



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE QUIMICA

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN Y ANÁLISIS ALIMENTARIO

**DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS  
BASADAS EN LA ELECTROFORESIS CAPILAR EN MEDIO NO  
ACUOSO PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES  
EMERGENTES EN MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES**

**Eva Blanco Romero**

Memoria para optar al grado de Doctora en Química

Santiago de Compostela, Octubre de 2009



D. Alberto Cepeda Sáez, Catedrático de Universidad y Director del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela,

**Informa:**

Que Dña. Eva Blanco Romero ha realizado en este departamento, bajo la dirección de las Profesoras Titulares de Universidad Dña. María del Carmen Casais Laíño y Dña. María del Carmen Mejuto Martí, el trabajo **“Desarrollo de nuevas metodologías analíticas basadas en la electroforesis capilar en medio no acuoso para la determinación de contaminantes emergentes en muestras medioambientales”**, que presenta para optar al grado de Doctora en Química.

Y para que así conste, firmo el presente informe en Santiago de Compostela, a día 7 de Octubre de 2009.

D. Alberto Cepeda Sáez



**Dña. María del Carmen Casais Laíño y Dña. María del Carmen Mejuto Martí,**  
Profesoras Titulares de Universidad del Departamento de Química Analítica, Nutrición y  
Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela,

**Autorizan:**

A la licenciada **Dña. Eva Blanco Romero** a la presentación del trabajo titulado  
**“Desarrollo de nuevas metodologías analíticas basadas en la electroforesis capilar  
en medio no acuoso para la determinación de contaminantes emergentes en  
muestras medioambientales”**, que ha realizado bajo nuestra dirección, para optar al  
grado de Doctora en Química.

Y para que así conste, firmamos la presente autorización en Santiago de  
Compostela, a día 7 de Octubre de 2009.

Dña. María del Carmen Casais

Dña. María del Carmen Mejuto



## **Agradecimientos**

*Aunque el camino ha sido largo y duro, por fin ha llegado este momento...*

*Me gustaría dar las gracias al Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Facultad de Química, al Instituto de Investigación y Análisis Alimentarios (IIAA) y, en especial, al Prof. Rafael Cela por permitirme formar parte de su grupo de investigación y ofrecerme todos los medios técnicos y materiales para la realización de este trabajo.*

*Debo dar las gracias también a la Fundación Segundo Gil Dávila, a la Xunta de Galicia y a la Universidad de Santiago de Compostela por la concesión de las becas disfrutadas durante el período de realización de esta Tesis. Al Ministerio de Ciencia y Tecnología (proyectos BQU2002-01944 y BQU2003-02090), al Ministerio de Educación y Ciencia (proyecto CTQ2006-03334/BQU), a la Xunta de Galicia (proyectos PGIDT01PX123701PN, PGIDT04PXIC123701PN y PGIDT06PXIB237039PR) y a la Fundación E. U. FEDER por la financiación de este trabajo.*


*Quisiera dar las gracias también a mis directoras de Tesis, Carmela y Mamen, por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo. Agradecerles todo su apoyo, y la formación recibida. Gracias también a Rafael por la ayuda prestada durante todos estos años.*

*To Dr. Monika Möder, Dr. Peter Popp and all people at UFZ Leipzig for their kindly welcome to the group, and all their great help during my three months stay in their laboratory. Vielen Dank!*

*Thanks to Pirkko-Leena for our fruitful collaboration during your stay in the IIAA lab. I hope you had enjoyed the time you spent here, and also you had learned more about "things typical Spanish". Kiitos!*

*Gracias a todos mis compañeros de laboratorio del IIAA, a todos aquellos que me habéis acompañado a lo largo de estos siete años de trabajo encerrados en estas cuatro paredes, y que habéis tenido que soportarme día a día. Gracias por vuestra ayuda, y por los momentos divertidos compartidos.*

*Muchas gracias a aquéllos con los que, además, he compartido tantos buenos momentos dentro y, especialmente, fuera de este laboratorio. Sin apenas darnos cuenta, con el tiempo nos hemos ido convirtiendo en buenos amigos. Hemos vivido momentos muy buenos juntos, que espero se sigan repitiendo: las casas rurales, los paseos por la playa, los viajes en el asiento de atrás del coche, las fiestas y sus pinchitos, el sing-star, las películas por el messenger, ... Chicos, vosotros tenéis la luz!*



*No puedo dejar de escribir aquí unas palabras para agradecer a las personas que han trabajado codo con codo conmigo estos últimos tres años. No ha sido fácil. Muchas gracias a todos vosotros por el gran esfuerzo, por intentar conseguir algo que nos hacía mucha ilusión, y que creo que, después de todo, nos merecíamos. Espero que algún día llegue nuestra recompensa... En especial, agradecer a Rafael todas las oportunidades que me ha brindado, y la confianza que ha depositado en mí y que me ha demostrado siempre a lo largo de todo este tiempo. Gracias a mis compis, Juan y Carmen, por compartir nuestro esfuerzo y nuestras esperanzas, y enseñarme que los objetivos alcanzados juntos (aunque fugazmente) se disfrutan más cuando son compartidos. Al final hemos conseguido formar un gran equipo, y me ha encantado trabajar con vosotros!*

*A Jacobo, porque ti foches e sigues sendo o meu apoio máis importante nestos últimos anos. Gracias por aguentalo todo, por terme animado sempre que o necesitei, porque ó final sempre consigues facerme ver o lado positivo das cousas, e porque sempre consigues facerme rir. Gracias por ver e compartir o mundo comigo, sempre os dous xuntos.*

*Y finalmente, gracias a mi familia, y muy especialmente a mis padres y a mi hermano, porque sin vuestro cariño y apoyo incondicional, y sin vuestro sacrificio diario, yo no hubiera llegado nunca hasta aquí.*

Gracias

# ÍNDICE





<b>ABSTRACT (*)</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>5</b>
<b>CAPÍTULO II. INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
<b>1. ELECTROFORESIS CAPILAR</b>	<b>13</b>
<b>1.1. Fundamentos teóricos. Conceptos básicos.</b>	<b>14</b>
1.1.1. Electromigración	14
1.1.2. Electroósmosis	15
1.1.3. Parámetros analíticos	19
1.1.4. Modos de operación	21
<b>1.2. Instrumentación</b>	<b>24</b>
1.2.1. Esquema básico de un equipo de electroforesis capilar	24
1.2.2. Métodos de inyección de muestra	25
1.2.3. Sistemas de detección	28
<b>1.3. Procedimientos de concentración en línea (<i>on-column</i>)</b>	<b>30</b>
<b>1.4. Electroforesis capilar en medio no acuoso (NACE)</b>	<b>33</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>39</b>
<b>2. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS</b>	<b>45</b>
<b>2.1. Definición, estructura y propiedades</b>	<b>46</b>
<b>2.2. Producción y aplicaciones</b>	<b>49</b>
<b>2.3. Distribución y presencia en el medioambiente</b>	<b>50</b>
<b>2.4. Exposición y toxicidad</b>	<b>54</b>
<b>2.5. Legislación aplicable</b>	<b>55</b>
<b>2.6. Métodos de análisis de fenoles y bisfenoles halogenados</b>	<b>56</b>
2.6.1. Procedimientos de preparación de muestra. Extracción, concentración y limpieza.	57
2.6.1.1. Estación depuradora de aguas residuales (EDAR): aguas residuales y lodos de depuradora	58
2.6.1.2. Preparación de muestras acuosas	59

2.6.1.3. Preparación de muestras sólidas medioambientales	65
2.6.2. Determinación de fenoles y bisfenoles halogenados	76
Bibliografía	80
<b>3. PARABENOS Y ÁCIDO <i>p</i>-HIDROXIBENZOICO</b>	<b>91</b>
3.1. Definición, estructura y propiedades	92
3.2. Producción y aplicaciones	94
3.3. Distribución y presencia en el medioambiente	97
3.4. Exposición y toxicidad	100
3.5. Métodos de análisis de parabenos y ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	102
3.5.1. Procedimientos de preparación de muestra. Extracción, concentración y limpieza.	102
3.5.2. Determinación de parabenos y ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	106
Bibliografía	116
<b>CAPÍTULO III. EXPERIMENTAL</b>	<b>121</b>
<b>1. PATRONES Y REACTIVOS</b>	<b>123</b>
1.1. Reactivos, gases y disolventes generales	123
1.2. Patrones comerciales	124
<b>2. INSTRUMENTACIÓN Y MATERIAL</b>	<b>124</b>
2.1. Material general de laboratorio	124
2.2. Instrumentación para la determinación	126
2.3. Acondicionamiento y limpieza del material	126
2.3.1. Limpieza del material de vidrio y plástico	126
2.3.2. Preparación y acondicionamiento de materiales adsorbentes	127
2.3.3. Acondicionamiento y mantenimiento de capilares	127
<b>3. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES</b>	<b>129</b>
3.1. Preparación de disoluciones estándar de analitos	129
3.2. Preparación de disoluciones tampón de desarrollo	129
3.3. Preparación de otras disoluciones	131
<b>4. MUESTREO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS</b>	<b>132</b>

4.1. Toma de muestra y pretratamiento	132
4.2. Contaminación de las muestras	133
5. MEDIDA DEL FLUJO ELECTROSMÓTICO Y CÁLCULO DE PARÁMETROS ANALÍTICOS	134
Bibliografía	136
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>137</b>
1. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS	139
1.1. Resumen	139
1.2. Separación de fenoles y bisfenoles halogenados mediante electroforesis capilar	141
Artículo I. <i>Comparative study of aqueous and non-aqueous capillary electrophoresis in the separation of halogenated phenolic and bisphenolic compounds in water samples.</i>	143
1.3. Determinación de bromofenoles y bisfenoles halogenados en muestras de agua	141
Artículo II. <i>Analysis of tetrabromobisphenol A and other phenolic compounds in water samples by non-aqueous capillary electrophoresis coupled to photodiode array ultraviolet detection.</i>	157
1.4. Determinación de bromofenoles y bisfenoles halogenados en muestras sólidas medioambientales	141
Artículo III. <i>Approaches for the simultaneous extraction of tetrabromobisphenol A, tetrachlorobisphenol A, and related phenolic compounds from sewage sludge and sediment samples based on matrix solid-phase dispersion.</i>	167
1.5. Conclusiones y consideraciones adicionales	177
2. PARABENOS Y ÁCIDO <i>p</i> -HIDROXIBENZOICO	181
2.1. Resumen	181
2.2. Separación de parabenos y ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico mediante electroforesis capilar en medio no acuoso	182
Artículo IV. <i>Simultaneous determination of p-hydroxybenzoic acid and parabens by capillary electrophoresis with improved sensitivity in nonaqueous media.</i>	183
2.3. Determinación de parabenos y ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico en muestras de agua	182

## ÍNDICE

---

Artículo V. <i>Combination of off-line solid-phase extraction and on-column sample stacking for sensitive determination of parabens and p-hydroxybenzoic acid in environmental waters by non-aqueous capillary electrophoresis.</i>	195
2.4. Conclusiones y consideraciones adicionales	205
<b>CAPÍTULO V. CONCLUSIONES</b>	<b>207</b>
<i>Conclusions</i>	211
<b>ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS</b>	<b>213</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>225</b>
<b>ANEXO I. OTRAS PUBLICACIONES</b>	<b>227</b>
Publicación I. <i>Capillary Electrophoresis /Phenols. Encyclopedia of Separation Science, online update.</i>	229
Artículo VI. <i>Improving sensitivity in simultaneous determination of copper carboxylates by nonaqueous capillary electrophoresis.</i>	239

(\*) Chapters and Sections denoted in italics are written in English

# **ABSTRACT**

---

---



Capillary electrophoresis (CE) is a simple and low-cost non-chromatographic separation technique with sufficiently proved efficiency on environmental analysis. The introduction of organic solvents as electrolyte modifiers and the development of separations in pure organic media have broadened CE application field. The main goal of this PhD dissertation has been the approaching of CE, and especially **non-aqueous capillary electrophoresis (NACE)**, to the environmental chemical analysis daily practice, which bears a great interest owing to the high potential of this technique and its scarce usage in routine laboratories.

In last decades the study of some groups of organic pollutants with uncertain toxicity has arisen. At first, these compounds were considered harmless, so they had been used uncontrollably. Actually, many of these non-regulated chemicals are known as **emerging pollutants**, because accumulated data suggest that by their selves or through their degradation products may cause a negative effect on human health and/or the environment. These compounds are usually present in daily consumer products such as cosmetics, pharmaceutical and personal care products (PPCPs), and in plastics, polymers and other materials with flame retardant properties, among others. In general, these compounds are introduced directly on the environment through recreational waters and domestic, urban and industrial wastewaters discharges, waste disposals, or released from products or materials containing them.

Nowadays it has been demonstrated that some of these compounds can act as endocrine disrupting chemicals (EDCs), exhibiting weak or moderate estrogenic and other hormone-related activity. Toxicity is relatively low for most of them. However, they can be precursors of other chemicals considered as priority organic pollutants. The continuous release of this kind of apparently harmless chemicals to the environment highlights the need of developing suitable analytical methodology for the monitorization of these potential pollutants, and their degradation products, in different environmental compartments.

In this sense, this PhD dissertation tries to contribute to scientific research dealing with environmental analysis and pollution control. Thus, research studies here gathered have been mainly focused on the **development of analytical methodology based on NACE** for the determination of two different groups of organic compounds considered as emerging pollutants, namely brominated flame retardants (specifically, **bromophenols and halogenated bisphenols**) and preservative agents (particularly, **p-hydroxybenzoic acid and parabens**).

In these studies, environmentally interesting **aqueous and solid samples** have been analyzed, such as surface waters (continentals), urban wastewaters, sediments, and sewage sludges. As **sample pretreatment procedures**, simple and low-cost methodologies, like **solid-phase extraction (SPE)** for aqueous samples, and **matrix solid-phase dispersion (MSPD)** for solid samples, were selected. The use of these techniques avoids multistep procedures usually applied for complex matrices pretreatment, thus minimizing as much as possible sample size, organic solvent

## ABSTRACT

---

consumption, residue generation, and analysis time, and consequently costs. All optimization studies were performed trying to maintain the compatibility between organic extracts and NACE system. Also, in order to improve sensitivity, **large-volume sample stacking (LVSS)** was evaluated as on-line preconcentration technique.

All developed analytical methodologies gathered on this thesis are original research studies. Five articles have been already published in international journals, and various communications presented in international symposiums. Also it has been used as a reference and guideline for the development of other investigation works carried out in parallel to this thesis, that also have generated another two scientific publications and some academic reports.

# **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

---

---



La electroforesis capilar (*capillary electrophoresis*, CE) es una técnica de separación no cromatográfica, sencilla, barata, y con efectividad suficientemente comprobada en el análisis medioambiental. La introducción de disolventes orgánicos como modificadores de los electrolitos y el desarrollo de separaciones en medios puramente orgánicos han ampliado su campo de aplicación. El principal propósito de esta memoria de tesis ha sido acercar la CE, y muy especialmente la **electroforesis capilar en medio no acuoso** (*non-aqueous capillary electrophoresis*, NACE), a la práctica diaria del análisis químico medioambiental, de gran interés dado el elevado potencial de esta técnica y su escasa implantación en los laboratorios de rutina.

En el siglo XX, durante décadas de investigación científica y desarrollo tecnológico, se liberaron al medio ambiente multitud de sustancias químicas, la mayoría de ellas de origen artificial o antropogénico. La fabricación de nuevos materiales de construcción y de mobiliario, y la aparición de nuevos productos de consumo, entre otros, fueron los principales responsables de esta explosión de nuevos compuestos contaminantes producidos comercialmente y de uso indiscriminado. Desgraciadamente, en aquellos momentos no se llevaron a cabo controles ni estudios toxicológicos, y tampoco se evaluaron las posibles consecuencias medioambientales de su utilización.

En las últimas décadas, tanto por parte de la comunidad científica como de la sociedad en general, fue surgiendo una creciente preocupación por la conservación del medio ambiente. En este punto, se comenzaron los primeros estudios para evaluar la distribución, persistencia y bioacumulación, y los posibles efectos adversos de estas sustancias potencialmente nocivas y contaminantes.

Desde entonces, se ha detectado un gran número de sustancias peligrosas para la salud humana y/o el medio ambiente en muestras de diversos compartimentos medioambientales. Muchos de estos compuestos han sido incluidos por diversas organizaciones internacionales en sus listas de contaminantes orgánicos prioritarios (*priority organic pollutants*, POPs), entre ellos, cabe destacar, los bifenilos policlorados (*polychlorinated biphenyls*, PCBs) y polibromados (*polybrominated biphenyls*, PBBs), los difeniléteres polibromados (*polybrominated diphenylethers*, PBDEs), los hidrocarburos aromáticos policíclicos (*polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAHs), las dioxinas, los contaminantes fenólicos, especialmente los clorofenoles, o ciertos pesticidas organoclorados y organofosforados. Tras realizarse exhaustivos programas de monitorización e impacto ambiental, se formularon diversas legislaciones, tanto nacionales como internacionales, con el fin de reducir la exposición a los mismos, y evitar sus consecuencias a corto y largo plazo. Así, para la mayoría de estos compuestos se establecieron restricciones en cuanto a niveles permitidos de fabricación y utilización, y a emisiones al medio ambiente (concretamente al medio acuático), e incluso en algunos casos la prohibición de su uso.

Más recientemente han comenzado a estudiarse otros grupos de contaminantes orgánicos de toxicidad desconocida, y que por ello, en un principio, fueron

## I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---

considerados inocuos y utilizados sin control alguno. Se trata de los denominados **contaminantes emergentes**, compuestos no regulados y que, en sí mismos o por sus productos de degradación, pueden ejercer efectos nocivos en el hombre y/o en el medio ambiente. Suelen estar presentes en productos de consumo de uso diario tales como cosméticos, fármacos y productos de cuidado e higiene personal (*pharmaceutical and personal care products*, PPCPs), y en plásticos, polímeros y otros materiales con carácter ignífugo, entre otros. Generalmente, estos compuestos se introducen directamente en el medio ambiente a través de las descargas de aguas de recreo de piscinas, y aguas residuales domésticas, urbanas e industriales, así como por vertidos, o por lixiviación de los productos o materiales que los contienen.

Hoy en día se ha demostrado que algunos de estos compuestos son **disruptores endocrinos químicos** (*endocrine disrupting chemicals*, EDCs), puesto que interfieren en la acción de las hormonas endógenas. Para la mayoría de ellos, la toxicidad es relativamente baja. Sin embargo, pueden ser precursores de otras especies consideradas contaminantes prioritarios, como es el caso de ciertos retardantes de llama bromados (*brominated flame retardants*, BFRs), que por degradación fotoquímica generan dibenzodioxinas (*polybrominated dibenzodioxines*, PBDDs) y dibenzofuranos (*polybrominated dibenzofuranes*, PBDFs) polibromados. Del mismo modo, durante los tratamientos de cloración de las aguas residuales, algunos PPCPs pueden dar lugar a compuestos aromáticos clorados.

La continua liberación de este tipo de sustancias aparentemente inocuas al medio ambiente hace necesario el desarrollo de procedimientos analíticos apropiados para el control de estos contaminantes potenciales, y sus productos de degradación, en los distintos compartimentos medioambientales. Así, con los datos obtenidos en futuros estudios de distribución en el medio ambiente y evaluaciones toxicológicas, por exposición continuada a corto y largo plazo, podrá establecerse una legislación que regule adecuadamente la utilización de estos compuestos para minimizar los riesgos para la salud del hombre y el medio ambiente.

En este sentido, esta memoria de tesis pretende contribuir a la investigación científica relacionada con el análisis medioambiental y el control de la contaminación. Así, los trabajos de investigación aquí recogidos se han centrado fundamentalmente en el **desarrollo de metodología analítica basada en la técnica NACE** (capítulo II.1) para la determinación de dos grupos de compuestos orgánicos considerados contaminantes emergentes, entre los que se incluyen los retardantes de llama bromados (concretamente, **bromofenoles y bisfenoles halogenados**, capítulo II.2), y los agentes preservativos (en particular, el **ácido *p*-hidroxibenzoico** (*p-hydroxybenzoic acid*, PHBA) y los **parabenos**, capítulo II.3).

En estos estudios se han analizado tanto **muestras acuosas** como **sólidas** de interés ambiental, como son las aguas superficiales (continentales), aguas residuales urbanas, sedimentos, y lodos de depuradora de aguas residuales. Para los **procedimientos de preparación de muestra** se han seleccionado metodologías sencillas y de bajo coste, como la **extracción en fase sólida** (*solid-phase extraction*, SPE) para las muestras acuosas, y la **dispersión de la matriz en fase sólida** (*matrix*

*solid-phase dispersion*, MSPD) para las muestras sólidas. Con el empleo de estas técnicas se pretenden evitar los procesos multietapa que conllevan algunos procedimientos analíticos utilizados en el tratamiento de muestras complejas, reduciendo en lo posible el tamaño de muestra, el consumo de disolventes orgánicos, la cantidad de residuos generados, y el tiempo de análisis, abaratando así los costes. Todo ello se realiza intentando obtener a su vez extractos compatibles con el sistema NACE utilizado en la determinación final.

Como medios para alcanzar este fin, se han marcado unos objetivos más concretos, que se enumeran a continuación:

- En el estudio de los bromofenoles y bisfenoles halogenados, se desarrollarán métodos de determinación basados en las técnicas CE en medio acuoso y NACE (capítulo IV.1.2). En ambos casos, se optimizarán las variables que afectan al proceso de separación electroforética, y se explorarán modalidades de inyección no convencionales, como la inyección de grandes volúmenes para la concentración de muestra con campo amplificado y eliminación de matriz (*large-volume sample stacking*, LVSS), para la preconcentración en línea de los analitos. Se realizará un estudio comparativo de las técnicas CE en medio acuoso y NACE, evaluándose la efectividad de ambos medios electroforéticos, y su fiabilidad para la separación de los analitos y otras interferencias potenciales.
- Una vez comprobada la validez del método NACE, se evaluará su aplicación al análisis de los compuestos considerados en muestras medioambientales acuosas y sólidas. Por un lado, se estudiará la posibilidad de extracción y concentración de los compuestos considerados en muestras de agua mediante SPE (capítulo IV.1.3). Por otro lado, para las muestras de sedimentos y lodos de depuradora de aguas residuales, se evaluará la eficacia de extracción de la técnica MSPD (capítulo IV.1.4). Se optimizarán los factores influyentes en ambos procesos de extracción, verificándose en todo momento la compatibilidad de los extractos obtenidos con el sistema electroforético de determinación. Una vez optimizadas las condiciones de trabajo, se estudiarán los parámetros analíticos de las metodologías propuestas. La validez de estos métodos se evaluará estudiando la presencia de estos contaminantes emergentes en distintas muestras reales.
- Toda la experiencia y los conocimientos adquiridos en el desarrollo de los objetivos anteriores se aplicarán al estudio del PHBA y un grupo de parabenos. De esta forma, se desarrollará un método NACE de determinación (capítulo IV.2.2), junto con un procedimiento de preparación de muestras acuosas basado en la técnica de extracción SPE (capítulo IV.2.3). Finalmente, se llevará a cabo el análisis de estos compuestos en diversas muestras de agua.

## I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---

Todas las metodologías analíticas desarrolladas y recogidas en esta memoria de tesis son trabajos de investigación originales. Estos estudios han dado lugar a diversas publicaciones en revistas internacionales, así como a varias comunicaciones en congresos internacionales, y, a su vez, han servido de referencia para otros trabajos científicos y académicos desarrollados paralelamente (Anexo I).

# **INTRODUCCIÓN**

---

---



### CAPÍTULO II.1. ELECTROFORESIS CAPILAR

La electroforesis capilar (CE) se ha convertido en los últimos años en una de las técnicas instrumentales de separación más potentes, adquiriendo así un papel preponderante en el ámbito de la química analítica. Entre sus interesantes características destacan, desde el punto de vista analítico<sup>[1]</sup>, las siguientes:

- Alta eficacia, el número de platos teóricos varía entre  $10^4$  y  $10^6$  por metro de capilar de sílice.
- Gran poder de resolución y elevada velocidad de separación (tiempos de separación muy cortos).
- Mínimo consumo de reactivos y residuos generados. Requiere pequeños volúmenes de muestra, normalmente del orden de 1 a 10 nL.
- El orden de migración de los analitos es fácilmente predecible.
- Es una técnica sencilla, barata y fácilmente automatizable.
- Gran versatilidad en cuanto a modos de operación y aplicabilidad, se puede emplear con una gran variedad de analitos, tanto iónicos como moleculares (iones simples o complejos, moléculas polares, ácidos, bases, neutros, etc.), y no existen limitaciones en cuanto a peso molecular (macromoléculas, coloides o materia corpuscular).

Dado que es una técnica de determinación bastante olvidada para el análisis medioambiental, merece la pena explorar sus posibilidades.

Son numerosas las referencias bibliográficas relacionadas con la electroforesis capilar, donde se pueden consultar sus fundamentos, instrumentación, diferentes modalidades, y aplicaciones<sup>[1-13]</sup>. A continuación, en este capítulo de introducción se da una visión general de la CE, por ser la técnica de separación empleada a lo largo de todo el trabajo de investigación expuesto en esta memoria, centrandó la atención principalmente en la electroforesis capilar de zona (*capillary zone electrophoresis*, CZE), en el empleo de disoluciones no acuosas como medios electroforéticos (electroforesis capilar en medio no acuoso, NACE), y en las técnicas de preconcentración en línea (inyección de grandes volúmenes para la concentración de muestra con campo amplificado y eliminación de matriz, LVSS). Más adelante, en los capítulos II.2 y II.3, se expondrán de forma más concreta los trabajos de CE relacionados con los diferentes compuestos de interés de esta memoria de tesis, que se han encontrado en la bibliografía consultada.

### 1.1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS. CONCEPTOS BÁSICOS.

La electroforesis en columnas capilares fue introducida prácticamente al mismo tiempo por Mikkers y col. en 1979<sup>[14-15]</sup>, y por Jorgenson y Lukacs en 1981<sup>[16-18]</sup>. Se trata de una técnica de separación no cromatográfica basada en el transporte por migración diferencial, en sentido y velocidad, de especies eléctricamente cargadas a través de un medio fluido, bajo la influencia de un campo eléctrico de corriente continua<sup>[12]</sup>.

El medio de separación se denomina medio electroforético, y es una disolución tampón que actúa como conductor de la corriente eléctrica y controla la carga de las sustancias a analizar<sup>[1]</sup>.

La velocidad de migración de dichas especies depende de su carga eléctrica, de su masa (radio hidrodinámico), de la intensidad del campo eléctrico aplicado y de las características del medio que rodea a la especie en movimiento. Así la separación mediante electroforesis se basa en las diferencias en las velocidades de migración de los solutos al aplicar el campo eléctrico.

