispersiva</i>	- 24 -
II. <i>Técnicas cromatográficas</i>	- 28 -
II.1 <i>Cromatografía Multijeringa</i>	- 30 -
II.1.1 <i>Review: Contribution of multi-commuted flow analysis combined with monolithic columns to low-pressure, high-performance chromatography</i>	- 35 -
II.1.2 <i>Review: Monolithic columns in flow analysis: a review of SIC and MSC techniques</i>	- 49 -
C. COMPUESTOS ESTUDIADOS	- 61 -
I. <i>Vitaminas Hidrosolubles</i>	- 61 -
I.1 <i>Definición, estructura y propiedades</i>	- 61 -
I.2 <i>Producción y aplicaciones</i>	- 64 -
I.3 <i>Análisis químico de las vitaminas hidrosolubles</i>	- 66 -
II. <i>Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos</i>	- 70 -
II.1 <i>Definición, estructura y propiedades</i>	- 70 -
II.2 <i>Origen, toxicidad y legislación ambiental</i>	- 74 -
II.3 <i>Análisis químico de PAHs en muestras de aguas</i>	- 79 -
CAPÍTULO II: MSC APLICADA A LA DETERMINACIÓN DE VITAMINAS SOLUBLES EN AGUA.....	- 85 -
II.1 ARTÍCULO ORIGINAL: MODULATION OF MOBILE PHASE COMPOSITION IN FLOW-INJECTION/ SEQUENTIAL-INJECTION CHROMATOGRAPHY EXPLOITING MULTISYRINGE FLOW ANALYSIS	- 91 -
II.2 ARTÍCULO ORIGINAL: MULTISYRINGE CHROMATOGRAPHY (MSC): AN EFFECTIVE AND LOW COST TOOL FOR WATER-SOLUBLE VITAMIN SEPARATION.....	- 103 -

CAPÍTULO III: MSFIA EN EL TRATAMIENTO DE MUESTRAS. ACOPLAMIENTO A SISTEMAS CROMATOGRÁFICOS PARA EL ANÁLISIS DE PAHS	- 117 -
III.1 ARTÍCULO ORIGINAL: ONLINE COUPLING LAB ON VALVE-DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION-MULTISYRINGE FLOW INJECTION WITH GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY FOR THE DETERMINATION OF SIXTEEN PRIORITY PAHS IN WATER.....	- 123 -
III.2 MANUSCRITO: DETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS USING DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION PREVIOUS TO HIGH RESOLUTION CHROMATOGRAPHY	- 135 -
III.3. INFORMACIÓN ADICIONAL. EVALUACIÓN DE UN MÉTODO DE SPE AUTOMATIZADO MEDIANTE MSFIA ACOPLADO A HPLC PARA EL ANÁLISIS DE PAHS	- 157 -
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS.....	- 163 -
CONCLUSIONES.....	- 171 -
ACRÓNIMOS.....	- 175 -
ANEXOS	- 177 -
ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	- 179 -
ANEXO II: STANDARDIZATION OF UV-VISIBLE DATA IN A FOOD ADULTERATION CLASSIFICATION PROBLEMA.....	- 183 -
ANEXO III: LISTADO DE PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES REALIZADAS DURANTE LA TESIS.	- 193 -
REFERENCIAS	- 197 -

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Una gran parte de la humanidad actual, vive en una sociedad industrial altamente compleja. En poco más de un siglo, los avances en medicina, agricultura, electrónica, informática, química, etc. han sido tan grandes, que se ha producido una auténtica revolución.

Este continuo progreso industrial lleva asociado un grave problema medioambiental; la generación de residuos se produce en cantidades tan elevadas y tan diferentes que su eliminación total se hace muy difícil y su control analítico es imprescindible.

De manera similar, los avances en áreas de la salud mejoran cada vez más la calidad de vida de la población. Sin embargo la producción y el consumo de fármacos crece a un ritmo muy acelerado; especialmente aquellos considerados estimulantes o suplementarios para una dieta equilibrada, y deben ser estrictamente analizados antes de llegar a los consumidores.

Así, en la sociedad actual se ha producido un incremento en la demanda de información analítica: aparecen nuevos objetos de análisis, existe mayor necesidad de alcanzar concentraciones cada vez más bajas, con mayor eficiencia en la exactitud y precisión de las medidas, en tiempos cada vez más breves y a menor coste. Esta necesidad ha llevado a los investigadores a buscar alternativas y, a lo largo de los años, se han ido desarrollando nuevas áreas de investigación en el campo de la instrumentación y automatización de procedimientos analíticos que sean capaces de proveer información de forma continua, in situ, en tiempo real y, por supuesto, amigables con el medio ambiente.

El perfeccionamiento de técnicas y métodos de análisis ha sido uno de los principales objetivos de las investigaciones en Química de las últimas décadas, con el fin de disminuir los errores resultantes de la

intervención humana y utilizar los mínimos recursos en el menor tiempo posible.

La técnica de análisis en flujo, en sus diferentes versiones, representa una de las formas más avanzadas, en el área de química analítica, para manipular muestras, reactivos y disoluciones sin necesidad de ser manipuladas por el analista. Numerosas publicaciones científicas avalan el empleo de estos procedimientos en el tratamiento de muestras y la determinación de diversos analitos de interés medioambiental, clínico e industrial.

Partiendo de estas premisas, la presente memoria se ha centrado en el uso de la técnica de análisis por inyección en flujo multijeringa para desarrollar nuevos métodos analíticos. La principal finalidad ha sido aplicar metodologías que ofrezcan resultados comparables a los obtenidos con sistemas convencionales, pero utilizando metodologías alternativas que sean rápidas, económicas y que disminuyan la generación de residuos.

Así, se han propuesto dos objetivos generales:

- Desarrollar un nuevo sistema cromatográfico, utilizando la técnica de análisis por inyección en flujo multijeringa acoplada a una columna monolítica; que permita la determinación de los compuestos de interés evitando el empleo de la costosa instrumentación necesaria para el análisis por cromatografía convencional.
- Acoplar en línea la técnica de análisis por inyección en flujo multijeringa, aplicada al tratamiento de muestras, a un sistema cromatográfico, a fin de obtener un método totalmente automático para la determinación de los analitos de estudio.

Para alcanzar el primer objetivo se ha utilizado una bomba multijeringa, como sistema impulsor de líquidos, acoplada a una columna monolítica RP-18 y el sistema ha sido aplicado a la determinación de vitaminas hidrosolubles en diferentes matrices. Como sistema de detección se ha utilizado un espectrofotómetro de arreglo de diodos.

En la segunda etapa se ha desarrollado un método de microextracción líquido - líquido dispersiva automatizado a través de un sistema MSFIA, para la pre-concentración en línea de hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de agua. Para la determinación se ha utilizado un cromatógrafo de gases con detector de masas y un cromatógrafo líquido de alta resolución con detección fluorimétrica.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

A. TÉCNICAS DE ANÁLISIS EN FLUJO

I. INTRODUCCIÓN

Toda muestra sometida a un análisis químico debe ser tratada hasta obtener las condiciones adecuadas para que el mismo pueda realizarse. La dilución es la operación más simple y necesaria en la mayoría de los ensayos, pero en matrices complejas la etapa de preparación puede requerir la eliminación de compuestos contaminantes y el enriquecimiento selectivo de los analitos objetos de estudio.

A mediados del siglo XX, el creciente número de controles analíticos requeridos en áreas como la salud, el medio ambiente o la industria alimentaria promovieron la aparición y desarrollo de técnicas de análisis en flujo que permiten la automatización de estos tratamientos evitando largos y tediosos procedimientos manuales, en ocasiones peligrosos para el operador. Entre otras ventajas, los procesos automáticos proporcionan mayor reproducibilidad al minimizar la influencia del factor humano e incrementan la velocidad de análisis.

En este capítulo se presenta una sinopsis de los principios básicos, metodología y aplicaciones de las técnicas de análisis en flujo, profundizando en el Análisis por Inyección en Flujo Multijeringa que ha sido utilizado durante el desarrollo de esta memoria.

II. EVOLUCIÓN DE LAS TÉCNICAS DE ANÁLISIS EN FLUJO

El uso de los métodos automáticos de análisis va ligado al concepto de sustitución de una operación o medida estática, realizada manualmente, por una operación y medida continua o secuencial. Sobre la base de este concepto fue descrito por Skeggs en 1957 el primer sistema de flujo continuo conocido como **Análisis en Flujo Segmentado** (*Segmented Flow Analysis, SFA*) [1]. El sistema se compone de una

bomba peristáltica que aspira de forma continua la muestra y los reactivos, un conjunto de tuberías de plástico que permiten la conducción de los líquidos y un detector ([Figura 1](#)).

Las muestras y reactivos son aspirados secuencialmente y espaciados entre sí por burbujas de aire, evitando la dispersión de las mezclas y garantizando la homogeneidad química de la inyección. Generalmente se requiere un tiempo de residencia de la mezcla en el sistema para alcanzar el equilibrio estacionario antes de la detección. El perfil grafico obtenido en estos métodos es casi rectangular, siendo la altura proporcional a la concentración del analito.

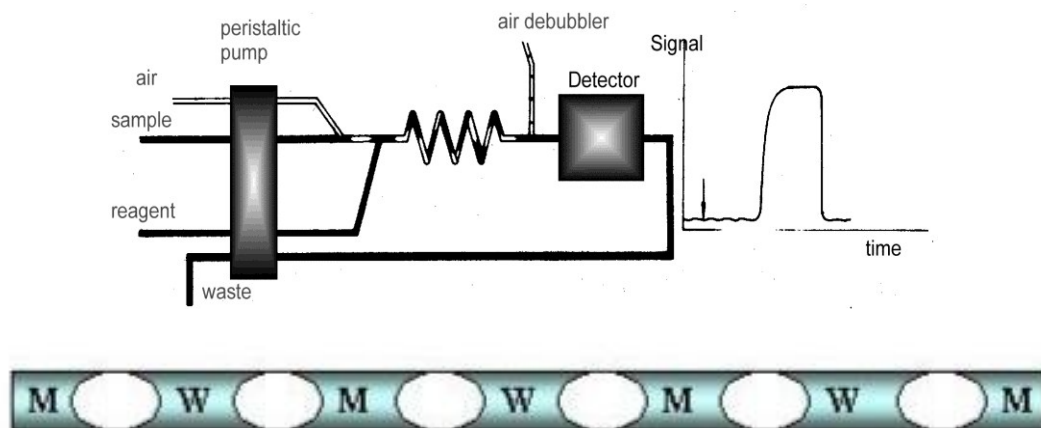


Figura 1. Dibujo de un sistema de análisis en flujo segmentado.

Posteriormente Ružička y Hansen introducen el **Análisis por Inyección en Flujo** (*Flow Injection Analysis, FIA*) [2] que si bien tiene sus antecedentes en el SFA, se diferencia de este en que la muestra no es aspirada de manera continua, el flujo no está segmentado y en el momento de la detección la muestra no ha alcanzado el equilibrio físico ni químico.

El método se basa en la inserción o inyección directa de un volumen definido de muestra, mediante una válvula de inyección, en una corriente continua de un líquido portador (carrier). La muestra se puede hacer confluir con diferentes reactivos necesarios para el método analítico durante su traslado hasta el detector ([Figura 2](#)), donde se genera una señal transitoria en forma de pico denominado diagrama.

Las condiciones de trabajo habituales de FIA favorecen que la muestra, al ser incorporada al sistema, se disperse en la disolución portadora o en el reactivo. Al ser un sistema continuo se obtiene una señal cuyo máximo corresponde con la parte menos diluida; por lo tanto la señal obtenida dependerá de la dispersión que sufra la muestra y por consiguiente del tiempo que esta permanezca dentro del sistema.

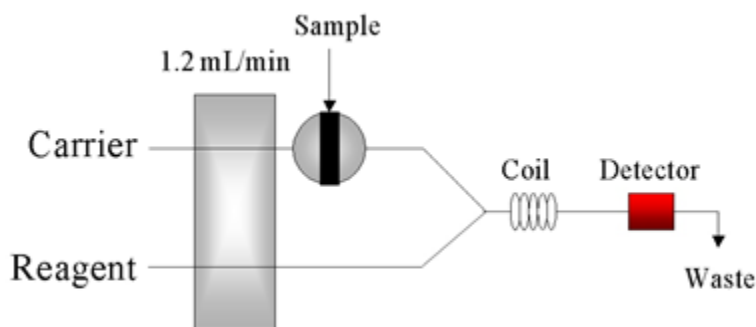


Figura 2. Esquema de un sistema de análisis por inyección en flujo.

Dentro de las principales ventajas de los métodos FIA destacan la reducción del volumen de muestra que pasa del orden de mililitro del SFA a microlitro, la apreciable disminución del tiempo de respuesta y su configuración extremadamente simple con materiales relativamente económicos. La mayor desventaja está en el empleo de bombas peristálticas como sistema impulsor de líquidos, debido a la incompatibilidad de los tubos flexibles de Tygon® con ácidos y bases concentrados o disolventes orgánicos, y el progresivo aplastamiento que

sufren estos tubos, lo que conlleva a cambios en los caudales obligando a periódicas re-calibraciones del sistema.

En 1990 se introdujo el **Análisis por Inyección Secuencial** (*Sequential Injection Analysis*, SIA), por Řužička y Marshall ^[3], como propuesta alternativa a los métodos en flujo continuo. La principal aportación de esta técnica está en la sustitución de la válvula de inyección empleada en FIA por una válvula de selección que permite la incorporación de módulos y reactores auxiliares favoreciendo el análisis multiparamétrico. Su puerto central está conectado a una bomba bidireccional que se encarga de aspirar secuencialmente volúmenes exactos de muestras y reactivos, y los conduce, mediante un líquido portador, hacia un bucle de carga donde permanecerán en contacto hasta que son dispensados dentro de un bucle de reacción por inversión del flujo y de aquí al detector ([Figura 3](#)).

En estos sistemas las bombas peristálticas generalmente son substituidas por bombas de pistón provistas de jeringas de vidrio, que permiten el uso de disolventes orgánicos y reactivos agresivos. Además se reemplazan los tubos de Tygon® por tuberías de politetrafluoroetileno (PTFE) para construir el manifold garantizando que este sea más resistente y duradero.

La mayoría de los métodos SIA son controlados por un ordenador que, además de ocuparse de la adquisición y tratamiento de los datos, tiene como funciones básicas seleccionar el momento en el que la bomba debe aspirar o dispensar líquido, conectar el puerto central de la válvula con los puertos laterales y controlar las variables físicas del sistema como el volumen y el caudal de trabajo de la bomba.

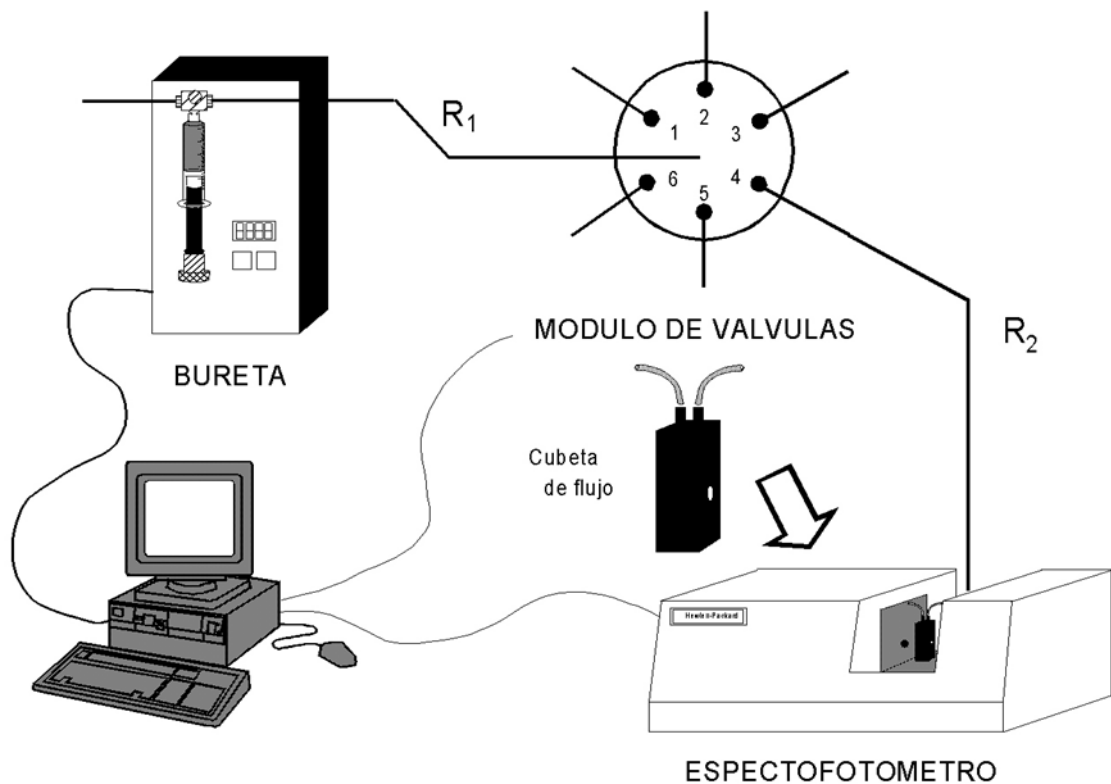


Figura 3. Representación esquemática de un sistema de análisis por inyección secuencial con bomba de pistón y detección espectrofotométrica.

Un nuevo enfoque del análisis en flujo basado en el uso de válvulas solenoides de tres vías de conmutación rápida fue propuesto por Reis y col. en 1994, conocido como **Análisis por Inyección en Flujo Multiconmutado** (*Multi-Commutated Flow Injection Analysis, MCFIA*) [4].

En estos sistemas las válvulas solenoides son controladas por un ordenador y cada una de ellas actúa de manera independiente al resto. Constan de dos posiciones, ON y OFF, y dos de las tres vías están permanentemente conectadas. En general se configura el sistema de manera que cuando la válvula está en la posición ON las disoluciones son impulsadas hacia el sistema, mientras en la posición OFF regresan a sus respectivos recipientes, garantizando el ahorro de muestras y

reactivos que solo son introducidos en el sistema cuando son necesarios para la medición.

En sus inicios el MCFIA tuvo su principal limitación en el escaso desarrollo que existía en interfaces electrónicas y software necesarios para controlar el funcionamiento de las válvulas solenoides.

Una representación esquemática de un sistema de control diseñado y creado por nuestro grupo y comercializado por Sciware SL (Palma de Mallorca, España) se muestra en la [Figura 4](#). Este módulo se controla a través de la interface de la serie Crison RS232.

Otro inconveniente de esta técnica es el sobrecalentamiento que pueden sufrir las válvulas de conmutación cuando están activadas durante períodos de tiempo prolongados. Este sobrecalentamiento es provocado por el calor disipado por el bobinado del solenoide y puede llegar a deformar el teflón de las membranas internas; por lo que se recomienda evitarlo incorporando algún tipo de sistema de protección electrónico del solenoide [5].

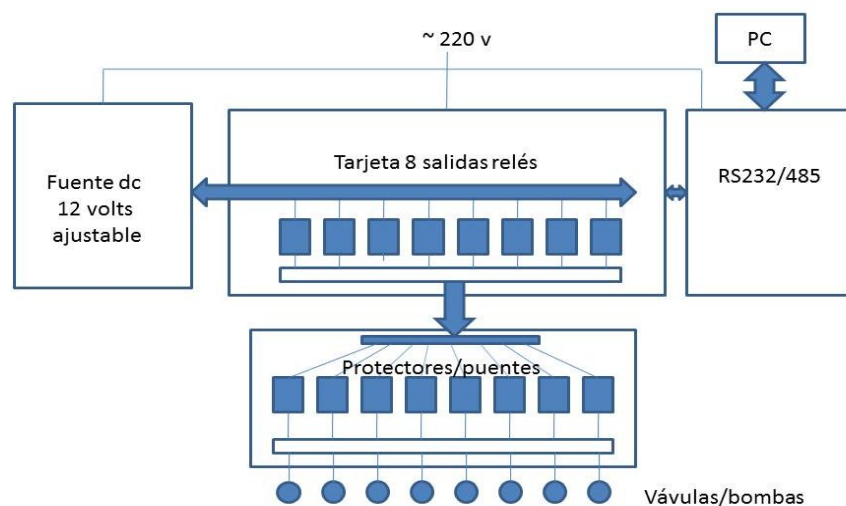


Figura 4. Esquema de un sistema diseñado para el control de las válvulas en la técnica MCFIA.

III. ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO MULTIJERINGA

En 1999 Cerdá y col. en cooperación con Crison Instrument S.A. (Alella, Barcelona, España), proponen el **Análisis por Inyección en Flujo Multijeringa**, (*Multi-Syringe Flow Injection Analysis, MSFIA*), con el objetivo de unificar las ventajas de las técnicas en flujo conocidas hasta entonces y a su vez intentar mitigar los principales inconvenientes de las mismas [6-8].

Estos sistemas están compuestos básicamente por una bureta multijeringa, que funciona de forma similar a una bureta automática convencional, como las utilizadas en SIA, pero adaptada para mover simultáneamente hasta cuatro jeringas que están conectadas en bloque a un mismo motor paso a paso, [Figura 5A](#).

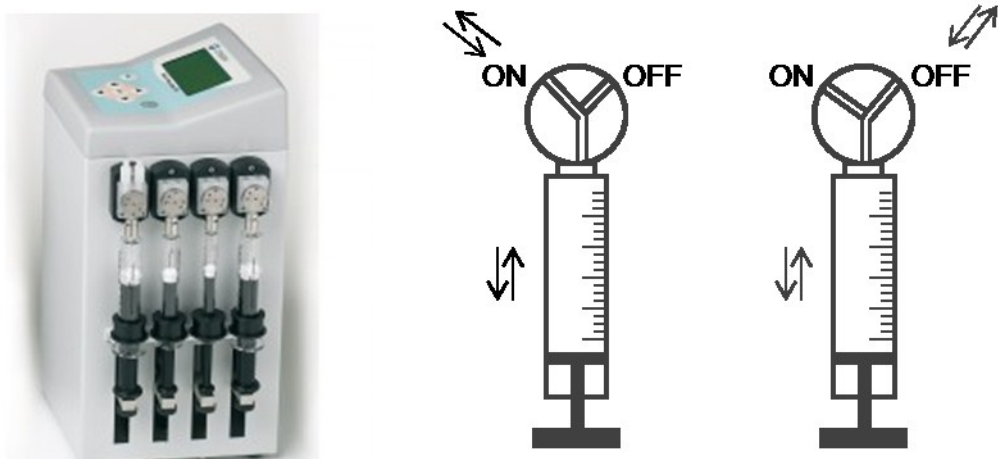


Figura 5A. Fotografía de una bureta multijeringa. 5B. Esquema del movimiento de jeringas mostrando las cuatro posibilidades de conducir el flujo.