Este movimiento de las especies en el medio electroforético se rige por dos fenómenos que tienen lugar simultáneamente: la electromigración y la electroósmosis<sup>[10,12]</sup>.

#### 1.1.1. ELECTROMIGRACIÓN

La velocidad de migración  $v$  de un soluto viene dada por la expresión:

$$v = \mu_e \cdot E \quad (1)$$

donde  $\mu_e$  es la movilidad electroforética de ese soluto, y  $E$  es el campo eléctrico aplicado para la separación.

El campo eléctrico  $E$  es función del voltaje aplicado y de la longitud del capilar. Al realizar la electroforesis en capilares de muy pequeño diámetro, capaces de disipar eficientemente el calor que se origina, es posible aplicar campos eléctricos muy altos, con lo que se reduce el tiempo de análisis y tienen lugar separaciones más eficientes.

La movilidad de un soluto determinado será constante siempre que no se varíe el medio y las condiciones en las que tiene lugar la electroforesis. Esta movilidad estará determinada por las magnitudes de la fuerza eléctrica o electromotriz  $F_e$  que experimenta el soluto y de la fuerza de rozamiento o fricción  $F_f$  que ejerce el medio sobre él.

$$F_e = q \cdot E \quad (2)$$

donde  $q$  es la carga del ion.

Considerando la ecuación que define la *ley de Stokes*<sup>[19]</sup> (válida para disoluciones acuosas diluidas, con moléculas esféricas de radios de aproximadamente 5 Å o mayores), la fricción  $F_f$  ejercida por el medio será:

$$F_f = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (3)$$

donde  $\eta$  es la viscosidad del medio y  $r$  es el radio de Stokes del analito.

Durante el proceso electroforético se alcanza un estado de equilibrio entre  $F_e$  y  $F_f$ , en el cual estas dos fuerzas tienen igual magnitud y sentidos opuestos:

$$q \cdot E = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (4)$$

Según esto, la velocidad electroforética del ion será:

$$v = \frac{q \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (5)$$

Sustituyendo en esta expresión la ecuación (1), la movilidad electroforética  $\mu_e$  vendrá dada por:

$$\mu_e = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (6)$$

De esta ecuación se deduce que tendrán alta movilidad los iones de mayor carga eléctrica y menor tamaño. Las desviaciones de esta ecuación en el caso de analitos muy pequeños o efectos iónicos pueden compensarse con la introducción de factores de corrección<sup>[19-20]</sup>.

### 1.1.2. ELECTROÓSMOSIS

Aunque la ecuación (6) es útil para describir los cambios de movilidad en función de la carga o masa molecular del analito, muestra algunas limitaciones, pues la *ley de Stokes* sólo es válida para iones esféricos rígidos, y además está ignorando la atmósfera de contraiones, dejando inexplicada la influencia del medio sobre la movilidad.

En medio acuoso y en condiciones normales, la mayoría de las superficies sólidas de vidrio o sílice poseen un exceso de cargas negativas que puede resultar de la ionización de los grupos funcionales de la superficie (equilibrio ácido-base) y/o adsorción de especies iónicas. En la superficie de la pared de sílice fundida del capilar probablemente ocurren ambos procesos: los numerosos grupos silanol (Si-OH) estarán en forma aniónica (Si-O<sup>-</sup>) a pH alcalino o ligeramente ácido (pH>3), y atraerán contraiones del medio para mantener el balance de cargas en el sistema.

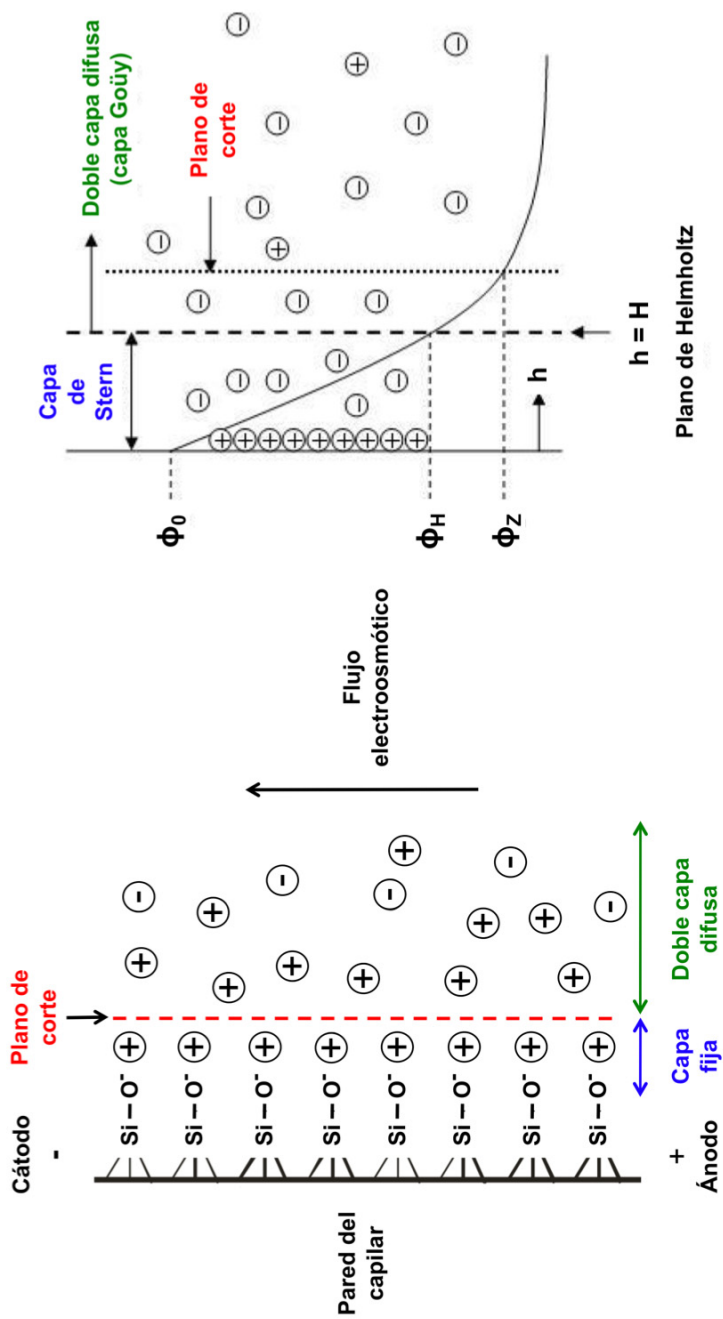


Figura II.1.1. Esquema de formación de la doble capa eléctrica y dirección del flujo electroosmótico bajo polaridad normal (o positiva) en la pared de un capilar de sílice fundida, y diagrama de potencial<sup>[1]</sup>.

La *teoría de la doble capa de Stern* describe la interfase entre un ion simple, sus contraiones y la disolución circundante. Stern combinó los modelos de Helmholtz y Gouy-Chapman, considerando la existencia de una capa fija de iones adsorbidos a la superficie, mientras los restantes forman una capa difusa (ver figura II.1.1). El potencial zeta  $\zeta$  corresponde al potencial en el plano de corte.

Bajo la influencia de un potencial externo, los cationes que forman parte de la doble capa difusa son atraídos por el cátodo. El movimiento de estos iones, que están solvatados, origina un flujo de líquido en dirección del ánodo al cátodo conocido como flujo electroosmótico (*electroosmotic flow*, EOF) o flujo electroosmótico.

Aunque el valor exacto de  $pK_a$  en la sílice fundida es difícil de determinar, el EOF es significativo por encima de  $pH\ 4$ <sup>[21-22]</sup>. La magnitud del flujo electroosmótico puede expresarse en términos de velocidad o de movilidad:

$$v_{eo} = \mu_{eo} \cdot E \quad (7)$$

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \quad (8)$$

donde  $v_{eo}$  es la velocidad del EOF,  $E$  es el campo eléctrico aplicado,  $\mu_{eo}$  es la movilidad del EOF,  $\varepsilon$  es la constante dieléctrica,  $\zeta$  es el potencial zeta, y  $\eta$  es la viscosidad del medio.

Como el potencial zeta  $\zeta$  está esencialmente determinado por la carga en la superficie del capilar, y ésta es dependiente del pH, la magnitud del EOF puede controlarse ajustando el pH del electrolito. A valores altos de pH, donde los grupos silanol estarán en su mayoría desprotonados, el EOF será significativamente superior que a pH bajo, donde estarán protonados<sup>[23]</sup>.

Además, el potencial zeta  $\zeta$  depende de la fuerza iónica del electrolito, de forma que un aumento de la misma conduce a una compresión de la doble capa eléctrica junto a la pared del capilar, que hace disminuir el potencial zeta  $\zeta$ , y con él, el EOF.

El EOF también puede ser controlado mediante la modificación de la pared del capilar con ciertos aditivos, como tensioactivos y otros modificadores orgánicos, que añadidos al electrolito pueden invertir, y en ocasiones anular, la carga en la superficie del capilar<sup>[24]</sup>. Bajo este mismo principio se ha ensayado la utilización de capilares recubiertos con materiales como el polivinilalcohol, la poliacrilamida, el polietilenglicol, la celulosa y otros polímeros para eliminar el EOF.

Una característica típica del EOF es que posee un perfil de flujo cuasi plano (ver figura II.1.2(a)). Por el contrario, cuando se impulsa un líquido a través de un tubo mediante presión hidrostática, el perfil es parabólico (ver figura II.1.2(b)). Debido a que el perfil del EOF es prácticamente plano, no contribuye de manera significativa al

## 1. ELECTROFORESIS CAPILAR

ensanchamiento de banda como hace el flujo hidrodinámico en cromatografía líquida (*liquid chromatography*, LC)<sup>[7]</sup>.

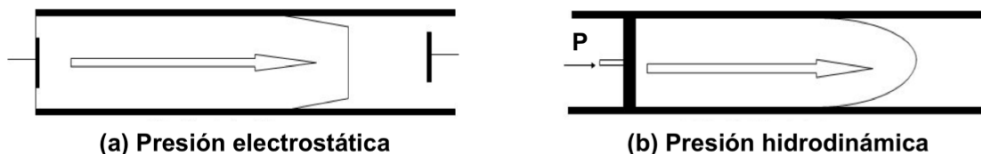


Figura II.1.2. Perfiles de flujo bajo (a) presión electrostática en electroforesis capilar, y (b) presión hidrodinámica en cromatografía líquida<sup>[7]</sup>.

En presencia del EOF, la movilidad medida experimentalmente para un soluto dado se denomina movilidad aparente  $\mu_{app}$  (*apparent electrophoretic mobility*), pues el soluto se moverá en función de su propia movilidad y por la acción del EOF. En la mayoría de los casos, el flujo electroosmótico hace que migren en un mismo sentido prácticamente todas las especies, independientemente de su carga: las moléculas neutras se moverán a la misma velocidad que el EOF, los cationes lo harán más rápido que éste y los aniones más lentamente. Asumiendo polaridad normal, se considera que para que los aniones puedan ser arrastrados hacia el cátodo, el EOF deberá ser superior en un orden de magnitud a la movilidad electroforética de dichos aniones. Gracias a esto, muchas veces es posible analizar en una sola inyección a cationes, aniones y especies neutras.

La movilidad total o aparente  $\mu_{app}$  observada resulta de la combinación vectorial de la movilidad electroforética y electroosmótica del analito, y puede calcularse como:

$$\mu_{app} = \frac{L_{eff}}{t \cdot E} = \frac{L_{eff} \cdot L_t}{t \cdot V} \quad (9)$$

donde  $t$  es el tiempo de migración del analito,  $L_{eff}$  es la longitud efectiva del capilar (hasta el detector, *effective length*),  $L_t$  es la longitud total del capilar, y  $V$  es el voltaje aplicado.

A partir de  $\mu_{app}$  puede conocerse la movilidad efectiva  $\mu_{eff}$  (*effective electrophoretic mobility*):

$$\mu_{eff} = \mu_{app} - \mu_{eo} \quad (10)$$

donde  $\mu_{eo}$  corresponderá a la movilidad de un marcador neutro que se moverá a una velocidad igual a la del EOF.

1.1.3. PARÁMETROS ANALÍTICOS

Los parámetros analíticos en electroforesis capilar pueden describirse con los mismos términos usados en cromatografía.

- EFICACIA

La eficacia, expresada como número de platos teóricos  $N$ , se calcula como:

$$N = \left( \frac{L_{eff}}{\sigma} \right)^2 \tag{11}$$

donde  $L_{eff}$  es la longitud efectiva del capilar, y  $\sigma$  es la desviación estándar del pico (en unidades de longitud).

En condiciones ideales, durante la migración de una especie a lo largo del capilar, el ensanchamiento de banda al cabo de un tiempo  $t$  se debe solamente a la difusión longitudinal de soluto (no existe ensanchamiento debido al flujo térmico). En este caso, la dispersión puede ser expresada como:

$$\sigma^2 = 2 \cdot D \cdot t = \frac{2 \cdot D \cdot L_{eff} \cdot L_t}{V \cdot (\mu_{eff} + \mu_{eo})} \tag{12}$$

donde  $D$  es el coeficiente de difusión molecular del soluto,  $t$  es el tiempo de migración del analito,  $L_t$  es la longitud total del capilar,  $V$  es el voltaje aplicado,  $\mu_{eff}$  es la movilidad electroforética del ion, y  $\mu_{eo}$  es la movilidad del EOF.

Sustituyendo esta última expresión en la ecuación (11), la eficacia queda como:

$$N = \frac{V \cdot L_{eff} \cdot (\mu_{eff} + \mu_{eo})}{2 \cdot D \cdot L_t} = \frac{E \cdot L_{eff} \cdot (\mu_{eff} + \mu_{eo})}{2 \cdot D} \tag{13}$$

De aquí se deduce que la eficacia de la separación es directamente proporcional al voltaje aplicado. Trabajando a potenciales elevados, aumenta  $N$ , y los análisis tienen lugar en un menor tiempo.

Sin embargo, esto está limitado por los efectos adversos del calentamiento Joule, que pueden originar dispersión por gradientes de temperatura en el interior del capilar, cambios locales de la viscosidad y ensanchamiento de zonas. Así, este calentamiento aumenta la conductividad eléctrica de la disolución, las movilidades de las especies, la anchura de los picos, y hasta puede afectar a la operatividad del instrumento de CE bajo condiciones críticas. Como el calor producido en electroforesis capilar es proporcional al cuadrado de la corriente eléctrica, será importante mantener los valores de corriente tan bajos como sea posible. Para reducir los efectos del

## 1. ELECTROFORESIS CAPILAR

---

calentamiento, facilitando la disipación del calor, resulta conveniente utilizar capilares con un elevado cociente área superficial/volumen.

El coeficiente de difusión molecular  $D$  está relacionado con la viscosidad del medio  $\eta$  a través de la *ecuación de Stokes-Einstein*<sup>[25]</sup>:

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (14)$$

donde  $k$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura, y  $r$  es el radio de Stokes del analito.

Sin embargo, incluso trabajando en condiciones óptimas, es frecuente que aparezcan en los electroferogramas picos con frente o cola. Esta desviación se origina debido a la diferente movilidad de los iones del analito respecto a los contraiones del electrolito. La forma de los picos se ve también afectada por el proceso de inyección, concentración y conductividad de la muestra, calentamiento por efecto Joule y adsorción del soluto a la pared del capilar<sup>[26]</sup>.

### - RESOLUCIÓN

Para un sistema con dos analitos, la resolución  $R_s$  puede calcularse como:

$$R_s = \frac{2 \cdot (t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} = \frac{(t_2 - t_1)}{4 \cdot \sigma} \quad (15)$$

donde  $t_1$  y  $t_2$  son los tiempos de migración de los componentes 1 y 2,  $w$  es el ancho de los picos en la base correspondientes, y  $\sigma$  es la desviación estándar temporal. El numerador describe el proceso de separación en términos de migración diferencial, y el denominador el proceso dispersivo contrario.

En contraste con la cromatografía, en electroforesis capilar la separación está fundamentalmente condicionada por la eficacia, y no por la selectividad. La resolución puede expresarse en función de la eficacia:

$$R_s = \frac{1}{4} \cdot \left( N^{1/2} \right) \cdot \frac{\Delta \mu_e}{\bar{\mu}_e} \quad (16)$$

$$\Delta \mu_e = \mu_{e2} - \mu_{e1} \quad (17)$$

$$\bar{\mu}_e = \frac{(\mu_{e1} + \mu_{e2})}{2} \quad (18)$$

donde  $\mu_e$  es la movilidad electroforética de los iones.

Sustituyendo en la expresión (16) la ecuación (13), queda:

$$R_s = \left( \frac{1}{4 \cdot \sqrt{2}} \right) \cdot (\Delta\mu_e) \cdot \left( \frac{V}{D \cdot (\bar{\mu}_e + \mu_{eo})} \right)^{1/2} \quad (19)$$

En contraste con la eficacia, que aumenta linealmente con el voltaje aplicado, en resolución no se ha encontrado una ganancia similar, debido a su dependencia cuadrática, y deberá cuadruplicarse el voltaje para duplicar la resolución. La generación de calor por efecto Joule limita a menudo los beneficios de esta acción.

#### 1.1.4. MODOS DE OPERACIÓN

Existen diversos modos de separación en CE, entre los que se encuentran la electroforesis capilar de zona (CZE), la cromatografía electrocinética micelar (*micellar electrokinetic chromatography*, MEKC), electroforesis capilar en gel (*capillary gel electrophoresis*, CGE), isotacoforesis capilar (*capillary isotacophoresis*, CITP), enfoque isoeléctrico capilar, (*capillary isoelectrofocusing*, CIEF), y electrocromatografía capilar (*capillary electrochromatography*, CEC). Estas modalidades se diferencian principalmente en la naturaleza del medio de separación y en las características de los analitos a separar. En la siguiente tabla II.1.1 se muestra una referencia de las diferentes modalidades de electroforesis empleadas en el análisis de diversas clases de analitos.

**Tabla II.1.1:** Modalidades de CE utilizadas en la separación de diferentes clases de analitos.

Iones pequeños	Moléculas pequeñas	Péptidos	Proteínas	ADN
CZE CITP	CZE MEKC CITP	CZE MEKC CGE CITP CIEF	CZE CGE CITP CIEF	CGE

ADN: ácido desoxirribonucleico

#### - ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA (CZE)

La electroforesis capilar de zona, también denominada CE en solución libre, es el modo más ampliamente utilizado debido a su simplicidad de operación y versatilidad. El capilar se rellena únicamente con la disolución de electrolito, y la

## 1. ELECTROFORESIS CAPILAR

---

separación ocurre gracias a que los solutos migran en zonas discretas a diferentes velocidades. En este modo de operación es posible la separación tanto de analitos aniónicos como catiónicos, no así de solutos neutros, que no tienen movilidad propia, y llegan todos juntos al detector por la acción del EOF.

### - CROMATOGRAFÍA ELECTROKINÉTICA MICELAR (MEKC)

Mediante la adición al medio electroforético de tensioactivos capaces de formar micelas, es posible la separación y análisis de moléculas cargadas y neutras. Los solutos, dependiendo de su polaridad, se distribuirán en diferente grado entre la fase acuosa y las micelas. La proporción en la que se distribuyen puede manipularse mediante la elección cuidadosa del surfactante (catiónico, aniónico o neutro), que condiciona la naturaleza física de la micela (tamaño, carga, geometría), variando el pH del electrolito o incluyendo un modificador orgánico. Las micelas formadas a partir de tensioactivos iónicos estarán cargadas, y dependiendo de su signo migrarán a favor o en contra del EOF. Durante la migración, las micelas pueden interactuar con los solutos por vía electrostática o hidrófoba, y cuanto mayor sea esta interacción, mayor será su tiempo de migración.

Los surfactantes más utilizados son los alquilsulfatos como el dodecilsulfato de sodio (*sodium dodecylsulphate*, SDS), las sales biliarias y las sales de amonio de cadena hidrófoba.

### - ELECTROFORESIS CAPILAR EN GEL (CGE)

La electroforesis capilar en gel se ha empleado fundamentalmente en las ciencias biológicas para la separación por tamaños de macromoléculas de similar relación carga/radio ( $q/r$ )<sup>[1]</sup>. La separación tiene lugar haciendo pasar los solutos a través de un polímero que actúa como tamiz molecular.

Entre las matrices poliméricas disponibles están la poliacrilamida, la agarosa, el dextrano, el alcohol polivinílico, las combinaciones de poliacrilamida y bisacrilamida, etc.

### - ISOTACOFRESIS CAPILAR (CITP)

Esta técnica es útil para la separación de materiales iónicos, pero no es posible separar cationes y aniones en un solo análisis. Se realiza en un sistema de tampón discontinuo, pues emplea una combinación de dos electrolitos con iones de distinta movilidad, uno rápido conocido como precedente, y otro más lento denominado terminal, para crear un estado en el cual las bandas de separación de los solutos se muevan a igual velocidad. Estas zonas estarán enmarcadas entre el electrolito precedente y el terminal. El electrolito precedente se escoge de manera que tenga mayor movilidad que cualquier otro componente, y de la misma manera, el terminal tendrá la menor movilidad.

Los solutos en la zona de muestra se moverán de acuerdo con su movilidad intrínseca, separándose y formando bandas de solutos. Las especies con mayor movilidad electroforética estarán al lado de la disolución precedente, mientras que las más lentas se situarán delante del electrolito terminal. Cuando se alcanza el equilibrio, se habrán formado zonas discretas que se moverán a la misma velocidad, definida por el electrolito precedente.

En CITP, cada zona tiene una concentración constante, determinada por la concentración del electrolito precedente. Las zonas menos o más concentradas que el electrolito precedente se contraen o ensanchan para adaptarse a la concentración adecuada. Este principio ha sido utilizado como método de preconcentración de los solutos en CZE, MEKC y CGE. Desde el punto de vista del análisis de trazas, se ha demostrado que el acoplamiento de la isotacoforesis con la CZE es una variante muy atractiva, con incrementos de hasta 100 veces en la sensibilidad<sup>[27]</sup>.

### - ENFOQUE ISOELÉCTRICO CAPILAR (CIEF)

En enfoque isoeléctrico capilar o isoelectroenfoque, los solutos cargados migran, bajo la acción de un campo eléctrico, a través de un gradiente de pH. Cuando cada soluto alcanza su punto isoeléctrico, se convierte en una especie neutra, no activa electroforéticamente, y deja de migrar. Este proceso se conoce como enfoque, y después de que se haya alcanzado para todos los analitos (lo que se manifiesta en una caída de la corriente cercana a cero), se hacen pasar las zonas de solutos a través del detector mediante la aplicación de presión o electroforéticamente, mediante la adición de sales a uno de los viales de electrolito.

En este modo de operación es necesario reducir o eliminar el EOF, pues puede expulsar del capilar tanto a electrolitos como a solutos antes de que el enfoque se haya completado. La reducción del EOF se logra mediante la modificación dinámica o covalente de la pared del capilar.

### - ELECTROCROMATOGRAFÍA CAPILAR (CEC)

Esta técnica es un híbrido de la cromatografía líquida de alta resolución (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) y la electroforesis capilar, que combina la alta eficacia y resolución de la CZE con la alta selectividad, versatilidad y universalidad de la HPLC<sup>[1]</sup>.

La instrumentación es la utilizada en electroforesis capilar, pero el capilar se rellena con una fase estacionaria esférica o se cubre su pared con algún tipo de adsorbente. El EOF generado con la aplicación de voltaje impulsa al eluyente y los solutos a través del capilar, y la separación tiene lugar por el reparto cromatográfico de los analitos entre la fase móvil y la estacionaria, a lo que se suma la migración de los analitos por la posible diferencia en sus movilidades electroforéticas<sup>[28]</sup>. La principal ventaja de esta técnica respecto a la cromatografía capilar convencional es la facilidad para producir los flujos tan bajos que se necesitan debido al pequeño diámetro de los

## 1. ELECTROFORESIS CAPILAR

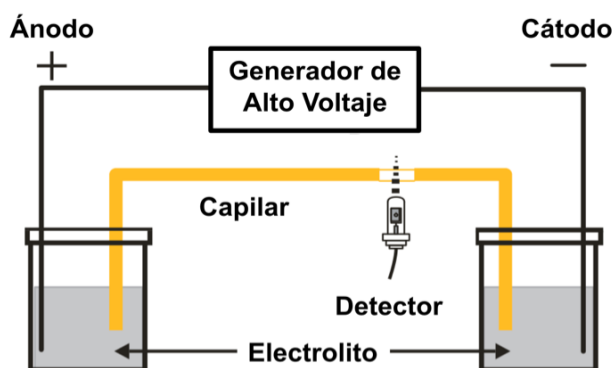
capilares. Al aprovechar el perfil plano del flujo, la eficiencia de las separaciones es mayor.

### 1.2. INSTRUMENTACIÓN

#### 1.2.1. ESQUEMA BÁSICO DE UN EQUIPO DE ELECTROFORESIS CAPILAR

La técnica de separación por electroforesis capilar requiere una instrumentación sencilla, que normalmente se reduce a una fuente de elevado voltaje, dos recipientes para la disolución de electrolito (tampón), un capilar y un sistema de detección.

En la figura II.1.3 se muestran los componentes básicos de un aparato de electroforesis capilar.



**Figura II.1.3.** Esquema básico de un equipo convencional de electroforesis capilar.

El capilar donde se lleva a cabo el proceso de separación electroforética suele ser de sílice fundida, entre 20 y 200  $\mu\text{m}$  de diámetro interno (*inner diameter*, i.d.), y entre 20 y 100 cm de longitud, está recubierto de una capa de poliimida que permite su flexibilidad sin roturas, y habitualmente se sitúa en un compartimento climatizado. Se llena con la disolución del electrolito (tampón), y sus extremos se sumergen en viales llenos de dicha disolución. En estos viales se introducen los electrodos, unas láminas de platino conectadas a un generador de alto voltaje que actúan de ánodo y cátodo, y que establecerán el contacto eléctrico entre dicho generador y el capilar durante el análisis. La fuente de elevado voltaje generalmente permite aplicar voltajes de 10 a 30 kV, tanto en polaridad positiva como en negativa, para que tenga lugar la separación de los solutos.

La introducción de los analitos en el capilar se logra reemplazando uno de los viales de electrolito por otro que contiene la muestra, y aplicando un campo eléctrico o

una presión externa, según sea el método de inyección empleado (ver sección 1.2.2 del presente capítulo).

Una vez colocado de nuevo el extremo del capilar en el vial que contiene al electrolito, se aplica el campo eléctrico para que tenga lugar la separación electroforética. De esta forma, los iones de carga positiva (cationes) migrarán hacia el extremo catódico del capilar, y los iones cargados negativamente (aniones) se moverán hacia el extremo anódico, mientras que las moléculas neutras no se ven influenciadas por el campo eléctrico y son transportadas con el EOF. La velocidad a la que migren los iones en uno u otro sentido depende de su relación  $q/r$ : cuanto mayor sea esta relación, más rápidamente se moverán los analitos por el medio electroforético. La migración de todas estas especies en el interior del capilar de separación se rige por los fenómenos ya comentados de la electromigración y la electroósmosis (en las secciones 1.1.1 y 1.1.2 del presente capítulo).

El detector normalmente se coloca en columna (*on-column*), de forma que el propio capilar actúa de celda de detección para la muestra, desprovisto para ello de su recubrimiento de poliimida, como se muestra en la figura II.1.3. La detección de los analitos tiene lugar en el extremo opuesto al de inyección del capilar, directamente a través de su pared. La señal correspondiente se observará en la pantalla del ordenador del equipo en forma de electroferograma, cromatograma electrocinético micelar o isotacofograma, dependiendo del modo de electroforesis capilar que se haya utilizado.

### 1.2.2. MÉTODOS DE INYECCIÓN DE MUESTRA

Para mantener la alta eficacia que caracteriza a la electroforesis capilar, el sistema de inyección no debe introducir un ensanchamiento de zona importante. Para ello, habitualmente se inyectan, de forma eficiente y reproducible, volúmenes muy pequeños de muestra, proporcionales al reducido diámetro interno de los capilares. Así, la longitud o volumen que la muestra inyectada ocupa dentro del capilar es un parámetro crítico, siendo recomendable que no supere el intervalo de 1-2% de la longitud total del capilar.

El volumen del capilar  $V_c$  se calcula como:

$$V_c = \pi \cdot r^2 \cdot L_t \quad (20)$$

donde  $r$  es el radio interno del capilar, y  $L_t$  es su longitud total.

La sobrecarga del capilar con muestra trae consigo dos efectos significativos y perjudiciales para la resolución y la eficacia:

## 1. ELECTROFORESIS CAPILAR

- El ensanchamiento de los picos del electroferograma por difusión longitudinal del analito, debido a una mayor anchura de la zona de muestra respecto a la zona de difusión controlada.
- Un campo eléctrico no homogéneo y la deformación de los picos debido a la diferente conductividad entre la zona de muestra y el tampón.

Los aparatos convencionales de electroforesis capilar disponen de varios métodos para la introducción de la muestra en el capilar.

### - INYECCIÓN HIDRODINÁMICA O HIDROSTÁTICA

La inyección hidrodinámica es el método de introducción de muestra más usado. Se puede llevar a cabo por aplicación de presión positiva en el extremo de entrada del capilar, o presión negativa (succión) en el extremo de salida, lo que provoca el paso de muestra al capilar. Ambos métodos están representados en la figura II.1.4.

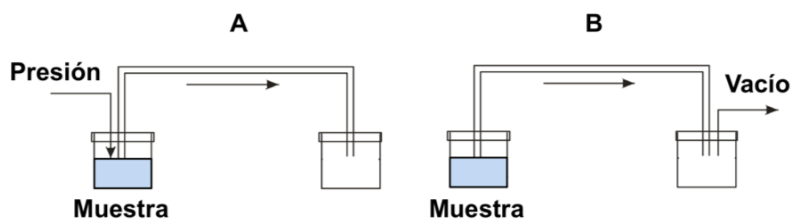


Figura II.1.4. Inyección hidrodinámica por aplicación de presión (A) o de vacío (B).

Con este modo de inyección, la cantidad de muestra inyectada será prácticamente independiente de la naturaleza de la matriz. Sin embargo, el volumen inyectado por unidad de tiempo es inversamente proporcional a la viscosidad de la disolución, por lo que debe controlarse cuidadosamente la temperatura, pues se ha demostrado que la viscosidad del electrolito y la cantidad de muestra inyectada varían entre 2 y 3% por cada grado en que varíe la temperatura<sup>[23]</sup>.

Un procedimiento menos común, pero también utilizado, es la inyección hidrostática, debida al efecto sifón. Para que tenga lugar, es necesario elevar mecánicamente el vial de muestra (y con él, el extremo de entrada del capilar) con respecto al vial colocado en el extremo de salida (ver figura II.1.5), de manera que la diferencia de altura genera un flujo temporal de muestra hacia el interior del capilar por gravedad.

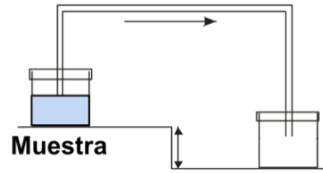


Figura II.1.5. Inyección hidrostática.

En ambos tipos de inyección, el volumen de muestra cargada es función de las dimensiones del capilar, de la diferencia de presión aplicada o establecida, de la viscosidad de las disoluciones y del tiempo de inyección establecido<sup>[29]</sup>. Este volumen puede ser calculado según la *ecuación de Hagen-Poiseuille*<sup>[12]</sup>:

$$V_i = \frac{\Delta P \cdot d^4 \cdot \pi \cdot t}{128 \cdot L_t \cdot \eta} \quad (21)$$

donde  $V_i$  es el volumen de inyección,  $\Delta P$  es la diferencia de presión aplicada,  $d$  es el diámetro interno del capilar,  $t$  es el tiempo de inyección y  $\eta$  es la viscosidad de la disolución.

#### - INYECCIÓN ELECTROKINÉTICA

La inyección electrokinética se lleva a cabo reemplazando el vial de electrolito del extremo inicial del capilar por uno que contenga la muestra, y aplicando a continuación un voltaje (ver figura II.1.6), que suele ser de 3 a 5 veces más bajo que el utilizado durante la separación. De esta manera, los analitos entran en el capilar por su migración electroforética y/o por la acción del EOF.

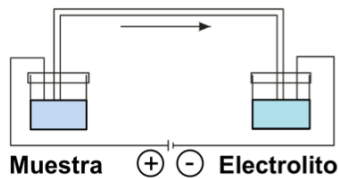


Figura II.1.6. Inyección electrokinética.

En este caso, la cantidad de muestra inyectada depende de muchos factores, como la polaridad y la magnitud y duración del voltaje aplicado, el pH del electrolito, las dimensiones del capilar, la movilidad electroforética de cada analito en particular, el EOF, y la concentración y viscosidad de la muestra<sup>[29]</sup>. Se produce una discriminación en la inyección de las especies iónicas, debido a que los iones con mayor movilidad son cargados en mayor proporción que los menos móviles. Además, debido a que los efectos de matriz pueden provocar variaciones de conductividad de la muestra, la inyección electrokinética es menos reproducible que la hidrodinámica.

### 1.2.3. SISTEMAS DE DETECCIÓN

La detección es un aspecto muy significativo en la electroforesis capilar. Tal y como se ha comentado anteriormente (ver sección 1.2.1 del presente capítulo), en general la detección se realiza directamente sobre el capilar, en modo *on-column*. Las pequeñas dimensiones de los capilares utilizados limitan, al mismo tiempo, el volumen de muestra a introducir y el paso óptico de la ventana de detección, y con ello la sensibilidad. Por eso, será necesario que las muestras a analizar tengan una concentración relativamente alta, lo cual, en ocasiones, implica etapas de preconcentración de los analitos (ver sección 1.3 del presente capítulo). También se han hecho varios intentos para modificar la geometría de los capilares a fin de aumentar el paso óptico de la ventana de detección<sup>[30]</sup> (ver más adelante en esta misma sección).

Las técnicas de detección normalmente empleadas en CE son las basadas en la absorción ultravioleta-visible (UV-vis) y en fenómenos de fluorescencia, aunque también se han realizado aplicaciones con detectores de espectrometría de masas (*mass spectrometry*, MS), electroquímicos, radioquímicos, etc. Entre los detectores disponibles en los equipos comerciales se pueden mencionar los detectores de espectrofotometría de absorción UV-vis de longitud de onda fija o múltiple con red de diodos (*diode array detector*, DAD), detectores de fluorescencia inducida por láser (*laser-induced fluorescence*, LIF), y detectores de conductividad. Con algunos instrumentos es posible conectar el extremo de salida del capilar con un espectrómetro de masas, combinando así la alta eficiencia de la electroforesis con las posibilidades para el análisis estructural de MS.

La espectrofotometría de absorción UV-vis es el método de detección más ampliamente utilizado, debido a su naturaleza casi universal para la detección de compuestos orgánicos. Dada su baja absorción de radiación en la zona del UV-vis, los capilares de sílice fundida permiten llevar a cabo la detección en columna (*on-column*) de los analitos, removiendo un pequeño segmento de su cubierta de poliimida para elaborar una ventana óptica de pocos mm.

Después del detector de absorbancia UV-vis, el detector de fluorescencia es el más utilizado<sup>[31-36]</sup>, sobre todo cuando se requiere alta sensibilidad y selectividad. Particularmente los detectores de LIF se han hecho últimamente muy populares por su sensibilidad extremadamente elevada. Desafortunadamente, este modo de detección tiene aplicación limitada en algunos campos como el medio ambiental, donde sólo unos pocos compuestos de interés tienen propiedades fluorescentes, mientras que los restantes tendrían que ser derivatizados con moléculas que contengan en sus estructuras grupos fluorescentes<sup>[37]</sup>.

En los últimos años, la espectrometría de masas ha ido cobrando una importancia cada vez mayor como método de detección en CE, dado que aporta una adecuada sensibilidad y alta selectividad, así como información estructural de las sustancias analizadas a partir de su masa molecular y/o patrones de fragmentación obtenidos<sup>[38-43]</sup>. Durante los primeros años de desarrollo del acoplamiento entre CE y

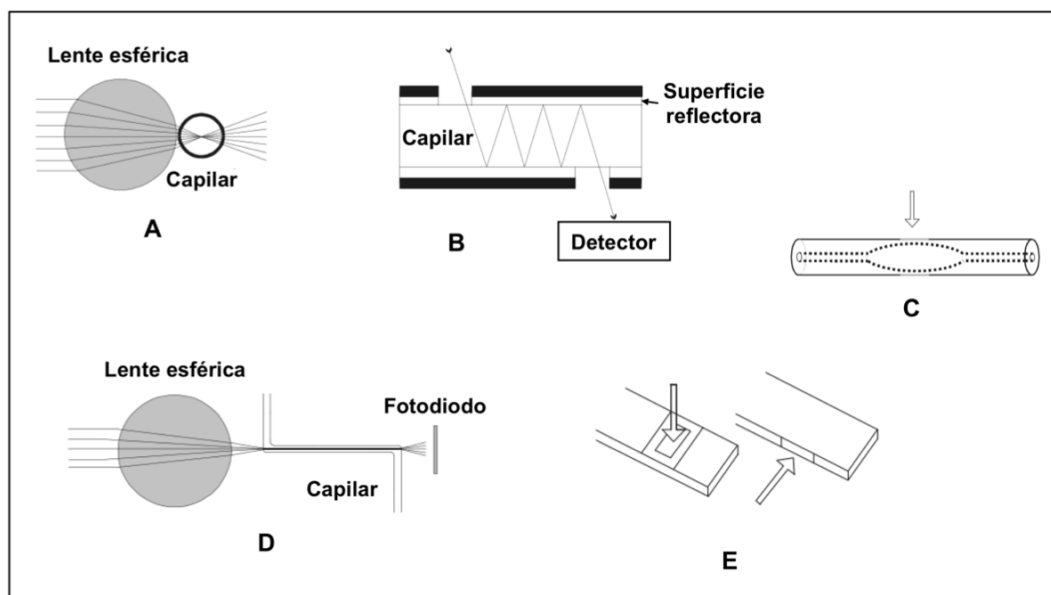
MS, ha sido necesario solucionar una primera dificultad asociada con la compatibilidad entre una técnica que trabaja con muestras en fase líquida, como la CE, con otra técnica que trabaja con muestras en estado gaseoso, como la MS, para garantizar su fiabilidad y eficacia. Para ello, generalmente se emplean tampones volátiles con la mínima concentración y fuerza iónica posible. El cierre del circuito eléctrico del sistema de CE se consigue principalmente mediante la incorporación de un flujo adicional de una disolución conductora, o en ocasiones, se recubre el extremo del capilar próximo al equipo de MS con un metal conductor. La interfase de ionización por *electrospray* (*electrospray ionization*, ESI) es, sin duda alguna, la más utilizada en la actualidad en CE-MS. La ESI requiere un flujo mínimo más grande que el desarrollado en la parte de separación mediante CE. Para conseguirlo, normalmente se añade un disolvente orgánico (por ejemplo, acetonitrilo, metanol o isopropanol) que se mezcla con el eluyente del capilar, formando así un sistema adecuado para la operación del *electrospray*.

### - ESTRATEGIAS PARA INCREMENTAR LA SENSIBILIDAD: ALTERNATIVAS EN CUANTO A GEOMETRÍA Y DISEÑO ÓPTICO DEL CAPILAR Y LA CELDA DE DETECCIÓN

En electroforesis capilar, el diseño del detector *on-column* es crítico debido a que el paso de luz está limitado por el pequeño diámetro interno del capilar (normalmente, entre 20 y 200  $\mu\text{m}$ ), limitando la detección por su efecto sobre la sensibilidad. Debido a la curvatura del capilar, el paso óptico real de la ventana de detección es menor que el diámetro de éste, puesto que sólo una fracción de radiación pasará directamente por su centro. Aunque la cantidad mínima detectada, expresada en masa, puede ser muy baja debido a los pequeños volúmenes inyectados (del orden de los nL), el límite en cuanto a concentración suele ser del orden de  $10^{-6}$  M, lo cual es varias veces más alto que los límites de detección habituales en HPLC.

Puesto que, de acuerdo con la *ley de Beer*, la absorbancia de la muestra es directamente proporcional a la longitud del paso óptico a través del cual se mide, el capilar puede ser modificado en la zona de detección para mejorar la sensibilidad. En la figura II.1.7 se muestran algunas de las alternativas en la geometría y el diseño óptico del capilar y la celda de detección<sup>[33,36,44-46]</sup>. Los capilares de formas planas son más frágiles que los cilíndricos, y en algunos casos se ha observado un ensanchamiento de los picos debido a un mayor grado de calentamiento.

El uso de estos tipos de celdas modificadas no se ha generalizado, dado que su manejo no es sencillo y, aunque el incremento de sensibilidad obtenido es apreciable, la resolución y la eficacia de los picos pueden verse afectadas de manera importante.



**Figura II.1.7.** Modificaciones de la geometría y diseño del capilar y de la celda de detección para mejorar la sensibilidad: (A) lente esférica que concentra la radiación en la ventana de detección, (B) celda de reflexión múltiple de la radiación, (C) capilares con celda de burbuja, (D) celda en forma de Z, (E) capilar de lados planos.

### 1.3. PROCEDIMIENTOS DE CONCENTRACIÓN EN LÍNEA (*ON-COLUMN*)

Para aumentar la sensibilidad de la electroforesis capilar mediante el incremento de la concentración de la muestra, es necesario concentrar los analitos en etapas de pretratamiento fuera de línea (*off-line*) antes de su análisis electroforético, o haciendo uso de procedimientos para la concentración en línea (*on-line*) del analito en el propio capilar (*on-column*)<sup>[47-49]</sup>.

La primera opción comprende técnicas de preparación de muestra tales como la extracción líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*, LLE) y la extracción en fase sólida (SPE) para matrices acuosas, así como la extracción asistida por ultrasonidos (*ultrasound-assisted extraction*, UAE) o por microondas (*microwave-assisted extraction*, MAE) para muestras sólidas, entre otras. Aunque, sin duda alguna, la SPE ha sido la técnica más ampliamente utilizada en la extracción y/o preconcentración de contaminantes previamente a su separación mediante CE<sup>[50]</sup>. Por otro lado, los procedimientos de preconcentración en línea se basan fundamentalmente en las denominadas técnicas de *sample stacking* (explicadas más adelante en esta misma sección). La mejora de sensibilidad que se obtiene con estos últimos métodos depende, en general, de la naturaleza de los analitos y de la matriz en la que se encuentran disueltos, así como de las condiciones de separación empleadas.

Un método de concentración en línea con el que se logra concentrar la muestra en el interior del capilar por mecanismos cromatográficos es la extracción en fase sólida (SPE *on-line*)<sup>[51-52]</sup>. La fase sólida (desde octadecilsilano (C18) hasta inmunoabsorbentes) puede ser incorporada en una pequeña porción del extremo inicial del capilar o como una fase estacionaria hidrófoba unida a su pared interna. Sin embargo, la poca cantidad de fase que se puede incorporar a capilares de tan pequeño diámetro impone límites al factor de enriquecimiento de los analitos, que en el mejor de los casos llega a 250. Otras desventajas se derivan de la imposibilidad de introducir la muestra directamente, sin algún paso previo de limpieza, debido al riesgo de bloquear el sistema, y de la escasa disponibilidad de estos capilares, lo que aumenta su coste.

Por otra parte, para realizar la preconcentración *on-column* y mejorar así los límites de detección (*limits of detection*, LOD) de la técnica CE, también se han utilizado diversas técnicas basadas en fenómenos electroforéticos, entre las que se encuentran la isotacoforesis y las técnicas de inyección con campo amplificado o *sample stacking*, que son las modalidades más empleadas en CZE. La isotacoforesis es en sí misma un modo de operación de electroforesis capilar, y ya ha sido descrito anteriormente (ver sección 1.1.4 del presente capítulo).

El término *stacking* fue propuesto por primera vez por Ornstein en 1964<sup>[53]</sup>. Actualmente, este término hace referencia al estrechamiento de las bandas electroforéticas (de forma que se produce una concentración de la muestra) como consecuencia del propio proceso electroforético. El fenómeno de *stacking* se conoce casi desde el nacimiento de la electroforesis clásica<sup>[53-55]</sup>, pero no fue hasta 1979 cuando Mikkers y col.<sup>[14]</sup> lo introdujeron en CZE para la concentración de analitos con carga. Desde entonces, se han desarrollado diversas modalidades para la concentración *on-column* de los analitos, tanto cargados como neutros, de la muestra mediante *sample stacking*, tal y como muestran algunos artículos de revisión (*reviews*)<sup>[56-64]</sup>. Estos métodos focalizan y preconcentran los analitos aprovechando diferentes propiedades, tales como diferencias de conductividad, pH, fuerza iónica, viscosidad, etc., entre el tampón de separación y la matriz de la muestra<sup>[65]</sup>.

Las técnicas de inyección para la concentración de muestra con campo amplificado (*field-amplified sample stacking*, FASS) se basan en el hecho de que la velocidad electroforética de los analitos depende directamente de la fuerza del campo eléctrico. Cuando los analitos se disuelven e inyectan en una matriz de muestra de menor conductividad eléctrica que la disolución del electrolito, ocurre un fenómeno de concentración o *stacking* de los mismos. Así, al aplicar voltaje, la intensidad del campo eléctrico en el medio poco conductivo de la zona de muestra es mayor que en la zona del electrolito, y los analitos migrarán rápidamente hasta la interfase entre las dos zonas de diferente conductividad, a una velocidad proporcional a la relación de conductividades entre ambas. Una vez que todos los analitos hayan alcanzado la interfase, donde el campo eléctrico es menor, migrarán más lentamente consiguiéndose así una contracción de la zona de muestra.

## 1. ELECTROFORESIS CAPILAR

---

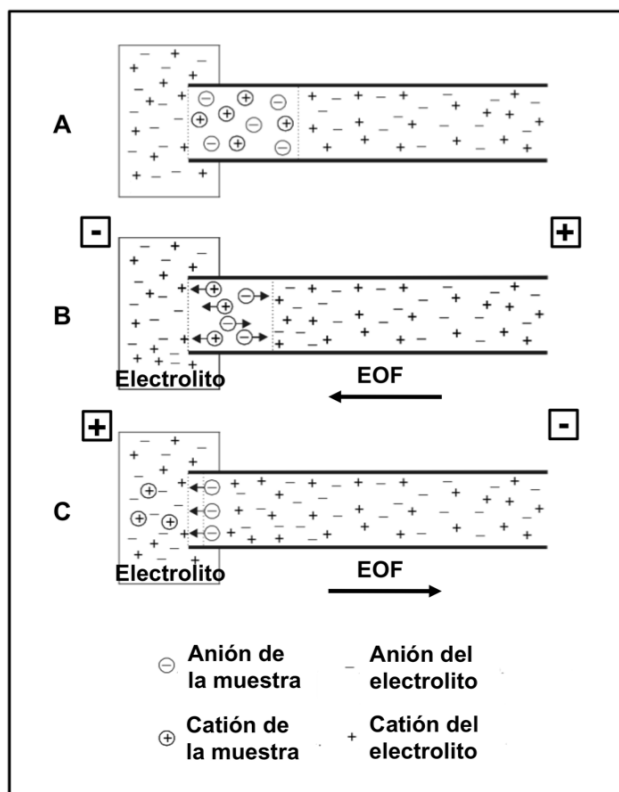
Normalmente, las muestras se diluyen en agua o en tampón diluido, y pueden ser inyectadas hidrodinámica o electrocinéticamente. Cuando el flujo electroosmótico y los analitos migran en el mismo sentido, la eficacia del *stacking* disminuye en la medida que el EOF sea mayor: la eficacia óptima será alcanzada cuando los analitos y el flujo electroosmótico migren en sentidos contrarios y la velocidad del analito sea mayor que la del EOF. Con este método de *stacking* en modo normal se logra aumentar la sensibilidad en más de diez veces.

Chien y col.<sup>[51]</sup> demostraron que el factor de enriquecimiento de la muestra puede beneficiarse del flujo electroosmótico. Su idea consiste en eliminar la zona de matriz durante o después de la etapa de enriquecimiento, pero antes de empezar la separación. Esto se puede llevar a cabo bombeando hacia fuera la zona de matriz mediante la acción del EOF. Esta técnica se conoce como inyección de grandes volúmenes para la concentración de muestra con campo amplificado y eliminación de matriz (LVSS).

En la figura II.1.8 se muestra el procedimiento de LVSS que tiene lugar para los analitos aniónicos. En primer lugar, se inyecta hidrodinámicamente un volumen de muestra relativamente grande (figura II.1.8.A), y al aplicar voltaje con polaridad invertida, la matriz de la muestra es forzada por el EOF a salir de capilar. Los analitos aniónicos migran hacia la zona altamente conductiva del electrolito mientras que el EOF lo hace en sentido opuesto (figura II.1.8.B).

Tras la inyección, y antes de aplicar el voltaje para la separación, los componentes de la muestra estarán distribuidos en un segmento del capilar relativamente amplio donde, debido a la dilución, la resistencia eléctrica es mucho mayor que en la zona del electrolito. Una vez que se aplica el voltaje para la separación, el campo eléctrico es más intenso en la zona de la muestra, lo que hace que los analitos migren en este segmento a una velocidad considerablemente mayor. Cuando los analitos alcanzan la región del electrolito experimentan un campo menos intenso y migran más lentamente, quedando concentrados en una zona mucho más pequeña que el segmento original de muestra.

La polaridad invertida se mantiene hasta que la corriente alcance un nivel de aproximadamente del 95% de su valor normal, momento en el cual debe haberse eliminado la mayor parte de la matriz sin que los analitos hayan sido expulsados del capilar. De acuerdo con Chien y col., para evitar la pérdida de analitos en esta etapa, la velocidad del EOF tiene que ser menor que la del analito de menor movilidad<sup>[44]</sup>. Una vez que el capilar se ha llenado nuevamente con el electrolito, y estando el analito concentrado en una banda estrecha en el extremo inicial del capilar, tiene lugar la separación electroforética en polaridad normal (figura II.1.8.C).



**Figura II.1.8.** Esquema de la técnica LVSS para la concentración de especies aniónicas: (A) inyección de la muestra, (B) al invertir la polaridad el EOF expulsa a la matriz fuera del capilar, y (C) se inicia la separación en polaridad normal<sup>[51]</sup>.

Desde el punto de vista práctico y económico, la inyección con campo amplificado es la mejor variante de concentración de los analitos en el propio capilar. El proceso puede efectuarse en cualquier aparato de los disponibles en el ámbito comercial, utilizando un capilar de sílice fundida sin requerimientos especiales. La principal ventaja es que, sin modificar el instrumento, la inyección de grandes volúmenes puede conducir a factores de enriquecimiento de muestras de más de 500, lo que posibilita la determinación de analitos a nivel de sub-ppb ( $\text{sub-}\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Otro aspecto favorable es que durante el proceso de concentración es posible eliminar selectivamente a la mayoría de las interferencias que migran antes que los analitos de interés.

#### 1.4. ELECTROFORESIS CAPILAR EN MEDIO NO ACUOSO (NACE)

La gran mayoría de las separaciones mediante electroforesis capilar han sido realizadas en medio acuoso, de tal forma que su aplicación queda limitada a aquellas

## 1. ELECTROFORESIS CAPILAR

---

sustancias solubles y estables en agua. Esto también significa que las posibilidades de variar las propiedades del medio en el que ocurre la electroforesis estarán condicionadas por los parámetros físico-químicos del agua.

Desde los estudios de Hayek en 1951 sobre la movilidad de partículas de carbón en keroseno<sup>[66]</sup>, los disolventes orgánicos han sido utilizados en la electroforesis convencional, tanto como modificadores para mejorar la solubilidad de solutos hidrófobos, y para incrementar la selectividad y la resolución del sistema, así como para controlar el EOF y alterar la movilidad de los analitos. La adición de disolventes orgánicos al electrolito ha sido estudiada tanto en CZE como en MEKC<sup>[67]</sup>, pero la concentración del modificador orgánico raramente sobrepasaba el 40%.

Los primeros métodos de NACE, basados en la modalidad CIP, fueron introducidos en los años 1970s<sup>[68-69]</sup> y 1980s<sup>[70-71]</sup>. En estos casos, los primeros disolventes usados fueron metanol (MeOH)<sup>[68-70]</sup> y acetonitrilo (AcN)<sup>[71]</sup>. En 1984, Walbroehl y Jorgenson<sup>[72]</sup> publicaron la primera separación realizada mediante CZE utilizando un electrolito no acuoso en AcN. En los últimos años, el uso de disolvente orgánico ha sido una alternativa a la electroforesis capilar convencional en medio acuoso y a la isotacoforesis<sup>[73-75]</sup> que se ha extendido rápidamente<sup>[74,76-93]</sup>.

La NACE se basa en la utilización de una disolución tampón o medio electrolítico (*background electrolyte*, BGE) preparado en disolventes orgánicos puros o mezclas de los mismos<sup>[94]</sup>. El gran desafío en el desarrollo de una separación mediante NACE es la selección y optimización de un BGE adecuado para los compuestos de interés, dado que su composición determina la movilidad electroforética de los analitos iónicos, por ejemplo, debido a interacciones con el disolvente o a interacciones ion-ion<sup>[91,95]</sup>.