Este tipo de buretas reúne las ventajas de la operación multicanal, propia de las bombas peristálticas, así como el manejo de volúmenes exactos, característico de las bombas de pistón. De este modo la técnica MSFIA logra mantener la versatilidad y robustez del SIA basada en el uso de bombas provistas de jeringas evitando los continuos procedimientos de re-calibración requeridos en los sistemas FIA como

consecuencia del envejecimiento de los tubos flexibles de Tygon® necesarios para el correcto funcionamiento de las bombas peristálticas.

En la parte superior de cada una de las cuatro jeringas se acopla una válvula solenoide de conmutación de tres vías, que permite dispensar las muestras y reactivos al sistema solo cuando son requeridas para la determinación analítica; cambiando la posición de conmutación las disoluciones son enviadas hacia el recipiente que las contiene, disminuyendo su consumo. En la [Figura 5B](#) puede observarse el movimiento unidireccional de las jeringas, bien para dispensar (*dispense*) o para cargar (*pick up*) las diferentes disoluciones. Teniendo en cuenta que las válvulas pueden estar en posición ON u OFF tenemos cuatro posibilidades para conducir las muestras y los reactivos a través del manifold.

El tiempo de respuesta de estas válvulas es de solo 35 ms, por lo cual las conmutaciones se pueden realizar incluso durante el movimiento de la bomba de pistón sin producir sobrepresión, permitiendo así diversas modalidades de inyección basadas en tiempo, como multiconmutación, splitting, técnica sandwich o inyección hidrodinámica [9]. Como medida, para evitar la contaminación entre muestras consecutivas, se aconseja no utilizar ninguna de las jeringas del sistema para la inyección de la muestra, siendo necesario un sistema adicional tal como una válvula de inyección, de selección o de conmutación conectada a la jeringa que se empleará para este fin y así garantizar la automatización del sistema.

En la actualidad existen módulos multijeringa con motores que disponen de una resolución de 40000 pasos por cada movimiento del pistón, lo que permite dispensar y aspirar volúmenes pequeños con mayor precisión que los prototipos iniciales que contaban solo con 5000 pasos.

Cada jeringa puede tener diferente capacidad (0.5-1-2.5-5-10 ó 25mL), lo cual ofrece gran variedad de combinaciones de caudales y le confiere mayor versatilidad al sistema. Sin embargo, una limitación de la técnica es el movimiento en bloque de las cuatro jeringas, pues una vez establecido el volumen y el caudal para una de ellas, el flujo de las tres restantes se ajusta de manera automática dependiendo exclusivamente de su tamaño. Otra desventaja de estos sistemas radica en la necesidad de recargar las jeringas periódicamente con las diferentes disoluciones, lo que puede provocar una disminución de la frecuencia de análisis.

Las técnicas de detección tales como la espectrofotometría, fluorescencia atómica, potenciometría, fluorimetría y quimioluminiscencia han sido las más empleadas en los sistemas MSFIA. Recientemente esta técnica ha sido también acoplada con éxito a sistemas de cromatografía de gases como método de separación y detección [10,11].

Para el control del sistema y el tratamiento de los datos, obtenidos a través de la técnica MSFIA, se utiliza el software AutoAnalysis 5.0 [12], que se caracteriza por su gran flexibilidad, pues permite la combinación de diferentes instrumentos según las necesidades del análisis.

Este programa se divide en una aplicación principal relativamente simple y un conjunto de bibliotecas de enlace dinámico (*Dynamic Link Libraries*, DLL) para la conexión de los instrumentos al ordenador y su control. Así, para incorporar un nuevo instrumento en el sistema tan sólo es necesario elaborar las correspondiente DLLs, una de comunicación y otra con los comandos del instrumento.

El programa básico presenta un panel que permite la configuración de los equipos que conforman el sistema en flujo a utilizar. Para comenzar se selecciona de una lista la DLL de cada uno de los canales de

comunicación necesarios para el detector y demás módulos y otra que contiene los comandos de los instrumentos.

Una vez configurado el sistema con los instrumentos que serán utilizados se procede a la edición del método analítico, que consiste en crear una secuencia de instrucciones, donde cada una es ejecutada por uno de los instrumentos conectados o bien es un comando definido por el programa principal para controlar el tiempo, agregar marcas, condicionales o repetir procedimientos, etc.

Una vez definido un método o cargado uno existente, se procede a la ejecución del mismo. Mediante una barra de herramientas se puede controlar dicha ejecución y los parámetros del área del fiagrama obtenido.

IV. NUEVA GENERACIÓN DE ANÁLISIS EN FLUJO

Propuesta por Růžička en el año 2000, el sistema *Lab-on-valve* (LOV) [13] busca la miniaturización del sistema y ha sido concebida para disminuir el consumo de muestras y reactivos.

En el LOV la manipulación de las disoluciones se realiza a modo de inyección secuencial. El diseño del sistema es muy parecido al de un SIA, donde se sustituye la culata de una válvula de selección convencional, por un dispositivo con canales integrados ([Figura 6](#)). Esta técnica permite la manipulación de perlas con superficies activas, generalmente usadas como sistema de preconcentración en fase sólida y/o clean up [14].

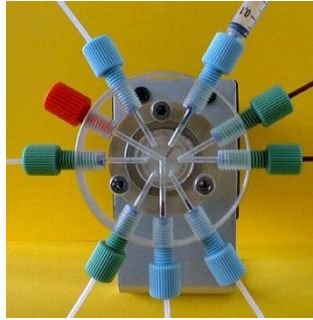


Figura 6. Fotografía del cabezal de un sistema LOV.

Los sistemas MPFS (*Multi-Pumping Flow System*, MPFS), introducidos en el 2002 por Lapa y col. ^[15] se basan en la utilización de microbombas solenoides de pistón que actúan a la vez de impulsor de líquidos y de válvula solenoide de conmutación. Cada pistonada significa la impulsión de un volumen predeterminado de líquido (3, 8, 20, 25, 50 μ l), que junto a la frecuencia del pistón definen el caudal del método ^[5,16]. La MPFS es una técnica muy versátil, de fácil configuración y de bajo costo. Se caracteriza por su rápido mezclado de muestra y reactivos, que es atribuido al movimiento turbulento provocado por las pistonadas, lo que se traduce en un aumento de la señal analítica y por tanto mayor sensibilidad.

B. MÉTODOS DE ANÁLISIS

A pesar de los considerables avances en la química analítica, en pocas ocasiones los instrumentos de medición son capaces de procesar muestras ambientales directamente, ya que su naturaleza ha de ser compatible con la técnica de detección. Generalmente se necesita una etapa previa de preparación de muestras con el objetivo de obtener un extracto limpio compatible con el sistema analítico y concentrar los compuestos de interés.

Las técnicas de extracción son las más utilizadas para la preparación de muestras; de entre todas ellas las de extracción sin disolventes y las miniaturizadas han experimentado un gran auge en los últimos años debido principalmente, a que minimizan el uso de disolventes orgánicos muchas veces caros y tóxicos.

En este apartado se describen las técnicas de preconcentración más utilizadas, haciendo énfasis en extracción en fase sólida y la microextracción líquido-líquido dispersiva que han sido empleadas durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

Así mismo se hace referencia brevemente a algunas características de la cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (*Gas Chromatography - Mass Spectrometry*, GC-MS), y la cromatografía líquida de alta resolución (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), que han sido utilizadas para la separación y determinación cuantitativa de los analitos estudiados. Una descripción más detallada se ofrece sobre la cromatografía multi-jeringa (*Multisyringe Chromatography*, MSC), que ha sido introducida en la última década como técnica alternativa, rápida y económica, a las técnicas convencionales de cromatografía líquida.

I. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN

Las técnicas de extracción más utilizadas son la extracción líquido-líquido (*Liquid Liquid Extraction*, LLE), y la extracción en fase sólida (*Solid-Phase Extraction*, SPE), siendo esta última la más utilizada debido a que precisa de menores cantidades de disolventes orgánicos, los tiempos necesarios para realizar la extracción son menores y la manipulación de la muestra es también menor.

La extracción en fase sólida se basa en la retención selectiva de los analitos sobre un adsorbente apropiado y su posterior elución. Es un proceso físico, en el que la muestra pasa a través del lecho del adsorbente y los analitos se concentran en la superficie, mientras que el resto de componentes no retenidos pasan a través del mismo. Se pueden conseguir extracciones muy selectivas trabajando con adsorbentes adecuados.

La SPE utiliza menos disolvente que la LLE, pero el procesamiento de la muestras es lento y muchas veces se necesita concentrar los extractos obtenidos. Una desventaja que limita la recuperación de los compuestos más ligeros, es la pérdida por volatilidad durante las etapas de secado del cartucho y de concentración de los extractos.

La extracción líquido-líquido se basa en la transferencia de analitos desde la muestra acuosa hacia un disolvente inmiscible en agua. A pesar de los buenos resultados de extracción que se obtienen, esta técnica es laboriosa y requiere mucho tiempo para alcanzar el equilibrio. En ocasiones se necesitan varios pasos para la evaporación del disolvente, lo que puede provocar pérdidas de analitos. Además tiene asociado un elevado consumo de disolventes tóxicos y costosos.

1.1 Extracción en fase sólida

La SPE permite aislar, purificar y preconcentrar analitos en disolución de manera rápida y reproducible. Esta técnica no solo evita las molestas emulsiones que se generan en muchos de los procesos de extracción líquido- líquido, sino que además es un método sencillo, económico y que consume una cantidad considerablemente menor de disolventes orgánicos. Desde su aparición en los años 50, la expansión de la SPE ha sido imparable, llegando a ser una de las técnicas más utilizadas. Esto ha impulsado la comercialización de formatos que permiten la automatización del proceso. La síntesis de nuevos adsorbentes han incrementado la selectividad de la extracción y sus aplicaciones.

El funcionamiento consiste en hacer pasar una muestra a través de un lecho de fase sólida que retiene los analitos y posiblemente algunos interferentes ^[17], que deben ser eliminados mediante lavados antes de eluir los compuestos de interés ([Figura 7](#)). La elución se realiza con la menor cantidad de disolvente posible para aumentar los límites de detección y simplificar el análisis. Otro modo de operación, menos común es retener los interferentes mientras eluyen los analitos.

La naturaleza química de los materiales empleados en SPE es similar a la de los utilizados en cromatografía líquida por lo cual es muy fácil acoplarla ambas técnicas utilizando precolumnas y así se evita la manipulación de las muestras lo que reduce las posibilidades de contaminación y pérdidas de los analitos.

La selectividad de la SPE está relacionada con la capacidad del adsorbente de discriminar entre los analitos de interés y los demás compuestos de la matriz. Las propiedades del adsorbente están relacionadas con la estructura química del analito y/o la composición de la matriz de la muestra.

Los materiales comúnmente empleados en SPE tienen en común una estructura tridimensional rígida y porosa, con una elevada área superficial. En general se utilizan sílice o resinas poliméricas que pueden ser modificados mediante la introducción de diferentes grupos funcionales.

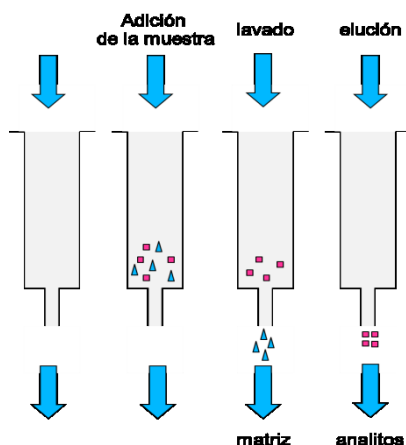


Figura 7. Esquema del procedimiento SPE para la extracción de muestras.

1.2 Microextracción líquido-líquido dispersiva

En los últimos años la atención se ha centrado en la miniaturización de las técnicas de preparación de muestras, que garantizan la reducción del consumo de reactivos. En este sentido los métodos de microextracción han atraído mucho la atención. Así métodos como microextracción en fase sólida (*Solid-Phase Microextraction*, SPME), extracción por adsorción sobre barra agitadora (*Stir Bar Sorptive Extraction*, SBSE) microextracción en fase líquida (*Liquid-Phase Microextraction*, LPME) y más recientemente micro-extracción líquida-líquida dispersiva (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*, DLLME) [18, 19], han sido desarrollados como técnicas alternativas a los procedimientos clásicos de extracción. De todos ellos el más simple, rápido y amigable con el medio ambiente es el método de DLLME [20].

La DLLME se basa en una inyección rápida de un sistema de disolventes ternarios en la muestra acuosa que contiene los analitos de

interés. La mezcla inyectada combina pocos microlitros de un disolvente extractante de alta densidad y muy baja solubilidad en agua, con otro llamado solvente dispersivo de alta miscibilidad tanto en la fase de extracción como en la acuosa. Los disolventes de extracción más comunes son disolventes orgánicos clorados como el clorobenceno, tetracloruro de carbono, tetracloroetileno o cloroformo; mientras acetona, metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano son los disolventes dispersantes utilizados generalmente.

Inmediatamente después de la inyección se produce una gran turbidez de la mezcla ternaria, debido fundamentalmente a la formación de gotas muy pequeñas que se dispersan a través de la muestra acuosa. Luego, con el objetivo de unir las gotas dispersadas, se centrifuga la mezcla turbia, obteniéndose una fase sedimentada en el fondo del tubo (Figura 8). Por razones prácticas, se utilizan tubos de vidrio de fondo cónico, lo cual facilita la recuperación de la gota que se lleva a cabo con una microjeringa. Los analitos de interés se concentran, desde la muestra acuosa, en el pequeño volumen de disolvente de extracción, con lo cual la extracción y concentración de los mismos ocurre en una única etapa. Por último la determinación de los analitos en la fase sedimentada se realiza mediante análisis instrumental.

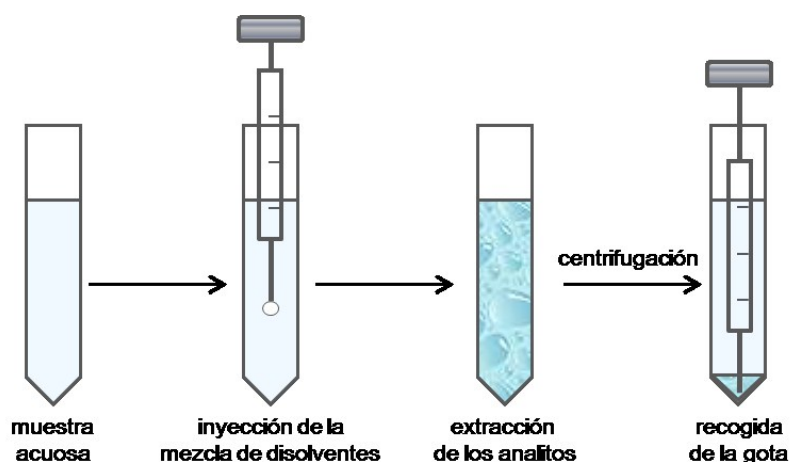


Figura 8. Esquema del proceso de DLLME.

Para controlar la influencia de las distintas variables durante la etapa de optimización se tiene en cuenta el factor de enriquecimiento (EF) y la recuperación (R). El EF para cada compuesto se define como el cociente entre su concentración en la fase sedimentada y la concentración inicial en la muestra acuosa ([ecuación 1](#)). La recuperación se calcula como el cociente entre el volumen de la fase sedimentada y la fase acuosa multiplicando por cien ([ecuación 2](#)).

—

Ecuación 1

—

Ecuación 2

La eficiencia de extracción en los procesos de DLLME depende fundamentalmente del tipo y volumen de los disolventes empleados. Otros factores que conviene tener en cuenta son el tiempo de extracción, el tiempo de centrifugado y la fuerza iónica ^[21].

El disolvente de extracción debe tener mayor densidad que el agua, alta capacidad de extracción para los compuestos de interés y buen comportamiento cromatográfico. El volumen del disolvente de extracción es un factor fundamental que debe ser optimizado; el aumento de este se traduce en un aumento del volumen de fase sedimentada, por lo que disminuye el factor de enriquecimiento. Sin embargo, su reducción está determinada por la obtención de una gota sedimentada fácilmente manipulable.

La miscibilidad del disolvente dispersante con el disolvente de extracción y con la fase acuosa, es esencial en la selección del mismo. El volumen de disolvente dispersante afecta directamente al grado de dispersión del disolvente de extracción en la fase acuosa, y por lo tanto,

a la eficiencia de extracción. Variaciones en el volumen de disolvente dispersante también originan cambios del volumen de la fase sedimentada.

En DLLME, el tiempo de extracción se define como el intervalo entre la inyección de la mezcla (dispersante/extractante) en la muestra acuosa, y el comienzo de la etapa de centrifugación. Generalmente, el tiempo no influye en la eficiencia de la extracción. El área superficial entre el disolvente de extracción y la fase acuosa es muy elevada, por lo que la transferencia de los analitos de la fase acuosa a la fase de extracción es muy rápida, y el estado de equilibrio se alcanza rápidamente [18,21-23]. En consecuencia el tiempo de extracción es muy corto, siendo esta una de las principales ventajas de DLLME. No obstante, en ciertas aplicaciones se observó una influencia del tiempo en los resultados de extracción [24-26].

Otra posibilidad es agitar la muestra justo después de la inyección de la mezcla de disolventes, para favorecer el contacto entre las fases acuosa y orgánica [27]. La agitación puede realizarse manualmente o mediante un baño de ultrasonidos.

La etapa de centrifugación generalmente no afecta la eficiencia de la extracción; sin embargo para muchos autores es una etapa esencial para obtener dos fases diferenciadas, y puede afectar el volumen de la fase sedimentada [22,27].

La adición de sales ha sido ampliamente utilizada en procesos como LLE, SPME y LPME, para mejorar la eficiencia de extracción. Generalmente, la adición de sal disminuye la solubilidad de los analitos en la fase acuosa y favorece el paso de los mismos a la fase orgánica, por lo cual la fuerza iónica también afecta el volumen obtenido de la fase sedimentada [21,28,29].

II. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

El término cromatografía engloba un conjunto de métodos físicos de separación basados en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una estacionaria y otra móvil. Frecuentemente estas técnicas se clasifican de acuerdo a la naturaleza de la fase móvil. Así, hablamos de cromatografía de gases (*Gas Chromatography*, GC), cromatografía líquida (*Liquid Chromatography*, LC) o cromatografía de fluidos supercríticos (*Supercritical Fluid Chromatography*, SFC).

La **Cromatografía de gases**, basada en la diferencia de volatilidad de los solutos y en la distinta capacidad de interacción de los mismos con la fase estacionaria, ofrece alta capacidad de separación y sensibilidad en el análisis de compuestos volátiles.

Para el desarrollo de esta tesis doctoral se utilizó un sistema GC-MS como método de determinación, empleando como detector de masas una trampa de iones en la modalidad de impacto electrónico como modo de ionización. Este sistema de detección, mediante el paso de corriente, genera electrones que chocan con las moléculas que fluyen de la columna, provocando su ionización. Cuando la energía de los electrones supera el potencial de ionización de las moléculas, éstas se ionizan positivamente, formando el ión molecular y liberando un electrón. Como resultado del choque se produce la rotura de uno o más enlaces del ión molecular y se genera una fragmentación específica para cada molécula permitiendo su identificación.

Durante el proceso de fragmentación las especies ionizadas pasan al analizador y se someten a una corriente de radiofrecuencias que estabiliza en órbitas circulares los fragmentos con una determinada relación masa/carga (m/z). El analizador de trampa iónica ofrece la posibilidad de aislar un ión y re-fragmentarlo, obteniendo así un espectro

de masas-masas (MS/MS). Este modo de trabajo aumenta la sensibilidad y selectividad de la determinación analítica; por esta razón la GC-MS generalmente es considerada la técnica de elección para el análisis traza de compuestos orgánicos.

En el proceso de detección los potenciales de los electrodos que constituyen la trampa se alteran y provocan inestabilidad en la trayectoria de los fragmentos que son expulsados de la trampa hacia el detector. El detector consiste en un multiplicador donde se genera una cascada de electrones por el impacto de cada fragmento; la señal eléctrica amplificada se registra y se procesa en forma de pico cromatográfico ^[30], permitiendo la identificación y cuantificación de los analitos estudiados.

La **cromatografía líquida de alta resolución** es una técnica rápida y de aplicación casi universal, debido al continuo progreso y desarrollo de diferentes tipos de detectores, columnas, fases estacionarias y técnicas de inyección. Es muy valiosa para aquellos compuestos que responden bien a un sistema de detección particular, como por ejemplo analitos que fluorescen (o que pueden ser derivatizados y dar un compuesto fluorescente).

La mayoría de las separaciones, por HPLC, se realizan actualmente en fase reversa (*reverse phase*, RP) debido a su mayor campo de aplicación. La NP-HPLC (*normal phase*, NP) debe su poco uso, fundamentalmente, a la falta de reproducibilidad de los tiempos de retención puesto que los disolventes próticos cambian el estado de hidratación del gel de sílice o alúmina de la cromatografía.

El análisis se realiza mediante la introducción de la muestra, (generalmente entre 20 y 100 μL), en el inyector desde donde es arrastrada por una fase móvil líquida hasta la columna en la cual ocurre la separación de los analitos, pasando luego al detector. Dentro de los

detectores más utilizados en HPLC destacan el de índice de refracción, ultravioleta, fluorescencia y electroquímicos.

La gran variedad de fases estacionarias y detectores proporcionan una selectividad única para la separación de isómeros que normalmente son difíciles de separar en cromatografía de gases.

II.1 Cromatografía Multijeringa

Las técnicas de análisis en flujo son descritas en la literatura como métodos multiparamétricos, sin embargo la mayoría de ellos son aplicados a la determinación de solo uno o dos analitos a la vez. El análisis de diversos parámetros químicos se ha limitado a determinaciones específicas y para lograrlo es necesario mantener un único caudal de flujo a través de un multidetector o varios sistemas de detección colocados en serie [31-33].

Para identificar analitos de una mezcla, mediante estas técnicas, es necesario un procedimiento previo de derivatización eficaz, lo que no siempre permite que todos los componentes de la muestra se resuelvan de forma selectiva. En ocasiones algunos problemas de selectividad pueden evitarse utilizando herramientas no separativas como detectores selectivos, cámaras de separación o procedimientos matemáticos específicos.

Otra forma de aumentar considerablemente la selectividad de las técnicas de análisis en flujo consiste en utilizar columnas cromatográficas acopladas al sistema, separando los compuestos a estudiar antes de su identificación; sin embargo, el desarrollo de estos procedimientos no fue posible hasta la aparición de las columnas monolíticas, debido a que tanto las bombas peristálticas como las bombas multijeringas soportan presiones relativamente bajas, no compatibles con las columnas cromatográficas convencionales.

Las primeras columnas monolíticas se obtuvieron a partir de espumas de poliuretano en la década de los 70, para cromatografía líquida y gaseosa ^[34]. Posteriormente, en 1989, Hjertén investigó sobre los geles ligeros, a los cuales llamó lechos continuos ^[35]. Tanto las espumas como los geles eran incapaces de resistir las presiones asociadas a caudales elevados debido a su baja resistencia mecánica, imposibilitando los análisis rápidos.

Este problema se solventó cuando Svec y colaboradores ^[36], introdujeron los primeros monolitos poliméricos rígidos para electrocromatografía capilar. En 1991 Nakanishi y Soga describieron una técnica para la obtención de una estructura porosa de sílice monolítica para HPLC ^[37], pero presentaba dificultades en su procesado y su desarrollo se vio retrasado hasta 1996 ^[38]. Finalmente en el año 2000 empezaron a comercializarse las primeras columnas monolíticas fabricadas por Merck (KGaA, Darmstadt, Alemania) ^[39], basadas en el método de Nakanishi.

La palabra griega “monolithos” se traduce como “piedra única”. En términos cromatográficos significa que la separación tiene lugar en un soporte o lecho continuo. Mientras las columnas cromatográficas convencionales están rellenas con pequeñas partículas esféricas de sílice, las monolíticas están formadas por una sola pieza con estructura bimodal, (conteniendo macroporos y mesoporos), que le confiere una alta estabilidad mecánica y largos tiempos de vida operativa ^[40].

Esta estructura porosa de monolitos rígidos garantiza además una alta permeabilidad y baja resistencia hidrodinámica, facilitando las separaciones cromatográficas con moderadas o bajas presiones sin pérdidas significativas de resolución ^[41]. Esta característica es la que ha hecho posible que estas columnas puedan ser acopladas a técnicas de

análisis en flujo obteniendo buenos resultados en la separación e identificación de compuestos dentro de una mezcla.

En el año 2003, Solich y col. reportan los primeros trabajos científicos basados en la integración de una columna monolítica en el manifold de un sistema SIA, denominando a esta técnica cromatografía de inyección secuencial (*Sequential Injection Chromatography*, SIC) [42]. Su objetivo fue desarrollar un nuevo método de separación y demostrar su funcionalidad en la determinación simultánea de varios compuestos. Estas técnicas han sido aplicadas con buenos resultados en el análisis de muestras de varios componentes, principalmente en el área farmacéutica [43].

De manera similar, Cerdà y col. introdujeron la cromatografía multijeringa (*Multisyringe Chromatography*, MSC) acoplando una columna monolítica con un sistema MSFIA [44]. Esta técnica ha sido aplicada con resultados satisfactorios en diferentes grupos de compuestos [44,45-49].

De manera general el uso combinado de SIA o MSFIA con sistemas cromatográficos permite disminuir los tiempos de análisis manteniendo la selectividad y especificidad requerida. Además, simplifican el análisis y debido al bajo coste de las técnicas de análisis en flujo, son métodos más económicos que los sistemas comerciales de cromatografía líquida. Su principal desventaja radica en que solo se puede utilizar columnas cortas para evitar que se genere un exceso de presión en el sistema. Así mismo el rango de flujos para la fase móvil está limitado por los valores de presiones que pueden soportar las válvulas.

Una descripción más detallada de las técnicas SIC y MSC se pueden encontrar en el review titulado “Contribution of multi-commuted flow analysis combined with monolithic columns to low-pressure, high-performance chromatography”, que se adjunta a este capítulo. En este

artículo se revisan las principales características así como algunas aplicaciones y las ventajas y desventajas de estas técnicas.

También se anexa el mini-review titulado “Monolithic columns in flow analysis: a review of SIC and MSC techniques”, el cual, además de una visión general de dichas técnicas, incluye aplicaciones más recientes que las expuestas en la publicación anterior. Este trabajo ha sido aceptado para su publicación por invitación en la revista *Instrumentation Science & Technology*.

II.1.1 Review:

***Contribution of multi-commuted flow analysis combined
with monolithic columns to low-pressure, high-
performance chromatography***

M. Fernández, H.M. González-San Miguel, J.M. Estela, V. Cerdà.

Trends in Analytical Chemistry 28 (2009) 336-246

II.1.2 Review:

***Monolithic columns in flow analysis: a review of SIC and
MSC techniques***

Mailen Fernández, Rafel Forteza & Víctor Cerdá

Instrumentation Science and Technology 40 (2012) 90–98

C. COMPUESTOS ESTUDIADOS

Con el objetivo de ensayar y validar los métodos de análisis propuestos durante el desarrollo de esta memoria se estudiaron diferentes analitos. La puesta a punto de los métodos de cromatografía multijeringa se ha realizado con vitaminas hidrosolubles; mientras que para los estudios de extracción en fase sólida y microextracción líquido-líquido dispersiva, mediante análisis en flujo acoplado a cromatografía, se han empleado hidrocarburos aromáticos policíclicos.

En este apartado se presenta una breve descripción de las principales características de estos compuestos y sus métodos de caracterización.

I. VITAMINAS HIDROSOLUBLES

1.1 Definición, estructura y propiedades

Las vitaminas son nutrientes orgánicos esenciales para la vida, pues sin ellas el organismo no es capaz de aprovechar los elementos necesarios para el mantenimiento de las constantes biológicas [50]. Actúan como coenzimas y grupos prostéticos de las enzimas en numerosas reacciones bioquímicas. Son moléculas biológicamente muy activas por lo que sus requerimientos no son altos, pero tanto su defecto como su exceso pueden provocar enfermedades [51,52].

Hay 13 vitaminas identificadas que forman una familia de compuestos heterogéneos y se clasifican en liposolubles, (que incluye las vitaminas (A, E, D y K), e hidrosolubles (grupo vitamínico del complejo B y ácido ascórbico), de acuerdo a su solubilidad en grasas o agua respectivamente. Son compuestos orgánicos, que se diferencian en su estructura química, así como en su acción fisiológica y su importancia nutricional en la dieta humana, incluso dentro del mismo grupo [53].

En las vitaminas hidrosolubles además de carbono, hidrógeno y oxígeno, podemos encontrar uno o más átomos de nitrógeno y azufre ([Figura 9](#)). Actúan como cofactor en diversas reacciones metabólicas para producir energía. Al ser solubles en agua el exceso de ingestión no suele provocar toxicidad, ya que son transportadas por la sangre y eliminadas por el aparato excretor. Por este motivo dentro de este grupo de vitaminas, las reservas en el organismo no revisten importancia, y la alimentación diaria debe aportar y cubrir sus necesidades para el desarrollo y mantenimiento normal de las funciones corporales.

En condiciones ideales, una dieta equilibrada debe proporcionar la dosis de vitaminas necesarias para el mantenimiento del organismo, sin embargo, investigaciones científicas demuestran que esta situación no se da en la práctica para todas las vitaminas ni para todos los grupos de población.

En gran medida están presentes en frutas, vegetales y algunas fuentes animales; además pueden ser sintetizadas químicamente. En general son moléculas lábiles que se alteran con facilidad o resisten mal los cambios de temperatura y los almacenamientos prolongados de los alimentos.

Para anticipar y corregir las pérdidas que pueden ocurrir durante el procesado o preservación de ciertos alimentos, algunos productos son enriquecidos con vitaminas, especialmente aquellos dirigidos a la nutrición infantil. Este enriquecimiento generalmente se alcanza con premezclas que contienen elevadas concentraciones de vitaminas ^[54]. Además, existen productos farmacéuticos orientados básicamente a estados carenciales avanzados.

La deficiencia de una sola vitamina es, en la actualidad, rara vez endémica y es más probable que se presente como parte de los estados

de desnutrición general en consecuencia de dietas no equilibradas, en personas alcohólicas, en enfermos que requieren alimentación parenteral prolongada, o en los que presentan una inadecuada absorción intestinal. También puede existir carencia, siempre que el organismo se vea sometido a un esfuerzo especial, como ocurre durante el embarazo, la lactancia y en las fases de crecimiento más rápido del niño, así como en caso de trabajo físico intenso; situaciones que tienen mayor probabilidad de asociarse a un déficit vitamínico cuando hay dificultades para asegurar una dieta rica y variada.

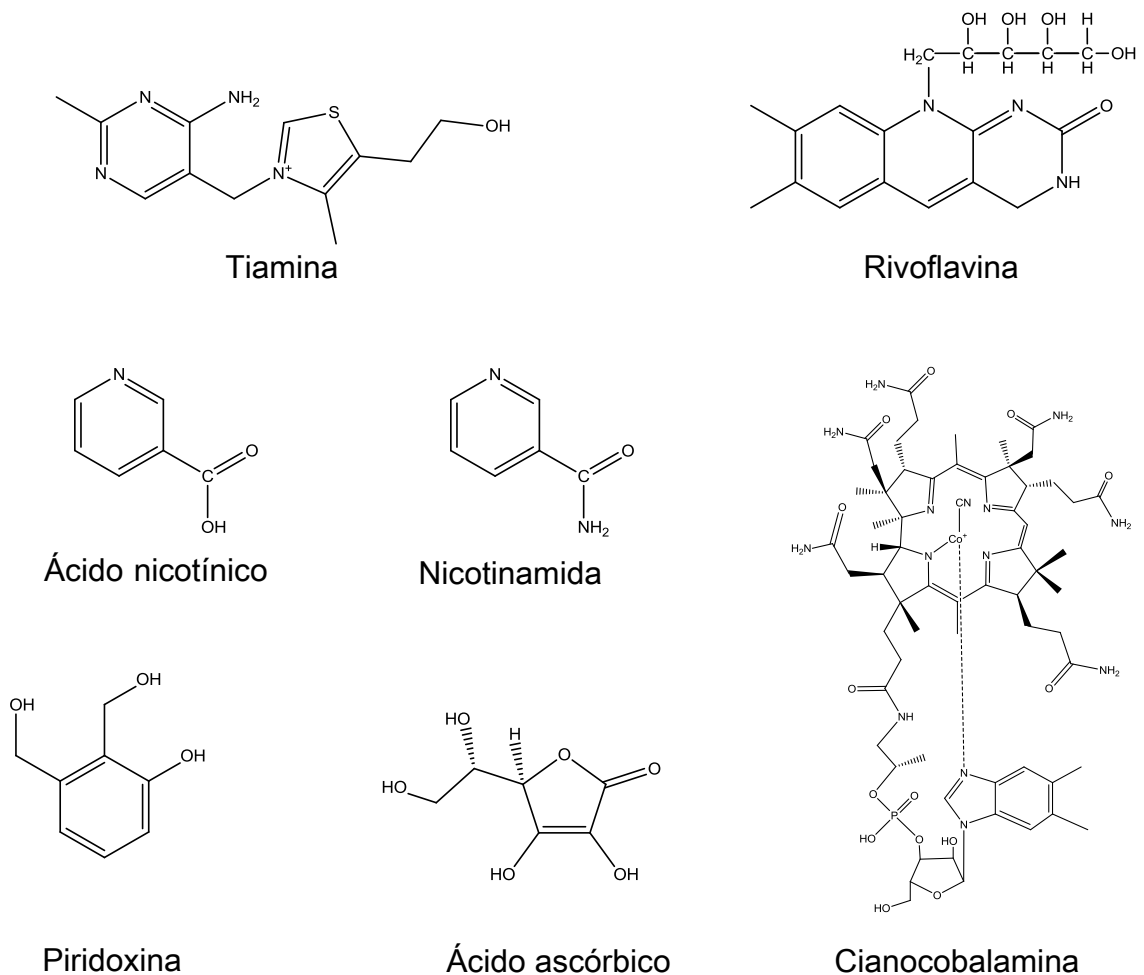


Figura 9. Estructura de las vitaminas hidrosolubles estudiadas.

1.2 Producción y aplicaciones

Todas las vitaminas pueden ser obtenidas desde fuentes naturales, animal o vegetal. La mayoría de ellas son además, producidas industrialmente para ser utilizadas como aditivos de alimentos y piensos, agentes médicos o terapéuticos, en técnicas cosméticas y otros usos.

En la actualidad pocas vitaminas son producidas exclusivamente por vía de síntesis química o procedimientos de extracción, debido a que estos procesos requieren un elevado consumo energético, lo cual ha llevado a incrementar el interés en sustituir estas técnicas por procesos biotecnológicos. Los métodos de fermentación, mediante microorganismos, han sido aplicados como una buena alternativa a los procesos de extracción de un amplio rango de vitaminas [55]. Adicionalmente, se han usado diferentes métodos, como la mutación, el screening, la conversión biocatalítica y la ingeniería genética, para optimizar su producción.

La mayor parte de las vitaminas obtenidas industrialmente son utilizadas para la producción de suplementos vitamínicos. En los últimos años el consumo de complementos dietéticos ha aumentado considerablemente y con ellos la competencia industrial por producir mayores cantidades para cubrir la demanda.

Las vitaminas farmacéuticas, al ser consideradas como complemento alimenticio, no son sometidas a los mismos controles de seguridad que se les exige a otros productos médicos. Investigaciones realizadas por asociaciones de consumidores en algunos países revelaron que no siempre los suplementos vitamínicos cumplían con la pureza y cualidades anunciadas por el fabricante y hasta incluso podían variar de píldora a píldora en un mismo frasco.

Con el objetivo de regular los suplementos alimenticios el Parlamento Europeo, en su *Directiva 2002/46/CE* establece que dichos complementos solo podrán contener las vitaminas y sustancias vitamínicas enumeradas en sus anexos I y II, solas o combinadas ^[56]. Así mismo dicta que la Comisión fijará los criterios de pureza de las sustancias que los componen y sus cantidades máximas y mínimas autorizadas. Además se fijan las condiciones de etiquetado, el sistema de control y la cláusula de salvaguardia. Esta Directiva se refiere a los complementos alimenticios, definidos como fuentes concentradas de nutrientes (vitaminas y minerales) o a otras sustancias que tengan efectos nutricionales o fisiológicos que se comercializan en forma dosificada (por ejemplo, cápsulas, tabletas, bolsitas de polvos, etc.), y cuyo fin sea complementar una dieta normal.

De igual manera en España, el *Real Decreto 1487/2009* regula aquellos suplementos alimenticios consistentes en fuentes de nutrientes y que se presentan con la finalidad de complementar la ingesta de tales nutrientes en la dieta normal ^[57]. Este real decreto se ajusta plenamente a las prescripciones de la *Directiva 2002/46/CE*.

Para algunos consumidores el recurso de los fármacos, entendidos como sustancias puramente químicas y no naturales, va perdiendo su atractivo. Así surgen los denominados "farmalimentos" o "alimentos enriquecidos", que incluyen un suplemento de alguna sustancia beneficiosa para el organismo, lo que teóricamente les coloca en un lugar aventajado con respecto a sus homólogos corrientes.

El enriquecimiento de los alimentos es un método tecnológico eficaz, que incorpora micronutrientes esenciales, (vitaminas y minerales), con el fin de mejorar la calidad nutricional de los mismos para prevenir o corregir una demostrada deficiencia de uno o más nutrientes en la

población o grupos de población específica con un riesgo mínimo para la salud.

El *Reglamento No 1925/2006* del Parlamento Europeo y del Consejo armoniza las normas de los Estados miembros para facilitar la libre circulación de los alimentos dentro de la Unión Europea (UE) y mejorar la protección del consumidor. Asimismo, establece una lista de vitaminas y minerales que se pueden añadir a los alimentos. Por otro lado, fija normas de etiquetado complementarias para informar mejor al consumidor sobre los nutrientes añadidos a los alimentos ^[58].

1.3 Análisis químico de las vitaminas hidrosolubles

Dada la importancia que revisten las vitaminas hidrosolubles en la salud del organismo humano, su análisis cuantitativo es imprescindible para determinar el contenido de las mismas en alimentos y en productos farmacéuticos.

Existen varios factores que conducen a la pérdida de las vitaminas hidrosolubles en alimentos, tales como la temperatura, la presencia de oxígeno, la luz, la humedad, el pH, las modificaciones enzimáticas y la presencia de elementos traza metálicos, particularmente hierro y cobre ^[59]. El nivel de degradación que pueden alcanzar, varía de acuerdo a cada vitamina y puede verse afectado también por el tiempo de procesamiento y de almacenamiento al que los alimentos sean sometidos. Se conoce que las vitaminas del complejo B son muy susceptibles a las pérdidas por lixiviación durante el lavado, mientras que la vitamina C es muy propensa a la oxidación química.

Las normas y directivas establecidas para el control de los suplementos alimenticios y los alimentos enriquecidos con vitaminas exigen un adecuado etiquetado nutricional de los mismos, lo que supone

una carga adicional en el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de vitaminas de manera rápida y específica.

El análisis de vitaminas solubles en agua se realiza en dos etapas. Inicialmente se precede a la extracción de las mismas para separarlas de la matriz de estudio eliminando posibles interferencias y posteriormente se efectúa la determinación cualitativa y/o cuantitativa de las mismas. Es necesario seleccionar las condiciones de extracción en forma cuidadosa con el fin de minimizar las posibles pérdidas en la etapa de preparación de muestras.

El procedimiento para la extracción del ácido ascórbico, (vitamina C), es diferente al de las restantes vitaminas, debido a que este es muy inestable a pH neutro o ligeramente ácido y se oxida muy fácilmente a ácido dehidroascórbico, situación que se favorece en presencia de oxígeno disuelto, iones de cobre, hierro e hidroxilo [60,61].

El análisis de vitamina C se puede realizar desde dos enfoques diferentes, se puede determinar el ácido ascórbico presente en la muestra ignorando alguna presencia posible de ácido dehidroascórbico o determinar el "ácido ascórbico total" que incluye la suma de ambas formas y requiere un paso para la transformación ya sea de ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico o viceversa.

El ácido ascórbico es fácilmente oxidado en condiciones alcalinas, por lo que generalmente se utiliza un disolvente ácido de elevada fuerza iónica para suprimir la actividad metabólica sobre la perturbación de las células y para precipitar las proteínas. El ácido metafosfórico proporciona la extracción más eficiente del ácido ascórbico con respecto a otros ácidos; pero puede causar serias interacciones analíticas con columnas a base de sílice, (ej. fases enlazadas a NH₂ y RP-C18), que pueden resultar en derivas de la línea de base y tiempo de retención [62,63]. El

ácido oxálico también ha sido reportado como un extractante y a las concentraciones empleadas usualmente, es más económico y menos tóxico que el ácido metafosfórico [64]; sin embargo, a veces no se recupera el ácido ascórbico total presente en la muestra y los extractos obtenidos son menos estables que en ácido metafosfórico.

Debido a la baja longitud de onda en la absorbancia del ácido dehidroascórbico, (210 nm), y la falta de respuesta en los detectores electroquímicos, en ocasiones se lleva a cabo su reducción a ácido ascórbico para determinar la vitamina C total. Los compuestos que tienen un grupo sulfhidrilo, tales como la homocisteína, dimercaptopropanol, dimercaptoetanol, glutatión, cisteína y ditiotreitól [65], o la tris(2-carboxietil)fosfina [66] han sido empleados con resultados satisfactorios en el procedimiento de reducción.

Además, debido a la presencia de iones metálicos, especialmente hierro y cobre en la muestra a estudiar, se puede requerir el uso de un agente quelante, tal como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Este paso en la extracción ralentiza el análisis debido al largo tiempo de retención del EDTA.

La identificación de las vitaminas del complejo B es a veces engorrosa desde el punto de vista analítico, debido a las múltiples formas biológicamente activas en las que ellas existen y los bajos niveles en los que generalmente se encuentran en las diferentes matrices [59]. Las vitaminas que integran este grupo se determinan frecuentemente en su forma libre, lo cual implica la hidrólisis de las formas fosforiladas y/o aquellas unidas a las proteínas durante la etapa de extracción. Las vitaminas libres de proteínas en general, se obtienen por tratamiento en autoclave de la muestra (121°C) o por extracción con HCl 0.1M en caliente (30 min, 100°C), ajustando el pH a 4.5 [54,67]. Algunos autores

han recomendado el tratamiento con enzimas (amilasa y taka-diastrasa), durante 12 horas a 37°C para hidrolizar estos compuestos antes de su identificación [68-71].

Los métodos para la determinación conjunta de todas las vitaminas hidrosolubles se ven obstaculizados debido a que éstas son moléculas lábiles de alta polaridad y difieren entre sí en su estructura. Otro factor a tener en cuenta es la baja concentración en la que se encuentran en algunos alimentos, necesitando métodos analíticos muy sensibles para su cuantificación.

En la actualidad los ensayos microbiológicos siguen siendo los métodos de referencia de la AOAC (*Association of Official Analytical Communities*) para la determinación de vitaminas hidrosolubles [72]. Estos son muy sensibles pero también laboriosos para conseguir una estimación del valor medio con cierta precisión y la mayoría de ellos están diseñados para el análisis de una vitamina individual y sus compuestos de degradación; además se requiere mucho tiempo para el análisis [59,70,73].

En estudios recientes la Farmacopea de Estados Unidos [74], reporta métodos de cromatografía líquida de alta resolución empleando columnas C8 (octil silano) y C18 (octadecil silano) para la determinación simultánea de tiamina, riboflavina, niacina o nicotinamida y piridoxina.

En los últimos años se han sido desarrollado una gran variedad de técnicas no oficiales para el análisis de vitaminas solubles en agua y sus metabolitos. Estas incluyen cromatografía de gases [75,76], electroforesis capilar, [77,78] y cromatografía líquida con diversos métodos de detección, [54,79-87].

La mayor parte de estos métodos utilizan HPLC con detección espectrofotométrica. Recientemente Langer y col. realizaron un estudio

para el análisis de seis vitaminas hidrosolubles comparando los resultados obtenidos con detección ultravioleta, fluorescente y coulombimétrica [88]. Bajo las condiciones óptimas para cada una, los resultados revelan que únicamente la riboflavina y el piridoxal fueron detectadas por fluorescencia y solo el ácido fólico, el piridoxal y el ácido ascórbico tuvieron sensibilidad suficiente para ser detectadas por coulombimetría. Sin embargo, todas pudieron ser identificadas utilizando detección ultravioleta.