Como la selectividad en la CZE se basa en las diferencias en la carga efectiva y el radio hidrodinámico de los analitos, para que el sistema sea selectivo, el disolvente deberá ser capaz de solvatar a las especies cargadas. Por lo tanto, la movilidad electroforética estará condicionada por el grado en que el disolvente orgánico influya sobre el equilibrio de formación del ion solvatado (analito). En la preparación de los electrolitos será preferible utilizar disolventes con altas constantes dieléctricas, capaces de ceder o aceptar protones, esto es, disolventes próticos<sup>[96]</sup>.

Muchas propiedades de los analitos pueden cambiar en medio no acuoso. Así, dependiendo del disolvente, el  $pK_a$  del soluto puede variar dramáticamente y la carga real del analito dependerá de la forma en que las propiedades protolíticas del disolvente afecten su equilibrio ácido-base y constante de ionización<sup>[73,97]</sup>. Los valores de  $pK_a$  son más altos en la mayoría de los disolventes orgánicos utilizados en NACE, en comparación con el medio acuoso<sup>[91,98]</sup>. También ha de tenerse en cuenta que la movilidad electroforética está directamente relacionada con el radio del ion solvatado, el cual será diferente para cada disolvente.

El disolvente orgánico altera la composición y aumenta la viscosidad de la doble capa eléctrica en la pared del capilar y alrededor del ion del analito, además de

aumentar los valores de  $pK_a$  de los grupos silanol de la pared, todo lo cual afecta el potencial zeta  $\zeta$ , y con ello a la movilidad del analito y la eficacia del sistema. La migración electroforética de los solutos se ve influenciada por el efecto causado por el disolvente sobre, por una parte, la movilidad real del soluto debida a cambios en el tamaño de las partículas solvatadas y en la viscosidad del medio, y, por otra parte, las propiedades ácido-base del soluto, expresadas por su valor de  $pK_a$ , lo cual determina la movilidad efectiva a un pH específico<sup>[95,99]</sup>.

Jansson y col. demostraron que la eficacia por unidad de tiempo está determinada por el valor  $\varepsilon^2/\eta$  del electrolito<sup>[25]</sup>. Según la siguiente ecuación, los disolventes con alto cociente  $\varepsilon^2/\eta$  pueden proporcionar la máxima eficacia:

$$\frac{N}{t} \propto \frac{r}{k \cdot T \cdot \eta} \left( 2 \cdot \zeta_{\text{ion}} - 3 \cdot \zeta_{\text{pared}} \right)^2 \left( \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot E \right)^2 \quad (22)$$

donde  $r$  es el radio de Stokes del analito,  $k$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura,  $\varepsilon_0$  la permitividad del vacío,  $\varepsilon_r$  es la constante dieléctrica relativa del electrolito, y  $E$  es el campo eléctrico.

Aunque la ecuación (22) sólo es válida cuando la difusión es la única causa del ensanchamiento de bandas, deja claro que la constante dieléctrica del disolvente, el campo eléctrico aplicado y el potencial zeta  $\zeta$  tienen una fuerte influencia en la separación.

Hay que destacar también que los electrolitos no acuosos normalmente generan corrientes eléctricas más bajas que los medios acuosos de igual fuerza iónica, reduciéndose así los efectos adversos debidos al calentamiento Joule. Esto permite aplicar campos eléctricos elevados (voltajes altos) en capilares de pequeña longitud, conduciendo a análisis más rápidos y/o una mejora en la eficacia de pico<sup>[100]</sup>. Además, en general, los disolventes orgánicos son totalmente compatibles (en ocasiones incluso más apropiados que el agua) con la mayoría de los detectores empleados en CE, tales como UV, fluorescencia y LIF, electroquímico y de MS<sup>[91]</sup>.

Las principales ventajas de la NACE son<sup>[91,101]</sup>:

- ✓ La separación selectiva por el uso de un disolvente orgánico. La selectividad se puede alterar fácilmente cambiando el disolvente orgánico o usando mezclas de disolventes, y empleando sales volátiles como electrolito<sup>[67]</sup>.
- ✓ Los análisis de compuestos hidrofóbicos son más fáciles en medio orgánico, debido a su escasa solubilidad en medio acuoso.
- ✓ La preparación de la muestra se puede simplificar ya que, los extractos orgánicos obtenidos tras el pretratamiento de muestra, se pueden inyectar directamente en el sistema electroforético.

## 1. ELECTROFORESIS CAPILAR

- ✓ La relativamente baja corriente generada, combinada con la volatilidad de los disolventes orgánicos utilizados, conducen a una mayor estabilidad del *electrospray* en CE-MS.

Teniendo en cuenta que las propiedades físicas y químicas de los disolventes orgánicos varían en un amplio rango, se supone que sus propiedades electroforéticas difieran de uno a otro y respecto al agua. Esto introduce una mayor flexibilidad en la optimización de las separaciones: se dispondrá de un amplio rango de constantes dieléctricas, polaridades, densidades, viscosidades y propiedades ácido-base, haciendo posible, en muchos casos, separar sustancias que en medio acuoso tengan movilidades electroforéticas similares (compuestos con relaciones  $q/r$ ,  $pK_a$  y/o estructuras similares entre sí). En la tabla II.1.2 se resumen algunas propiedades características de los disolventes más utilizados en electroforesis capilar.

**Tabla II.1.2:** Propiedades físico-químicas a 25 °C de los disolventes más comunes usados en electroforesis capilar<sup>[13,91]</sup>.

Disolvente	$\eta$ (mPa·s)	$\epsilon$	$pK_{\text{auto}}$	$\mu$ (D)	Categoría	$T_{\text{eb}}$ (°C)	$\lambda$ (nm)
Agua	0.8903	78.36	14.00	1.85	Anfiprótico	100.0	190
MeOH	0.551	32.66	16.91	2.87	Anfiprótico	64.5	205
Etanol	1.083	24.55	19.19	1.66	Anfiprótico	78.2	210
1-propanol	1.943	20.45	19.40	3.09	Anfiprótico	97.1	210
2-propanol	2.044	19.92	21.08	1.66	Anfiprótico	82.2	205
1-butanol	2.571	17.51	20.89	1.75	Anfiprótico	117.6	215
AcN	0.341	35.94	32.20	3.92	Aprótico	81.6	190
Formamida	3.302	109.5	16.80	3.37	Anf.-básico	210.5	---
NMF	1.650	182.4	10.74	3.86	Anf.-básico	199.5	---
DMF	0.802	36.71	23.10	3.82	Anf.-básico	153.0	268
DMA	0.780	37.8	24.0	3.72	Anf.-básico	166	---
DMSO	1.991	46.45	31.80	4.06	Aprótico	189	268

MeOH: metanol. AcN: acetonitrilo. NMF: N-metilformamida. DMF: N,N-dimetilformamida. DMA: N,N-dimetilacetamida. DMSO: dimetilsulfóxido.  $\eta$ : viscosidad dinámica.  $\epsilon$ : constante dieléctrica.  $K_{\text{auto}}$ : constante de autoprotólisis.  $\mu$ : momento dipolar.  $T_{\text{eb}}$ : temperatura de ebullición.  $\lambda$ : longitud de onda.

Las propiedades únicas de los disolventes orgánicos en comparación con el agua juegan un papel fundamental en el procedimiento de separación. Los criterios a tener en cuenta al seleccionar un disolvente serán<sup>[88,91,96,100]</sup>:

1. Capacidad de disolución de todos los componentes del sistema, para mantener estable la corriente eléctrica entre los electrodos y evitar la precipitación de cristales del electrolito que puedan bloquear el capilar.
2. Comportamiento protolítico. La variedad en los valores de las constantes de autoprotólisis ( $K_{\text{auto}}$ ) de los diferentes disolventes permite que el

intervalo operacional sea aquí más amplio que cuando se usan electrolitos acuosos.

3. Constante dieléctrica y suficiente permitividad relativa para originar un movimiento electroforético normal en medios poco conductivos. La permitividad relativa se relaciona con la fuerza de las interacciones entre los iones y el disolvente<sup>[82]</sup>.
4. Baja viscosidad. La viscosidad dinámica describe la resistencia de un disolvente al flujo laminar, y es dependiente de la temperatura<sup>[82]</sup>.
5. Baja volatilidad, pues los disolventes orgánicos con baja temperatura de ebullición pueden evaporarse debido al calentamiento por efecto Joule, lo que se traduce en una caída brusca del nivel de corriente por la formación de burbujas en el interior del capilar.
6. Compatible con las demandas instrumentales, ya que pueden provocar inconvenientes en la detección, pues generalmente los disolventes orgánicos absorben luz en la región ultravioleta (UV). Debe seleccionarse correctamente la longitud de onda, y el disolvente orgánico deberá ser transparente a la radiación UV a esa longitud de onda.
7. Estabilidad química, alta pureza, disponibilidad, y bajo coste.

En NACE pueden emplearse tanto disolventes anfipróticos como apróticos. Los alcoholes (MeOH, etanol, propanol, butanol, etc.) son disolventes hidrófilos anfipróticos, con propiedades ácidas (protogénicas) y básicas (protófilicas)<sup>[85]</sup>. En cambio, formamida, NMF, DMF y DMA son disolventes anfipróticos de carácter básico, por lo que incrementan la acidez de los solutos<sup>[102]</sup>. Por otro lado, el AcN y el DMSO representan una clase de disolventes inertes, apróticos<sup>[85]</sup>.

El metanol<sup>[95,101-110]</sup> y el acetonitrilo<sup>[104-106,109,111-116]</sup>, que fueron los primeros disolventes orgánicos empleados en NACE, tanto puros como en mezclas<sup>[73,117]</sup>, siguen siendo los más usados en la actualidad. También se han empleado como disolventes de BGE, el etanol<sup>[108,110,114,116]</sup>, el propanol<sup>[108,114,116]</sup>, el butanol<sup>[108]</sup>, la formamida<sup>[100,118]</sup> y la NMF<sup>[102,107]</sup>, y la DMF<sup>[107,116]</sup>, entre otros. El uso de mezclas de diferentes disolventes es ventajoso dada la posibilidad de influir en las propiedades del BGE, tales como alta viscosidad o bajo poder de ionización, modificándolas con la adición de un segundo disolvente adecuado<sup>[117]</sup>. En ocasiones, estos disolventes se acompañan de ácidos y sales, como por ejemplo, el ácido acético y el acetato amónico<sup>[82,117]</sup>, para incrementar la solubilidad de los analitos en el medio. Como sales de electrolito suelen utilizarse el tetraborato sódico, el acetato amónico<sup>[82,106,111-115,119]</sup>, y el tris(hidroximetil)aminometano (Tris)<sup>[101,119]</sup>, para conseguir separaciones más eficientes y reproducibles<sup>[91]</sup>.

Debido a sus propiedades, algunos de estos disolventes resultan más prometedores que otros. Así, el AcN puede actuar como base o como ácido muy débil,

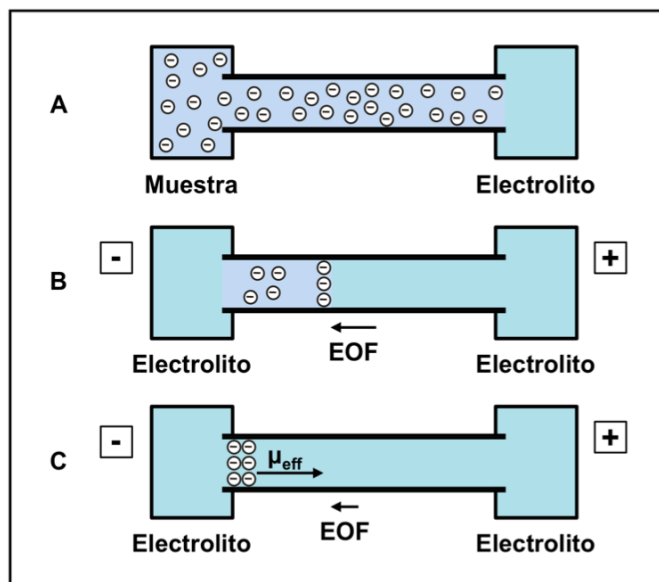
## 1. ELECTROFORESIS CAPILAR

---

resultando un buen disolvente diferenciador para analitos ácidos y básicos. Tiene además una baja viscosidad y excelente transparencia a la radiación UV. Pero, debido a sus características apróticas, no es un disolvente adecuado para la mayoría de las sales que componen las disoluciones electrolíticas, aunque la adición de otros disolventes como el ácido acético puede solucionar los problemas de solubilidad<sup>[73,96]</sup>.

Kim y col.<sup>[101]</sup> han desarrollado un método de NACE para la determinación de compuestos orgánicos débilmente ácidos, entre ellos, el pentaclorofenol y dos tetraclorofenoles, utilizando el MeOH como disolvente de BGE. El MeOH proporciona una adecuada supresión del EOF y un incremento de la movilidad electroforética de estos analitos aniónicos en comparación con el agua, lo que permite la concentración de los aniones mediante la técnica de inyección de grandes volúmenes para la concentración de muestra con campo amplificado y eliminación de matriz utilizando el EOF como bomba impulsora (*large-volume sample stacking using the EOF pump*, LVSEP) empleando polaridad negativa. El proceso de LVSEP aparece representado esquemáticamente en la figura II.1.9. Inicialmente, el capilar se llena con la disolución de muestra mediante inyección hidrodinámica (figura II.1.9.A). A continuación, la matriz de la muestra es expulsada fuera del capilar (por el extremo *inlet* o de entrada de muestra en el capilar) mediante la acción del EOF generado bajo un potencial negativo. La mayor parte del voltaje aplicado se distribuye a través de la zona de muestra de baja conductividad, mientras que el campo eléctrico en la zona de la disolución tampón es muy pequeño. Los analitos de la muestra se concentran en la interfase entre muestra y electrolito, que se va desplazando hacia el extremo *inlet* del capilar (figura II.1.9.B). Cuando el capilar se llena con disolución electrolito de alta conductividad (desde el extremo *outlet*, donde va situado el detector), la magnitud del EOF se reduce debido al incremento en la fuerza iónica del medio en el interior del capilar<sup>[120-121]</sup>. Cuando el EOF y las velocidades electroforéticas de los analitos se equilibran, la dirección de migración de los analitos concentrados cambia hacia el detector, sin que sea necesario un intercambio de polaridad (figura II.1.9.C).

Estos mismos autores también han demostrado que, además del incremento en sensibilidad alcanzado con la concentración *on-column* mediante LVSEP, se puede conseguir una carga adicional de los analitos aniónicos mediante inyección electrocinética durante la etapa de eliminación de la matriz de la muestra en LVSEP, lo que permite lograr factores de concentración entre 300 y 430<sup>[101]</sup>.



**Figura II.1.9.** Esquema del proceso LVSEP para la concentración de especies aniónicas: (A) inyección de la muestra, (B) al aplicar la polaridad inversa, el EOF expulsa a la matriz fuera del capilar mientras los analitos de la muestra se concentran, y (C) se inicia la separación sin intercambio de polaridad<sup>[101]</sup>.

En el Anexo I de esta memoria se ha incluido el capítulo de una enciclopedia<sup>[122]</sup> (fruto de un estudio bibliográfico desarrollado en paralelo a esta tesis doctoral) relacionado con el análisis de fenoles mediante CE, en el cual hay un apartado dedicado a la técnica NACE. También se presenta otra publicación<sup>[123]</sup> en la que se ha desarrollado, en colaboración con otros investigadores, un método NACE para la determinación simultánea de siete carboxilatos (como complejos de cobre), empleando NMF como disolvente de BGE.

## **BIBLIOGRAFÍA**

[1] C. Cruces Blanco, *Electroforesis capilar.*, Monografías Ciencia y Tecnología, Servicio de Publicaciones de la Universidad de Almería, Almería (1998).

[2] P. Camilleri, *Capillary Electrophoresis Theory & Practice.*, CRC Press, Londres (1992).

## 1. ELECTROFORESIS CAPILAR

---

- [3] S. F. Y. Li, *Capillary Electrophoresis Theory & Practice.*, Academic Press, Inc., San Diego (1992).
- [4] F. Foret, L. Krivánková, P. Bocek, *Capillary Electrophoresis.*, VCH Publishers, Inc., Weinheim (1993).
- [5] R. Kuhn, S. Hoffstetter-Kuhn, *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice.*, Springer-Verlag, Berlín (1993).
- [6] R. Weinberger, *Practical Capillary Electrophoresis.*, Academic Press, Inc., San Diego (1993).
- [7] D. A. Skoog, J. J. Leary, *Análisis instrumental.*, 4ª edición, McGraw-Hill (1994).
- [8] K. D. Altria, *Capillary Electrophoresis Guidebook.*, Humana Press, New Jersey (1995).
- [9] J. P. Landers, *Handbook of capillary electrophoresis.*, CRC Press, Boca Ratón (1997).
- [10] M. G. Khaledi, *High Performance Capillary Electrophoresis. Theory, Techniques, and Applications.*, Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, Inc., USA (1998).
- [11] D. N. Heigger, *High Performance Capillary Electrophoresis. An Introduction.*, Agilent Technologies (2000).
- [12] R. Cela, R. A. Lorenzo, M. C. Casais, *Técnicas de separación en Química Analítica.*, Biblioteca de químicas, Editorial Síntesis, Madrid (2002).
- [13] M. L. Marina, A. Ríos, M. Valcárcel (eds.), *Analysis and detection by capillary electrophoresis.*, en: D. Barceló (ed.) Wilson & Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry, vol. XLV, Elsevier, Amsterdam (2005).
- [14] F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts, Th. P. E. M. Verheggen, *J. Chromatogr.* 169 (1979) 1-10.
- [15] F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts, Th. P. E. M. Verheggen, *J. Chromatogr.* 169 (1979) 11-20.
- [16] J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1298-1302.
- [17] J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *Clin. Chem.* 27 (1981) 1551-1553.
- [18] J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *J. High Resolut. Chromatogr. Commun.* 4 (1981) 230-231.
- [19] R. A. Robinson, R. H. Stokes, *Electrolyte Solutions.*, Butterworths, London (1959), p. 124.
- [20] M. Spiro, A. K. Convington, T. Dickinson, *Physical Chemistry of Organic Solvent Systems.*, Ed. Plenum Press, London (1973), p. 643.
- [21] W. J. Lambert, D. L. Middleton, *Anal. Chem.* 62 (1990) 1585-1587.
- [22] S. M. Masselter, A. J. Zemann, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1047-1053.

- [23] D. N. Heigger, *High Performance Capillary Electrophoresis. An Introduction.*, Hewlett-Packard (1992).
- [24] J. Horvath, V. Dolník, *Electrophoresis* 22 (2001) 644-655.
- [25] M. Jansson, J. Roeraade, *Chromatographia* 40 (1995) 163-169.
- [26] Y. He, H. K. Lee, *J. Chromatogr. A* 793 (1998) 331-340.
- [27] N. J. Reinhoud, U. R. Tjaden, J. Van der Greef, *J. Chromatogr.* 641 (1993) 155-162.
- [28] A. De Rossi, C. Desiderio, *Electrophoresis* 23 (2002) 3410-3417.
- [29] K. Altria, T. Kelly, B. Clark, *LC-GC International* July (1996) 408-413.
- [30] D. N. Heiger, P. Kaltenbach, H.-J. P. Sievert, *Electrophoresis* 15 (1994) 1234-1237.
- [31] O. H. J. Szolar, R. S. Brown, J. H. T. Luong, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3004-3010.
- [32] C. Yan, R. Dadoo, H. Zhao, R. N. Zare, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2026-2029.
- [33] S. Brown, J. H. T. Luong, O. H. J. Szolar, A. Halasz, J. Hawari, *Anal. Chem.* 68 (1996) 287-292.
- [34] D. K. Hansen, S. M. Lunte, *J. Chromatogr. A* 781 (1997) 81-89.
- [35] C. E. MacTaylor, A. G. Ewing, *Electrophoresis* 18 (1997) 2279-2290.
- [36] C. Horstkotter, S. Kober, H. Spahn-Langguth, E. Mutschler, G. Blaschke, *J. Chromatogr. B* 769 (2002) 107-117.
- [37] D. Martínez, F. Borrull, M. Calull, *J. Chromatogr. A* 788 (1997) 185-193.
- [38] S. S. Kannamkumarath, K. Wrobel, K. Wrobel, J. B'Hymer, J. A. Caruso, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 245-266.
- [39] S. L. Nilsson, C. Andersson, N. J. R. Sjöberg, D. Bylund, P. Petersson, M. Jörntén-Karlsson, K. E. Markides, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 2267-2272.
- [40] Y. Tanaka, K. Otsuka, S. Terabe, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2003) 1889-1895.
- [41] J. Hernández-Borges, C. Neusüß, A. Cifuentes, M. Pelzing, *Electrophoresis* 25 (2004) 2257-2281.
- [42] G. Álvarez-Llamas, M. R. Fernández de la Campa, A. Sanz-Medel, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 28-36.
- [43] P. Pantucková, P. Gebauer, P. Bocek, L. Krivánková, *Electrophoresis* 30 (2009) 203-214.
- [44] M. Albin, P. D. Grossman, S. E. Moring, *Anal. Chem.* 65 (1993) 489A-497A.
- [45] J. R. Chervet, R. E. J. Van Soest, M. Ursem, *J. Chromatogr.* 543 (1991) 439-449.
- [46] S. E. Morin, R. T. Reel, R. E. J. van Soest, *Anal. Chem.* 65 (1993) 3454-3459.
- [47] G. Hempel, *Electrophoresis* 21 (2000) 691-698.

## 1. ELECTROFORESIS CAPILAR

---

- [48] E. Dabek-Zlotorzunska, R. Aranda-Rodríguez, K. Keppel-Jones, *Electrophoresis* 22 (2001) 4262-4280.
- [49] B. M. Simonet, A. Ríos, M. Valcárcel, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 605-614.
- [50] D. Martínez, M. J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 65-89.
- [51] R. L. Chien, D. S. Burgi, *Anal. Chem.* 64 (1992) 489A-496A.
- [52] P. Puig, F. W. A. Tempels, G. W. Somsen, G. J. de Jong, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, *Electrophoresis* 29 (2008) 1339-1346.
- [53] L. Ornstein, L., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121 (1964) 321-349.
- [54] H. Hanglund, A. Tiselius, *Acta Chem. Scand.* 4 (1950) 957-962.
- [55] B. J. Davis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121 (1964) 404-412.
- [56] D. M. Osbourn, D. J. Weiss, C. E. Lunte, *Electrophoresis* 21 (2000) 2768-2779.
- [57] J. P. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 109-135.
- [58] Z. K. Shihabi, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 107-117.
- [59] R. L. Chien, *Electrophoresis* 24 (2003) 486-497.
- [60] J. B. Kim, S. Terabe, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2003) 1625-1643.
- [61] Z. Malá, L. Krivánková, P. Gebauer, P. Bocek, *Electrophoresis* 28 (2007) 243-253.
- [62] J. Intaraprasert, P. J. Marriott, *Methods Mol. Biol.* 384 (2008) 661-701.
- [63] S. L. Simpson Jr., J. P. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 504-541.
- [64] Z. Malá, A. Slampová, P. Gebauer, P. Bocek, *Electrophoresis* 30 (2009) 215-229.
- [65] P. Britz-McKibbin, D. Y. Chen, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1242-1252.
- [66] M. Hayek, *J. Phys. Colloid Chem.* 55 (1951) 1527-1533.
- [67] I. Bjørnsdottir, S. H. Hansen, *J. Chromatogr. A* 711 (1995) 313-322.
- [68] J. L. Beckers, F. M. Everaerts, *J. Chromatogr.* 51 (1970) 339-342.
- [69] J. L. Beckers, F. M. Everaerts, *J. Chromatogr.* 68 (1972) 207-230.
- [70] J. C. Reijenga, H. J. L. A. Slaats, F. M. Everaerts, *J. Chromatogr.* 267 (1983) 85-89.
- [71] H. Yoshida, Y. Hirama, *J. Chromatogr.* 298 (1984) 243-251.
- [72] Y. Walbroehl, J. Jorgenson, *J. Chromatogr.* 315 (1984) 135-143.
- [73] S. Morales, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 846 (1999) 401-411.
- [74] M.-L. Riekkola, M. Jussila, S. P. Porras, I. E. Valkó, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 155-170.
- [75] C. W. Huie, *Electrophoresis* 24 (2003) 1508-1529.
- [76] I. Bjørnsdottir, J. Tjornelund, S. H. Hansen, *Electrophoresis* 19 (1996) 2179-2186.

- [77] F. Steiner, M. Hassel, *Electrophoresis* 21 (2000) 3994-4016.
- [78] S. Palonen, M. Jussila, S. P. Porras, T. Hyötyläinen, M.-L. Riekkola, *J. Chromatogr. A* 916 (2001) 89-99.
- [79] S. P. Porras, M.-L. Riekkola, E. Kenndler, *Electrophoresis* 22 (2001) 3798-3804.
- [80] M. Grob, F. Steiner, *Electrophoresis* 23 (2002) 1853-1861.
- [81] F. M. Matysik, *Electrophoresis* 23 (2002) 400-407.
- [82] M.-L. Riekkola, *Electrophoresis* 23 (2002) 3865-3883.
- [83] Z. K. Shihabi, *Electrophoresis* 23 (2002) 1628-1632.
- [84] J. L. Beckers, M. T. Ackermans, P. Bocek, *Electrophoresis* 24 (2003) 1544-1552.
- [85] M. Fillet, A.-C. Servais, J. Crommen, *Electrophoresis* 24 (2003) 1499-1507.
- [86] J. Jang, Y. M. Koo, D. S. Chung, *J. Capill. Electrophor. Microchip Technol.* 8 (2003) 19-24.
- [87] J. Kruaysawat, P. J. Marriot, J. Hughes, C. Tenerry, *Electrophoresis* 24 (2003) 2180-2187.
- [88] S. P. Porras, M.-L. Riekkola, E. Kenndler, *Electrophoresis* 24 (2003) 1485-1498.
- [89] S. P. Porras, E. Kenndler, *J. Chromatogr. A* 1037 (2004) 455-465.
- [90] S. P. Porras, E. Kenndler, *Electrophoresis* 26 (2005) 3203-3220.
- [91] L. Geiser, J.-L. Veuthey, *Electrophoresis* 28 (2007) 45-57.
- [92] G. K. Scriba, *J. Chromatogr. A* 1159 (2007) 28-41.
- [93] L. Geiser, J. L. Veuthey, *Electrophoresis* 30 (2009) 36-49.
- [94] M. Vaher, M. Koel, M. Kaljurand, *J. Chromatogr. A* 979 (2002) 27-32.
- [95] S. P. Porras, M.-L. Riekkola, E. Kenndler, *Electrophoresis* 23 (2002) 367-374.
- [96] S. H. Hansen, J. Tjoernelund, I. Bjoernsdottier, *Trends Anal. Chem.* 15 (1996) 175-180.
- [97] F. Rived, M. Rosés, E. Bosch, *Anal. Chim. Acta* 374 (1998) 309-324.
- [98] M. D. Cantu, S. Hillebrand, E. Carrilho, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 99-105.
- [99] I. E. Valkó, H. Siren, M.-L. Riekkola, *LC-GC* 15 (1997) 560-567.
- [100] R. S. Sahota, M. G. Khaledi, *Anal. Chem.* 66 (1994) 1141-1146.
- [101] B. Kim, D. S. Chung, *Electrophoresis* 23 (2002) 49-55.
- [102] L. Geiser, S. Cherkaoui, J.-L. Veuthey, *J. Chromatogr. A* 979 (2002) 389-398.
- [103] M. Chiari, E. Kenndler, *J. Chromatogr. A* 716 (1995) 303-309.
- [104] D. Barrón, A. Irlles, J. Barbosa, *J. Chromatogr. A* 871 (2000) 367-380.
- [105] J. L. Miller, D. Shea, M. G. Khaledi, *J. Chromatogr. A* 888 (2000) 251-266.