Los detectores ultravioleta y ultravioleta visible son muy comúnmente utilizados para el análisis mediante HPLC. Estos permiten al usuario seleccionar la longitud de onda adecuada para garantizar los mejores resultados. Dentro de este grupo, el detector UV-vis de arreglo de diodos es especialmente útil ya que ofrece la posibilidad de hacer barridos a distintas longitudes de onda de cada uno de los componentes separados. De esta manera, se genera una colección de cromatogramas a diferentes longitudes de onda de cada analito y así se puede determinar la mejor longitud de onda a la que debe monitorearse el compuesto de interés.

II. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

II.1 Definición, estructura y propiedades

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, PAHs), representan una extensa familia de compuestos formados principalmente por átomos de carbono e hidrógeno agrupados en dos o más anillos aromáticos fusionados entre sí, dando lugar a un alto grado de insaturación con gran cantidad de electrones deslocalizados.

Si bien están generalmente formados por anillos bencénicos, algunos contienen anillos de cinco eslabones en su estructura como el acenaftileno y el fluoranteno (Figura 10). Además existen algunos PAHs

que contienen grupos alquilo, así como compuestos cercanos a esta familia que contienen átomos de oxígeno, azufre o nitrógeno en sus moléculas.

Las propiedades físico-químicas de los PAHs, ([Tabla 1](#)) son muy diversas y dependen especialmente del grado de saturación, de la configuración espacial de los anillos aromáticos en su estructura y de su peso molecular, relacionado con el número de electrones moleculares enlazantes ocupados ^[89]. Son sustancias orgánicas neutras, no polares y con baja volatilidad. Los sistemas conjugados de sus orbitales π son los responsables de su estabilidad química.

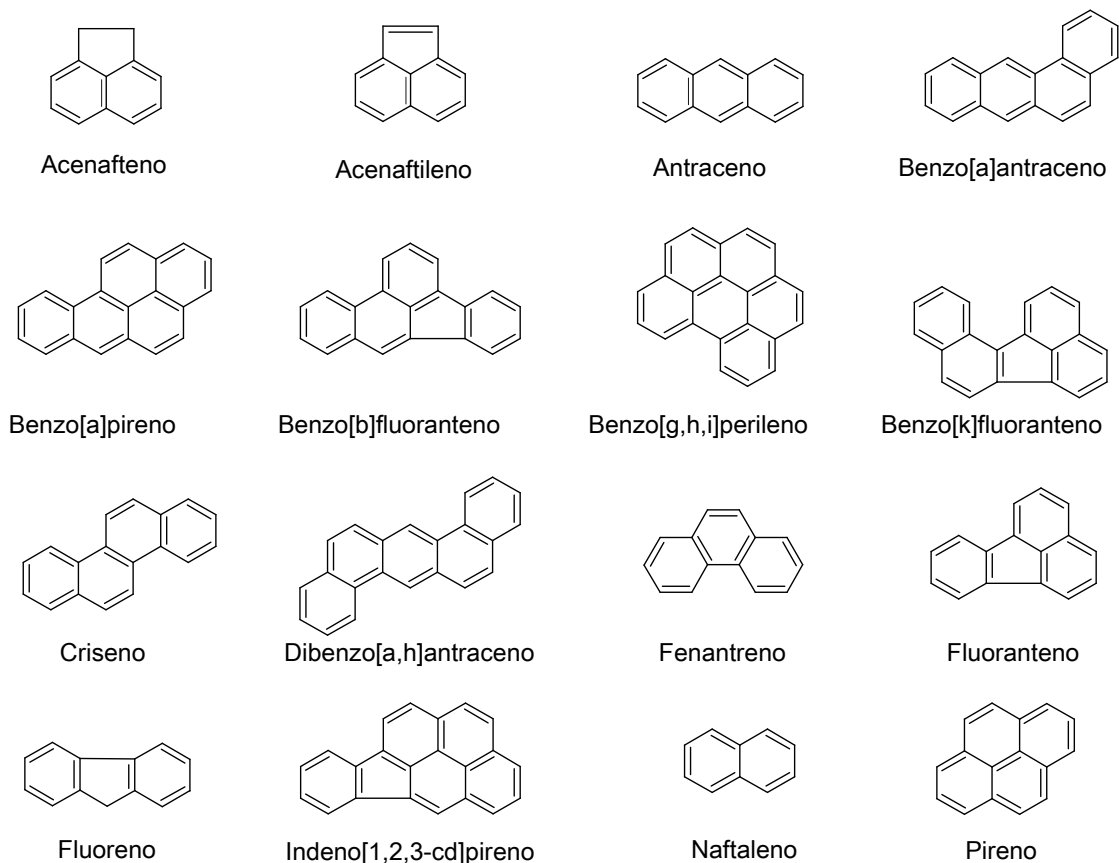


Figura 10. Estructura de los 16 PAHs considerados prioritarios por la US EPA.

Los PAHs en general son lipofílicos, con valores de $\log K_{ow}$ que oscila entre 3 y 7, por lo que tienden a unirse a sustancias grasas; propiedad

que se incrementa con la complejidad de su estructura y la masa molecular. La solubilidad en agua puede aumentar en presencia de detergentes, sales alcalinas, ácidos grasos o disolventes orgánicos. También tiene una influencia considerable en la solubilidad de estas moléculas, la presencia de grupos alquílicos en sus estructuras, así como la configuración geométrica de las mismas y la temperatura, pudiéndose triplicar la solubilidad de algunos PAHs al variar la temperatura entre 6 y 26 °C.

En forma de sustancias químicas puras existen generalmente como sólidos cristalinos incoloros o de color blanco-amarillento y tienen un olor leve y agradable. Existen más de 100 clases diferentes de PAHs y rara vez se encuentran aislados, casi siempre están formando parte de mezclas complejas. Constituyen uno de los grupos más contaminantes presentes en el medio ambiente siendo considerados prioritarios por la Agencia Norteamericana de Protección Ambiental (*United States Environmental Protection Agency*, US-EPA) y la Unión Europea, debido a las propiedades mutágenas, carcinógenas y teratógenas que poseen algunos de ellos ^[90].

Como consecuencia de sus elevados coeficientes de partición octanol-agua y la baja solubilidad en agua que experimentan los PAHs, es de esperar que estos se bioacumulen y se concentren en la fase orgánica de partículas sólidas de suelos y sedimentos, convirtiéndose en contaminantes orgánicos persistentes en el medio ambiente ^[91].

Tabla 1. Propiedades físico-químicas de los 16 PAHs clasificados por la US EPA como contaminantes prioritarios.

compuesto	fórmula molecular	peso molecular g/mol	punto de fusión °C	punto de ebullición °C	solubilidad agua µg/L a 25°C	log Kow	presión de vapor Pa	constante de Henry atm M ⁻¹ x 10 ⁻⁵
Naftaleno	C ₁₀ H ₈	128,2	81	218	31700	3,40	10,4	43,01
Acenaftileno	C ₁₂ H ₈	152,2	92	265	16100	4,07	0,9	8,4
Acenafteno	C ₁₂ H ₁₀	154,2	95	279	3930	3,92	0,3	12,17
Fluoreno	C ₁₃ H ₁₀	166,2	116	295	1980	4,18	0,09	7,87
Fenantreno	C ₁₄ H ₁₀	178,2	100	340	1290	4,57	0,02	4,45
Antraceno	C ₁₄ H ₁₀	178,2	216	342	73	4,54	0,001	3,96
Fluoranteno	C ₁₆ H ₁₀	202,3	109	375	260	5,22	0,00123	1,037
Pireno	C ₁₆ H ₁₀	202,3	150	393	135	5,18	0,0006	0,92
Benzo[a]antraceno	C ₁₈ H ₁₂	228,3	161	400	14	5,61	2,8 x 10 ⁻⁵	0,581
Criseno	C ₁₈ H ₁₂	228,3	254	448	2	5,91	5,7 x 10 ⁻⁷	5,86
Benzo[b]fluoranteno	C ₂₀ H ₁₂	252,3	168	481	1,2	6,12	3,0 x 10 ⁻⁹	-
Benzo[k]fluoranteno	C ₂₀ H ₁₂	252,3	216	480	0,76	6,84	5,2 x 10 ⁻⁸	0,016
Benzo[a]pireno	C ₂₀ H ₁₂	252,3	178	496	3,8	6,50	7,0 x 10 ⁻⁷	0,046
Dibenzo[a,h]antraceno	C ₂₂ H ₁₄	278,4	267	524	0,26	6,50	3,7 x 10 ⁻¹⁰	-
Benzo[ghi]perileno	C ₂₂ H ₁₂	276,3	278	545	62	7,10	1,3 x 10 ⁻⁸	0,075
Indeno[1,2,3-cd]pireno	C ₂₂ H ₁₂	276,3	164	536	0,5	6,58	-	6,95

II.2 Origen, toxicidad y legislación ambiental

Los PAHs pueden ser de origen natural o antropogénico, siendo estos últimos los que producen una mayor fuente de entrada de estos contaminantes al medio ambiente [92-94]. Sólo algunos PAHs, como el antraceno y el pireno, se producen industrialmente.

En general se encuentran en la naturaleza en numerosos materiales orgánicos fósiles y la combustión incompleta o pirolisis, a temperaturas elevadas, de materia que contenga carbono e hidrógeno, brinda las condiciones idóneas para su formación, que se verá más favorecida cuanto menor sea la disponibilidad de oxígeno en el ambiente. En ocasiones se forman también PAHs alquil sustituidos.

Entre las principales fuentes naturales destacan las filtraciones de fuel fósil, la actividad volcánica, la deposición atmosférica de contaminantes [91,95], los incendios forestales [96,97] y la biosíntesis directa a través de microorganismos y plantas [98].

Las fuentes antropogénicas generan las principales vías de contaminación de PAHs en el entorno. Dentro de las actividades humanas de mayor contribución se encuentran los procesos industriales, las calefacciones domésticas, las fuentes móviles de emisión (transportes), las incineradoras de residuos urbanos y las plantas de generación eléctrica [93]. Cabe destacar el consumo de tabaco que, si bien es insignificante como fuente en general, es de gran importancia como fuente de exposición directa de fumadores y de los cercanos a éstos.

Dada la gran cantidad de procesos naturales y actividades cotidianas del hombre que involucran la formación de PAHs, estos se consideran contaminantes ubicuos de gran abundancia en la atmósfera, dependiendo sus concentraciones de las características físico químicas de cada uno de ellos.

Una vez liberados al medio ambiente, los PAHs pueden repartirse entre el aire, el agua, el suelo y/o los sedimentos y sufrir transformaciones químicas y fotoquímicas que los conviertan en productos más o menos inertes que los iniciales, en dependencia de las condiciones ambientales a las que estén expuestos. Por otra parte, los PAHs son capaces de asociarse con los coloides presentes en el medio y, de esta forma, ser transportados a través del mismo. Así, se justifica su presencia en organismos que habitan en lugares alejados de una intensa actividad humana o el hecho de que los sedimentos sean más ricos en PAHs que el medio que los rodea ^[99].

La primera referencia histórica sobre la toxicidad de estos compuestos data de 1775, cuando el médico británico Percival Pott encontró cierta relación entre la profesión de deshollinador y el cáncer de escroto ^[100]. No obstante, no fue hasta 1930 que estas patologías fueron atribuidas al benzo[a]pireno y al dibenzo[a,h]antraceno. A partir de entonces los PAHs desatan gran interés científico y se realiza un gran esfuerzo en investigación para establecer la relación entre estos compuestos y sus posibles efectos nocivos.

Diversos ensayos de experimentación en animales con resultados obtenidos in vivo e in vitro, manifiestan que muchos PAHs tienen claras propiedades genotóxicas y/o mutagénicas. Se ha demostrado que estas propiedades obedecen en gran medida a su estructura química, ya que han sido asociadas con su grado de no-planaridad, así como a la existencia de la *región bahía*. Se cree que el mayor grado de reactividad de los PAHs no-planares es debido al aumento del carácter olefínico de algunos enlaces aromáticos en la molécula, mientras que la presencia de la *región bahía* le confiere elevadas propiedades electrofílicas que le permiten interactuar con los enlaces covalentes ^[101]. La introducción de grupos metilos o de otros sustituyentes en los anillos aromáticos que

forman los PAHs produce una distorsión de la planaridad que algunas veces se traduce en mayor reactividad y carcinogenia.

Varias asociaciones y organismos gubernamentales internacionales han considerado a muchos compuestos de este grupo como contaminantes peligrosos en base a los efectos nocivos y su elevada toxicidad en el medio ambiente y en los seres vivos. La US-EPA ha desarrollado varias publicaciones relacionadas con la toxicidad de los PAHs y ha clasificado a 16 de ellos como contaminantes orgánicos cuyo estudio debe considerarse prioritario [102,103]. Estos son el naftaleno, acenafteno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,hi]perileno e indeno[1,2,3-c,d]pireno.

También en Estados Unidos la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, ATSDR) ha publicado un informe que recoge información acerca de la toxicología de los PAHs y sus efectos adversos en la salud [104] y ha elaborado una lista de 17 compuestos de este grupo en base a su toxicidad, mayor riesgo de exposición, mayores concentraciones encontradas y el volumen de información existente sobre ellos. La mayoría de los compuestos recogidos coinciden con los clasificados por la USEPA como contaminantes prioritarios, exceptuando el naftaleno e incluyendo el benzo[e]pireno y el benzo[j]fluoranteno.

La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (*International Agency for Research on Cancer*, IARC), creada en 1965 por la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha realizado innumerables investigaciones para evaluar el potencial carcinogénico de los PAHs y nitro-PAHs [90,105].

Estos compuestos, además de su actividad carcinogénica, pueden actuar como disruptores endocrinos, originando efectos adversos en la reproducción [106-108], como por ejemplo anovulación, reducción de la velocidad de concepción, abortos, desórdenes menstruales y defectos en el desarrollo de los tejidos reproductivos femeninos [109], así como la disminución de la fertilidad en varones [110,111]. Por otro lado, diversos estudios han demostrado que la exposición a PAHs durante la etapa de gestación, origina problemas en el desarrollo normal del feto, incluso provocando posteriormente problemas de salud en los niños [112,113].

Otros riesgos asociados a la exposición de PAHs son efectos agudos y crónicos en el sistema nervioso central, pérdida de consciencia, depresión respiratoria, alteraciones de la función intelectual y problemas cardiovasculares [108]. En los últimos años numerosos ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*, han sido desarrollados para descifrar el mecanismo responsable del efecto mutagénico y carcinógeno de estos compuestos [101,114-117]. Se ha demostrado que sus moléculas por sí mismas no ejercen actividad carcinógena o mutagénica, sino que éstas propiedades son inducidas a través de su biotransformación a compuestos intermedios químicamente reactivos que se enlazan covalentemente a macromoléculas celulares [108,118].

Teniendo en cuenta el peligro que representa la naturaleza tóxica de algunos PAHs para la salud humana y su amplia distribución ambiental, estos compuestos han sido incluidos en la legislación de control del medio ambiente, estableciendo límites para ciertos PAHs en diferentes matrices y regiones.

La *Directiva 2000/76/CE* del Parlamento Europeo [119], relativa a la incineración de residuos, obliga a los Estados Miembros a establecer los límites máximos de emisión de PAHs sobre la base de las recomendaciones de la OMS y la AIRC.

Con respecto a los lodos residuales, la Comunidad Europea ha establecido concentraciones máximas tolerables para algunos PAHs en aquellos lodos que serán empleados con fines agrícolas [120].

En aguas de bebida, la EPA [121] y la OMS [122] recomiendan la monitorización de rutina del benzo[a]pireno, cuya máxima concentración no debería exceder de 200 ng L⁻¹ según la EPA, mientras que la OMS ha establecido un máximo permisible de 700 ng L⁻¹. La Unión Europea en su *Directiva 98/83/EC* regula además del benzo[a]pireno, el benzo[b]fluoranteno, el benzo[k]fluoranteno, el benzo[g,h,i]perileno y el indeno[1,2,3-c,d]pireno [123]. Así mismo la Unión Europea establece unos límites restrictivos en aguas superficiales [124].

El *Real Decreto 9/2005*, establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados [125]. Así, el Gobierno de España establece niveles regulatorios para algunos PAHs en función de los usos del suelo y los límites máximos aceptables para 13 PAHs en suelos destinados para actividades agrícolas, forestales y/o ganaderas.

Por otro lado, tras haberse contrastado en diversos estudios la absorción dérmica de los PAHs, pudiendo producir carcinogénesis dérmica y sistémica, se prohíbe mediante la *Directiva 97/45/CE* el uso de alquitranes de hulla brutos y refinados en los productos cosméticos [126].

Los límites máximos para PAHs en alimentos están establecidos por el *Reglamento 1881/2006*, en el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios [127], principalmente aquellos que contienen grasas y aceites y alimentos donde el humo y los procesos de secado o la contaminación ambiental puedan causar altos niveles de PAHs.

La *Directiva 96/62/CE* sobre la evaluación y gestión de la calidad del aire ambiente, establece una lista de los contaminantes atmosféricos que deben tenerse en cuenta en la evaluación y gestión de la calidad del aire ambiente, donde aparecen los PAHs [128]. Más adelante, con el fin de reducir al mínimo los efectos perjudiciales para la salud humana, la *Directiva 2004/107/CE* establece un límite máximo de 1 ng/m³ para el benzo[a]pireno, siendo este compuesto el indicador del riesgo cancerígeno de los PAHs en el aire ambiente [129].

II.3 Análisis químico de PAHs en muestras de aguas

Los PAHs son compuestos hidrofóbicos con muy baja solubilidad en agua, por lo cual su análisis en muestras acuosas requiere un paso de pre-concentración en el proceso analítico antes de su determinación cuantitativa para aumentar la sensibilidad del método. Innumerables técnicas han sido desarrolladas para alcanzar este propósito.

La SPE ha sido utilizada para la extracción de PAHs en aguas de bebida [130,131], medioambientales [132-134] y residuales [135]. La fase C18 [136-139] ha sido la más utilizada, aunque también se han desarrollado aplicaciones con C8 [140,141], ciclohexil [133], o fases poliméricas, como discos de estireno-divinilbenceno [142], Oasis HLB (*polímero macroporoso de poli(divinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona)*) [132] o Strata-X (*fase polimérica de estireno-divinilbenceno de superficie modificada*) [143,144]. Los disolventes de elución generalmente empleados son acetonitrilo, metanol, 2-propanol, n-hexano, diclorometano, acetato de etilo, tetrahidrofurano, tolueno, o mezclas de ellos.

El método oficial 550.1 descrito por la EPA, utiliza SPE para la extracción de PAHs en aguas destinadas a consumo con cartuchos de C18 o discos del mismo material; las recuperaciones obtenidas para algunos de estos compuestos, son de un 50% aproximadamente [145].

La SPE utiliza menos cantidad de disolvente que las extracciones líquido- líquido, pero el procesamiento de las muestras es lento y muchas veces se necesitan concentrar los extractos obtenidos. Una desventaja que limita la recuperación de los compuestos más ligeros, es la pérdida por volatilidad durante las etapas de secado del cartucho y de concentración de los extractos.

La LLE resulta especialmente eficaz en la extracción de los PAHs. Ha sido aplicada a diferentes tipos de aguas como ríos [146], lagos [147], agua lluvia [148] y agua de mar [149]. Los disolventes más utilizados son hexano, diclorometano o mezclas de ellos. El diclorometano es el disolvente utilizado en el método oficial EPA 550 [145], para la determinación de PAHs en aguas destinadas a consumo humano, y en el método EPA 610 [150], para la determinación de PAHs en aguas residuales.

Recientemente, con los avances en la miniaturización de las técnicas clásicas, métodos como SPME [151,152], SBSE [153,154], LPME [155,156] y DLLME [18,19], han sido desarrollados como técnicas alternativas a los procedimientos clásicos de extracción en la determinación de PAHs.

En particular en el análisis de PAHs existe un inconveniente adicional pues es frecuente la pérdida de analitos debido a la adsorción de los mismos a las paredes de los recipientes y del manifold por los que circula la muestra [157]. Para solventar este problema se recurre a la adición de un disolvente orgánico (metanol, acetonitrilo o 2-propanol) o un surfactante, para incrementar su solubilidad en la muestra acuosa. Si se añade un porcentaje de disolvente bajo quizás no sea suficiente para solubilizar los PAHs de mayor peso molecular, y si es demasiado alto se verá reducido el volumen de ruptura de los PAHs de bajo peso molecular. Por tanto este es un parámetro a optimizar en función del adsorbente y del disolvente utilizado [158].

La separación y determinación cuantitativa de los PAHs se realiza habitualmente a través de técnicas de cromatografía, ya sea líquida o gaseosa, acopladas a diferentes sistemas de detección.

La cromatografía líquida ofrece gran versatilidad debido al amplio rango disponible de combinaciones de fase móvil y fase estacionaria, por lo que los componentes de la muestra pueden ser completamente separados, asegurando la determinación precisa de la concentración de cada especie.

Los sistemas de detección más habituales son el de fluorescencia [159-166] y el ultravioleta [167-171]. Si bien este último es de aplicación casi universal, el detector de fluorescencia (*Fluorescence Detector*, FLD), ofrece una mayor sensibilidad y selectividad ya que son pocas las moléculas que exhiben fluorescencia, por lo que resultan muy útiles en el análisis de PAHs. Por su parte los espectros UV ofrecen información muy valiosa a la hora de confirmar identidades, y han sido utilizados en la determinación de PAHs de matrices de gran complejidad.

Otra opción para la determinación de PAHs mediante cromatografía líquida es acoplar un detector de espectrometría de masas [172-178]; aunque el número de aplicaciones de esta técnica, es muy reducido en comparación con fluorescencia. Este hecho puede atribuirse principalmente a que se trata de compuestos no-iónicos y apolares, de difícil ionización y fragmentación. Sin embargo, HPLC-MS ofrece mayor exactitud en los resultados, debido a que se generan datos espectrales que aportan información adicional y permite la identificación de compuestos con picos cromatográficos no resueltos.

Para el análisis de PAHs mediante cromatografía de gases, la espectrometría de masas es el método de detección más utilizado [179-183]. La combinación GC-MS tiene ventajas adicionales como su alta selectividad, además de la posibilidad de utilizar estándares internos

deuterados (IS) para la cuantificación, los cuales son utilizados para detectar posibles interacciones entre compuestos que puedan afectar los factores de respuesta y tiempos de retención.

La técnica de ionización más empleada en el análisis de PAHs con MS es el impacto de electrones (EI) con cuadrupolo. A pesar de la pobre fragmentación que sufren estos compuestos, utilizando este sistema de detección, se producen señales intensas de los iones moleculares [184].

La MS puede utilizarse tanto en modo de barrido completo del espectro (full scan) para detectar todos los iones que resultan de la fragmentación de los compuestos o en modo de monitorización del ion selectivo (SIM). En el modo de detección completa, el espectrómetro de masas monitorea continuamente un amplio rango de m/z (relación masa/carga), mientras que en modo SIM, se monitorea la abundancia de iones con valores de m/z elegidos previamente, lo que incrementa la selectividad y baja los límites de detección reduciendo los niveles del ruido.

Otra alternativa es MS con trampa de iones (IT/MS). Esta técnica se ha utilizado para la determinación de PAHs en diferentes matrices [149,185]. Los analizadores de IT son rápidos, ya que un barrido completo del rango habitual de trabajo (10-650 m/z) se obtiene en 1 s o menos. No obstante presentan ciertas limitaciones, dado que las trampas de iones almacenan todos los iones producidos en la fragmentación de la muestra y los van filtrando progresivamente, no es posible la selección de iones discontinuos como en el modo SIM.

La cromatografía de gases con detector de ionización de llama, (*Flame Ionization Detector*, FID), también ha sido empleado en la determinación de PAHs y se sigue utilizando en la actualidad [186-188]. Una ventaja asociada a este sistema de detección, es que la respuesta es proporcional al número de carbonos, por lo que se pueden cuantificar

compuestos dentro del mismo grupo de isómeros, incluso si no se dispone de patrones de calibración de todos ellos. En la literatura, se encuentran numerosas aplicaciones de GC-FID para el análisis de PAHs en muestras medioambientales; no obstante, si se trata de muestras de elevada complejidad, lo más común es utilizar GC-MS para la determinación, puesto que permite obtener mayor exactitud que los métodos de detección universales. Además de conseguir mayor sensibilidad, la selectividad asociada a la naturaleza del detector MS permite minimizar las interferencias de otras sustancias procedentes de la matriz.

En un estudio comparativo entre los métodos de HPLC-FLD y GC-MS aplicados a la determinación de PAHs, Gratz y col. ^[189], concluyen que los coeficientes de variación de las concentraciones de compuestos individuales son menores, en la mayoría de los casos, empleando GC-MS. Sin embargo, la resolución de ciertos isómeros (como por ejemplo benzo(a)antraceno y criseno, y los benzofluorantenos) es mayor cuando se utiliza HPLC-FLD. Por otro lado, se obtienen límites de detección inferiores, en al menos un orden de magnitud, utilizando la GC-MS.

**CAPÍTULO II: MSC APLICADA A LA DETERMINACIÓN
DE VITAMINAS SOLUBLES EN AGUA**

La técnica cromatográfica más utilizada para la determinación de vitaminas hidrosolubles es la cromatografía líquida de alta resolución. En los últimos años numerosos trabajos de investigación han sido publicados usando diferentes detectores en diversas matrices.

Esta técnica ofrece la posibilidad de automatizar el análisis siendo una excelente herramienta para la separación de mezclas complejas permitiendo la determinación de los analitos con buena resolución. Sin embargo, una de sus desventajas es la dificultad para detectar coelución, lo que puede dar lugar a la categorización del compuesto incorrecto. Una solución a este problema consiste en utilizar detectores selectivos o aquellos que brindan información espectral de los analitos.

En este sentido el detector de arreglo de diodos, (Diode Array Detector, DAD), resulta especialmente útil, ya que tiene la cualidad de realizar una exploración espectroscópica y lecturas de absorbancia precisas a diferentes longitudes de onda mientras el analito está atravesando la celda de flujo. El DAD añade una nueva dimensión a la capacidad analítica de la cromatografía líquida pues brinda información cualitativa muy valiosa para la identificación de los analitos, además del tiempo de retención.

La mayor ventaja del DAD es que permite obtener el espectro UV de cada analito y así se puede seleccionar la longitud de onda más adecuada para realizar el análisis real. Además los espectros ofrecen información para evaluar la pureza de cada pico cromatográfico, ya que la forma de los picos en sí mismo no revela si en realidad corresponde solo a uno, a dos o incluso más componentes.

Otro inconveniente de los métodos de HPLC es el elevado coste de los instrumentos necesarios para su desarrollo y el mantenimiento de los mismos. En este sentido resulta interesante la búsqueda de técnicas

alternativas, como puede ser la cromatografía multijeringa, con la cual se alcanzan resultados que no difieren significativamente de los obtenidos usando equipos cromatográficos convencionales, y a la vez son considerablemente más económicos.

En este capítulo se discute el desarrollo de dos métodos empleando MSC para determinar vitaminas hidrosolubles en diferentes matrices. Los métodos propuestos se basan en el acoplamiento de una columna monolítica a una bomba multijeringa, que se encarga de aspirar la muestra y hacerla pasar a través de dicha columna y de esta al detector.

La técnica de MSC ofrece resultados similares a los obtenidos con sistemas comerciales. Adicionalmente el precio por análisis es menor y disminuye considerablemente el consumo de los reactivos y los disolventes empleados para el tratamiento y elución de la muestra. Uno de sus principales inconvenientes radica en el tamaño de la columna que se puede utilizar y que está condicionado por la presión que es capaz de soportar el sistema; debido a lo cual la MSC se utiliza generalmente en muestras relativamente sencillas que contengan pocos analitos.

En el primer trabajo presentado se ha realizado el análisis de tiamina B1, piridoxina B6 y cobalamina B12, mediante un método rápido y preciso para su determinación en tabletas e inyectables. Para la separación se ha empleado una columna monolítica corta RP-18e de (25 x 4.6 mm), la cual ha permitido una separación eficiente en menos de 9 minutos.

Debido a que la mayoría de las muestras reales donde encontramos estos analitos presentan otras vitaminas en su composición, se ha realizado un segundo trabajo experimental que incluye el análisis de B1 y B6, además de rivo flavina B2, ácido nicotínico B3ac, nicotinamida B3am y ácido ascórbico (vitamina C). Se ha excluido la cobalamina debido a

que esta se encuentra en concentraciones muy bajas y por tanto no es posible la determinación conjunta en una sola inyección cromatográfica.

Para conseguir la separación y cuantificación simultánea de las seis vitaminas se ha utilizado un sistema similar al anterior pero con una columna de mayor tamaño (50 x 4.6 mm), así mismo se ha aumentado el volumen de las jeringas utilizadas, para poder dispensar mayor cantidad de fase móvil y realizar el análisis sin necesidad de detener la elución. Bajo estas condiciones, fue necesario eliminar las válvulas solenoides para disminuir la presión del sistema.

En ambos estudios se ha empleado un DAD como método de detección, lo que ha permitido escoger la longitud de onda óptima para cada vitamina estudiada, garantizando así una mayor sensibilidad. La optimización del sistema se llevó a cabo mediante un diseño de experimentos y los resultados fueron comparados con los obtenidos empleando un equipo de HPLC comercial y el método oficial de la Farmacopea americana; adicionalmente se utilizó un material certificado (SRM 1846), para validar la técnica propuesta.

II.1 ARTÍCULO ORIGINAL:

***MODULATION OF MOBILE PHASE COMPOSITION IN FLOW-
INJECTION/ SEQUENTIAL-INJECTION CHROMATOGRAPHY
EXPLOITING MULTISYRINGE FLOW ANALYSIS***

Mailen Fernández & Manuel Miró & Hilda M. González & Víctor Cerdà

Anal Bioanal Chem 391 (2008) 817–825

II.2 ARTÍCULO ORIGINAL:

***MULTISYRINGE CHROMATOGRAPHY (MSC): AN EFFECTIVE AND
LOW COST TOOL FOR WATER-SOLUBLE VITAMIN SEPARATION***

Mailen Fernández, Rafael Forteza & Víctor Cerdá

Analytical Letters 45 (2012) 2637-2647

**CAPÍTULO III: MSFIA EN EL TRATAMIENTO DE
MUESTRAS. ACOPLAMIENTO A SISTEMAS
CROMATOGRÁFICOS PARA EL ANÁLISIS DE PAHs**

La preparación de muestras es uno de los pasos más importantes dentro de todo proceso analítico, generalmente consume entre el 60 y el 80 % del tiempo de análisis total. En ocasiones se requiere de largos y tediosos procesos de extracción o limpieza de la muestra para eliminar interferentes, y es la etapa donde más disolventes se utilizan. Por este motivo numerosas investigaciones han sido orientadas a la miniaturización y automatización de las operaciones previas a la determinación.

En este sentido las técnicas de análisis en flujo son una importante herramienta que no solo permiten automatizar esta etapa, sino que pueden ser acoplados a diferentes detectores e incluso a sistemas cromatográficos facilitando la automatización completa del estudio. Los sistemas automáticos ofrecen una mayor frecuencia de análisis, a la vez que disminuyen el consumo de muestras y reactivos, así como los costes y los tiempos necesarios para la determinación. Además evitan la contaminación de fuentes externas.

Generalmente para la automatización se prefiere la SPE en lugar de la LLE, ya que minimiza algunos inconvenientes asociados al uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos ^[190]. Si bien el uso de sistemas en línea SPE-HPLC se encuentra bien documentado en la literatura, para CG resulta ser menos común. Esto se debe fundamentalmente al proceso de transferencia de los analitos desde la fase sólida empleada hasta el inyector. Además, el agua no es un solvente compatible con CG, por lo que debe eliminarse del extracto final, ya que hidroliza los enlaces de siloxano en la columna, lo que conlleva a una pérdida de resolución y el deterioro de la misma ^[191].

Sin embargo el desarrollo de nuevas técnicas de extracción líquida como la DLLME facilita el acoplamiento de estos métodos a los sistemas

cromatográficos, debido a que la muestra se concentra y se extrae en pocos microlitros de un disolvente orgánico.

En este capítulo se presentan dos trabajos para el análisis automático de PAHs. Se ha utilizado un sistema MSFIA, que permite el tratamiento previo de la muestra, acoplado a un equipo de cromatografía para la separación y detección de los analitos estudiados. La etapa de preconcentración ha sido evaluada utilizando tanto la SPE como la DLLME y ambas técnicas ofrecen buenos resultados analíticos. Sin embargo, el acoplamiento en línea del sistema MSFIA-SPE a cromatografía presenta algunos inconvenientes desde el punto de vista práctico-experimental (ver apartado III.3). Por esta razón los dos artículos expuestos se han realizado utilizando un método de DLLME para la preconcentración de PAHs. En la determinación han sido empleados un sistema GC-MS en el primer trabajo y HPLC con detector de fluorescencia en el segundo artículo.

La preparación de muestras acuosas de PAHs presenta el inconveniente de su baja solubilidad en este medio y la frecuente pérdida de analitos por la adsorción de los mismos a las paredes de los recipientes y conductos por los que circula la muestra. Este problema suele resolverse mediante la adición de un disolvente orgánico, (metanol, acetonitrilo, 2-propanol), o un surfactante que incrementan la solubilidad de estos analitos en agua.

La concentración del disolvente orgánico añadido es un parámetro crítico que debe ser optimizado. Si el porcentaje adicionado es bajo, probablemente no sea suficiente para solubilizar los PAHs de mayor peso molecular, produciéndose de igual manera las pérdidas por adsorción. Si por el contrario el porcentaje de disolvente orgánico es

demasiado elevado, el volumen de ruptura de los PAHs de bajo peso molecular, se verá reducido.

Para el desarrollo de los trabajos presentados en esta memoria se ha realizado un estudio de solubilidad de los PAHs en agua a través de un diseño de experimentos. Se ha analizado la concentración de disolvente, así como el método y el tiempo de agitación.

Los PAHs son moléculas con muy baja solubilidad en agua, por lo que se requiere un paso de concentración previo a su análisis. Los métodos tradicionales para su determinación son variaciones del método USEPA 610. Todos ellos se basan en la extracción líquido-líquido de la muestra acuosa, seguida por evaporación del extracto orgánico, reconstitución y análisis por CG con detector de ionización de llama o espectrómetro de masas, o bien por HPLC con detector ultravioleta o de fluorescencia. Estos métodos son muy largos y trabajosos en su ejecución e implican una continua manipulación de la muestra.

III.1 ARTÍCULO ORIGINAL:

***ONLINE COUPLING LAB ON VALVE-DISPERSIVE LIQUID-LIQUID
MICROEXTRACTION-MULTISYRINGE FLOW INJECTION WITH GAS
CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY FOR THE
DETERMINATION OF SIXTEEN PRIORITY PAHS IN WATER***

Sabrina Clavijo, Mailén Fernández, Rafael Forteza, María del Rosario Brunetto and
Víctor Cerdà

Analytical Methods 6 (2014) 3335-3344 *

**material suplementario disponible en anexo I*

III.2 MANUSCRITO:

***DETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS
USING DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION PREVIOUS
TO HIGH RESOLUTION CHROMATOGRAPHY***

M. Fernández, S. Clavijo, R. Forteza and V. Cerdà

Artículo enviado a Talanta para revisión

III.3. INFORMACIÓN ADICIONAL. EVALUACIÓN DE UN MÉTODO DE SPE AUTOMATIZADO MEDIANTE MSFIA ACOPLADO A HPLC PARA EL ANÁLISIS DE PAHs

La extracción en fase sólida (SPE) en sus diversas modalidades se ha convertido en una alternativa de elección para la preparación de muestras ambientales. La SPE se ha empleado para aislar y concentrar los PAHs de diversas matrices acuosas, utilizando adsorbentes de fase reversa C-18 depositados en discos, en membranas, en cartuchos desechables o en barras adsorptivas [192,193].

Durante el desarrollo de esta tesis se ha implementado un método automático para preconcentrar PAHs, desde matrices acuosas, utilizando columnas rellenables con fase C18. El método ha sido optimizado paso a paso analizando las variables que afectan el sistema. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y el porcentaje de recobrado fue escogido como indicador del método para cada uno de los 15 PAHs estudiados.

Optimización del flujo empleado para cargar la muestra.

Generalmente la adsorción completa de la muestra se garantiza cuando los analitos pasan a flujos muy bajos a través de la columna, pero esto puede requerir un largo período de tiempo. Por otro lado como la extracción se realiza de manera automática en un sistema MSFIA, el flujo utilizado no debe ser excesivamente alto para evitar problemas de sobrepresión en el sistema. Así tres flujos diferentes de 0.5, 1.5 y 3.0 fueron estudiados. Para este estudio se utilizaron 10mL de muestra a 10 µg/L de cada PAHs con un 5% de acetonitrilo.

Como puede observarse en la [Figura 11](#), los resultados muestran que el flujo al cual se deposita la muestra en la columna no influye en el recobrado de los PAHs mediante la técnica estudiada, resultados

similares fueron obtenidos por Junk y col. que utilizan un flujo de 25mL/min en columnas C18 [194]. El flujo seleccionado para los experimentos posteriores fue de 1,5 mL/min, no se ha utilizado un flujo más alto para evitar sobrepresiones en el sistema y las consecuentes pérdidas de líquidos.

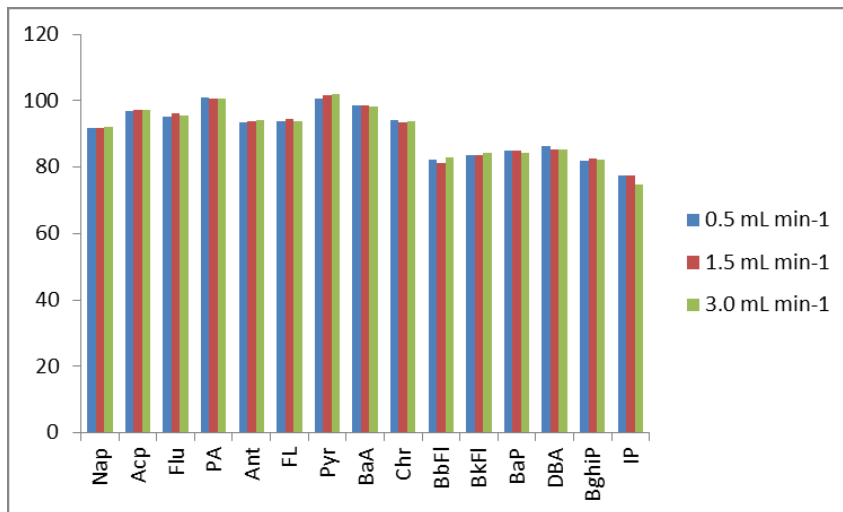


Figura. 11. Efecto del flujo utilizado para cargar la muestra en el recobrado de los 15 PAHs estudiados.

Optimización del solvente de elución

Los disolventes comúnmente utilizados para la elución de los PAHs son n-hexano, diclorometano, tetrahidrofurano y acetona [192,135]. En este trabajo se ha evaluado la elución con acetonitrilo, n-hexano y diclorometano para determinar su eficiencia en el recobrado.

Como muestra la [Figura 12](#) el recobrado de los PAHs disminuye de forma considerable con el aumento del peso molecular cuando se usan disolventes polares como el acetonitrilo. Estos resultados coinciden con los reportados por Kiss y col. en el análisis de PAHs con C18 [192] y los de Li y col. utilizando C30 para los mismos analitos [195].

Para los PAHs de 5 o 6 anillos los recobrados obtenidos han sido bajos (40-43%) usando acetonitrilo, mientras que para los mismos compuestos los resultados han sido satisfactorios cuando se ha utilizado n-hexano o diclorometano, obteniéndose mayores valores de recobrado cuando este último ha sido utilizado.

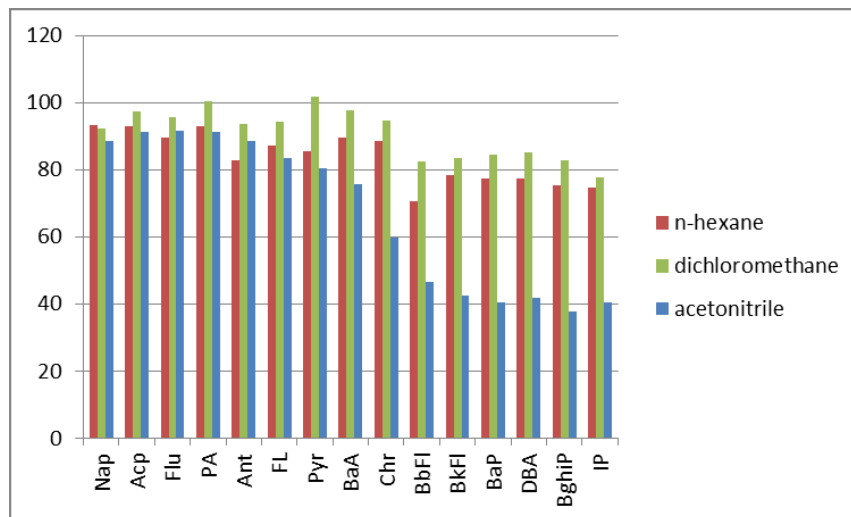


Figura 12. Efecto del solvente de elución en los recobrados de 15 PAHs (n=3).

Entonces el diclorometano fue escogido como solvente de elución ya que permite eluir de manera efectiva para todos los PAHs estudiados. Además el diclorometano es también compatible con el sistema de HPLC que ha sido usado para la separación de los analitos.

Optimización de otras variables experimentales

El flujo de elución también ha sido estudiado encontrándose que, al igual que el flujo para cargar la muestra, no ofrece diferencias significativas en los resultados. Entonces se ha trabajado con 1 mL/min para la etapa de elución de los PAHs desde la fase C18 e introducirlos mediante una válvula de inyección directamente en la columna cromatográfica.

Para determinar el volumen necesario para la elución de los analitos se ha utilizado, a modo de prueba, 1 mL de diclorometano comprobando que los PAHs de mayor peso molecular no eluyen completamente. Entonces se pasaron fracciones de 0.2 mL cada vez, hasta comprobar que 1.6 mL es el volumen mínimo para la elución total de los analitos.

Procedimiento SPE utilizado

Para la preconcentración de PAHS mediante SPE se rellenó una columna de PTFE con 0.5 g de C18. La columna fue condicionada con 5 mL de diclorometano, 5 mL de metanol y 5 mL de agua : acetonitrilo en ese orden de secuencia. Posteriormente las muestras fueron cargadas en la columna a un flujo de 1.5 mL/min y por último los analitos fueron eluidos con 1.6 mL de diclorometano e inyectados directamente en la columna cromatográfica.

El sistema MSFIA-SPE-HPLC que ha sido empleado para el análisis de PAHs mediante SPE se muestra en la [Figura 13](#).

Evaluación del proceso analítico

El rendimiento del método fue evaluado bajo las condiciones óptimas y los resultados se muestran en la tabla 2. La linealidad del método fue evaluada en el rango de concentraciones de 0,2-400 µg/L con coeficientes de correlación (R^2) que van desde 0,992-0,998. Las desviaciones estándar relativas (RSD %) fueron todas por debajo de 10%.

Los factores de enriquecimiento, definidos como la relación entre las concentraciones obtenidas después y antes de la extracción, fueron de 21 a 93. Los límites de detección (LD, $S / N = 3$) se encuentran en el rango entre 0,02 hasta 0,68 µg/L.

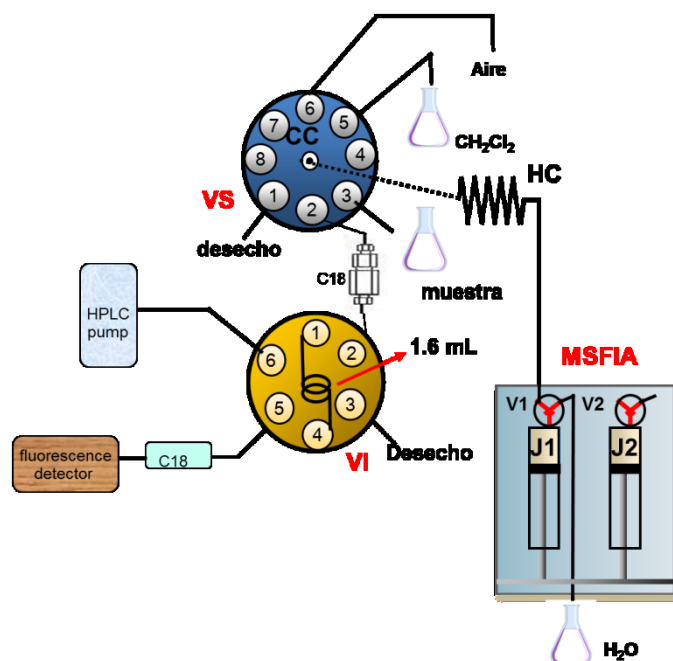


Figura 13. Esquema del sistema MSFIA-SPE-HPLC utilizado para la preconcentración de PAHs. VS: válvula de selección, VI: válvula de inyección.