## 1. ELECTROFORESIS CAPILAR

---

- [106] S. Cherkaoui, J.-L. Veuthey, *Electrophoresis* 23 (2002) 442-448.
- [107] J.-M. Lin, M. Nakagawa, K. Uchiyama, T. Hobo, *Electrophoresis* 23 (2002) 421-425.
- [108] S. Palonen, M. Jussila, S. P. Porras, T. Hyötyläinen, M.-L. Riekkola, *Electrophoresis* 23 (2002) 393-399.
- [109] M. Vaheer, M. Koel, M. Kaljurand, *Electrophoresis* 23 (2002) 426-430.
- [110] S. Palonen, M. Jussila, S. P. Porras, M.-L. Riekkola, *Electrophoresis* 25 (2004) 344-354.
- [111] S. Cherkaoui, J.-L. Veuthey, *J. Chromatogr. A* 874 (2000) 121-129.
- [112] S. J. Carter, X.-F. Li, J. R. Mackey, S. Modi, J. Hanson, N. J. Dovichi, *Electrophoresis* 22 (2001) 2730-2736.
- [113] F. Menzinger, P. Schmitt-Kopplin, M. Frommberger, D. Freitag, A. Kettrup, *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001) 25-34.
- [114] E. F. Hilder, C. W. Klampfl, W. Buchberger, P. R. Haddad, *Electrophoresis* 23 (2002) 414-420.
- [115] J. Rodríguez-Flores, J. J. Berzas Nevado, A. M. Contento Salcedo, M. P. Cabello Díaz, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 175-182.
- [116] M. Vaheer, M. Koel, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 83-88.
- [117] A. Karbaum, T. Jira, *Electrophoresis* 20 (1999) 3396-3401.
- [118] S. P. Porras, E. Kenndler, *Electrophoresis* 25 (2004) 2946-2958.
- [119] B. Kim, M.-S. Chun, S. Shin, D. S. Chung, *Bull. Korean Chem. Soc.* 20 (1999) 1483-1486.
- [120] E. Kenndler, J. C. Reijenga, W. Friedl, *J. Chromatogr. A* 709 (1995) 163-170.
- [121] W.-L. Tseng, M.-M. Hsieh, S.-J. Wang, H.-T. Chang, *J. Chromatogr. A* 894 (2000) 219-230.
- [122] E. Blanco, M. C. Casais, M. C. Mejuto, R. Cela, *Capillary Electrophoresis / Phenols*. En: Colin F. Poole and Ian D. Wilson, (Editors-in-Chief) *Encyclopedia of Separation Science, online update*, Oxford: Elsevier Science Ltd. (2007) p. 1-9.
- [123] P.-L. Laamanen, E. Blanco, R. Cela, R. Matilainen, *J. Chromatogr. A* 1110 (2006) 261-267.

## **CAPÍTULO II.2. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS**

Los materiales orgánicos poliméricos, tales como los plásticos y las fibras sintéticas, son ampliamente utilizados en la industria para la fabricación de diferentes productos, principalmente, equipamiento eléctrico y electrónico, materiales de construcción, espumas de mobiliario y textiles, entre otros. Para reducir la inflamabilidad de estos materiales, suelen emplearse aditivos retardantes de llama que contienen bromo, cloro o fósforo en sus estructuras<sup>[1-3]</sup>, lo que les confiere propiedades ignífugas<sup>[4]</sup>.

Los retardantes de llama (*flame retardants*, FRs) comprenden varios grupos de compuestos químicos de carácter inorgánico y orgánico, siendo más importantes estos últimos, entre los que pueden citarse los ésteres organofosforados con o sin halógenos, y los compuestos orgánicos clorados y bromados, tales como los fenoles y bisfenoles halogenados<sup>[4-5]</sup>. Con su uso se consiguen alcanzar altos niveles de seguridad contra los incendios, lo que reduce los daños materiales causados por los mismos y, mucho más importante, permite salvar muchas vidas humanas. Asimismo, los beneficios medioambientales implican la disminución de la contaminación debida a los incendios<sup>[6-7]</sup>.

Los retardantes de llama bromados (BFRs) son el medio más barato de mejorar la resistencia al fuego de los materiales. Se trata de un grupo de unos 75 compuestos, aunque los más comunes son el tetrabromobisfenol A (*tetrabromobisphenol A*, TBBPA), los difeniléteres polibromados (PBDEs), el hexabromociclododecano (HBCD), y los bifenilos polibromados (PBBs)<sup>[4-5]</sup>. Existen algunas alternativas a ellos, como los compuestos fosforados y metálicos, pero son más costosos y pueden dar problemas en su fabricación<sup>[8]</sup>.

En general, los BFRs son compuestos lipofílicos, aunque relativamente solubles en agua, por lo que pueden encontrarse presentes en el medio ambiente, no sólo en aguas, sino principalmente depositados en materia particulada y sólidos<sup>[5]</sup>. Tras años de empleo masivo, estos compuestos comienzan a plantear serios problemas y amenazas medioambientales, debido a su ubicuidad, su potencial transporte a largas distancias en la atmósfera, y su elevada persistencia, bioacumulación y toxicidad. Además, parece haberse demostrado que estos compuestos ignífugos se transforman en dibenzodioxinas polibromadas (PBDDs) y/o dibenzofuranos polibromados (PBDFs) cuando los materiales poliméricos a los que han sido adicionados se someten a estrés térmico, durante los procesos de combustión o reciclado<sup>[1,9-11]</sup>. Por todo ello, diversos organismos internacionales los han incluido en sus listas de contaminantes prioritarios, sustancias tóxicas y de acción prioritaria, así como en programas de control medioambiental y estudios de evaluación de riesgos para la salud humana y ambiental. De ahí, por tanto, el creciente interés analítico por estos compuestos en los últimos años.

Existen numerosas referencias bibliográficas relacionadas con la determinación de BFRs y su presencia en el medio ambiente, centradas principalmente en los PBDEs<sup>[12-</sup>

## 2. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS

---

<sup>17]</sup>, el TBBPA<sup>[18-19]</sup> y el HBCD<sup>[20-23]</sup>. Sin embargo, se han llevado a cabo muy pocos estudios considerando los bromofenoles<sup>[24-27]</sup>. Por lo tanto, apenas existe información sobre su presencia y distribución medioambiental.

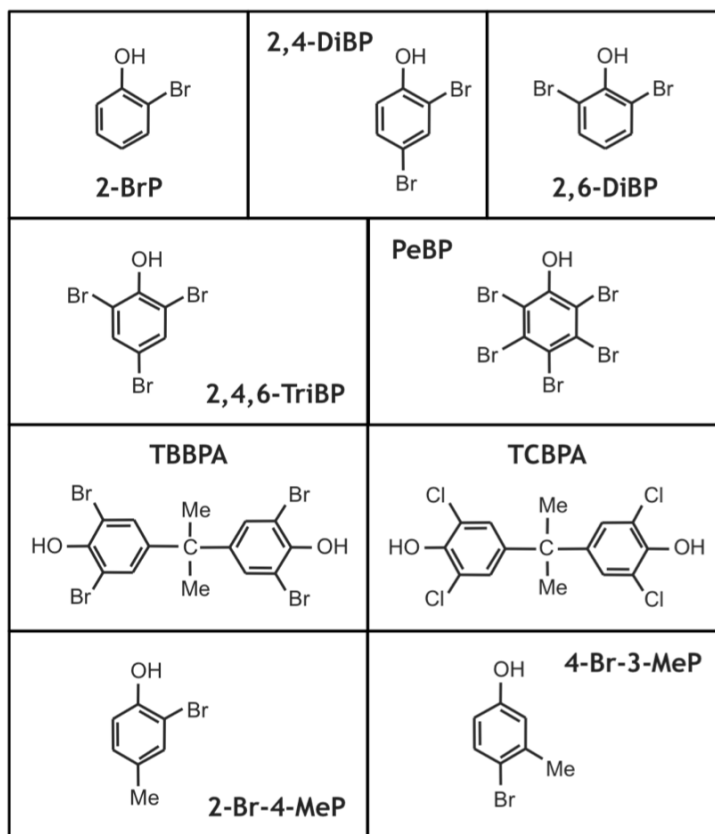
Una parte importante del trabajo de investigación que se recoge en esta memoria se ha centrado en el desarrollo de procedimientos analíticos basados en la determinación mediante electroforesis capilar (CE), tanto en medio acuoso como en medio no acuoso (NACE), para el análisis de un grupo de fenoles y bisfenoles halogenados utilizados como FRs, o relacionados con sus procesos de fabricación y/o degradación (capítulo IV.1.2). Como técnicas de pretratamiento de muestra, se han empleado la extracción en fase sólida (SPE) para las muestras acuosas (capítulo IV.1.3), y la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) para las matrices sólidas (capítulo IV.1.4). A continuación se presenta una revisión bibliográfica como introducción a la problemática del uso de los BFRs y el interés de su estudio, y que resume la metodología analítica más reciente relacionada con los mismos.

### 2.1. DEFINICIÓN, ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

Los retardantes de llama bromados son un grupo de compuestos de diferentes estructura, características físico-químicas, perfil de toxicidad y presencia en el medio ambiente. Contienen entre un 50% y un 95% en peso de bromo, y engloban sustancias químicas como compuestos aromáticos, ciclos alifáticos, derivados fenólicos, y derivados anhídridoftalatos, entre otros<sup>[5,7,28]</sup>. Los más comunes son el TBBPA, los PBDEs, el HBCD, y los PBBs<sup>[4-5]</sup>.

De hecho, el TBBPA es uno de los BFRs de mayor volumen de producción a nivel mundial<sup>[29-30]</sup>. Otros BFRs comercializados son el 2,4-dibromofenol (*2,4-dibromophenol*, 2,4-DiBP), el 2,4,6-tribromofenol (*2,4,6-tribromophenol*, 2,4,6-TriBP), el pentabromofenol (*pentabromophenol*, PeBP) y el tetraclorobisfenol A (*tetrachlorobisphenol A*, TCBPA)<sup>[28,31]</sup>.

En el presente trabajo de investigación, se ha considerado este grupo de fenoles bromados y bisfenoles halogenados, empleados como ignífugos, así como otros compuestos relacionados con sus procesos de degradación y/o fabricación, tales como el 2-bromofenol (*2-bromophenol*, 2-BrP) y el 2,6-dibromofenol (*2,6-dibromophenol*, 2,6-DiBP), o presentes en las mezclas técnicas comerciales, como el 2-bromo-4-metilfenol (*2-bromo-4-methylphenol*, 2-Br-4-MeP) y el 4-bromo-3-metilfenol (*4-bromo-3-methylphenol*, 4-Br-3-MeP)<sup>[32]</sup>. En la figura II.2.1 se muestran las estructuras moleculares de todos estos compuestos.



**Figura II.2.1.** Estructuras moleculares de los compuestos fenólicos y bisfenólicos halogenados estudiados.

Los bromofenoles y los bisfenoles halogenados son compuestos sólidos o líquidos a temperatura ambiente. Poseen un olor muy fuerte y desagradable. Su acidez es mayor que la de los alcoholes de cadena alifática. En la tabla II.2.1 se recogen información y algunas de las principales propiedades o características físico-químicas de los compuestos objeto de estudio.

## 2. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS

**Tabla II.2.1:** Propiedades físico-químicas de los bromofenoles y los bisfenoles halogenados considerados en este estudio.

Compuesto	Abrev.	N° CAS	Fórmula molec.	P <sub>m</sub>	pK <sub>a</sub> <sup>(a)</sup>	log K <sub>ow</sub> <sup>(a,b)</sup>	S (mg·L <sup>-1</sup> ) <sup>(a,b)</sup>
2-Bromofenol	2-BrP	95-56-7	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> BrO	173.01	8.29 <sup>[33]</sup> - 8.44 <sup>[34]</sup>	2.47	2230
2,4-Dibromofenol	2,4-DiBP	615-58-7	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Br <sub>2</sub> O	251.92	7.80 <sup>[34]</sup>	3.22- 3.43	2080
2,6-Dibromofenol	2,6-DiBP	608-33-3	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Br <sub>2</sub> O	251.92	6.60 <sup>[34]</sup>	3.41	119
2,4,6-Tribromofenol	2,4,6-TriBP	118-79-6	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> Br <sub>3</sub> O	330.82	6.10 <sup>[35]</sup> - 6.31 <sup>[36]</sup>	4.13- 4.33	59
Pentabromofenol	PeBP	608-71-9	C <sub>6</sub> HBr <sub>5</sub> O	488.62	4.43	6.10	0.1
Tetrabromo bisfenol A	TBBPA	79-94-7	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	543.90	pK <sub>a1</sub> : 7.50 <sup>[31]</sup> pK <sub>a2</sub> : 8.50 <sup>[31]</sup>	4.54- 7.29	0.08
Tetracloro bisfenol A	TCBPA	79-95-8	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	366.07	pK <sub>a1</sub> : 7.50 <sup>[37]</sup>	5.68	0.70
2-Bromo-4-metilfenol	2-Br-4-MeP	6627-55-0	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> BrO	187.04	8.73	2.93	
4-Bromo-3-metilfenol	4-Br-3-MeP	14472-14-1	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> BrO	187.04	9.50	2.95	1700

K<sub>ow</sub>: Coeficiente de partición octanol-agua; S: solubilidad en agua

<sup>(a)</sup> Datos calculados usando Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software Solaris V4.67 (© 1994-2009 ACD/Labs)<sup>[38]</sup>.

<sup>(b)</sup> Solubilidad a 25 °C. Valores obtenidos de la base de datos de Syracuse Research Corporation (Interactive PhysProp Database)<sup>[39]</sup>.

Debido a las diferentes estructuras y grados de bromación de estos compuestos, sus propiedades físicas y químicas favorecen su distribución en el medio ambiente<sup>[1]</sup>. Para los fenoles con menor grado de bromación, la solubilidad en agua es relativamente alta. En cambio, para los fenoles con mayor número de átomos de bromo y los bisfenoles, tanto la solubilidad como las presiones de vapor son muy bajas<sup>[5]</sup>. En general, presentan unos valores de log K<sub>ow</sub> relativamente altos, por lo que se consideran compuestos lipofílicos<sup>[40]</sup>, son bastante resistentes a la degradación, y como consecuencia, persistentes y contaminantes del medio ambiente<sup>[28]</sup>. Muchos de ellos son fotolábiles, pues sufren reacción fotoquímica en presencia de radiación ultravioleta, lo que complica su análisis<sup>[41]</sup>. En comparación con los retardantes de llama clorados, son más susceptibles de degradación medioambiental debido a la menor fuerza del enlace C-Br con respecto al enlace C-Cl<sup>[5]</sup>.

Dependiendo de su uso, se clasifican en retardantes de llama aditivos o reactivos. Los FRs aditivos sólo están mezclados o disueltos en el polímero, y pueden separarse de los productos a los que han sido aplicados con relativa facilidad. Algunas veces, estos compuestos son volátiles y se liberan del polímero, con lo que sus propiedades retardantes pueden perderse gradualmente, y pueden migrar hacia el medio ambiente fácilmente de forma rápida<sup>[5,8]</sup>. En cambio, los FRs reactivos se encuentran unidos químicamente, por enlace covalente, al polímero. Por ello, en

principio resulta menos probable que se liberen al medio ambiente, a menos que los productos se quemen o se descompongan<sup>[5]</sup>, aunque siempre existe la posibilidad de que parcialmente no hayan polimerizado y puedan ser liberados<sup>[42]</sup>.

Aunque los retardantes de llama halogenados son un grupo muy diverso de compuestos, el mecanismo de inhibición de la combustión es básicamente el mismo para todos ellos. Al aplicar calor, estas sustancias se descomponen antes que la matriz del polímero, evitando la formación de gases inflamables<sup>[8,43]</sup>. Así, en los compuestos ignífugos bromados, la proporción de átomos de bromo del compuesto es la responsable de la actividad inhibidora de la combustión de la molécula<sup>[7]</sup>, pues estos átomos actúan principalmente como sustancias interferentes en el mecanismo radicalario que tiene lugar en la fase gas durante la combustión. Los radicales OH· y H· de alta energía formados durante la combustión son desplazados por los Br· liberados de los retardantes de llama<sup>[8]</sup>. Para que una sustancia actúe como un adecuado retardante de llama debe descomponerse a una temperatura aproximadamente 50° por debajo del polímero<sup>[43]</sup>. La mayoría de los compuestos organobromados poseen estas propiedades térmicas debido a sus enlaces C-Br débiles. En general, los compuestos alifáticos bromados poseen menor estabilidad térmica que los aromáticos. Por eso, los compuestos aromáticos bromados se usan ampliamente como retardantes de llama a nivel mundial.

### 2.2. PRODUCCIÓN Y APLICACIONES

Los retardantes de llama halogenados representan alrededor de un 45% de la producción mundial<sup>[3]</sup>. En un extenso y detallado informe de la Agencia de Protección Ambiental Sueca se han recogido datos acerca del importante mercado de estos compuestos<sup>[18]</sup>. La demanda y producción mundial de retardantes de llama aumentó durante la década de los 90s: el consumo global anual pasó de 610000 toneladas en 1992 a 924000 toneladas en 1996; aproximadamente, se consumieron 150000 y 202000 toneladas de estos compuestos bromados en 1992 y 1996, respectivamente<sup>[4]</sup>, lo que representa el 30% del volumen total de retardantes de llama utilizado<sup>[5]</sup>, y de las que una cuarta parte se destinan a la industria europea. Este incremento en la producción y uso de los retardantes se debe a la creciente utilización de materiales plásticos y fibras sintéticas, y a la introducción de rigurosos requisitos en la seguridad contra los incendios, lo que se ve reflejado en el aumento de los niveles de estas sustancias presentes en el medio ambiente<sup>[5,43]</sup> (ver sección 2.3 del presente capítulo). De hecho, los ignífugos se han convertido en el segundo aditivo de mayor utilización por parte de la industria de los plásticos<sup>[44]</sup>.

El TBBPA es el retardante de llama bromado de mayor volumen de producción, abarcando aproximadamente un 60% del mercado de los BFRs<sup>[45]</sup>. Este compuesto se produce actualmente en Estados Unidos, Israel y Japón, no así en la Unión Europea (*European Union*, EU)<sup>[46-47]</sup>, donde también se está empleando como ignífugo bromado. El proceso de producción industrial consiste en la bromación en sistema cerrado del bisfenol A (*bisphenol A*, BPA) con bromo en presencia de un disolvente como metanol o

## 2. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS

---

un halocarbono, 50% de ácido bromhídrico o monoésteres alquilados en agua<sup>[29]</sup>. Además, el TBBPA puede ser importado a la EU, no sólo en materias primas, sino también en productos parcial o totalmente acabados. Así, se estima que la cantidad de TBBPA importado a la EU es de aproximadamente 40000 Ton/año<sup>[46-47]</sup>.

Los retardantes de llama están presentes normalmente en objetos de uso doméstico. Estos nuevos contaminantes potenciales han sido utilizados durante décadas en la fabricación de una amplia gama de productos de tipo textil (especialmente en textil-hogar), equipamiento eléctrico y electrónico, equipamiento deportivo y recreativo, materiales de construcción, pinturas, polímeros, plásticos, y espumas de mobiliario, entre otros, para mejorar su resistencia al fuego, interfiriendo en la combustión de los materiales poliméricos a los que han sido añadidos<sup>[4-5,8,30,48]</sup>. Su principal aplicación se encuentra en la elaboración de carcasas plásticas de productos electrónicos, como televisores y ordenadores, partes de automóviles, circuitos impresos, componentes eléctricos y cables<sup>[5]</sup>.

La proporción de compuestos ignífugos bromados presentes en los polímeros normalmente se encuentra entre 10 y 30% en peso<sup>[43,48]</sup>. Cada retardante de llama tiene su aplicación específica en los materiales poliméricos. Así, por ejemplo, el 58% del TBBPA suele incorporarse como retardante de llama reactivo, esto es, covalentemente enlazado al polímero<sup>[2]</sup>, en resinas epoxi, policarbonatos, y resinas viniléster, y el 18% como aditivo en polímeros de acrilonitrilo-butadieno-estireno (*acrylonitrile-butadiene-styrene*, ABS) y en poliestireno de alta densidad; el 18% también se utiliza como intermediario en la producción de retardantes de llama aditivos para la fabricación de polímeros termoplásticos (éteres tetrabromobisfenol A, y oligómeros)<sup>[48-49]</sup>. El 2,4,6-TriBP se usa principalmente como intermediario en la producción de aditivos retardantes de llama, tales como éteres alílicos bromados, fenoxietanos, y óxidos fenileno. Asimismo, tanto el 2,4,6-TriBP como el 2,4-DiBP y el PeBP suelen añadirse en resinas epoxi, resinas fenólicas, poliésteres y poliolefinas<sup>[1,31,50-51]</sup>.

### 2.3. DISTRIBUCIÓN Y PRESENCIA EN EL MEDIOAMBIENTE

Un gran número de compuestos organobromados, como los bromofenoles, se encuentran de forma natural en el medio ambiente, y en particular, en el medio acuático<sup>[27]</sup>. Algunos fenoles bromados son producidos por organismos marinos, y de hecho, se han encontrado concentraciones de estos compuestos del orden de  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  en peces, corales, crustáceos, moluscos, gusanos y algas marinas<sup>[52-54]</sup>.

Los retardantes de llama pueden liberarse al medio ambiente durante su producción y su utilización, y desde los productos finales tratados, durante su uso y tras su eliminación, reciclado o deposición<sup>[41]</sup>. Su aplicación es muy diversa, originando diferentes fuentes, rutas de entrada y de transporte, y concentraciones en el medio ambiente. Así, la liberación de los compuestos ignífugos bromados al medio ambiente procede no sólo de las industrias que los utilizan (automoción, electrónica y textil, entre otros) y del consumo de sus productos, sino también de su lenta evaporación

desde materiales calentados en zonas domésticas, del manejo y almacenaje de desechos industriales, de plantas de tratamiento de aguas residuales, de vertederos y de desechos de plantas de reciclaje<sup>[2-3,55]</sup>, y de las incineradoras en forma de partículas<sup>[41]</sup>.

Como consecuencia, y dadas sus diferentes estructuras y grados de bromación, así como sus distintas propiedades físicas y químicas (ver tabla II.2.1), los BFRs son sustancias críticas para el medio ambiente<sup>[1]</sup>. En general, los contaminantes con  $\log K_{ow}$  menor de 4 se disuelven preferentemente en las matrices acuosas, mientras que los más hidrofóbicos (con  $\log K_{ow}$  por encima de 4) tienden a adsorberse a la superficie de la materia particulada en suspensión (*suspended particulate matter*, SPM)<sup>[56]</sup>. Por tanto, cuando estos compuestos se liberan al ambiente se introducen al medio acuático y se adsorben rápidamente a partículas sólidas en suelos, sedimentos y lodos<sup>[5]</sup>. Tienen tendencia a bioacumularse, causando un grave problema medioambiental y repercutiendo así en la cadena alimentaria<sup>[3,28]</sup>. Por tanto, se puede encontrar una gran variedad de estas sustancias en muestras biológicas y medioambientales<sup>[8]</sup>.

Así, el TBBPA, el TCBPA y los fenoles con mayor grado de bromación (2,4,6-TriBP y PeBP) se han encontrado en diversos tipos de matrices biológicas, como tejidos de peces, estrellas de mar, huevos e hígado de pájaros, grasa de cetáceos, suero, leche materna<sup>[3,5,48,57]</sup>.

En cuanto a las muestras medioambientales, estos compuestos (especialmente el TBBPA) han sido investigados en aguas superficiales y residuales<sup>[24-27,58-61]</sup>, suelos<sup>[62-65]</sup>, sedimentos<sup>[42,59-60,66-72]</sup>, y lodos de depuradora<sup>[28,42,67,69-70,72-75]</sup>. También se han analizado en muestras de aire y polvo de las cercanías de plantas de fabricación de BFRs y de los interiores de oficinas computerizadas, plantas de reciclaje, laboratorios y hogares domésticos<sup>[2,48]</sup>, siendo mucho mayores las concentraciones encontradas en los ambientes interiores (hasta  $140 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-3}$  de TBBPA en plantas de reciclado de material electrónico<sup>[76]</sup>,  $520 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  en polvo doméstico<sup>[77]</sup> y  $39.6 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  en polvo de oficina<sup>[64]</sup>) que en los exteriores (normalmente menores de  $1 \text{ pg}\cdot\text{m}^{-3}$  en aire<sup>[48]</sup>). En principio, los niveles de BFRs son mayores en las cercanías de fuentes industriales, aunque también se han detectado hasta  $70 \text{ pg}\cdot\text{m}^{-3}$  en partículas del aire del Ártico<sup>[78]</sup>, lo que demuestra que estos compuestos pueden sufrir diferentes rutas de transporte llegando a áreas remotas, lejos del origen de la contaminación.

No obstante, existe muy poca información sobre la presencia de los fenoles bromados en el medio ambiente. La presencia de compuestos como 2-BrP, 4-BrP, 2,4-DiBP, 2,6-DiBP y 2,4,6-TriBP, se relaciona con los procesos de tratamiento del agua. Su determinación también resulta de interés si consideramos que son los responsables del sabor a plástico o medicinal que presentan las aguas de bebida cloradas<sup>[79]</sup>. En concreto, el umbral de sabor para el 2,6-DiBP se encuentra en  $0.5 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  en agua<sup>[80]</sup>.