Tabla 2. Figuras de mérito del método MSFIA-SPE-HPLC.

Analito	tret (min)	R ²	FE	RSD % (n=5)		LD (µg/L)
				inter day	intra day	
Nap	4.2	0.9994	30.39	5.32	3.94	0.68
Acp	6.2	0.9997	43.54	3.57	2.65	0.55
Flu	6.5	0.9998	56.87	3.94	2.05	0.07
PA	7.5	0.9992	53.16	5.76	3.64	0.21
Ant	8,8	0.9998	27.64	3.82	4.36	0.03
FL	10.1	0.9996	50.36	6.47	3.82	0.45
Pyr	10.9	0.9994	20.48	5.43	4.39	0.26
BaA	13.1	0.9995	43.15	6.95	2.47	0.06
Chr	13.5	0.9993	83.29	2.67	4.25	0.08
BbFl	14.8	0.9998	73.92	4.23	4.39	0.05
BkFl	15.3	0.9993	67.31	7.79	3.51	0.03
BaP	15.9	0.9997	82.53	1.74	3.64	0.06
DBA	17.6	0.9996	90.42	2.85	2.57	0.18
BghiP	18.1	0.9998	25.63	4.39	2.46	0.09
IP	16.8	0.9997	21.34	2.49	1.93	0.07

De los datos anteriormente expuestos se resume que el sistema MSFIA-SPE-HPLC puede ser aplicado exitosamente a la determinación

de PAHs en muestras reales. Sin embargo, desde el punto de vista experimental la SPE tiene la desventaja de la sobrepresión que provoca la columna C18 conectada al sistema MSFIA. Este problema se acentúa cuando se analizan muestras reales cuyas matrices no son tan limpias como los estándares utilizados para la optimización del sistema. Esta sobrepresión causa pérdida de líquidos y la consecuente pérdida de analitos cuando estos eluyen desde la columna. Otro inconveniente de esta técnica es la necesidad cambiar la fase C18 cada cierto número de análisis y que va a depender fundamentalmente de la concentración de PAHs e interferentes que estén presentes en las muestras analizadas.

Además la DLLME ofrece mejores factores de enriquecimiento, principalmente cuando está acoplada a HPLC. Por estas razones, se ha elegido la DLLME para desarrollar el método de análisis automático para la determinación de PAHs en muestras de agua.

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS

Discusión general de los resultados

El objetivo principal de la presente tesis doctoral, ha sido aplicar distintos sistemas de análisis por inyección en flujo multijeringa a determinaciones analíticas en muestras de varios componentes. Así, en todos los trabajos experimentales presentados se han desarrollado métodos de separación y detección que aprovechan las numerosas ventajas ofrecidas por estas técnicas de análisis en flujo. El trabajo se ha dividido en dos etapas y una bureta multijeringa ha sido el elemento común en las investigaciones realizadas. Todos los métodos descritos se basan en el uso de la cromatografía, ya sea de líquidos o de gases, como técnica de separación de los analitos previa al proceso de detección. En la tabla 3 se resumen los datos más representativos de los diferentes métodos desarrollados en la realización de esta tesis.

Como se ha descrito en la introducción, la técnica MSFIA incorpora una bomba multijeringa capaz de impulsar líquidos a través de hasta cuatro jeringas simultáneamente, además permite la incorporación de válvulas solenoides y válvulas de selección que ofrecen mayor versatilidad al sistema. Aprovechando estas características se ha desarrollado un método MSC, un nuevo sistema de cromatografía líquida eficiente y económico, que permite sustituir los costosos equipos de HPLC, brindando resultados similares a los obtenidos con la instrumentación comercial. El sistema consiste en utilizar la bureta multijeringa acoplada a una columna monolítica y esta a un detector.

Comparada con los sistemas convencionales la técnica MSC, además de ser menos costosa, ofrece gran variabilidad pues permite incorporar reactivos en cualquier momento y punto del análisis, facilitando los procesos de preparación de muestras en línea. Asimismo

es un sistema modular que simplifica su manejo y traslado para pruebas in situ.

La principal desventaja de esta técnica reside en la longitud de las columnas que pueden ser utilizadas y que depende fundamentalmente de la presión que estas generan en el sistema. Por esta razón este método se ve limitado a muestras que contengan relativamente pocos analitos, (entre 7 u 8) y a matrices que no sean muy complejas.

En el capítulo II se exponen dos trabajos experimentales que consisten en el desarrollo y puesta a punto de métodos MSC. En total siete vitaminas hidrosolubles se han analizado para demostrar la eficacia del procedimiento desarrollado, utilizando dos columnas monolíticas de diferentes longitudes. Los resultados fueron comparados con los obtenidos por el método propuesto por la US EPA utilizando un HPLC comercial y se observó que no existen diferencias significativas entre ambos métodos.

En la tabla 4 se recogen algunas características de los métodos MSC utilizados. Como puede observarse al aumentar el número de analitos objeto de estudio fue necesario incrementar el tamaño de la columna monolítica y para ello se sustituyó la válvula solenoide de tres vías por otra similar pero capaz de soportar mayor presión.

En la Tabla 5 se muestran las figuras de mérito de ambos métodos para cada vitamina estudiada. A la vista de los resultados obtenidos se puede afirmar que la técnica MSC es precisa, proporcionando unos valores de desviación estándar relativa (RSD) inferiores al 5%. Los límites de detección se encuentran en el intervalo entre 0.1-2.4 µg/ mL y la linealidad se cumple satisfactoriamente en el intervalo estudiado.

Los métodos propuestos se han aplicado a diferentes muestras reales que contenían las vitaminas sometidas a estudio. La ausencia de efecto matriz se confirmó analizando el espectro UV de cada analito en el punto de máxima concentración con otros puntos del pico cromatográfico.

Tabla 3. Elementos diferenciadores entre los capítulos experimentales.

uso de MSFIA	analitos	muestras	preparación de la muestra	optimización	sistema de separación	sistema de detección
MSC	vitaminas	fármacos bebidas fórmula infantil	manual	multivariante	MSC	UV-vis
tratamiento de muestras	PAHs	aguas	automático	paso a paso multivariante	HPLC GC	fluorescencia masas

Tabla 4. Características de los métodos MSC utilizados

analitos	apartado	muestra	Nº de analitos	columna	fase móvil	tiempo de análisis
vitaminas hidrosolubles		fármacos fórmula infantil	3	Chromolith RP-18e 25 x 4.6 mm		8 min
		bebidas	6	Chromolith RP-18e 50 x 4.6 mm		18 min

Tabla 5. Figuras de méritos de los métodos MSC para las vitaminas estudiadas.

	coeficiente de correlación		RSD % (80 µg mL ⁻¹)		LOD % (µg mL ⁻¹)	
	PUB 1	PUB 2	PUB 1	PUB 2	PUB 1	PUB 2
B1	0.9999	0.9999	3.4	3.2	2.2	1.8
B2	-	0.9998	-	2.1	-	0.1
B3ac	-	0.9994	-	3.4	-	1.1
B3am	-	0.9998	-	2.9	-	1.5
B6	0.9999	0.9999	2.4	2.1	2.4	2.2
B12	0.9999	-	2.4	-	1.3	-
VitC	-	0.9997	-	2.5	-	0.1

En resumen, podemos afirmar que la técnica MSC puede ser empleada con éxito en la determinación de diferentes compuestos. Los métodos propuestos para el análisis de vitaminas resultan una alternativa económica a los métodos de HPLC comúnmente utilizados.

Otra aplicación de las técnicas de análisis en flujo es la posibilidad de utilizarlas para automatizar el tratamiento de muestras. En el capítulo III de esta memoria se presentan dos trabajos en los que se ha utilizado un sistema MSFIA, para preconcentrar 15 policíclicos aromáticos, acoplado a cromatografía, tanto líquida como de gases.

La etapa de preconcentración de los analitos ha sido evaluada utilizando SPE y DLLME. Ambos métodos han sido automatizados utilizando un sistema MSFIA y han sido optimizados estudiando aquellas variables que afectan la extracción en cada caso. La técnica SPE ha sido acoplada a HPLC mientras la DLLME se ha validado tanto para HPLC como para GC. La determinación cuantitativa en los procedimientos que emplean HPLC se ha realizado con un detector de fluorescencia y GC ha sido acoplada a un espectrómetro de masas. En la tabla 6 se muestra

una comparación de los parámetros empleados para evaluar los métodos expuestos.

Los resultados muestran que cualquiera de los tres métodos podría ser aplicado al análisis de PAHs en muestras acuosas con buenos resultados de reproducibilidad y bajos límites de detección. Sin embargo, en la práctica la técnica MSFIA-SPE-HPLC presenta algunos inconvenientes como la sobrepresión causada por la columna C18 en el sistema y la necesidad de cambiar la fase periódicamente.

La DLLME en cambio resulta más ventajosa desde el punto de vista del acoplamiento a los sistemas cromatográficos. Además utiliza menor cantidad de disolventes orgánicos y con HPLC los factores de enriquecimiento son mayores que los obtenidos por SPE.

Los métodos MSFIA-DLLME-HPLC y MSFIA-DLLME-GC se han aplicado en muestras reales de agua, algunas de las cuales estaban contaminadas con PAHs. Estas fueron enriquecidas con concentraciones conocidas de los analitos estudiados y los porcentajes de recobrados han sido calculados observándose que no existe efecto matriz para ninguna de las muestras estudiadas.

Se puede resumir que la técnica MSFIA puede ser utilizada con éxito para automatizar el proceso de DLLME. Si bien la GC-MS ofrece mejores límites de detección para algunos de los analitos evaluados, la HPLC permite obtener mejores factores de enriquecimiento para todos ellos.

Tabla 6. Figuras de mérito de los métodos desarrollados para el análisis de PAHs.

analito	RSD intra dia			RSD inter dia			LOD (µg/L)			R2			FE		
	SPE- HPLC	DLLME- HPLC	DLLME- GC	SPE- HPLC	DLLME- HPLC	DLLME- GC	SPE- HPLC	DLLME- HPLC	DLLME- GC	SPE- HPLC	DLLME- HPLC	DLLME- GC	SPE- HPLC	DLLME- HPLC	DLLME- GC
Nap	3.94	4.69	0.78	5.32	4.34	4.76	0.68	0.61	0.01	0.9994	0.9996	0.9983	30.39	87.56	32.47
Acp	2.65	4.13	3.03	3.57	3.82	4.04	0.55	0.52	0.05	0.9997	0.9997	0.9991	43.54	86.93	35.08
Flu	2.05	3.84	3.12	3.94	2.61	4.06	0.07	0.09	0.05	0.9998	0.9999	0.9997	56.87	92.06	28.78
PA	3.64	4.72	1.28	5.76	5.31	2.63	0.21	0.16	0.02	0.9992	0.9998	0.9984	53.16	92.36	36.02
Ant	4.36	1.60	3.31	3.82	2.89	4.09	0.03	0.04	0.02	0.9998	0.9997	0.9983	27.64	95.61	36.03
FL	3.82	4.23	0.97	6.47	4.73	1.61	0.45	0.41	0.02	0.9996	0.9997	0.9996	50.36	86.08	36.06
Pyr	4.39	3.74	1.63	5.43	4.51	1.64	0.26	0.26	0.03	0.9994	0.9999	0.9987	20.48	87.62	38.87
BaA	2.47	3.48	2.99	6.95	3.86	3.09	0.06	0.08	0.05	0.9995	0.9995	0.9995	43.15	90.51	27.01
Chr	4.25	3.01	2.98	2.67	2.95	4.87	0.08	0.07	0.05	0.9993	0.9998	0.9984	83.29	88.05	33.74
BbFl	4.39	2.58	3.77	4.23	3.74	4.61	0.05	0.08	0.07	0.9998	0.9997	0.9993	73.92	89.78	37.05
BkFl	3.51	1.63	3.48	7.79	2.13	4.02	0.03	0.02	0.07	0.9993	0.9999	0.9998	67.31	95.45	38.68
BaP	3.64	2.35	1.19	1.74	3.46	1.22	0.06	0.05	0.02	0.9997	0.9999	0.9994	82.53	90.87	38.68
DBA	2.57	4.37	3.33	2.85	3.86	5.91	0.18	0.14	0.06	0.9996	0.9999	0.9984	90.42	88.35	35.81
BghiP	2.46	2.96	1.48	4.39	3.59	2.66	0.09	0.09	0.07	0.9998	0.9997	0.9998	25.63	91.83	33.58
IP	1.93	2.85	3.38	2.49	2.97	5.38	0.07	0.06	0.07	0.9997	0.9998	0.9983	21.34	91.24	37.09

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se han evaluado nuevos métodos analíticos basados en el uso de las técnicas de análisis en flujo, las cuales han demostrado poseer un gran potencial tanto en separaciones cromatográficas como en la automatización de sistemas que incluyen procesos de preconcentración y separación.

El acoplamiento de columnas monolíticas a un sistema de análisis por inyección en flujo multijeringa ha dado como resultado una nueva técnica cromatográfica con la que se alcanzan resultados similares a los obtenidos con un cromatógrafo líquido convencional, pero con un menor coste por análisis. El sistema propuesto ofrece al mismo tiempo mayor versatilidad, con la posibilidad de tratamientos de muestras en línea antes de la separación y la facilidad de análisis in situ al tratarse de equipos modulares que pueden ser trasladados fácilmente. Se ha podido comprobar que empleando columnas monolíticas en cromatografía líquida disminuye considerablemente el tiempo necesario para estabilizar la columna cromatográfica entre muestras, aumentando así la frecuencia de análisis.

La técnica ha sido aplicada a la determinación de vitaminas hidrosolubles en muestras farmacéuticas, bebidas comerciales y leche infantil. La detección se ha realizado utilizando espectroscopia ultravioleta y se ha comprobado la eficacia de los detectores de arreglos de diodos que facilitan la detección de los analitos mediante el estudio del espectro de cada componente, detectando así posibles interferencias.

Otro sistema ha sido diseñado y evaluado para la preconcentración en línea de hidrocarburos policíclicos aromáticos mediante extracción en fase sólida y microextracción líquido- líquido dispersiva. Ambas técnicas proporcionan buenos resultados analíticos, sin embargo, desde el punto

de vista práctico la microextracción líquida ofrece mayor robustez en el análisis.

El método ha sido automatizado empleando análisis por inyección en flujo multijeringa para la etapa de extracción acoplado a técnicas cromatográficas. Su principal objetivo ha sido disponer de alternativas a las extracciones clásicas de policíclicos aromáticos, que se caracterizan por ser laboriosas y de larga duración. Con el método propuesto se reduce considerablemente la cantidad de disolventes orgánicos utilizados y se eliminan los errores introducidos por la manipulación de las muestras por parte del analista.

ACRÓNIMOS

SFA : Análisis en Flujo Segmentado, (Segmented Flow Analysis)

FIA : Análisis por Inyección en Flujo, (Flow Injection Analysis)

SIA: Análisis por Inyección Secuencial, (Sequential Injection Analysis)

MCFIA: Análisis por Inyección en Flujo, Multiconmutado (Multi-Commutated Flow Injection Analysis)

MSFIA: Análisis por Inyección en Flujo Multijeringa, (Multi-Syringe Flow Injection Analysis)

LOV: Lab-on-valve

MPFS: sistemas multipumping, (Multi-Pumping Flow System)

DLL: bibliotecas de enlace dinámico, (Dynamic Link Libraries)

GC-MS: cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, (Gas Chromatography - Mass Spectrometry)

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución, (High Performance Liquid Chromatography)

MSC: cromatografía multijeringa, (Multisyringe Chromatography)

NP: en cromatografía, fase normal, (normal phase)

RP: en cromatografía, fase reversa, (reverse phase)

FLD: detector de fluorescencia (Fluorescence Detector)

DAD: detector de arreglo de diodos, (Diode Array Detector)

LLE: extracción líquido-líquido, (Liquid Liquid Extraction)

SPE: extracción en fase sólida, (Solid-Phase Extraction)

SPME: microextracción en fase sólida, (Solid-Phase Microextraction)

SBSE: extracción por adsorción sobre barra agitadora, (Stir Bar Sorptive Extraction)

LPME: microextracción en fase líquida, (Liquid-Phase Microextraction,

DLLME: micro-extracción líquida-líquida dispersiva, (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*,

EDTA: ácido etilendiaminetetraacético (Ethylenediaminetetraacetic acid)

AOAC: Association of Official Analytical Communities

UV-vis: región ultravioleta visible

PAHs: hidrocarburos aromáticos policíclicos, (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)

US-EPA: Agencia Norteamericana de Protección Ambiental, (United States Environmental Protection Agency)

ATSDR: Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (Agency for Toxic Substances and Disease Registry)

IARC: Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (International Agency for Research on Cancer)

OMS: Organización Mundial de la Salud

ANEXOS

ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO

Supporting Information of:

On line coupling lab on valve - dispersive liquid-liquid microextraction - multisyringe flow injection with Gas Chromatography - Mass Spectrometry for the determination of sixteen priority PAHs in water

Table of contents

Five supporting materials are given

- **Table S-1.** Analytical sequence for the automated preconcentration of PAHs prior to GC separation and MS quantification by the LOV-DLLME-MSFIA system.
- **Figure S-2.** Effect of the type of extracting solvent on the extraction recovery (n = 3). Experimental conditions: PAHs concentration: 50 µg/L; IS concentration: 10 µg/L; aqueous sample: 4 mL, extracting solvent: 100 µL; dispersive solvent 900 µL.
- **Figure S-3.** Effect of the volume of extracting solvent on extraction recovery (n = 3). Experimental conditions PAHs concentration: 50 µg/L; IS concentration: 10 µg/L; aqueous sample: 4 mL, extracting solvent: 100 µL; dispersive solvent 900 µL.
- **Figure S-4.** Effect of the type of dispersive solvent on the extraction recovery (n = 3). Experimental conditions PAHs concentration: 50 µg/L; IS concentration: 10 µg/L; aqueous sample: 4 mL, extracting solvent: 100 µL; dispersive solvent 900 µL.
- **Figure S-5.** Effect of the volume of dispersive solvent on the extraction recovery (n = 3). Experimental conditions PAHs concentration: 50 µg/L; IS concentration: 10 µg/L; aqueous sample: 4 mL, extracting solvent: 100 µL; dispersive solvent 900 µL.

Anexo I

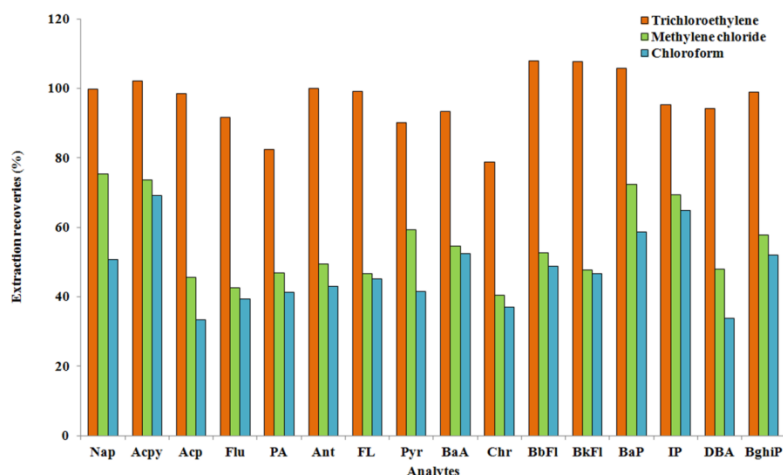
Table S-1.

Sequence and description		LOV position	Flow rate (mL/min)	Volume (μL)
1	Sample loading into HC			
	Aspirate sample into HC	2	1.0	4000
	Aspirate acetonitrile into HC	5	0.8	900
	Aspirate trichloroethylene into HC	4	0.5	100
2	DLLME extraction into EC			
	Dispense mix of solvents into EC	6	15.0	5000
	wait 30 seconds			
	Aspirate dead volume portion into HC	6	0.5	0.05
	Dispense dead volume portion to waste	1	0.5	0.05
3	Transportation of eluate into GC			
	injection valve moves to “load”			
	start loop: sample loading			
	Aspirate eluate into HC	6	0.5	0.02
	Dispense into micro loop	2	0.5	0.02
4	Eluate injection into GC			
	injection valve moves to “inject” and solenoid valve switches to GC-MS			
	Aspirate air into S2		15	1000
	Dispense air to completely deliver the eluate via air streaming to the CG injector		15	1000
	wait 20 seconds			
	Activation of GC-MS instrument			
	End loop: repeat three fold from sample loading loop			
5	System conditioning			
	Aspirate sample mixture into HC	6	2.5	5000
	Dispense sample mixture to waste	1	2.5	5000
	Start loop cleaning EC			
	Dispense cleaning EC with carrier solvent (acetonitrile:water 95:5)	6	5	2000
	Aspirate carrier solvent from EC into HC	6	2.5	2000
	Dispense carrier solvent from HC to waste	1	2.5	2000
	End loop: repeat three fold from cleaning EC			
	injection valve moves to “load” and solenoid valve switches to waste			
	Aspirate acetonitrile into HC	5	2.5	500

	injection valve moves to “inject”		
Dispense	air to completely deliver the acetonitrile via air segmentation to the solenoid valve	2	15 500

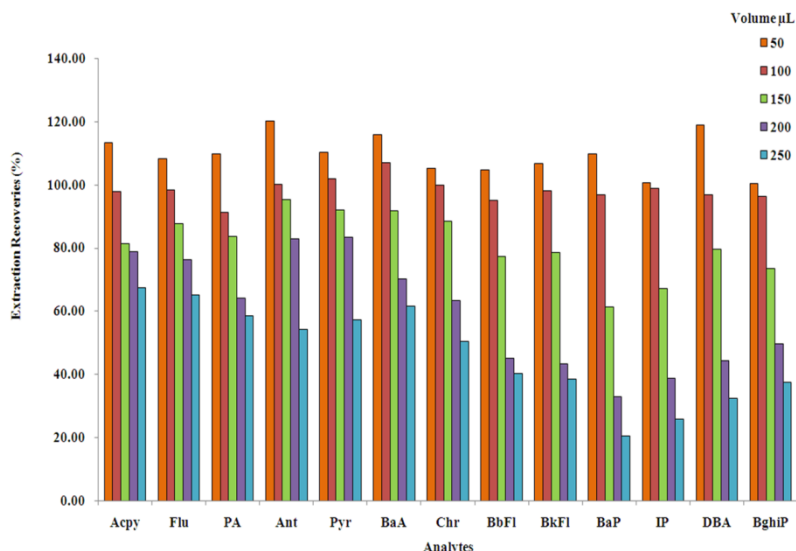
Analytical sequence for the automated preconcentration of PAHs prior to GC separation and MS quantification by the LOV-DLLME-MSFIA system

Figure. S-2



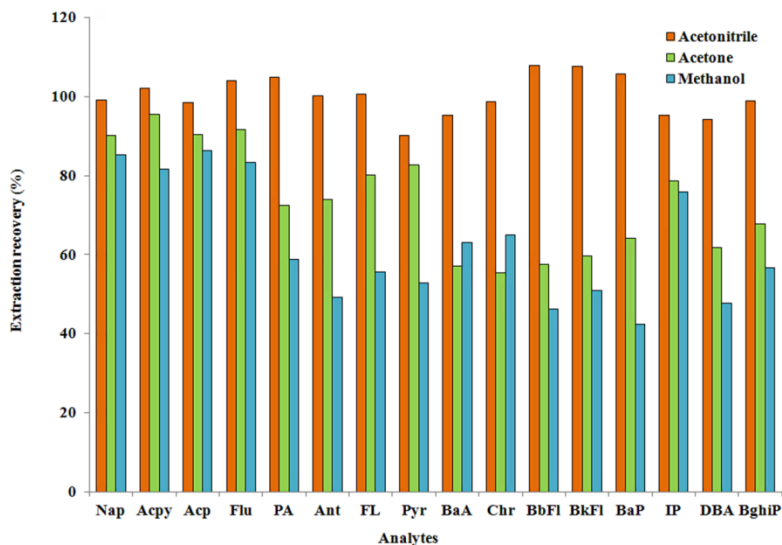
Effect of the type of extracting solvent on the extraction recovery (n = 3) Experimental conditions: PAHs concentration: 50 µg/L; IS concentration: 10 µg/L; aqueous sample: 4mL, extracting solvent: 100 µL; dispersive solvent 900 µL

Figure S-3



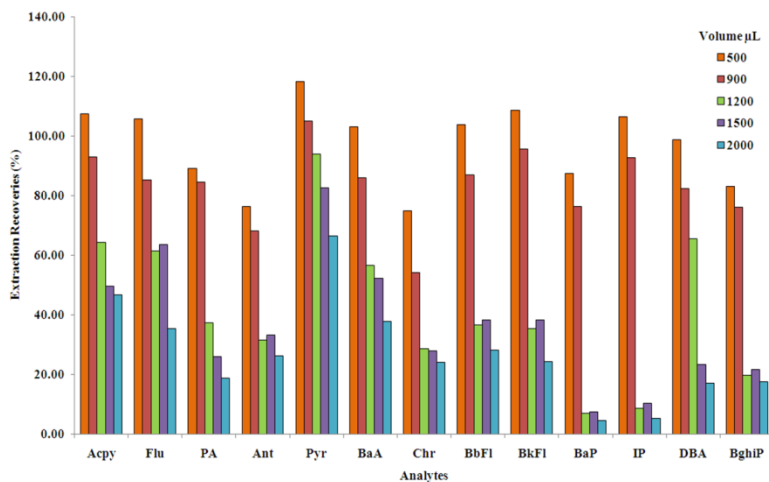
Effect of the volume of extracting solvent on the extraction recovery (n = 3): Experimental conditions PAHs concentration: 50 µg/L; IS concentration: 10 µg/L; aqueous sample: 4mL, dispersive solvent 900 µL

Figure. S-4



Effect of the type of dispersive solvent on the extraction recovery (n = 3) Experimental conditions PAHs concentration: 50 µg/L; IS concentration: 10 µg/L; aqueous sample: 4 mL, extracting solvent: 100 µL; dispersive solvent 900 µL

Figure. S-5



Effect of the volume of dispersive solvent on the extraction recovery (n = 3): Experimental conditions PAHs concentration: 50 µg/L; IS concentration: 10 µg/L; aqueous sample: 4mL, extracting solvent: 100

ANEXO II: STANDARDIZATION OF UV – VISIBLE DATA IN A FOOD ADULTERATION CLASSIFICATION PROBLEMA

En este anexo se incluye la publicación “Standardization of UV–visible data in a food adulteration classification problema”, que si bien no está estrictamente relacionada con los demás trabajos experimentales de esta tesis, ha sido realizada durante una estancia doctoral en la Universitat Rovira i Virgili, de Tarragona.

Este estudio evalúa el desempeño de los métodos de transferencia de calibración multivariantes en el contexto de clasificación. Se ha realizado el análisis de adulteración de especias culinarias con colorantes alimentario, específicamente Sudán I, II, III y IV.

Las muestras se han caracterizado mediante sus espectros UV–visible y el análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales ha sido empleado para discriminar entre las muestras adulteradas y no adulteradas con cualquiera de estos cuatro colorantes.

Artículo original:

**“Standardization of UV–visible data in a food adulteration
classification problema”**

Carolina V. Di Anibal, Itziar Ruisánchez, Mailén Fernández, Rafel Forteza, Víctor
Cerdà and M. Pilar Callao

Food Chemistry 134 (2012) 2326–2331

ANEXO III: LISTADO DE PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES REALIZADAS
DURANTE LA TESIS.

Publicaciones:

- Monolithic columns in flow analysis: a review of sic and msc techniques.

Mailen Fernández, Rafel Forteza & Víctor Cerdá.

Instrumentation Science and Technology, 2012, Vol. 40, p. 90–99.

- Contribution of multi-commuted flow analysis combined with monolithic columns to low-pressure, high-performance chromatography.

M. Fernández, H.M. González-San Miguel, J.M. Estela, V. Cerdà.

Trends in Analytical Chemistry, 2009, Vol. 28, p. 336-346.

- Modulation of mobile phase composition in flow-injection/ sequential-injection chromatography exploiting multisyringe flow analysis.

Mailen Fernández & Manuel Miró & Hilda M. González & Víctor Cerdà.

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008, Vol. 391, p. 817–825.

- Multisyringe Chromatography (MSC): An Effective and Low Cost Tool for Water-Soluble Vitamin Separation.

Mailen Fernández , Rafael Forteza & Víctor Cerdá.

Analytical Letters 2012, Vol. 45, p. 2637-2647.

- Online coupling lab on valve-dispersive liquid – liquid microextraction-multisyringe flow injection with gas chromatography-mass spectrometry for the determination of sixteen priority PAHs in water.

Sabrina Clavijo, Mailén Fernández, Rafael Forteza, Maria del Rosario Brunetto and Víctor Cerdà.

Analytical Methods 2014, Vol. 6, p. 3335-3344.

- Standardization of UV – visible data in a food adulteration classification problema.

Carolina V. Di Anibal, Itziar Ruisánchez, Mailén Fernández, Rafel Forteza, Víctor Cerdà and M. Pilar Callao.

Food Chemistry 2012, Vol. 134, 2326–2331.

Comunicaciones en congresos:

- Coupling of Sequential injection chromatography with second order multivariate approaches for fast determination of water soluble vitamins

Mailen Fernández, Verónica Gómez, Manuel Miró, María P. Callao, Víctor Cerdá

SIA 2008, 2008, República Checa

- Separation of seven water soluble vitamins using a time-based multiconmutated flow system coupling to monolithic

Mailen Fernández, Rafel Forteza, Víctor Cerdá

Flow Analysis XI, 2009, España

- Multi-syringe chromatography (MSC) using a monolithic column for the determination of textile dyes

C. Fernández, M. S. Larrechi, M. P. Callao, M. Fernández, R. Forteza, and V. Cerdà

Flow Analysis XI, 2009, España

- Coupling of a C18 monolithic chromatographic column with a multisyringe flow injection system

Mailen Fernández, Rafael Forteza, Víctor Cerdà

16th International Conference on Flow Injection Analysis, 2010, Tailandia

- Development of a fully automated LOV-DLLME-MSFIA-GC/MS system for the determination of sixteen priority PAHs in water

Sabrina Clavijo Roa, Mailén Fernández, Rafael Forteza, María del Rosario Brunetto and Víctor Cerdà

18 ICFIA. Porto, 2013, Portugal

REFERENCIAS

Referencias

- 1 L. T. Skeggs, Jr., An automatic method for colorimetric analysis. *American journal of clinical pathology* **28**, 311 (1957).
- 2 J. Růžička, E. H. Hansen, Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. *Analytica Chimica Acta* **78**, 145 (1975).
- 3 J. Ruzicka, G. D. Marshall, Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Analytica Chimica Acta* **237**, 329 (1990).
- 4 B. F. Reis, M. F. Giné, E. A. G. Zagatto, J. L. F. C. Lima, R. A. Lapa, Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. *Analytica Chimica Acta* **293**, 129 (1994).
- 5 V. Cerdà, Introducción a los métodos de análisis en flujo. (SCIWARE S.L., España, 2006).
- 6 F. Albertus, A. Cladera, V. Cerda, B. Horstkotte, A robust multisyringe system for process flow analysis . Part I. On-line dilution and single point titration of protolytes. *Analyst* **124**, 1373 (1999).
- 7 V. Cerdà et al., Flow techniques in water analysis. *Talanta* **50**, 695 (1999).
- 8 M. Miró, V. c. Cerdà, J. M. Estela, Multisyringe flow injection analysis: characterization and applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **21**, 199 (2002).
- 9 B. Horstkotte, O. Elsholz, V. Cerdà, Review on Automation using Multisyringe Flow Injection Analysis. *Journal Flow Injection Analalysis* **22**, 99 (2005).
- 10 S. Clavijo, M. Fernandez, R. Forteza, M. d. R. Brunetto, V. Cerda, Online coupling lab on valve-dispersive liquid-liquid microextraction-multisyringe flow injection with gas chromatography-mass spectrometry for the determination of sixteen priority PAHs in water. *Analytical Methods* **6**, 3335 (2014).
- 11 W. Boonjob, J. Quintana, R. Rodil, R. Cela, M. Miró, In-line sequential injection-based hollow-fiber sorptive microextraction as a front-end to gas chromatography-

- mass spectrometry: a novel fully automatic sample processing technique for residue analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405, 8653 (2013).
- 12 E. Becerra, A. Cladera, V. Cerdà, Design of a very versatile software program for automating analytical methods. *Laboratory Robotics and Automation* 11, 131 (1999).
 - 13 J. Ruzicka, Lab-on-valve: universal microflow analyzer based on sequential and bead injection. *Analyst* 125, 1053 (2000).
 - 14 J. Ruzicka, L. Scampavia, Peer Reviewed: From Flow Injection to Bead Injection. *Analytical Chemistry* 71, 257A (1999).
 - 15 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. *Analytica Chimica Acta* 466, 125 (2002).
 - 16 J. L. F. C. Lima, J. L. M. Santos, A. C. B. Dias, M. F. T. Ribeiro, E. A. G. Zagatto, Multi-pumping flow systems: an automation tool. *Talanta* 64, 1091 (2004).
 - 17 D. F. Hagen, C. G. Markell, G. A. Schmitt, D. D. Blevins, Membrane approach to solid-phase extractions. *Analytica Chimica Acta* 236, 157 (1990).
 - 18 M. Rezaee *et al.*, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A* 1116, 1 (2006).
 - 19 X. Zhao *et al.*, Analysis of PAHs in Water and Fruit Juice Samples by DLLME Combined with LC-Fluorescence Detection. *Chromatographia* 69, 1 (2009).
 - 20 C. Ojeda, F. Rojas, Separation and Preconcentration by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Procedure: Recent Applications. *Chromatographia* 74, 651 (2011).
 - 21 S. Berijani, Y. Assadi, M. Anbia, M.-R. Milani Hosseini, E. Aghaee, Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection: Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water. *Journal of Chromatography A* 1123, 1 (2006).
 - 22 M. A. Farajzadeh, M. Bahram, J. Å. Jönsson, Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography-diode array

-
- detection as an efficient and sensitive technique for determination of antioxidants. *Analytica Chimica Acta* **591**, 69 (2007).
- 23 H. Farahani, P. Norouzi, R. Dinarvand, M. R. Ganjali, Development of dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry as a simple, rapid and highly sensitive method for the determination of phthalate esters in water samples. *Journal of Chromatography A* **1172**, 105 (2007).
- 24 Y. C. Fan, Z. L. Hu, M. L. Chen, C. S. Tu, Y. Zhu, Ionic liquid based dispersive liquid–liquid microextraction of aromatic amines in water samples. *Chinese Chemical Letters* **19**, 985 (2008).
- 25 X. Zang *et al.*, Analysis of captan, folpet, and captafol in apples by dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography. *Anal Bioanal Chem* **392**, 749 (2008).
- 26 J. Xia, B. Xiang, W. Zhang, Determination of metacrate in water samples using dispersive liquid–liquid microextraction and HPLC with the aid of response surface methodology and experimental design. *Analytica Chimica Acta* **625**, 28 (2008).
- 27 M. García-López, I. Rodríguez, R. Cela, Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method for organophosphorus flame retardants and plasticizers determination in water samples. *Journal of Chromatography A* **1166**, 9 (2007).
- 28 R. R. Kozani, Y. Assadi, F. Shemirani, M.-R. M. Hosseini, M. R. Jamali, Part-per-trillion determination of chlorobenzenes in water using dispersive liquid–liquid microextraction combined gas chromatography–electron capture detection. *Talanta* **72**, 387 (2007).
- 29 D. Nagaraju, S.-D. Huang, Determination of triazine herbicides in aqueous samples by dispersive liquid–liquid microextraction with gas chromatography–ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1161**, 89 (2007).
- 30 D.A.Skoog, J. J. Leary, *Análisis Instrumental*. (México DF, ed. 4ta, 1994).
- 31 J. F. van Staden, Membrane separation in flow injection systems. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **352**, 271 (1995).

- 32 V. Kubáň, Gas Diffusion/Permeation Flow Injection Analysis. Part I. Principles and Instrumentation. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **23**, 323 (1992/01/01, 1992).
- 33 E. Castillo, J.-L. Cortina, J.-L. Beltran, M.-D. Prat, M. Granados, Simultaneous determination of Cd(), Cu() and Pb() in surface waters by solid phase extraction and flow injection analysis with spectrophotometric detection. *Analyst* **126**, 1149 (2001).
- 34 V. Pretorius, J. C. Davidtz, D. H. Desty, Open-pore silica foams: A new support for chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography* **2**, 583 (1979).
- 35 S. Hjertén, J.-L. Liao, R. Zhang, High-performance liquid chromatography on continuous polymer beds. *Journal of Chromatography A* **473**, 273 (1989).
- 36 Q. C. Wang, K. Hosoya, F. Svec, J. M. J. Frechet, Polymeric porogens used in the preparation of novel monodispersed macroporous polymeric separation media for high-performance liquid chromatography. *Analytical Chemistry* **64**, 1232 (1992).
- 37 K. Nakanishi, N. Soga, Phase Separation in Gelling Silica–Organic Polymer Solution: Systems Containing Poly(sodium styrenesulfonate). *Journal of the American Ceramic Society* **74**, 2518 (1991).
- 38 H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, Octadecylsilylated Porous Silica Rods as Separation Media for Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* **68**, 3498 (1996).
- 39 K. Cabrera, D. Lubda, H.-M. Eggenweiler, H. Minakuchi, K. Nakanishi, A New Monolithic-Type HPLC Column For Fast Separations. *Journal of High Resolution Chromatography* **23**, 93 (2000).
- 40 K. Cabrera, Applications of silica-based monolithic HPLC columns. *Journal of Separation Science* **27**, 843 (2004).
- 41 H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, Effect of skeleton size on the performance of octadecylsilylated continuous porous silica columns in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **762**, 135 (1997).

-
-
- 42 D. Šatínský, P. Solich, P. Chocholouš, R. Karlíček, Monolithic columns—a new concept of separation in the sequential injection technique. *Analytica Chimica Acta* **499**, 205 (2003).
- 43 P. Chocholouš, P. Solich, D. Šatínský, An overview of sequential injection chromatography. *Analytica Chimica Acta* **600**, 129 (2007).
- 44 H. M. G.-S. Miguel, J. M. Alpízar-Lorenzo, V. Cerdà-Martín, Development of a new high performance low pressure chromatographic system using a multisyringe burette coupled to a chromatographic monolithic column. *Talanta* **72**, 296 (2007).
- 45 C. Fernández, M. S. Larrechi, R. Forteza, V. Cerdà, M. P. Callao, Multisyringe chromatography (MSC) using a monolithic column for the determination of sulphonated azo dyes. *Talanta* **82**, 137 (2010).
- 46 J. L. Guzmán-Mar, L. Hinojosa-Reyes, A. M. Serra, A. Hernández-Ramírez, V. Cerdà, Applicability of multisyringe chromatography coupled to cold-vapor atomic fluorescence spectrometry for mercury speciation analysis. *Analytica Chimica Acta* **708**, 11 (2011).
- 47 F. Maya, J. M. Estela, V. Cerdà, Interfacing on-line solid phase extraction with monolithic column multisyringe chromatography and chemiluminescence detection: An effective tool for fast, sensitive and selective determination of thiazide diuretics. *Talanta* **80**, 1333 (2010).
- 48 F. Robert-Peillard, J.-L. Boudenne, B. Coulomb, Individual volatile fatty acids determination by chromogenic derivatization coupled to multi-syringe chromatography. *Talanta* **115**, 737 (2013).
- 49 M. Fernández, M. Miró, H. González, V. Cerdà, Modulation of mobile phase composition in flow-injection/sequential-injection chromatography exploiting multisyringe flow analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **391**, 817 (2008/06/01, 2008).
- 50 D. Della Penna, Nutritional Genomics: Manipulating Plant Micronutrients to Improve Human Health. *Science* **285**, 375 (July 16, 1999, 1999).
- 51 S. Southon et al., Dietary intake and micronutrient status of adolescents: effect of vitamin and trace element supplementation on indices of status and performance in

Referencias

- tests of verbal and non-verbal intelligence. *British Journal of Nutrition* 71, 897 (1994).
- 52 G. F. Combs, Blackwell Publishing Ltd (1992).
- 53 P. M. Finglas, U. Faure, P. J. Wagstaffe, Improvements in the determination of vitamins in food through intercomparisons and preparation of RMs for vitamin analysis within the BCR1 programme. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **345**, 180 (1993/02/01, 1993).
- 54 O. Heudi, T. Kiliç, P. Fontannaz, Separation of water-soluble vitamins by reversed-phase high performance liquid chromatography with ultra-violet detection: Application to polyvitaminated premixes. *Journal of Chromatography A* **1070**, 49 (2005).
- 55 Sophie De Baets, in *Encyclopedia of Microbiology*, E. J. Lederberg, Ed. (Academic Press, USA, 2000), vol. 4, pp. 837-853.
- 56 Directiva 2002/46/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 10 de junio de 2002 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de complementos alimenticios. DO: L 183/51.
- 57 Real Decreto 1487/2009, de 26 de septiembre, relativo a los complementos alimenticios. BOE: A-2009-16109, p 85370-85378.
- 58 Reglamento (CE) No 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006 sobre la adición de vitaminas, minerales y otras sustancias determinadas a los alimentos. DO: L 404/26.
- 59 G. F. M. Ball., *Vitamins in Foods: Analysis, Bioavailability and Stability.*, (CRC Press, Boca Raton, 2006).
- 60 M. W. Davey *et al.*, Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 825 (2000).
- 61 T. M. Berger *et al.*, Antioxidant Activity of Vitamin C in Iron-overloaded Human Plasma. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 15656 (June 20, 1997, 1997).

-
-
- 62 R. R. Musulin, C. G. King, METAPHOSPHORIC ACID IN THE EXTRACTION AND TITRATION OF VITAMIN C. *Journal of Biological Chemistry* **116**, 409 (November 1, 1936, 1936).
- 63 M. A. Kall, C. Andersen, Improved method for simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, isoascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in food and biological samples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **730**, 101 (1999).
- 64 V. Kabasakalis, D. Siopidou, E. Moshatou, Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage. *Food Chemistry* **70**, 325 (2000).
- 65 J. C. Deutsch, Dehydroascorbic acid. *Journal of Chromatography A* **881**, 299 (2000).
- 66 J. Lykkesfeldt, Determination of Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid in Biological Samples by High-Performance Liquid Chromatography Using Subtraction Methods: Reliable Reduction with Tris[2-carboxyethyl]phosphine Hydrochloride. *Analytical Biochemistry* **282**, 89 (2000).
- 67 K. Muhammad, D. Briggs, G. Jones, Comparison of a competitive binding assay with Lactobacillus leichmannii A.T.C.C. 7830 assay for the determination of vitamin B12 in foods. *Food Chemistry* **48**, 431 (1993).
- 68 M. Bergaentzlé, F. Arella, J. B. Bourguignon, C. Hasselmann, Determination of vitamin B6 in foods by HPLC — a collaborative study. *Food Chemistry* **52**, 81 (1995).
- 69 S. Ndaw, M. Bergaentzlé, D. Aoudé-Werner, C. Hasselmann, Extraction procedures for the liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and vitamin B6 in foodstuffs. *Food Chemistry* **71**, 129 (2000).
- 70 C. Pakin, M. Bergaentzlé, D. Aoudé-Werner, C. Hasselmann, α -Ribazole, a fluorescent marker for the liquid chromatographic determination of vitamin B12 in foodstuffs. *Journal of Chromatography A* **1081**, 182 (2005).
- 71 P. Viñas, C. López-Erroz, N. Balsalobre, M. Hernández-Córdoba, Reversed-phase liquid chromatography on an amide stationary phase for the determination of the B group vitamins in baby foods. *Journal of Chromatography A* **1007**, 77 (2003).

Referencias

- 72 C. Blake, Analytical procedures for water-soluble vitamins in foods and dietary supplements: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **389**, 63 (2007/09/01, 2007).
- 73 H. Baker, H. Sobotka, Microbiological assay methods for vitamins. *Advances in Clinical Chemistry* **5**, 173 (1962).
- 74 USP 34–NF 29. Oil- and Water-Soluble Vitamins with Minerals Tablets. (United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, 2011).
- 75 S. J. Lyle, M. S. Tehrani, Pyrolysis—gas chromatography of separated zones on thin-layer chromatograms : II. Application to the determination of some water-soluble vitamins. *Journal of Chromatography A* **236**, 31 (1982).
- 76 W. Korytnyk, in *Methods in Enzymology*, B. M. Donald, D. W. Lemuel, Eds. (Academic Press, 1970), vol. Volume 18, Part A, pp. 500-504.
- 77 U. Jegle, Separation of water-soluble vitamins via highperformance capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **652**, 495 (1993).
- 78 L. Fotsing *et al.*, Multivariate optimization approach for the separation of water-soluble vitamins and related compounds by capillary electrophoresis. *Biomedical Chromatography* **14**, 10 (2000).
- 79 C. M. Cho, J. H. Ko, W. J. Cheong, Simultaneous determination of water-soluble vitamins excreted in human urine after eating an overdose of vitamin pills by a HPLC method coupled with a solid phase extraction. *Talanta* **51**, 799 (2000).
- 80 A. Leporati *et al.*, Application of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method to the analysis of water-soluble vitamins in Italian pasta. *Analytica Chimica Acta* **531**, 87 (2005).
- 81 Z. Chen, B. Chen, S. Yao, High-performance liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry for simultaneous determination of taurine and 10 water-soluble vitamins in multivitamin tablets. *Analytica Chimica Acta* **569**, 169 (2006).
- 82 B. C. Nelson, K. E. Sharpless, L. C. Sander, Quantitative determination of folic acid in multivitamin/multielement tablets using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1135**, 203 (2006).