Como puede observarse en la tabla II.2.2, el 2,4-DiBP y el 2,6-DiBP sólo se han encontrado en muestras de agua de río de un estuario en Holanda, en puntos cercanos a un puerto, varias ciudades e industrias<sup>[27]</sup>. Asimismo, el 2,4-DiBP y el 2,4,6-TriBP también se han detectado a concentraciones bajas en agua de mar de Alemania<sup>[25]</sup>. El

## 2. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS

PeBP tan sólo se ha encontrado en muestras de agua residual recogidas en España<sup>[26]</sup>, aunque en concentraciones más altas, de hasta 704 ng·L<sup>-1</sup> en influente. En cambio, el TBBPA es el BFR detectado en la mayoría de las muestras analizadas, a concentraciones de hasta 130 ng·L<sup>-1</sup> en aguas residuales y 620 ng·L<sup>-1</sup> en filtrados de vertederos cercanos a zonas industriales de Japón. Esto se corresponde con su uso preferente como ignífugo frente a los bromofenoles en los materiales poliméricos y con su alta persistencia, que provoca que incluso siga detectándose en muestras próximas a vertederos que llevan hasta más de un año clausurados<sup>[58]</sup>.

**Tabla II.2.2:** Concentraciones de bromofenoles y TBBPA encontradas en muestras reales de agua. Las matrices se han ordenado de menor a mayor grado de complejidad.

Tipo de matriz	Procedencia	Concentración detectada (ng·L <sup>-1</sup> )				PeBP	Ref.
		TBBPA	2,4-DiBP	2,6-DiBP	2,4,6-TriBP		
Río (estuario)	Holanda	---	8.3-25	<0.1-1.6	---	---	[27]
Río	España	---	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	[26]
Agua de mar	Alemania	---	2-48	---	n.d.-6	---	[25]
Efluente	España	---	n.d.	n.d.	n.d.	221	[26]
Efluente	Japón	7.7	---	---	---	---	[60]
Filtrado de vertedero tratado	Japón	<LOD-11	---	---	---	---	[58]
Efluente industrial	Italia	4	---	---	---	---	[61]
Influente	España	---	n.d.	n.d.	n.d.	704	[26]
Influente	Japón	130	---	---	---	---	[60]
Filtrado de vertedero sin tratar	Japón	<LOD-620	---	---	---	---	[58]
Filtrado de residuos industriales	Japón	0.3-540	---	---	---	---	[60]

---: no analizado; n.d.: no detectado; <LOD: por debajo del límite de detección

Dado su carácter lipofílico moderado (especialmente de los compuestos más bromados, ver log  $K_{ow}$  en tabla II.2.1), su resistencia a la degradación y su alta persistencia en el medio ambiente, los BFRs presentan mayor tendencia a quedarse adsorbidos a la materia particulada y sólidos. En la siguiente tabla II.2.3 se resumen los datos de concentraciones de TBBPA y TCBPA encontrados en las referencias bibliográficas consultadas relacionadas con el análisis de muestras sólidas medioambientales, tales como suelos, sedimentos y lodos. Hasta el momento, todavía no se ha investigado la presencia de los bromofenoles en este tipo de matrices.

**Tabla II.2.3:** Concentraciones de TBBPA y TCBPA encontradas en muestras sólidas medioambientales. Las matrices se han ordenado de menor a mayor grado de complejidad.

Tipo de matriz	Procedencia	Concentración detectada (ng·g <sup>-1</sup> )		Ref.
		TBBPA	TCBPA	
Suelo	China	25.2	---	[63]
Suelo agrícola	España	0.3	n.d.	[65]
Suelo cercano a vertedero	China	1400-1800	n.d.	[64]
Suelo exterior de planta de producción	China	0.12	---	[62]
Suelo industrial	España	3.4-32.2	n.d.	[65]
Sedimento	Canadá	0.51	n.d.	[72]
Sedimento	Japón	22-140	---	[66]
Sedimento	Reino Unido	2-25	---	[69]
Sedimento	Holanda	0.1-67	---	[69]
Sedimento	Alemania	0.1-6.9	---	[69]
Sedimento	Estados Unidos	0.6-1.84	---	[68]
Sedimento	Noruega	0.04-0.13	---	[71]
Sedimento	Japón	<0.2-1.6	---	[60]
Sedimento cercano a fábrica de plásticos	Suecia	31-270	---	[42]
Sedimento cercano a planta de producción	Reino Unido	9800	---	[69]
Sedimento marino	Japón	5.5	---	[60]
Lodo tratado	Irlanda	192	---	[69]
Lodo de depuradora	Canadá	2.09-28.3	0.14-0.54	[72]
Lodo de depuradora	Canadá	<1-46.2	---	[73]
Lodo de depuradora	Holanda	<6.9-79	---	[69]
Lodo de depuradora	Reino Unido	<3.9-57	---	[69]
Lodo de depuradora	Suecia	<0.3-220	---	[74]
Lodo de depuradora	Suecia	32	---	[75]
Compost y digerido	Suiza	510	---	[81]

---: no analizado; n.d.: no detectado

Teniendo en cuenta su alto log  $K_{ow}$  (ver tabla II.2.1) y su transporte potencial a través de la atmósfera adsorbido a la materia particulada, podría esperarse que los suelos, los sedimentos y los lodos fuesen los principales destinos del TBBPA liberado de diferentes fuentes al medio ambiente. Sin embargo, su presencia en estas matrices va a depender también de su velocidad de degradación, transporte y deposición en las mismas<sup>[48,76]</sup>.

Así, el TBBPA se ha detectado normalmente a bajos niveles de concentración en suelos y sedimentos de países europeos, Japón, Estados Unidos y Canadá, en zonas sin influencia directa de emisiones industriales. No obstante, también se han encontrado altas concentraciones de este compuesto en algunas muestras tomadas en puntos

## 2. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS

---

cercanos a un vertedero en China ( $1.4-1.8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )<sup>[64]</sup>, una fábrica de plásticos de Suecia (hasta  $270 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ )<sup>[42]</sup>, y una planta de producción en Reino Unido ( $9.8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )<sup>[69]</sup>. Algunos de estos autores han comprobado el incremento en la concentración del TBBPA producido en los puntos de muestreo posteriores a la incorporación a los ríos del influente de salida de las fábricas<sup>[42,69]</sup>.

Mientras que el TCBPA sólo ha sido detectado en concentraciones muy bajas en lodos de depuradora procedentes de Canadá<sup>[72]</sup>, los niveles de concentración del TBBPA alcanzan los  $220 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  en lodos analizados en Suecia<sup>[74]</sup>, y hasta  $510 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  en muestras de compost y digerido de Suiza<sup>[81]</sup>. En algún caso, se han observado concentraciones más bajas en lodos de depuradora digeridos que en lodos no tratados, lo que indica que durante su tratamiento tiene lugar la degradación anaerobia del TBBPA<sup>[75]</sup>. Chu y col.<sup>[72]</sup> también han comprobado la debromación del TBBPA en muestras de lodo, tal y como también se había observado que ocurre en sedimentos de estuario<sup>[82]</sup>. Por otro lado, tal y como se utiliza hoy en día, el compost puede contribuir considerablemente a la introducción de contaminantes orgánicos en los suelos<sup>[48]</sup>.

Como ya se ha comentado anteriormente, otro de los problemas ambientales que presentan los BFRs es la eliminación de los productos que los contienen. En este sentido, es importante indicar que algunos compuestos como el TBBPA y los bromofenoles pueden producir otras sustancias químicas tóxicas, durante los procesos de incineración y reciclado de los productos de desecho<sup>[10-11]</sup>, o durante procesos de degradación ambiental. Así, a los posibles riesgos para la salud y el medio ambiente causados durante la producción y utilización de los BFRs se suma la preocupación por la posible formación de PBDDs, PBDFs<sup>[83]</sup> y diferentes bromofenoles<sup>[10-11]</sup>.

### 2.4. EXPOSICIÓN Y TOXICIDAD

En general, existe un conocimiento limitado acerca de la toxicidad y el comportamiento medioambiental de los retardantes de llama bromados<sup>[84]</sup> y sus productos secundarios<sup>[3]</sup>. El impacto y los efectos adversos que causan sobre la salud y el entorno ambiental todavía no se conoce con exactitud<sup>[5]</sup>. Aunque la toxicidad de la mayoría de estos compuestos parece ser pequeña<sup>[29,31]</sup>, en algunos casos se han detectado efectos de toxicidad similares a los bifenilos policlorados (PCBs), dibenzodioxinas policloradas (*polychlorinated dibenzodioxines*, PCDDs) y dibenzofuranos policlorados (*polybrominated dibenzofuranes*, PCDFs)<sup>[5,8,28]</sup>. Además, durante el proceso de fabricación de los polímeros se pueden formar PBDDs y PBDFs, así como durante el uso de estos materiales, en su combustión o reciclado<sup>[1,9-11]</sup>.

Algunos estudios sugieren que los compuestos ignífugos tienen un comportamiento pseudo-estrogénico, y por tanto, diversos organismos de protección ambiental los han incluido como potenciales disruptores endocrinos. Por ejemplo, el 2,4,6-TriBP, el PeBP, el TBBPA y el TCBPA se relacionan estructuralmente con hormonas como el  $17\beta$ -estradiol (E2) y la tirosina<sup>[85-90]</sup>, y se sabe que se enlazan a la transtiretina<sup>[43]</sup>. Así, en sus estructuras moleculares aparece una mitad similar a la de

tirosina, reemplazando los átomos de yodo por bromo o cloro, respectivamente. Por ello, se sospecha su toxicidad en la función tiroidea, y por lo tanto, pueden considerarse como potenciales disruptores endocrinos<sup>[3]</sup>.

## 2.5. LEGISLACIÓN APLICABLE

A pesar de su alta persistencia y de su toxicidad, actualmente no existe una legislación clara y específica acerca de los niveles de concentración permitidos para los bromofenoles y los bisfenoles halogenados en muestras ambientales.

Diversos organismos nacionales e internacionales han establecido unos niveles de concentración recomendados para los compuestos fenólicos en muestras de agua:

- La Directiva 75/440/EEC de la Comunidad Europea relativa a las sustancias peligrosas vertidas al medio acuático establece una concentración máxima admisible de fenoles en aguas superficiales destinadas a consumo entre 1 y 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , dependiendo del tratamiento requerido según su grado de potabilización<sup>[91]</sup>.
- La Directiva 2008/105/EC de la Unión Europea (que es una modificación de la Directiva Marco 2000/60/EC<sup>[92]</sup>) incluye al pentaclorofenol (PeCP) en su lista de sustancias de acción prioritaria en el ámbito de la política de aguas, y establece que el nivel máximo permitido en aguas superficiales no debe superar 1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (o un valor medio de 0.4  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )<sup>[93]</sup>.

Aunque todavía no existen prohibiciones de uso ni restricciones en su producción, parece clara la idea de que los compuestos bromados empleados como retardantes de llama deben ser retirados poco a poco del mercado, y ser sustituidos por otras sustancias. Siguiendo esta línea, diferentes organismos internacionales han comenzado a implementar medidas para la retirada paulatina de los BFRs.

Así, en Europa, el TBBPA ha sido incluido en la cuarta lista de contaminantes prioritarios establecida por el Consejo Europeo en 1993<sup>[94]</sup>. Por otro lado, en 2003, la EU adoptó la Directiva 2002/96/EC para la manipulación de los desechos de equipamiento eléctrico y electrónico (*waste electrical and electronic equipment*, WEEE)<sup>[95]</sup>, que fundamentalmente establece, entre otras disposiciones, un esquema de las actividades de reciclaje y eliminación de estos materiales, y más concretamente, requiere un tratamiento selectivo para los plásticos que contienen BFRs, incluyendo el TBBPA<sup>[48]</sup>. Actualmente, China está preparando una legislación similar a la Directiva 2002/96/EC relativa a WEEE, dado que se está convirtiendo en uno de los mayores receptores de desechos eléctricos y electrónicos<sup>[96]</sup>. Otros países como Japón, Canadá y Australia han comenzado a incluir al TBBPA en sus programas de control medioambiental y estudios de riesgos para la salud humana<sup>[49,97-99]</sup>.

Más adelante, en 2005, la OSPAR (Convenio sobre la protección del medio ambiente marino del nordeste Atlántico, originalmente Comisión Oslo-París), dentro de

## 2. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS

---

sus directrices para el control de la emisión y descarga de sustancias peligrosas al medio marino, ha incluido al TBBPA en su lista de sustancias de acción prioritaria<sup>[100]</sup>. Se ha propuesto como objetivo la evaluación de los riesgos asociados a este compuesto, sugiriendo su sustitución por otras sustancias menos perjudiciales<sup>[101]</sup>.

Recientemente, en la EU se ha implantado una nueva normativa (EC 1907/2006), que concierne el registro, la evaluación, la autorización y la restricción de sustancias químicas (*registration, evaluation, authorisation and restriction of chemical substances*, REACH) y su uso seguro<sup>[102]</sup>. Esta nueva ley, propuesta el 29 de octubre de 2003, ha entrado en vigor el 1 de junio de 2007. Dentro del contexto de REACH, el TBBPA está siendo una de las primeras sustancias a registrar dado su gran volumen de producción<sup>[49]</sup>. Sin embargo, el TBBPA no está incluido en la Directiva Marco del Agua de la EU (*EU Water Framework Directive*)<sup>[103]</sup>, en vigor desde enero de 2007. Por lo tanto, actualmente no existe ningún plan de monitorización que estudie la presencia de este compuesto en el medio acuático europeo.

Por otro lado, algunos compuestos fenólicos bromados como 2,4-DiBP, 2,4,6-TriBP, PeBP y derivados del TBBPA están incluidos en la lista de sustancias tóxicas (*Master Testing List*, MTL) de la agencia americana para la prevención y protección del medio ambiente (*United States Environmental Protection Agency*, USEPA)<sup>[104]</sup>.

Dado que no sólo los BFRs pueden causar efectos negativos, sino que sus productos de degradación como los PBDDs y PBDFs pueden ser incluso más nocivos, en Alemania se han establecido controles de emisión en las incineradoras de residuos municipales, imponiéndose límites a la liberación de dioxinas y furanos bromados<sup>[31]</sup>.

### 2.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS

En los últimos años, la mayor probabilidad de presencia en el medio ambiente de los retardantes de llama bromados o compuestos relacionados con los mismos, tales como los fenoles bromados y los bisfenoles halogenados estudiados en este trabajo de investigación, ha puesto de manifiesto la necesidad de desarrollar nueva metodología analítica para determinar tales contaminantes en todo tipo de muestras medioambientales.

La mayoría de las investigaciones relacionadas con la presencia de los BFRs en el medio ambiente se han centrado en el estudio de los PBDEs<sup>[12-17]</sup>. En cambio, no es tan abundante la bibliografía existente relacionada con la determinación de retardantes halogenados fenólicos y bisfenólicos, a pesar de haberse demostrado que los bromofenoles, el TBBPA y el TCBPA son compuestos relativamente lipofílicos, aunque ligeramente solubles en agua<sup>[40]</sup> (ver tabla II.2.1), lo que favorece su distribución en el medio ambiente. De estos últimos, el TBBPA ha sido, con diferencia, el más estudiado.

Hasta el momento de la realización de este trabajo (hasta 2005), no ha habido un gran interés analítico por los fenoles bromados. Por ello, son escasos los estudios donde se ha desarrollado metodología analítica para la identificación y cuantificación de estos compuestos en muestras medioambientales<sup>[24-27]</sup>, y todos ellos posteriores a los trabajos de esta memoria. Recientemente también se han publicado algunos artículos de revisión (*reviews*) que recopilan la información más relevante acerca de los métodos de análisis desarrollados en los últimos años para el TBBPA<sup>[15,19,22-23,48]</sup> (acompañando normalmente a los PBDEs o al HBCD) en muestras bióticas y abióticas.

A continuación se presenta un resumen de los procedimientos analíticos recientemente optimizados para el análisis de los bromofenoles y bisfenoles halogenados en muestras de agua y sólidas medioambientales, encontrados en la bibliografía consultada. En concreto, se han considerado los métodos empleados en la preparación de las muestras acuosas (aguas y fluidos biológicos), sedimentos y lodos de depuradora de aguas residuales, y las técnicas más habituales de determinación de estos compuestos en todo tipo de matrices. Conviene mencionar aquí de nuevo que la publicación de muchos de estos estudios, especialmente los referentes a bromofenoles en matrices acuosas, son posteriores al trabajo de investigación que se presenta en esta memoria, realizado durante los años 2002-2005 (capítulo IV.1).

### 2.6.1. PROCEDIMIENTOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA. EXTRACCIÓN, CONCENTRACIÓN Y LIMPIEZA.

La preparación de muestra tiene un papel importante en el análisis de retardantes de llama bromados en muestras medioambientales debido a la complejidad de las matrices y a los niveles traza en que se encuentran los analitos (ver sección 2.3 del presente capítulo). En primer lugar, estos compuestos se extraen y se aíslan de la muestra, y el procedimiento empleado en cada caso depende de lo compleja que sea la matriz, utilizándose diferentes métodos según se trate de muestras de aguas, sedimentos o lodos. Tras el aislamiento de los analitos, y teniendo en cuenta que la mayoría de los métodos de extracción no son lo suficientemente selectivos, ni el poder de separación de la técnica analítica suficientemente bueno, normalmente es necesario limpiar y fraccionar el extracto, ya que éste puede contener algunos compuestos interferentes similares a los BFRs, que podrían estar presentes en concentraciones elevadas. Los procedimientos de fraccionamiento son similares para los diferentes tipos de extractos<sup>[5]</sup>. Finalmente, y con el objetivo de alcanzar los límites de detección (LOD) y cuantificación (*limits of quantification*, LOQ) apropiados, los extractos se concentran antes de la determinación final.

Los estudios incluidos en esta memoria se han realizado sobre muestras de aguas superficiales y residuales, sedimentos, y lodos de depuradora, en las que se ha pretendido medir la presencia de bromofenoles, TBBPA y TCBPA. A continuación, se comentan brevemente las características principales de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR), de donde se han muestreado las aguas residuales y los lodos.

## 2. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS

### 2.6.1.1. ESTACIÓN DEPURADORA DE AGUAS RESIDUALES (EDAR): AGUAS RESIDUALES Y LODOS DE DEPURADORA

Las aguas residuales contienen, entre otros, compuestos contaminantes orgánicos que les llegan a través de diversas fuentes, entre ellas, desechos domésticos, productos de excreción humana, vertidos de combustibles, residuos urbanos, hospitalarios e industriales, etc.<sup>[105]</sup>. En las estaciones depuradoras de aguas residuales (ver esquema en figura II.2.2), para eliminar estos contaminantes, el agua se somete a distintos tratamientos físicos, químicos y biológicos, tales como procesos de volatilización, adsorción sobre sólidos, biodegradación y/o degradación química.

El producto final que queda en la planta depuradora, tras haber pasado el agua por unos procesos de tratamiento primario y secundario (biológico), se denomina lodo residual (ver figura II.2.2). Se trata de una mezcla de agua y sólidos en forma de suspensión más o menos concentrada, constituida por una mezcla de productos orgánicos que cuenta con más de 300 compuestos orgánicos identificados, así como compuestos inorgánicos, contaminantes microbiológicos y patógenos<sup>[106-109]</sup>.

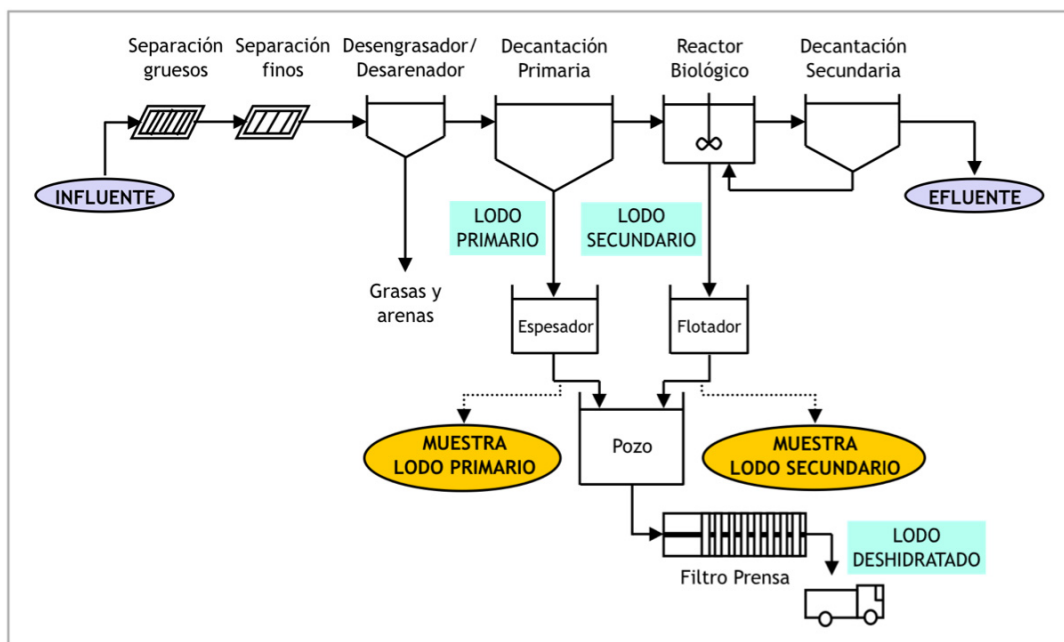


Figura II.2.2. Esquema general básico de una EDAR urbana<sup>[110]</sup>.

El lodo residual generado en una EDAR puede eliminarse mediante incineración o bien considerarlo un mero residuo o basura. Desde que en la década de los 90s se prohibiese su vertido en los océanos, la principal aplicación del lodo residual ha sido su uso como abono agrícola<sup>[107,111-114]</sup>. Se trata de un buen fertilizante para la agricultura

dado el elevado contenido en nutrientes para las plantas y en materia orgánica (40-80%) que presenta en su composición<sup>[105,115-116]</sup>.

Como contrapartida, el lodo residual también contiene otros contaminantes para las cosechas, como ciertos metales pesados (Pb, Cd, Cr, Cu, Ni, Hg, Zn) en elevada concentración, microorganismos y contaminantes orgánicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), PCBs, fármacos, detergentes, pesticidas y retardantes de llama, entre otros<sup>[116-117]</sup>. Debido a los vertidos, la incineración o su uso como fertilizantes, los lodos residuales pueden favorecer la reintroducción y dispersión de estos contaminantes orgánicos en el medio ambiente<sup>[118]</sup>, como es el caso de los fenoles y bisfenoles halogenados<sup>[119]</sup>, incluyendo el riesgo de formación de BPA<sup>[48]</sup>, PBDDs y PBDFs<sup>[9]</sup>. Por lo tanto, el uso del lodo residual como abono agrícola ha de realizarse intentando minimizar riesgos, ya que todos estos compuestos pueden tener una influencia negativa ya no sólo en la fertilidad, sino también en la estructura y los organismos del suelo, en la calidad de aguas superficiales y también en la salud de seres humanos, animales y plantas<sup>[112-114,120-122]</sup>.

La mayoría de los países industrializados eliminan una elevada cantidad de lodo residual utilizándolo como fertilizante, siguiendo las normas que regulan las cantidades de contaminantes que contienen, tanto de metales como de compuestos orgánicos. Las normativas marcan distintos límites según el país, y no siempre se controlan todos los compuestos<sup>[123]</sup>. La USEPA regula la concentración de los metales pesados y algunos contaminantes orgánicos, pero sin embargo no considera a muchos otros a causa de la falta de conocimiento de su toxicidad. Muchos de los compuestos orgánicos no regulados han de tenerse en cuenta ya que son o pueden ser tóxicos, carcinogénicos, persistentes y acumulables, ya sea en el medio ambiente o en tejidos animales.

### 2.6.1.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS ACUOSAS

#### - EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)

La extracción en fase sólida fue introducida a mediados de los años 70 como alternativa a la extracción líquido-líquido (LLE). Hoy en día es una de las técnicas de preparación de muestra más ampliamente utilizada en el caso de muestras líquidas, e incluso gaseosas.

La SPE es un procedimiento basado en la distribución de un analito entre dos fases inmiscibles (una fase líquida o gaseosa, y una fase sólida o una líquida inmovilizada sobre un soporte sólido adecuado) debida a fenómenos de adsorción o de partición (en el caso de que los analitos penetren en el sólido), que permite su concentración y purificación. El proceso consiste en hacer pasar una disolución a través de una fase sólida estacionaria donde se retienen selectivamente los analitos. Los solutos traza adsorbidos al sólido se eluyen con un pequeño volumen de disolvente de fuerza eluyente alta, y apropiado a la técnica de análisis que se vaya a utilizar. La

## 2. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS

---

extracción simplifica el análisis de la muestra porque elimina prácticamente su matriz<sup>[124-127]</sup>.

El diseño del dispositivo de la SPE puede variar, existiendo dos formatos comerciales: discos y cartuchos. Cada diseño tiene sus propias ventajas, que tienen que ver con el número de muestras procesadas, la naturaleza de éstas y su volumen. El dispositivo más comúnmente utilizado es el cartucho, que consiste en una jeringa de polietileno o polipropileno que contiene al material adsorbente (entre 50 mg y 10 g) situado entre dos fritas en la base del cartucho. Estas fritas retienen el adsorbente y filtran la materia particulada de las muestras a extraer<sup>[126]</sup>.

Otro formato de fase sólida disponible son los discos o membranas. El adsorbente está inmovilizado en una membrana de microfibras de aproximadamente 0.5 mm de espesor, y permite flujos más altos que los utilizados para la extracción con cartuchos. Por tanto, la velocidad de paso de muestra es mayor. Los discos se emplean fundamentalmente cuando los analitos se encuentran en concentraciones muy bajas en las muestras y es necesario extraer volúmenes muy grandes de las mismas, normalmente entre 2 y 4 L. Tienen la desventaja de que la disminución del tiempo de extracción puede derivar en una pobre recuperación de los analitos, debido al menor tiempo de interacción entre analito y adsorbente. Además, es necesario un mayor volumen de disolvente de elución que en el caso de los cartuchos<sup>[126]</sup>.

El proceso de SPE consta, fundamentalmente, de cuatro etapas básicas (ver figura II.2.3):

- 1) Acondicionamiento de la fase estacionaria, haciendo pasar un disolvente que humedezca y solvate los grupos funcionales del adsorbente de manera adecuada para una mejor interacción con la muestra, y la eliminación de posibles interferencias.
- 2) Paso de muestra a través del adsorbente, aplicando vacío o presión para acelerar el proceso. En un proceso ideal, los analitos quedan retenidos selectivamente, mientras que las interferencias contenidas en la muestra pasan sin ser retenidas.
- 3) Lavado de la columna con un disolvente selectivo para eliminar las interferencias que hayan podido quedar retenidas en la etapa anterior, mientras que los analitos permanecen en el lecho adsorbente.
- 4) Elución selectiva de los analitos concentrados y purificados con un disolvente de mayor afinidad por los analitos que el adsorbente sólido.