-
- 83 B. C. Nelson, K. E. Sharpless, L. C. Sander, Improved Liquid Chromatography Methods for the Separation and Quantification of Biotin in NIST Standard Reference Material 3280: Multivitamin/Multielement Tablets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 8710 (2006/11/01, 2006).
- 84 A. Zafra-Gómez, A. Garballo, J. C. Morales, L. E. García-Ayuso, Simultaneous Determination of Eight Water-Soluble Vitamins in Supplemented Foods by Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 4531 (2006/06/01, 2006).
- 85 P. Chen, W. Wolf, LC/UV/MS-MRM for the simultaneous determination of water-soluble vitamins in multi-vitamin dietary supplements. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387**, 2441 (2007/04/01, 2007).
- 86 R. Goldschmidt, W. Wolf, Simultaneous determination of water-soluble vitamins in SRM 1849 Infant/Adult Nutritional Formula powder by liquid chromatography–isotope dilution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **397**, 471 (2010/05/01, 2010).
- 87 K. W. Phinney *et al.*, Isotope Dilution Liquid Chromatography - Mass Spectrometry Methods for Fat- and Water-Soluble Vitamins in Nutritional Formulations. *Analytical Chemistry* **83**, 92 (2011/01/01, 2010).
- 88 S. Langer, J. K. Lodge, Determination of selected water-soluble vitamins using hydrophilic chromatography: A comparison of photodiode array, fluorescence, and coulometric detection, and validation in a breakfast cereal matrix. *Journal of Chromatography B* **960**, 73 (2014).
- 89 A. Bjørseth, *Handbook of polycyclic aromatic hydrocarbons*. (M. Dekker, New York, 1983).
- 90 I. A. f. R. o. Cancer., Certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds. Monograph on the evaluation of carcinogenic risks of the chemical to man. (World Health Organization., Lyon, France., 1973).
- 91 D. W. Connell, *Basic Concepts of Environmental Chemistry*. (New York ed. Taylor & Francis Group, Boca Ratón, 2005).
- 92 R. G. Harvey, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Journal of Chemical Education (Wiley-VCH, New York, 1997).

Referencias

- 93 K. Ravindra, R. Sokhi, R. Van Grieken, Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment* **42**, 2895 (2008).
- 94 P. Fernández, R. M. Vilanova, C. Martínez, P. Appleby, J. O. Grimalt, The Historical Record of Atmospheric Pyrolytic Pollution over Europe Registered in the Sedimentary PAH from Remote Mountain Lakes. *Environmental Science & Technology* **34**, 1906 (2000/05/01, 2000).
- 95 T. Vo-Dinh, J. Fetzer, A. D. Campiglia, Monitoring and characterization of polyaromatic compounds in the environment. *Talanta* **47**, 943 (1998).
- 96 A. Ribes, J. O. Grimalt, C. J. T. García, E. Cuevas, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mountain Soils of the Subtropical Atlantic. *Journal of Environmental Quality* **32**, 977 (2003/5, 2003).
- 97 D. J. Freeman, F. C. R. Cattell, Woodburning as a source of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science & Technology* **24**, 1581 (1990/10/01, 1990).
- 98 J. M. Neff, "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment: Sources, Fates and Biological Effects" 1522-2632 (London, 1979).
- 99 D. T. Gilbson, Microbial Degradation of Aromatic Compounds. *Science* **161**, 1093 (1968).
- 100 P. Pott, *Chirurgical observations relative to the cataract, the polypus of the nose, the cancer of the scrotum, the different kinds of ruptures, and the mortification of the toes and feet.* (Printed by T.J. Carnegy, for L. Hawes, W. Clarke, and R. Collins, London, 1775).
- 101 R. Dabestani, I. N. Ivanov, A Compilation of Physical, Spectroscopic and Photophysical Properties of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Photochemistry and Photobiology* **70**, 10 (1999).
- 102 United States Environmental Protection Agency. National Priorities List.
- 103 United States Environmental Protection Agency. Evaluation and Estimation of Potential Carcinogenic Risks of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. (Washington, 1985).

-
- 104 (ATSDR). U. S. Department of Health and Human Services, Atlanta, (1995).
- 105 International Agency for Research on Cancer. Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data. (World Health Organization., Lyon, France., 1983).
- 106 R. J. Šrám *et al.*, Adverse reproductive outcomes from exposure to environmental mutagens. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **428**, 203 (1999).
- 107 M. M. H. van Lipzig *et al.*, Formation of estrogenic metabolites of benzo[a]pyrene and chrysene by cytochrome P450 activity and their combined and supra-maximal estrogenic activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **19**, 41 (2005).
- 108 J. Lewtas, Air pollution combustion emissions: Characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **636**, 95 (2007).
- 109 S. Hombach-Klonisch, P. Pocar, S. Kietz, T. Klonisch, Molecular Actions of Polyhalogenated Arylhydrocarbons (PAHs) in Female Reproduction *Current Medicinal Chemistry* **12**, 599 (2005).
- 110 L. Gaspari *et al.*, Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human sperm as a marker of DNA damage and infertility. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **535**, 155 (2003).
- 111 Y. Han *et al.*, Reproductive hormones in relation to polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) metabolites among non-occupational exposure of males. *Science of The Total Environment* **408**, 768 (2010).
- 112 F. P. Perera, W. Jedrychowski, V. Rauh, R. M. Whyatt, Molecular Epidemiologic Research on the Effects of Environmental Pollutants on the Fetus. *Environmental Health Perspectives* **107 Supp 3**, 451 (1999).
- 113 D. Tang *et al.*, PAH-DNA Adducts in Cord Blood and Fetal and Child Development in a Chinese Cohort. *Environmental Health Perspectives* **114**, 1297 (2006).
- 114 D. Chakravarti *et al.*, The role of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in inducing mutations in mouse skin. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **649**, 161 (2008).

Referencias

- 115 J. Jacob, The significance of polycyclic aromatic hydrocarbons as environmental carcinogens. *Pure and Applied Chemistry* **68**, 301 (1996).
- 116 L. A. Hooven, W. M. Baird, Proteomic analysis of MCF-7 cells treated with benzo[a]pyrene, dibenzo[a,l]pyrene, coal tar extract, and diesel exhaust extract. *Toxicology* **249**, 1 (2008).
- 117 K. Skupinska, I. Misiewicz-Krzeminska, K. Lubelska, T. Kasprzycka-Guttman, The effect of isothiocyanates on CYP1A1 and CYP1A2 activities induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in MCF7 cells. *Toxicology in Vitro* **23**, 763 (2009).
- 118 Y. V. Pashin, L. M. Bakhitova, Mutagenic and carcinogenic properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Health Perspectives* **30**, 185 (1979).
- 119 Directiva 2000/76/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 4 de diciembre de 2000, relativa a la incineración de residuos. DO: L 332/91.
- 120 Council of the European Community, Working document on Sludge, 3rd Draft, 27 de abril de 2000, Bruselas. .
- 121 United States Environmental Protection Agency. National Primary Drinking Water Standards (2009).
- 122 "World Health Organization, Guidelines for Drinking Water Quality, Vol 1, Geneva (2008).".
- 123 Directiva 98/83/CE del Consejo del 3 de Noviembre de 1998, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano, DO: L 330/32.
- 124 Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008 relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas. DO: L348/84.
- 125 Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. BOE: 15/2005, p 1833-1843.
- 126 Directiva 97/45/CE de la Comisión de 14 de julio de 1997 por la que se adaptan al progreso técnico los Anexos II, III, VI y VII de la Directiva 76/768/CEE relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de productos cosméticos. DO: L 196/77.

- 127 Reglamento (CE) No 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. DO: L364/5.
- 128 Directiva 96/62/CE del Consejo de 27 de septiembre de 1996 sobre evaluación y gestión de la calidad del aire ambiente. DO: L 296.
- 129 Directiva 2004/107/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de diciembre de 2004, relativa al arsénico, el cadmio, el mercurio, el níquel y los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el aire ambiente, DO: L23/3.
- 130 P. W. Crozier, J. B. Plomley, L. Matchuk, Trace level analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface waters by solid phase extraction (SPE) and gas chromatography-ion trap mass spectrometry (GC-ITMS). *Analyst* **126**, 1974 (2001).
- 131 M. S. Garcia-Falcon, M. Perez-Lamela, J. Simal-Gandara, Comparison of strategies for extraction of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons from drinking waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 6897 (2004).
- 132 O. Delhomme, E. Rieb, M. Millet, Solid-Phase Extraction and LC with Fluorescence Detection for Analysis of PAHs in Rainwater. *Chromatographia* **65**, 163 (2007/02/01, 2007).
- 133 G. Kiss *et al.*, Survey of concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in lake balaton by HPLC with fluorescence detection. *Chromatographia* **48**, 149 (1998/07/01, 1998).
- 134 G. M. Titato, F. M. Lanças, Comparison Between Different Extraction (LLE and SPE) and Determination (HPLC and Capillary-LC) Techniques in the Analysis of Selected PAHs in Water Samples. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **28**, 3045 (2005/11/01, 2005).
- 135 F. Buseti, A. Heitz, M. Cuomo, S. Badoer, P. Traverso, Determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous and solid samples from an Italian wastewater treatment plant. *Journal of Chromatography A* **1102**, 104 (2006).
- 136 E. Martinez, M. Gros, S. Lacorte, D. Barceló, Simplified procedures for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediments and mussels. *Journal of Chromatography A* **1047**, 181 (2004).

- 137 Y.-g. Ma *et al.*, Distribution, sources, and potential risk of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in drinking water resources from Henan Province in middle of China. *Environ Monit Assess* **146**, 127 (2008/11/01, 2008).
- 138 E. Pitarch, C. Medina, T. Portolés, F. J. López, F. Hernández, Determination of priority organic micro-pollutants in water by gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **583**, 246 (2007).
- 139 F. Werres, P. Balsaa, T. C. Schmidt, Total concentration analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples with high suspended particulate matter content. *Journal of Chromatography A* **1216**, 2235 (2009).
- 140 Y. He, H. K. Lee, Trace analysis by combined use of off-line solid-phase extraction, on-column sample focusing and U-shape flow cell in capillary liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **808**, 79 (1998).
- 141 P. R. Kootstra *et al.*, Solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil samples. *Journal of Chromatography A* **697**, 123 (1995).
- 142 R. El Harrak, M. Calull, R. M. Marcé, F. Borrull, Influence of the Organic Solvent in On-Line Solid Phase Extraction for the Determination of PAHs by Liquid Chromatography and Fluorescence Detection. *Journal of High Resolution Chromatography* **21**, 667 (1998).
- 143 S. Barrek *et al.*, Multi-residue analysis and ultra-trace quantification of 36 priority substances from the European Water Framework Directive by GC-MS and LC-FLD-MS/MS in surface waters. *Talanta* **79**, 712 (2009).
- 144 V. c. Matamoros, E. Jover, J. M. Bayona, Part-per-Trillion Determination of Pharmaceuticals, Pesticides, and Related Organic Contaminants in River Water by Solid-Phase Extraction Followed by Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **82**, 699 (2010/01/15, 2009).
- 145 US EPA, Method 550 – Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water by liquid-liquid extraction and HPLC with coupled ultraviolet and fluorescence detection (1990).
- 146 D. M. Brum, R. J. Cassella, A. D. Pereira Netto, Multivariate optimization of a liquid-liquid extraction of the EPA-PAHs from natural contaminated waters prior to

-
- determination by liquid chromatography with fluorescence detection. *Talanta* **74**, 1392 (2008).
- 147 B. O. Kwach, J. O. Lalah, High Concentrations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Found in Water and Sediments of Car Wash and Kisat Areas of Winam Gulf, Lake Victoria-Kenya. *Bull Environ Contam Toxicol* **83**, 727 (2009/11/01, 2009).
- 148 A. Motelay-Massei, D. Ollivon, B. Garban, M. Chevreuil, Polycyclic aromatic hydrocarbons in bulk deposition at a suburban site: assessment by principal component analysis of the influence of meteorological parameters. *Atmospheric Environment* **37**, 3135 (2003).
- 149 A. Filipkowska, L. Lubecki, G. Kowalewska, Polycyclic aromatic hydrocarbon analysis in different matrices of the marine environment. *Analytica Chimica Acta* **547**, 243 (2005).
- 150 US EPA, Method 610 – Polynuclear aromatic hydrocarbons. Methods for organic chemical analysis of municipal and industrial wastewater. (2001).
- 151 A. J. King, J. W. Readman, J. L. Zhou, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water by solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **523**, 259 (2004).
- 152 M.-M. Zheng, B. Lin, Y.-Q. Feng, Hybrid organic–inorganic octyl monolithic column for in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1164**, 48 (2007).
- 153 Z. Qin, L. Bragg, G. Ouyang, J. Pawliszyn, Comparison of thin-film microextraction and stir bar sorptive extraction for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples with controlled agitation conditions. *Journal of Chromatography A* **1196–1197**, 89 (2008).
- 154 E. Pérez-Carrera, V. M. L. León, A. G. Parra, E. González-Mazo, Simultaneous determination of pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in seawater and interstitial marine water samples, using stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1170**, 82 (2007).

- 155 Y.-N. Hsieh *et al.*, Nafion membrane-supported ionic liquid–solid phase microextraction for analyzing ultra trace PAHs in water samples. *Analytica Chimica Acta* **557**, 321 (2006).
- 156 N. Ratola, A. Alves, N. Kalogerakis, E. Psillakis, Hollow-fibre liquid-phase microextraction: A simple and fast cleanup step used for PAHs determination in pine needles. *Analytica Chimica Acta* **618**, 70 (2008).
- 157 L. Wolska, M. Rawa-Adkonis, J. Namieśnik, Determining PAHs and PCBs in aqueous samples: finding and evaluating sources of error. *Anal Bioanal Chem* **382**, 1389 (2005/07/01, 2005).
- 158 R. M. Marcé, F. Borrull, Solid-phase extraction of polycyclic aromatic compounds. *Journal of Chromatography A* **885**, 273 (2000).
- 159 G. Bikas, E. Zervas, Regulated and Non-Regulated Pollutants Emitted during the Regeneration of a Diesel Particulate Filter. *Energy & Fuels* **21**, 1543 (2007/05/01, 2007).
- 160 S. T. Bagley, L. D. Gratz, J. H. Johnson, J. F. McDonald, Effects of an Oxidation Catalytic Converter and a Biodiesel Fuel on the Chemical, Mutagenic, and Particle Size Characteristics of Emissions from a Diesel Engine. *Environmental Science & Technology* **32**, 1183 (1998/05/01, 1998).
- 161 M. Shamsipur, J. Hassan, A novel miniaturized homogenous liquid–liquid solvent extraction-high performance liquid chromatographic-fluorescence method for determination of ultra traces of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment samples. *Journal of Chromatography A* **1217**, 4877 (2010).
- 162 W. Wang, R. Ma, Q. Wu, C. Wang, Z. Wang, Magnetic microsphere-confined graphene for the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental water samples coupled with high performance liquid chromatography–fluorescence analysis. *Journal of Chromatography A* **1293**, 20 (2013).
- 163 E. Selli, C. Zaccaria, F. Sena, G. Tomasi, G. Bidoglio, Application of multi-way models to the time-resolved fluorescence of polycyclic aromatic hydrocarbons mixtures in water. *Water Research* **38**, 2269 (2004).

-
- 164 H. Zhang, M. Xue, Z. Dai, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic products by HPLC-fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis* **23**, 469 (2010).
- 165 B. Janoszka, HPLC-fluorescence analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in pork meat and its gravy fried without additives and in the presence of onion and garlic. *Food Chemistry* **126**, 1344 (2011).
- 166 F. P. Serpe, M. Esposito, P. Gallo, L. Serpe, Optimisation and validation of an HPLC method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mussels. *Food Chemistry* **122**, 920 (2010).
- 167 A. Criado, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel, Direct automatic screening of soils for polycyclic aromatic hydrocarbons based on microwave-assisted extraction/fluorescence detection and on-line liquid chromatographic confirmation. *Journal of Chromatography A* **1050**, 111 (2004).
- 168 D. Fabbri *et al.*, Source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons in a coastal lagoon by molecular and isotopic characterisation. *Marine Chemistry* **84**, 123 (2003).
- 169 P. Villar, M. Callejón, E. Alonso, J. C. Jiménez, A. Guiraúm, Optimization and validation of a new method of analysis for polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge by liquid chromatography after microwave assisted extraction. *Analytica Chimica Acta* **524**, 295 (2004).
- 170 L. Pensado *et al.*, Strategic sample composition in the screening of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A* **1056**, 121 (2004).
- 171 H. Wang, S. Yu, A. D. Campiglia, Solid-phase nano-extraction and laser-excited time-resolved Shpol'skii spectroscopy for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water samples. *Analytical Biochemistry* **385**, 249 (2009).
- 172 N. Aguinaga, N. Campillo, P. Viñas, M. Hernández-Córdoba, Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in milk and related products using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **596**, 285 (2007).

- 173 E. Borrás, L. A. Tortajada-Genaro, Characterisation of polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric aerosols by gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **583**, 266 (2007).
- 174 Y. Ke *et al.*, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in leather products using solid-phase microextraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry. *Microchemical Journal* **112**, 159 (2014).
- 175 A. Ene, O. Bogdevich, A. Sion, T. Spanos, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by gas chromatography–mass spectrometry in soils from Southeastern Romania. *Microchemical Journal* **100**, 36 (2012).
- 176 X.-M. Li, Q.-H. Zhang, P. Wang, Y.-M. Li, G.-B. Jiang, Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Air by Stir Bar Sorptive Extraction-Thermal Desorption-Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* **39**, 1641 (2011).
- 177 W. B. Wilson, U. Hewitt, M. Miller, A. D. Campiglia, Water analysis of the sixteen environmental protection agency—polycyclic aromatic hydrocarbons via solid-phase nanoextraction-gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1345**, 1 (2014).
- 178 Y. Zhao, B. Hong, Y. Fan, M. Wen, X. Han, Accurate analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and alkylated PAHs homologs in crude oil for improving the gas chromatography/mass spectrometry performance. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **100**, 242 (2014).
- 179 M. Bates *et al.*, Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in airborne particles by direct sample introduction thermal desorption GC/MS. *Atmospheric Environment* **42**, 6144 (2008).
- 180 J. Á. Gómez-Ruiz, F. Cordeiro, P. López, T. Wenzl, Optimisation and validation of programmed temperature vaporization (PTV) injection in solvent vent mode for the analysis of the 15 + 1 EU-priority PAHs by GC–MS. *Talanta* **80**, 643 (2009).
- 181 S. Orecchio, V. P. Ciotti, L. Culotta, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coffee brew samples: Analytical method by GC–MS, profile, levels and sources. *Food and Chemical Toxicology* **47**, 819 (2009).

-
- 182 N. E. Sánchez *et al.*, Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) found in gas and particle phases from pyrolytic processes using gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). *Fuel* **107**, 246 (2013).
- 183 W.-C. Tseng, P.-S. Chen, S.-D. Huang, Optimization of two different dispersive liquid–liquid microextraction methods followed by gas chromatography–mass spectrometry determination for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) analysis in water. *Talanta* **120**, 425 (2014).
- 184 J. de Boer, R. J. Law, Developments in the use of chromatographic techniques in marine laboratories for the determination of halogenated contaminants and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Chromatography A* **1000**, 223 (2003).
- 185 M. I. H. Helaleh, A. Al-Omair, A. Nisar, B. Gevao, Validation of various extraction techniques for the quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges using gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1083**, 153 (2005).
- 186 H. Bagheri, A. Mohammadi, Pyrrole-based conductive polymer as the solid-phase extraction medium for the preconcentration of environmental pollutants in water samples followed by gas chromatography with flame ionization and mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A* **1015**, 23 (2003).
- 187 O. S. Olatunji, O. S. Fatoki, B. O. Opeolu, B. J. Ximba, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons [PAHs] in processed meat products using gas chromatography – Flame ionization detector. *Food Chemistry* **156**, 296 (2014).
- 188 M.-C. Wei, J.-F. Jen, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples by microwave assisted headspace solid-phase microextraction and gas chromatography/flame ionization detection. *Talanta* **72**, 1269 (2007).
- 189 M. J. Haas, K. M. Scott, T. L. Alleman, R. L. McCormick, Engine Performance of Biodiesel Fuel Prepared from Soybean Soapstock: A High Quality Renewable Fuel Produced from a Waste Feedstock. *Energy & Fuels* **15**, 1207 (2001/09/01, 2001).
- 190 Quintana, J.B., Boonjob, W., Miro, M., Cerda, V. Online Coupling of Bead Injection Lab-On-Valve Analysis to Gas Chromatography: Application to the Determination of Trace Levels of Polychlorinated Biphenyls in Solid Waste Leachates. *Analytical Chemistry*. Vol 81, 4822–4830, 2009.

Referencias

- 191 Hyotylainen, T.; Riekkola, M. L. On line coupling extraction with gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1186, 39-50, 2008.
- 192 G. Kiss, Z. Varga-Puchony, J. Hlavay, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in precipitation using solid-phase extraction and column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **725**, 261 (1996).
- 193 F. J. Camino-Sánchez *et al.*, Validation of a GC-MS/MS method for simultaneous determination of 86 persistent organic pollutants in marine sediments by pressurized liquid extraction followed by stir bar sorptive extraction. *Chemosphere* **84**, 869 (2011).
- 194 G. A. Junk, J. J. Richard, Organics in water: solid phase extraction on a small scale. *Analytical Chemistry* **60**, 451 (1988/03/01, 1988).
- 195 K. Li *et al.*, Solid-phase extraction with C30 bonded silica for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulate matters by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1154**, 74 (2007).