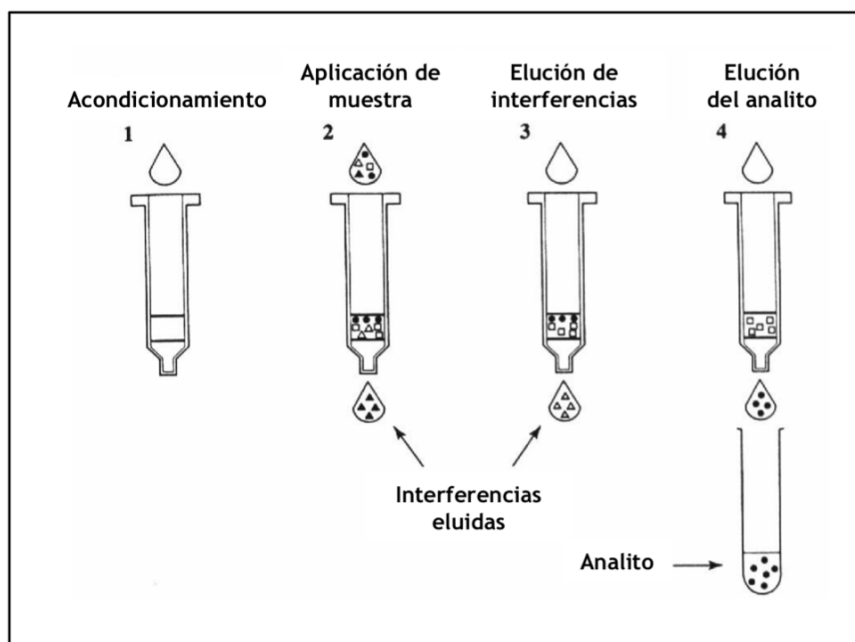


Figura II.2.3. Etapas del proceso de extracción en fase sólida (SPE).

Las fases sólidas empleadas en SPE son similares a las utilizadas en cromatografía líquida (LC). Los adsorbentes más comunes están basados en partículas de sílica, cuyas propiedades se modifican enlazando grupos funcionales a través de un enlace silil-éter. El octadecilsilano (C18) es, con diferencia, la fase enlazada más usada para la extracción de analitos no polares (fase inversa). Las fases octilsilano (C8) y etilsilano (C2) se utilizan para la retención de analitos más voluminosos. Asimismo, otras fases enlazadas, de carácter polar, utilizadas son aquellas modificadas con grupos ciano, amino y dioles, y también los intercambiadores iónicos (aniónico fuerte, *strong anion exchanger*, SAX; y catiónico fuerte, *strong cation exchanger*, SCX). Otras fases sólidas empleadas se basan en carbón grafitizado, silicato de magnesio, sílica gel y óxidos de aluminio.

También se han desarrollado fases adsorbentes basadas en copolímeros del tipo poliestireno-divinilbenceno (*polystyrene-divinylbenzene*, PS-DVB), que son estables en un rango de pH más amplio y, por lo general, conducen a una mayor retención de los analitos<sup>[128]</sup>. Existen comercialmente varios cartuchos con fases PS-DVB, entre ellos, Isolute ENV+, LiChrolut EN, Bond Elut ENV y Amberlita XAD-2.

Las propiedades de estos materiales poliméricos también se pueden mejorar introduciendo modificadores polares en su superficie, como grupos acetilo o sulfonato. Un ejemplo de material polimérico modificado muy utilizado son los cartuchos Oasis HLB®, modificados mediante la introducción de grupos N-vinilpirrolidona, que le confieren al adsorbente la propiedad de ser fácilmente hidratables en medio acuoso.

## 2. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS

---

(con lo que se puede obviar la etapa de acondicionamiento), y conducen a una mejor retención de compuestos moderadamente polares, como los fenoles y bisfenoles.

En los últimos años, los adsorbentes mixtos o de retención mixta (por ejemplo, los cartuchos comerciales Oasis MAX y Oasis MCX), constituidos por una fase polimérica y otra fase de intercambiador iónico, están siendo muy utilizados, especialmente en aquellos casos en los que se lleva a cabo la extracción conjunta de una gran cantidad de compuestos de diferente polaridad y acidez.

La SPE presenta una serie de ventajas en comparación con los procedimientos clásicos de tratamiento de muestras acuosas, como la LLE:

- baja manipulación de la muestra
- el consumo de disolventes se reduce sustancialmente
- alto poder de concentración, normalmente entre 100 y 1000
- se elimina la posibilidad de formación de emulsiones
- existe la posibilidad de automatización, o de acoplamiento en línea (*on-line*) con otras técnicas de análisis
- gran versatilidad en el tipo de adsorbentes utilizados
- el procedimiento analítico se simplifica y acorta drásticamente

Al optimizar un procedimiento de SPE para la retención de fenoles, ha de tenerse en cuenta la variabilidad, en términos de acidez y polaridad, que manifiestan estos compuestos y que, debido a sus valores de  $pK_a$ , resulta difícil aislarlos selectivamente de especies interferentes ácidas y neutras<sup>[125]</sup>. La SPE es un método rápido y eficiente en la extracción de retardantes de llama fenólicos, con un consumo mínimo de disolvente, bajo riesgo de contaminación respecto a la LLE, y normalmente alta selectividad<sup>[57]</sup>.

Así, por ejemplo, se han empleado discos SDB-XC (polimérico de PS-DVB) de fase inversa para la extracción y concentración de hasta 22 BFRs en muestras de agua de río, entre ellos, 2,4-DiBP y 2,6-DiBP<sup>[27]</sup>. Una vez acondicionados los discos de SPE con acetona, isopropanol, metanol y agua, se pasa la muestra de agua, de volumen 500 mL, a vacío hasta sequedad. La elución de los analitos retenidos en la fase adsorbente se lleva a cabo empleando 10 mL de acetato de etilo (AcOEt), 10 mL de diclorometano (DCM), y 10 mL de la mezcla AcOEt-DCM 1:1. Tras la elución, el extracto total se seca con sulfato sódico anhidro, y se concentra por evaporación con corriente de nitrógeno hasta 0.5 mL. El extracto obtenido se analiza directamente mediante cromatografía de gases (*gas chromatography*, GC) acoplada a espectrometría de masas (MS).

Dados los bajos niveles de concentración esperados en aguas, normalmente son necesarios volúmenes de hasta 1 L para asegurar la detección del TBBPA<sup>[60,129]</sup>. Suzuki y col.<sup>[60]</sup> han empleado los cartuchos Absolut Nexus (copolímero de PS-DVB y metacrilato) para la extracción del TBBPA y los isómeros del HBCD en muestras de aguas de lixiviado

de vertederos, reduciendo la cantidad de disolvente orgánico utilizado (en comparación con el procedimiento LLE con 50 mL de DCM) a 5 mL de acetona para la elución de los analitos. Posteriormente, el extracto se evapora con corriente de nitrógeno, y el residuo se disuelve en 1 mL de acetonitrilo para su determinación mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).

También se ha evaluado la eficacia de tres fases sólidas de SPE, polimérica (Oasis HLB), inversa (LC-18) y normal (Carbograph-1, de carbón negro grafitizado o *graphitized carbon black*, GCB), en la extracción y concentración del TBBPA y PBDEs en muestras de aguas de grifo y río, y de efluentes industriales<sup>[61]</sup>. Aunque los tres adsorbentes han proporcionado buenos resultados para el TBBPA, finalmente se ha seleccionado el cartucho GCB para conseguir recuperaciones altas también para los PBDEs. Tras el paso de 1 L de muestra, el cartucho se lava con 10 mL de agua y 500  $\mu$ L de metanol para eliminar las sales residuales y los restos de agua, respectivamente. La elución se lleva a cabo con 7 mL de la mezcla DCM-metanol-ácido acético 88:10:2. El extracto se evapora a sequedad con corriente de nitrógeno a 37 °C, y el residuo se redissuelve con 0.5 mL de metanol (MeOH), para su posterior determinación mediante LC acoplada a MS en tándem (LC-MS/MS). Paralelamente se ha llevado a cabo la extracción de las mismas muestras mediante LLE con 100 mL de hexano. La fase orgánica obtenida se evapora a sequedad en rotavapor a 60 °C, y el residuo se redissuelve con 0.5 mL de MeOH. Se ha comprobado que el método basado en SPE es más adecuado para muestras de bajo contenido en materia orgánica, como las aguas de grifo y río, mientras que para las aguas de efluente se obtienen mejores eficacias empleando LLE.

Por otro lado, Thomsen y col.<sup>[3,57]</sup> han empleado la SPE con columna de PS-DVB para la determinación de fenoles bromados, TCBPA y TBBPA en plasma y suero humanos (el PeBP y TCBPA sólo en plasma). El plasma, mezclado con una disolución mezcla de ácido fórmico-2-propanol, se trata en un baño de ultrasonidos, y se diluye con propanol-agua. Los compuestos fenólicos son fuertemente retenidos por la fase. Tras un lavado de la columna con una mezcla MeOH-agua, se lleva a cabo, directamente en la columna, la descomposición de los lípidos por tratamiento con ácido sulfúrico concentrado. Después de sucesivos lavados de la fase sólida con agua, tampón acetato y diferentes mezclas de agua-MeOH, los analitos se eluyen del cartucho seco con DCM-etanol. Posteriormente, se realiza su análisis mediante GC-MS. La recuperación obtenida para los bisfenoles es baja ya que, debido a su lipofilia y a las fuertes interacciones  $\pi$ - $\pi$  establecidas entre los anillos aromáticos y el adsorbente, estos compuestos no se desorben fácilmente de la fase estacionaria. Los autores demostraron más adelante que la utilización de una columna de SPE más polar conduce a mejores resultados en cuanto a recuperaciones obtenidas<sup>[3]</sup>.

Más tarde, estos mismos autores realizaron la extracción de compuestos bromados, como el 2,4,6-TriBP y el TBBPA, en muestras de aire del interior de un laboratorio, con la finalidad de determinar la contaminación generada en el mismo<sup>[2]</sup>. Para ello, se llevaron a cabo dos procedimientos de toma de muestra, en lugares lo más alejados posible de equipamiento electrónico:

## 2. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS

---

1. La adsorción de los analitos sobre el vidrio de un embudo expuesto al aire del laboratorio durante 48 h. Tras este tiempo, los compuestos adsorbidos se extrajeron con una mezcla de DCM-MeOH 7:3 (volumen/volumen, v/v).
2. La adsorción de los compuestos en una columna de fase sólida, mediante el bombeo de aire. El adsorbente utilizado es un copolímero de estireno-divinilbenceno, previamente lavado y acondicionado sucesivamente con disoluciones de MeOH, DCM y DCM-MeOH 7:3 (v/v). Tras el bombeo del aire de laboratorio, los retardantes de llama bromados se eluyeron con la mezcla DCM-MeOH 7:3 (v/v).

Previamente a la determinación de los compuestos mediante GC, ambos extractos fueron concentrados bajo atmósfera de nitrógeno. De los analitos estudiados, el 2,4,6-TriBP es el más volátil y, como consecuencia, se obtiene una mayor cantidad del mismo en el extracto de la fase sólida que en el del embudo de cristal.

### - OTROS MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE AGUA

En los últimos años se han publicado algunos métodos de preparación de muestras acuosas para la determinación de bromofenoles y bisfenoles halogenados, basados en técnicas de desarrollo relativamente reciente, como la microextracción en fase sólida (*solid-phase microextraction*, SPME)<sup>[24,130]</sup> y la extracción por adsorción con barras magnéticas agitadoras (*stir-bar sorptive extraction*, SBSE) recubiertas de polímero adsorbente<sup>[26]</sup>.

En el procedimiento de SPME desarrollado por Polo y col.<sup>[24]</sup>, se han empleado las fibras de polidimetilsiloxano (PDMS) y carboxen/PDMS (CAR/PDMS) como fases sólidas para la extracción, concentración y derivatización *in-situ* de bromofenoles, clorofenoles, TBBPA y TCBPA en muestras de agua de grifo y residuales. Aunque la fibra CAR/PDMS proporciona buenos resultados para la mayoría de los bromofenoles, los compuestos más halogenados (PeBP y bisfenoles) se extraen más eficazmente con la fibra de PDMS. Las muestras de volumen 10 mL se introducen en viales de 22 mL conteniendo 0.3 g de hidrogenocarbonato potásico (KHCO<sub>3</sub>) y un 35% de cloruro sódico (saturación de NaCl). Sobre esta mezcla se añaden 100 µL de anhídrido acético para que tenga lugar la acetilación *in-situ* de los analitos (previa a su determinación mediante GC-MS), y tras 5 min de tiempo de equilibrado, la muestra se extrae en modo espacio de cabeza (*headspace*, HS) a 100 °C durante 30 min con agitación. El método está libre de efecto matriz para los bromofenoles y los clorofenoles. En cambio, en el caso de TBBPA y TCBPA, ha sido necesario aplicar la calibración por adiciones estándar para su cuantificación en muestras de agua de entrada de la EDAR (influyente).

Para el estudio de la influencia del contenido en agua y del pH en los procesos de degradación de diversos productos, como el TBBPA, también se ha empleado la técnica de SPME seguida de la determinación mediante GC-MS<sup>[130]</sup>. El agua conteniendo TBBPA se introduce en un vial sellado a 100 °C durante 6 semanas, y se lleva a cabo el muestreo semanalmente. La mezcla BFR-agua se extrae con cloroformo, y se evapora el disolvente hasta la obtención de un residuo sólido. Los productos de degradación, tales

como el Bromofenol, el 2,4-DiBP y el 2,4,6-TriBP, se extraen con fibras recubiertas de carbowax/divinilbenceno (CW/DVB), en modo HS sobre el residuo durante 30 min a 80 °C. Tras esta exposición, la fibra se desorbe térmicamente en el inyector del cromatógrafo de gases durante 5 min para su separación cromatográfica.

Por otro lado, Quintana y col.<sup>[26]</sup> han empleado la SBSE con desorción en fase líquida para la extracción y concentración de diversos bromofenoles, clorofenoles, fármacos y herbicidas ácidos de muestras de agua de grifo, río, pozo, y residual. El pH de las muestras, de volumen 15 mL, se ajusta a 2 y se añaden 5 g de NaCl para favorecer el paso de los analitos a la fase sólida de PDMS. Tras un tiempo de extracción de 4 h a temperatura ambiente y con agitación a 5000 rpm, la barrita se desorbe en 200 µL de acetato de etilo durante 30 min. A pesar de que la acetilación *in-situ* funciona bien como método de derivatización de los compuestos fenólicos, el alto pH requerido en este proceso conduce a bajas recuperaciones en fármacos y herbicidas. Por ello, como solución de compromiso, estos autores han empleado la derivatización en el puerto de inyección (*in-port*) de vaporización a temperatura programada (*programmed temperature vapourisation*, PTV) del cromatógrafo, llevando a cabo la sililación de los analitos en el extracto con 20 µL de N-tert-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) durante 30 min, para su posterior determinación mediante GC-MS.

### 2.6.1.3. PREPARACIÓN DE MUESTRAS SÓLIDAS MEDIOAMBIENTALES

Puesto que las muestras sólidas medioambientales, tales como los sedimentos y los lodos de depuradora, son matrices complejas, en la mayoría de los casos los métodos analíticos propuestos para la determinación de compuestos orgánicos son largos procedimientos multietapa, que requieren el empleo de diversos disolventes y adsorbentes, además de un importante consumo de tiempo y dinero<sup>[5,22,48]</sup>.

Hasta ahora, en la bibliografía consultada no se ha encontrado ningún procedimiento de preparación de muestras sólidas medioambientales para el análisis de bromofenoles. No obstante, la técnica de extracción asistida por ultrasonidos (UAE) ha sido empleada por Mardones y col.<sup>[131-132]</sup> para la extracción del 2,4,6-TriBP y el PeCP en muestras de serrín. La muestra de 5 g se extrae con 50 mL de hexano durante 30 s en un baño de ultrasonidos, y luego se homogeneiza durante 30 min en un agitador. El extracto se evapora a sequedad bajo corriente de nitrógeno, y el residuo se disuelve en 5 mL de disolución de carbonato sódico (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) para su inyección directa en un sistema de cromatografía electrocinética micelar (MEKC)<sup>[132]</sup>. En cuanto a su determinación mediante GC-MS<sup>[131]</sup>, la muestra se extrae con disolución 0.1 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, y a continuación los analitos se derivatizan con anhídrido acético, y los derivados acetilados se extraen mediante LLE durante 30 min con 5 mL de hexano.

Por otro lado, sí se han desarrollado diversos métodos de preparación de muestras de suelos, sedimentos, y lodos de depuradora, para el análisis de TBBPA (normalmente acompañado por otros BFRs, como los PBDEs y el HBCD<sup>[15,19,22-23]</sup>, o los derivados del TBBPA<sup>[48]</sup>).

## 2. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS

---

La extracción Soxhlet es una técnica clásica, robusta, eficiente y de bajo coste, empleada en la determinación de BFRs en muestras de suelos, sedimentos y lodos<sup>[62,69,72]</sup>. Tanto las mezclas de acetona y hexano en diferentes proporciones (1:1 o 1:3, v/v)<sup>[69]</sup> o acetona-DCM 1:4<sup>[62]</sup>, como el metil-tert-butil éter (MTBE)<sup>[72]</sup> han proporcionado las mejores recuperaciones para el TBBPA y el TCBPA en estas matrices. Sin embargo, es necesario aplicar etapas adicionales de limpieza y fraccionamiento a estos extractos para eliminar la fracción lipídica y otras interferencias coextraídas antes de su determinación cromatográfica final. En general, los tratamientos consisten en aplicar la LLE con ácido sulfúrico y posterior purificación mediante cromatografía de permeación en gel (*gel permeation chromatography*, GPC)<sup>[69]</sup>, junto con la SPE empleando cartuchos de sílica<sup>[69,72]</sup> o C18<sup>[62,72]</sup>. La técnica Soxhlet también se ha utilizado para la extracción de algunos retardantes de llama, como el TBBPA y el 2,4,6-TriBP, de muestras de materiales poliméricos de carcasas de equipamiento electrónico, durante 3 h con una mezcla de MeOH y n-propanol<sup>[1]</sup>.

Chu y col.<sup>[72]</sup> han combinado la extracción mediante Soxhlet, el fraccionamiento por LLE, y la concentración y limpieza por SPE, para la determinación de derivados del BPA, como el TBBPA y el TCBPA, entre otros, en sedimentos y lodos de depuradora. En primer lugar, 10 g de muestra sólida se mezclan y homogeneizan en mortero de vidrio con 30 g de sulfato sódico (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) anhidro, y la mezcla se extrae en un embudo durante 12 h con 150 mL de MTBE. El extracto se concentra en rotavapor a 2 mL, a los que se le añaden 10 mL de hexano y 4 mL de disolución de hidróxido sódico (NaOH) para la separación de la fracción fenólica y neutra mediante LLE (esta última etapa se repite tres veces). Las fracciones fenólicas combinadas se acidifican a pH 2-3 y se concentran mediante SPE empleando cartuchos de fase inversa LC-C18 y 10 mL de acetona como disolvente de elución. El extracto obtenido se concentra con corriente de nitrógeno a un volumen de 0.5 mL, se le añaden 2 mL de etanol anhidro, y se evapora a sequedad. El residuo se reconstituye con 0.2 mL de DCM-hexano 1:9 (v/v), y este extracto se limpia pasándolo a través de un cartucho de SPE de fase normal de sílica LC-Si. Los analitos se eluyen con 10 mL de MTBE-DCM 1:9 (v/v), extracto que se evapora a sequedad y se reconstituye con 100 µL de MeOH para su determinación final mediante LC-MS/MS. Aunque el procedimiento es bastante laborioso, la etapa de concentración y limpieza con cartuchos de C18 y de sílica es fundamental para evitar el efecto de supresión iónica debido a compuestos interferentes, especialmente sales orgánicas e inorgánicas, presentes en estas muestras tan complejas.

A pesar de su uso ampliamente extendido para la extracción de compuestos orgánicos en matrices sólidas, tanto Soxhlet como los modos anteriores de extracción sólido-líquido y líquido-líquido presentan algunos inconvenientes, como un largo tiempo de extracción, o el empleo de grandes volúmenes de disolventes orgánicos, en los que posteriormente son necesarias etapas adicionales de limpieza, concentración y/o cambio de disolvente para su inyección en el sistema cromatográfico de determinación.

Otras metodologías emplean técnicas de extracción con disolventes más rápidas como alternativa a estos procedimientos multietapa, largos y laboriosos. Así, la extracción con líquidos presurizados (*pressurized liquid extraction*, PLE)) ha sido evaluada para el análisis de TBBPA en suelos, sedimentos y lodos de depuradora

secos<sup>[68]</sup>. Este compuesto se recupera cuantitativamente al emplear como disolvente de extracción el DCM, aplicando una temperatura de 100 °C y una presión de 12.7 MPa, en 2 ciclos de 5 min de duración. Sin embargo, en este caso, también es necesario aplicar una etapa de limpieza a los extractos obtenidos utilizando cartuchos de sílica y sílica ácida para eliminar las interferencias coextraídas, previamente a su determinación mediante GC-MS.

Hyötyläinen y col.<sup>[5]</sup> han utilizado la técnica de extracción con agua caliente presurizada (*pressurized hot water extraction*, PHWE) para el análisis de diversos compuestos bromados en sedimentos, incluido el TBBPA. Los analitos extraídos son atrapados en una trampa de Tenax TA, de donde son eluidos con una mezcla de pentano-AcOEt, tras el secado de la trampa con nitrógeno. Este pretratamiento de muestra no requiere ninguna etapa adicional de limpieza. Con esta técnica se obtienen mejores recuperaciones, y extractos más limpios que con la extracción Soxhlet. Al igual que estos autores, Kuosmanen y col.<sup>[28]</sup> analizaron retardantes de llama bromados, entre ellos el TBBPA, en muestras de sedimentos utilizando la misma técnica de extracción. Los extractos fueron analizados posteriormente en un híbrido *on-line* de cromatografía líquida-cromatografía de gases (LC-GC).

Por otro lado, Lee y col.<sup>[72]</sup> han empleado la extracción con fluidos supercríticos (*supercritical fluid extraction*, SFE) con derivatización *in-situ* para el análisis de PeCP, TBBPA, BPA y otros disruptores endocrinos (EDCs) en lodos de depuradora. Sobre la muestra, de entre 100 y 250 mg, se añaden 200 µL de anhídrido acético y 30 µL de trietilamina para que tenga lugar la acetilación *in-situ* de los analitos. La extracción se lleva a cabo utilizando dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) a 80 °C, aplicando un ciclo de 15 min de extracción estática, seguido de un ciclo de 10 min de extracción dinámica con CO<sub>2</sub> a 2 mL·min<sup>-1</sup>. Los analitos acetilados, que tras la extracción con CO<sub>2</sub> quedan retenidos por adsorción en una trampa de C18, se eluyen de la misma con dos alícuotas de acetona. El extracto obtenido se evapora a sequedad, se reconstituye con éter de petróleo, y se lava con una disolución básica de carbonato potásico (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) al 1%. A continuación, se limpia con una columna de sílica desactivada al 5%, y los analitos derivatizados se eluyen con DCM. Es necesario realizar un cambio de disolvente a 1 mL de isooctano para su posterior determinación mediante GC-MS.

También se ha utilizado la técnica UAE para la extracción del TBBPA (conjuntamente con los isómeros del HBCD) en sedimentos marinos<sup>[60]</sup>. La muestra de 1 g se extrae aplicando ultrasonidos durante 10 min con 5 mL de acetona. El extracto se centrifuga durante 10 min a 3000 rpm, y el sobrenadante se evapora a sequedad. El residuo se disuelve en 1 mL de acetonitrilo para su inyección en el sistema de determinación de LC-MS. Sant-Louis y col.<sup>[70]</sup> han extraído el TBBPA de muestras de sedimento y lodos de depuradora mediante UAE con 10 mL de DCM-MeOH 1:9 (v/v) durante 60 min a 30 °C. En este caso, tras la agitación rotatoria durante 3 h a temperatura ambiente de la mezcla y posterior centrifugación, la fase orgánica separada se limpia utilizando cartuchos ENVI-18. La elución se lleva a cabo empleando 1 mL de MeOH. Para los lodos de depuradora, es necesario aplicar un proceso de limpieza de los extractos más exhaustiva para eliminar las sales y los compuestos metálicos poliméricos presentes en esta matriz. Para ello, se lleva a cabo una LLE

## 2. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS

---

añadiendo 2 mL de ácido clorhídrico (HCl) al 1% y 2 mL de DCM sobre el extracto, y tras lavar la fase orgánica con agua, se realiza un cambio de disolvente concentrando por evaporación con corriente de nitrógeno a 0.05 mL, y añadiendo sobre este volumen 0.5 mL de MeOH, para su posterior inyección en el sistema LC-MS/MS.

Sánchez-Brunete y col.<sup>[65]</sup> han empleado la denominada extracción en pequeñas columnas asistida por ultrasonidos (*sonication assisted extraction in small columns*, SAESC) para la determinación de TBBPA, TCBPA y BPA en muestras de suelos. La muestra sólida de 5 g se introduce en una columna de vidrio de 20 mL que contiene 2 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, y se añaden 5 mL de AcOEt. Esta columna se somete a ultrasonidos durante 15 min a temperatura ambiente. El disolvente orgánico se retira de la columna aplicando vacío, y se repite de nuevo el proceso de extracción con otros 5 mL de AcOEt. Tras lavar la columna con 1 mL más de disolvente, el extracto total se concentra a 1 mL con corriente de nitrógeno. Para su posterior determinación por GC-MS, es necesario derivatizar previamente los analitos empleando N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA). Debido a la complejidad de los extractos obtenidos con el procedimiento anterior, en el caso de suelos industriales, es necesario añadir 2 g de Florisil acidificado a la columna, mezclándolo con el Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, para aumentar la selectividad de la extracción y eliminar así las interferencias coextraídas.

Posteriormente, Yu y col.<sup>[64]</sup> han desarrollado un procedimiento que combina la SBSE con la UAE para la determinación de BFRs, entre ellos el TBBPA, en muestras de polvo y suelos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En primer lugar, la muestra de 0.15 g se extrae con 2 mL de acetona mediante UAE durante 20 min a temperatura ambiente, y la mezcla se centrifuga durante 5 min a 3000 rpm. La fase orgánica se retira a un matraz de 10 mL y se repite la extracción UAE, esta vez empleando 2 mL de una disolución acuosa conteniendo un 10% de NaCl. Este segundo extracto se añade al mismo matraz, y la mezcla se lleva a 10 mL con agua ultrapura. Para llevar a cabo la extracción mediante SBSE, se toman 5 mL de esta disolución y se introducen en un vial de 20 mL, donde también se añaden 0.5 g de NaCl (correspondiente a un 10%) y una barrita magnética recubierta de PDMS-β-ciclodextrina (PDMS-β-CD) por una sola cara. Tras un tiempo de extracción de 10 min a temperatura ambiente y con agitación a 600 rpm, los analitos se desorben de la barrita en 50 µL de etanol aplicando ultrasonidos durante 20 min.

### - DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA (MSPD)

Tal y como ya se ha mencionado con anterioridad, la etapa crítica en la determinación de contaminantes orgánicos en muestras complejas, como sedimentos y lodos de depuradora, es la preparación de la muestra. Además de los analitos de interés, los extractos de muestra obtenidos pueden presentar un elevado número de interferencias, y un alto contenido en materia orgánica y grasa, y por tanto, en muchos casos son necesarias etapas adicionales de purificación previas a la determinación. La MSPD permite la extracción y purificación de muestras sólidas en un único paso, rápido, sencillo y de bajo coste.

En 1989, Barker y col.<sup>[133]</sup> introdujeron una nueva técnica de preparación de muestras sólidas y semisólidas, denominada dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD). Esta metodología nació con el objetivo de superar la gran limitación de la SPE, válida únicamente para muestras líquidas con un grado de viscosidad bajo y libres de partículas<sup>[134]</sup>. La MSPD permite llevar a cabo, de forma simultánea, la homogeneización y disrupción de la muestra, la extracción de los compuestos de interés, y la limpieza del extracto, sin necesidad de instrumentación específica ni costosa, y proporcionando una reducción significativa en el tamaño de muestra y el consumo de disolventes, así como en tiempo de análisis y costes<sup>[134-135]</sup>.

La MSPD consiste en la mezcla de una muestra sólida, semisólida o líquida viscosa, con un soporte sólido de sílice ( $\text{SiO}_2$ ) previamente derivatizada para producir en su superficie una fase orgánica enlazada, como por ejemplo el C18. El material sólido se utiliza como agente abrasivo, aumentando el potencial mezclador cuando se lleva a cabo la ruptura de la estructura de la matriz por medio mecánico, normalmente mediante la utilización de un mortero. Además, la presencia de la fase orgánica enlazada tiene una función adicional, puesto que también ayuda a disolver y dispersar los componentes de la muestra sobre su superficie, conduciendo a la disrupción completa de la muestra y a su dispersión sobre dicha superficie. Los componentes de la matriz se distribuyen sobre la superficie en base a su polaridad relativa, es decir, por interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas, dando lugar a una nueva fase con características únicas (diferentes a las del material sólido utilizado) para llevar a cabo el aislamiento selectivo de los analitos de interés<sup>[135]</sup>. Se producen interacciones entre los analitos y el soporte sólido, los analitos y la fase enlazada, los analitos con la matriz dispersada, la matriz con el soporte sólido, y la matriz con la fase ligada. Así, los compuestos apolares se dispersan en la fase orgánica no polar; las moléculas polares y de menor tamaño, como el agua, se asocian con grupos polares como los grupos silanol ( $\text{SiOH}$ ) de la superficie de las partículas de sílice y dentro de los poros del soporte sólido, así como con componentes de la matriz capaces de establecer enlaces de hidrógeno; los componentes más grandes y de naturaleza más apolar se distribuyen a través de la superficie de la estructura bifásica fase ligada/lípidos de la fase dispersada<sup>[134]</sup>. El proceso de disrupción permite así el acceso tanto al exterior como al interior de las muestras sólidas, y además crea un área superficial de gran tamaño que permite un mejor acceso de disolventes y reactivos utilizados en etapas posteriores de extracción y purificación.

La mezcla se introduce a continuación en un dispositivo que permita la elución de los analitos con un disolvente adecuado, siguiendo la metodología normal de la técnica de SPE tradicional (con la diferencia de que en este caso la muestra se distribuye a lo largo de toda la extensión, y no sólo en cabeza de columna como ocurre en SPE). La partición (en la fase estacionaria líquida) o el equilibrio de absorción o adsorción (en la fase estacionaria sólida), similar a los fenómenos de reparto existentes en una columna cromatográfica, son responsables de la distribución de los analitos entre la muestra dispersada y el disolvente de elución.

El procedimiento de MSPD consta fundamentalmente de las siguientes etapas<sup>[134,136]</sup> (ver esquema en figura II.2.4):

## 2. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS

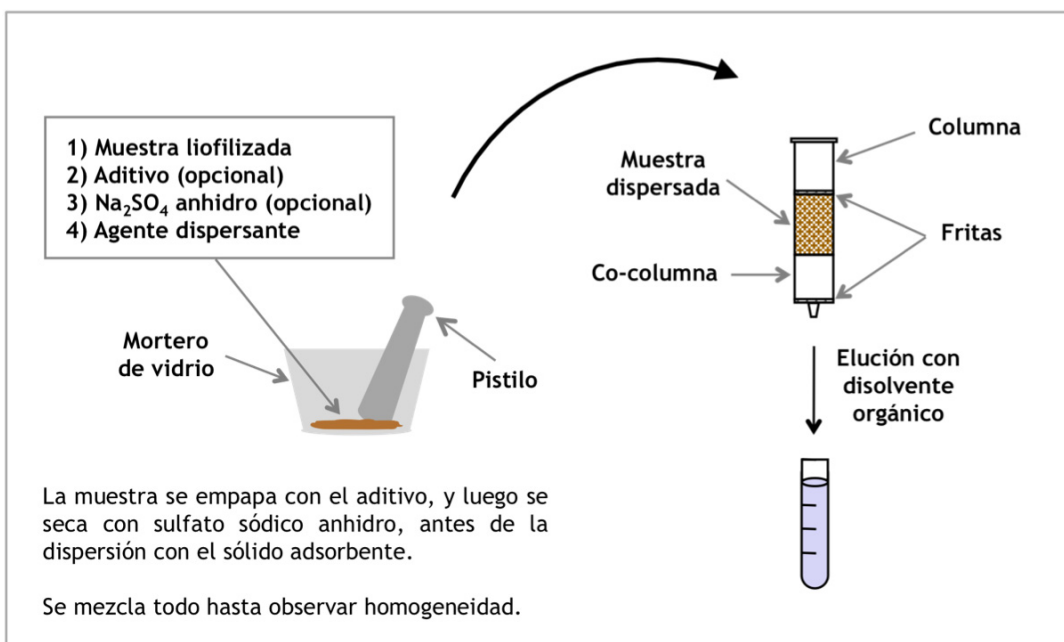
---

1. La muestra sólida, semisólida o líquida viscosa, se mezcla con un agente dispersante en un mortero utilizando el pistilo, con el objetivo de conseguir la completa disrupción, dispersión y homogeneización de la muestra sobre dicho dispersante. El mortero debe ser de vidrio o ágata, debido a que la porcelana y otros materiales porosos pueden conducir a pérdidas de analitos o de muestra. Se suele trabajar con tamaños pequeños de muestra, normalmente entre 0.2 y 0.5 g. En algunos procedimientos se han utilizado dispersantes abrasivos que también poseen propiedades como agentes de secado, tales como sílica o  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, conduciendo a la formación de un material finamente dividido y lo suficientemente seco para la posterior extracción<sup>[137]</sup>.
2. La mezcla resultante se empaqueta en una columna vacía o sobre un absorbente o adsorbente de SPE. La columna es normalmente un cuerpo de jeringa vacío o un cartucho con una frita de polipropileno o de acero inoxidable, un filtro de celulosa, o un tapón de lana de vidrio silanizada, en su parte inferior. Normalmente se coloca una segunda frita o tapón sobre la mezcla para después llevar a cabo la compresión de la misma con el émbolo de una jeringa. La colocación de la mezcla en la columna de separación sigue los principios de la cromatografía de adsorción convencional, es decir, deben evitarse la formación de canales en la columna y el material no debe estar comprimido en exceso, lo que ralentizaría, o incluso impediría totalmente, el flujo de disolvente a través del sistema.
3. En cuanto a la etapa de elución, existen tres posibilidades:
  - a) En una primera etapa de lavado, los analitos se quedan retenidos en la columna, mientras que las interferencias presentes en la matriz se eliminan por elución. A continuación, en una segunda etapa, los analitos se eluyen de la columna con un disolvente diferente.
  - b) En una misma etapa de elución, las interferencias de la matriz se retienen selectivamente en la columna mientras que los analitos se eluyen directamente.
  - c) Empleando eluciones múltiples (utilizando diferentes disolventes de elución) o secuenciales (usando varias fracciones del mismo disolvente), y dado que la totalidad de la muestra está presente en la columna, es posible el aislamiento de un único compuesto, de una clase de compuestos o incluso de varias clases de compuestos de una misma matriz.

En cualquier caso, la primera fracción del disolvente de elución, que se emplea para el lavado y enjuague del mortero y el pistilo, debe adicionarse en primer lugar sobre el cartucho de MSPD. La mayoría de las eluciones se llevan a cabo por gravedad aunque, en algunos casos, el flujo se inicia aplicando presión en cabeza de columna, o colocando la columna en un

sistema a vacío y aplicando succión. De modo similar, en otros métodos se han empleado sistemas a vacío para controlar el flujo de varios disolventes de elución.

- Finalmente, se puede llevar a cabo una etapa de limpieza adicional o, directamente, analizar la muestra. En muchos casos se recurre al uso de co-columnas para obtener un mayor grado de fraccionamiento y de purificación de la muestra. Así, se puede rellenar la parte inferior de la propia columna de MSPD (donde se va a introducir la mezcla dispersada en la capa superior) con el material sólido adecuado, formando una co-columna. También puede utilizarse una columna de adsorbente adicional situada a continuación del cartucho de MSPD para recoger las fracciones eluidas de la primera columna. Más adelante se explican estas opciones con más detalle.



**Figura II.2.4.** Esquema básico del procedimiento de dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD).

La MSPD está diseñada, en contraposición con la cromatografía, para fragmentar y dispersar los componentes de muestras sólidas en una fase orgánica ligada a un soporte sólido. Esta fase actúa además como un material de relleno a través del cual los componentes son eluidos de la muestra. De esta manera, la muestra dispersada a través de toda la columna forma parte del carácter cromatográfico del sistema: las interacciones dinámicas que se desarrollan en el mismo implican la fase estacionaria o soporte sólido, la fase móvil o eluyente, y todos los componentes de la matriz. Por lo tanto, la eficacia y selectividad en MSPD depende de varios factores, entre los que

## 2. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS

---

destacan el material dispersante, la naturaleza del sólido, la utilización de co-adsorbentes, el tipo de disolvente y la secuencia de elución.

### - Agente dispersante: naturaleza del soporte sólido y de la fase enlazada

Normalmente, en MSPD se utilizan materiales sólidos basados en la sílice como agentes dispersantes para la disrupción de la matriz. La principal ventaja que presentan estos materiales es que poseen grupos silanol no enlazados o derivatizados, tanto en la superficie de las partículas como en los poros, que interaccionan con el agua de la muestra, actuando así como agentes desecantes de la misma<sup>[134]</sup>.

En lo que se refiere a la fase enlazada, la mayoría de las aplicaciones utilizan materiales de fase inversa, especialmente el C18<sup>[134,136,138-141]</sup> y el C8<sup>[134,142-143]</sup>, y en menor medida el C30 (triacontilsilano)<sup>[144]</sup>, para aislar especies lipofílicas<sup>[134]</sup>. En la actualidad, estas fases inversas se están sustituyendo por amino-propil-sílica o por aminas primarias y secundarias (*primary and secondary amines*, PSA)<sup>[145-147]</sup>. Para analitos más polares, en algunos trabajos se han utilizado adsorbentes de fase normal como el cianopropilo y otros materiales relacionados<sup>[148]</sup>.

En los últimos años, la selectividad de la MSPD se ha mejorado utilizando otros materiales alternativos a los dispersantes de sílica enlazada, con la introducción de materiales no enlazados de fase normal, como son la sílica gel, el Florisil (MgSiO<sub>3</sub>), y la alúmina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)<sup>[149-157]</sup>. Estos materiales interaccionan con los componentes de la muestra sólo por adsorción y, obviamente, no son capaces de disolver la matriz de la muestra. No obstante, las propiedades de estos adsorbentes se pueden ajustar dependiendo de su contenido en agua y de su carácter ácido o básico<sup>[149,158]</sup>. Así, por ejemplo, la retención de los compuestos en sílica se puede cambiar modificando su superficie con un ácido, dando lugar a la sílica ácida<sup>[158]</sup>. Los compuestos básicos se retendrán entonces a través de los puentes de hidrógeno formados entre los grupos silanol y la base a través del ácido añadido. Los constituyentes ácidos o neutros de la matriz y las interferencias se pueden eluir previamente a los compuestos básicos utilizando un disolvente apolar. A continuación, se puede utilizar un disolvente relativamente polar, que forme enlaces de hidrógeno relativamente fuertes con los grupos silanol, para desplazar a la base y eluir selectivamente a los analitos de la columna de MSPD<sup>[136]</sup>.

En algunas aplicaciones también se han utilizado soportes inertes como la tierra de diatomeas o la arena<sup>[136,149,159-164]</sup>, principalmente para permitir la elución temprana de interferencias que no serían retenidas por ningún adsorbente durante la elución de los analitos. Se trata de métodos más baratos, pero a expensas de una selectividad limitada, ya que sólo está controlada por la solubilidad de los diferentes componentes de la muestra en el disolvente de elución. Recientemente se han empleado otros dispersantes poco convencionales, como el carbón activo<sup>[165]</sup>, los polímeros acrílicos<sup>[136,166-167]</sup>, el adsorbente polimérico Oasis HLB<sup>[168]</sup>, o los polímeros de impresión molecular (*molecular imprinted polymers*, MIPs)<sup>[169-170]</sup>.

Se ha comprobado que el tamaño de poro del agente dispersante no es un factor significativo. Sin embargo, el tamaño de partícula sí que es un parámetro a tener en cuenta. El uso de partículas de 3 a 20  $\mu\text{m}$  de diámetro conduce a flujos bajos o, incluso, nulos. La mayoría de las aplicaciones de MSPD han utilizado partículas de 40  $\mu\text{m}$  de diámetro. También se ha observado que un tamaño de partícula no uniforme, pero comprendido entre 40 y 100  $\mu\text{m}$ , funciona bien<sup>[134]</sup>.

Normalmente, la relación muestra/dispersante está comprendida entre 1:1 y 1:4, aunque depende de cada aplicación en particular, y es una variable que se debe examinar durante el desarrollo del método<sup>[136]</sup>. Por otro lado, la facilidad para conseguir una mezcla homogénea con el dispersante depende básicamente de la matriz considerada. Así, para muestras líquidas de baja viscosidad (por ejemplo, zumo, vino, leche, suero, sangre, etc.) normalmente es suficiente con agitar para conseguir una capa fina de muestra alrededor de las partículas de adsorbente<sup>[149]</sup>.

### - Disolvente y secuencia de elución

Al igual que en cromatografía o en SPE, la polaridad del disolvente de elución es de gran importancia a la hora de determinar qué analitos eluyen de la columna de MSPD y en qué orden lo hacen.

La selección del disolvente de elución a utilizar es función de la polaridad del analito. Las sustancias no polares se pueden recuperar utilizando disolventes apolares, como son hexano<sup>[171-173]</sup>, diclorometano<sup>[143,152]</sup> o mezclas de ambos<sup>[174-176]</sup>. Cuando los compuestos tienen una polaridad media o alta, las opciones más empleadas son acetonitrilo<sup>[177-179]</sup>, acetona<sup>[154]</sup>, acetato de etilo<sup>[180-182]</sup>, o mezclas de agua con etanol<sup>[183-184]</sup> o metanol<sup>[185-188]</sup>. Por otro lado, el agua caliente también se ha aplicado con éxito a la extracción de contaminantes polares o moderadamente polares de matrices sólidas (fundamentalmente de alimentos)<sup>[136,189-191]</sup>. El uso de agua caliente como extractante conlleva una serie de ventajas como son su bajo precio, su respeto por el medioambiente y la compatibilidad con la cromatografía líquida de fase inversa<sup>[149]</sup>.

Por otro lado, también se debe tener en cuenta la retención y elución de los componentes de la matriz de la muestra. Es decir, la secuencia de un perfil de elución se diseña considerando que debe retener a la matriz lo máximo posible en la columna, mientras permite eluir a los analitos con un elevado grado de especificidad<sup>[134]</sup>. La correcta elección del disolvente y el diseño del perfil de elución permiten obtener extractos libres de impurezas, bien en base a la retención de las mismas en la fase estacionaria<sup>[192]</sup>, o bien mediante una elución previa a la recuperación de los analitos para eliminarlas de la columna<sup>[154,178]</sup>. Sin embargo, esto no se consigue en todos los casos, resultando necesario el uso de co-columnas u otros medios de purificación<sup>[134]</sup> (ver más adelante).

Algunos estudios han demostrado que, cuando se trabaja con una mezcla de 0.5 g de muestra y 2 g de agente dispersante, la mayoría de los analitos se eluyen de la columna de MSPD en los primeros 4 mL<sup>[193]</sup>. De todas formas, el volumen de elución

## 2. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS

---

varía en función de la aplicación y es un parámetro que se debe examinar para reducir en lo posible el uso de disolvente orgánico y la coelución de interferencias<sup>[138]</sup>.

### - **Modificación química de la matriz o del disolvente de elución**

A veces resulta necesario alterar el estado de ionización de los componentes de la muestra para favorecer ciertas interacciones entre la fase ligada o enlazada del soporte sólido y el disolvente de elución. Esto puede conseguirse mediante la adición de ácidos, bases, sales, agentes quelatantes o desquelatantes, antioxidantes, etc. a la mezcla, o como aditivos en el disolvente de elución<sup>[134]</sup>.

### - **Temperatura y presión**

Recientemente, varias aplicaciones han combinado la extracción utilizando disolventes presurizados (*pressurized solvent extraction*, PSE) y la MSPD con el objetivo de conseguir extracciones más rápidas, automatizables y exhaustivas<sup>[136,149]</sup>. De hecho, en PSE son habituales las aplicaciones en las que la muestra se dispersa con arena o tierra de diatomeas<sup>[194-196]</sup>, y en ocasiones se han empleado adsorbentes de fase normal o inversa<sup>[149,197-199]</sup>.

### - **Etapas de limpieza: lavado de la columna y utilización de co-adsorbentes**

Aunque en algunas ocasiones los extractos obtenidos mediante MSPD son lo suficientemente limpios y libres de interferencias como para ser analizados directamente, a menudo se requiere una etapa adicional de limpieza.

En algunos casos, previamente a la elución de los analitos, se recurre al lavado de la columna, empleando un disolvente adecuado. Así, cuando los compuestos de interés son polares es habitual utilizar disolventes apolares, tales como hexano y DCM, para eliminar los componentes interferentes y menos polares de la matriz, como los lípidos y los ácidos grasos<sup>[178,200-201]</sup>. Por otro lado, se suele utilizar agua cuando es necesario eliminar compuestos polares de la muestra, tales como los azúcares y los pigmentos<sup>[140,202-203]</sup>. Evidentemente, cuando las etapas de lavado y elución se llevan a cabo con disolventes inmiscibles, el cartucho de MSPD se debe secar con una corriente de nitrógeno entre ambas etapas<sup>[149]</sup>.

Tal y como ya se ha comentado anteriormente, en MSPD también es habitual recurrir al uso de una co-columna para llevar a cabo la limpieza de los extractos. El material co-adsorbente (normalmente de diferente naturaleza que el agente dispersante) se puede empaquetar en la parte inferior del mismo cartucho de MSPD como co-columna (ver figura II.2.4), o bien se puede acoplar una columna de SPE en serie (SPE *on-line*) con el objetivo de retener las interferencias de la matriz<sup>[136]</sup>. En general se recurre a la primera opción, y para ello se suelen utilizar materiales de fase normal, habitualmente alúmina<sup>[204]</sup>, sílica<sup>[181,205-206]</sup>, Florisil<sup>[139,178,192]</sup> o carbón<sup>[177]</sup> para retener las interferencias polares que podrían eluir de las muestras dispersadas sobre C18 u otros dispersantes de fase inversa. En el caso de analitos de una elevada estabilidad química (por ejemplo, PCBs, PBDEs, y PBBs) y matrices alimentarias de alto

contenido en grasa (pescado, pollo, queso, mantequilla, etc.), a menudo se sitúa una capa de sílica ácida (en la mayoría de los casos con un 40% de ácido sulfúrico) en el fondo del cartucho de MSPD<sup>[158]</sup>. Esta alternativa destruye las interferencias de tipo lipídico y conduce a la obtención de extractos libres de grasa.

Obviamente, también es posible la combinación de ambas opciones de limpieza para incrementar la selectividad en la extracción de analitos de polaridad intermedia de muestras medioambientales complejas con contenidos en carbono orgánico de hasta un 30%<sup>[154,178]</sup>. En estos casos, los mejores resultados en cuanto a eficacia de extracción y selectividad se obtienen empleando en primer lugar un disolvente de polaridad baja, por ejemplo diclorometano, para eliminar las interferencias lipídicas, y seguidamente un disolvente más polar, como el acetonitrilo, para la extracción de los analitos. Las interferencias polares eluidas con el acetonitrilo se retienen en la co-columna de Florisil, de fase normal. Esta estrategia de limpieza es más efectiva cuanto más similares sean las polaridades de los analitos de interés<sup>[149]</sup>.

Finalmente, la MSPD presenta una serie de ventajas (algunas de ellas ya comentadas anteriormente) en comparación con los procedimientos clásicos de pretratamiento de muestra:

- el procedimiento analítico se simplifica y acorta drásticamente
- se elimina la posibilidad de formación de emulsiones
- el consumo de disolventes se reduce sustancialmente
- se mejora la eficacia de la extracción de los analitos, puesto que toda la muestra se expone al extractante<sup>[137]</sup>

Además, en comparación con otras técnicas como la PSE, en la MSPD se utilizan condiciones de extracción moderadas (temperatura ambiente y presión atmosférica) lo que, junto con la combinación adecuada de agente dispersante y disolvente de elución, normalmente conduce a recuperaciones aceptables y a una selectividad media. Otras ventajas adicionales de esta técnica son su bajo coste y la posibilidad de llevar a cabo, simultáneamente, las etapas de extracción y limpieza<sup>[136,149,193]</sup>. Es por ello que, a pesar de ser una técnica de desarrollo muy reciente, posee numerosas aplicaciones ya publicadas (muchas de ellas enumeradas a lo largo de esta sección), especialmente en lo que se refiere a muestras de tipo biológico, y concretamente a alimentos<sup>[193]</sup>.

Sin embargo, la extracción y purificación de compuestos orgánicos en matrices medioambientales sólidas, como los sedimentos y los lodos de depuradora, no habían sido investigadas hasta el momento de la realización de este trabajo experimental (2005). Tan sólo Li y col.<sup>[150,207]</sup> habían empleado la técnica de MSPD para la determinación de pesticidas en muestras de suelo. Posteriormente, se han desarrollado nuevos métodos basados en MSPD para la extracción de PAHs en lodos<sup>[152-153]</sup>, pesticidas en suelos<sup>[151]</sup> y lodos<sup>[156]</sup>, y retardantes de llama organofosforados<sup>[154]</sup> y bactericidas fenólicos<sup>[178]</sup> en polvo de atmósferas interiores, entre otros.

### 2.6.2. DETERMINACIÓN DE FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS

Además de las muestras de agua, sedimentos y lodos de depuradora (matrices de interés en esta memoria de investigación), las referencias que se citan a continuación incluyen también métodos de determinación desarrollados recientemente para el análisis de los bromofenoles, el TBBPA y el TCBPA en otras matrices, tales como polímeros y fluidos biológicos.

La mayoría de los métodos de determinación de bromofenoles y bisfenoles halogenados publicados en la bibliografía están basados fundamentalmente en su separación cromatográfica mediante GC<sup>[2-3,24-27,42,57,65,73-74,130-131,208-209]</sup> o LC<sup>[60-62,64,69-70,72,210-218]</sup>. Para el análisis de matrices complejas, como las muestras medioambientales, en las cuales estos compuestos están presentes en bajas concentraciones, es necesario emplear sistemas de detección de alta sensibilidad y selectividad. Por ello, en estos casos, los acoplamientos con la MS<sup>[24-27,42,60,65,73-74,131,208-209,214]</sup> o espectrometría de masas en tándem (MS/MS)<sup>[61,70,72,210]</sup> son los sistemas de detección más habituales. Aunque también existe alguna aplicación que emplea la detección ultravioleta (UV)<sup>[64]</sup>, con el consecuente detrimento de los límites de detección y cuantificación. A continuación se explican con más detalle estos procedimientos.

Todos los métodos de separación por GC para el análisis conjunto de fenoles y bisfenoles halogenados en muestras medioambientales, en materiales poliméricos o en fluidos biológicos se basan en la determinación mediante GC-MS<sup>[24-27,57,73-74,208-209]</sup>. Normalmente, la fragmentación de los compuestos ionizados tiene lugar en sistemas GC-MS con trampas de iones<sup>[24-26]</sup>, aunque algunos autores han utilizado el cuadrupolo<sup>[27,57,73]</sup>. La ionización de los analitos se lleva a cabo tanto por impacto electrónico (*electron impact*, EI)<sup>[24-26]</sup> como mediante ionización electroquímica negativa (*electrochemical negative ionization*, ECNI)<sup>[27,73]</sup>, también denominada ionización negativa de captura electrónica (*electron capture negative ionization*, ECNI, o simplemente EC)<sup>[2-3,57]</sup>, estas últimas de mayor selectividad y sensibilidad a los compuestos halogenados.

Para la separación de bromofenoles y/o bisfenoles halogenados mediante GC se emplean columnas capilares con fases apolares conteniendo 5% difenil y 95% dimetilpolisiloxano (HP-5 MS<sup>[73,131]</sup>, CP-Sil 8 CB<sup>[3,24,27,57,130]</sup>, CP-Sil 5 CB<sup>[2]</sup>, ZB-5MS<sup>[25,65]</sup> o DB-5MS<sup>[74]</sup>), de 25<sup>[24]</sup>, 30<sup>[25,57,65,73,74,131]</sup> o 60<sup>[27]</sup> m de longitud, con diámetros internos de 0.25 mm, y espesores de fase de 0.25 µm. Sólo en algún caso particular se han utilizado otras fases estacionarias, como 14% difenil y 86% dimetilpolisiloxano (DB-XLB) con una longitud de columna de 60 m (para la separación de hasta 46 contaminantes orgánicos ácidos y polares)<sup>[26]</sup>, y 14% cianopropil-fenil y 86% dimetilpolisiloxano con 30 m de longitud<sup>[25]</sup>.

En algunos casos, se han utilizado surrogados y/o patrones internos para corregir y compensar la variabilidad del proceso de extracción y/o de la señal cromatográfica, respectivamente. Así, por ejemplo, Thomsen y col.<sup>[57]</sup> han utilizado el clorotribromobisfenol A y el tetrabromo-*o*-cresol como patrones internos. Por otro lado,

Quintana y col.<sup>[26]</sup> emplearon clorofenoles marcados isotópicamente, entre ellos, 4-cloro-3-metilfenol-d2 (4-Cl-3-MeP-d2), 2,4,6-triclorofenol-d2 (2,4,6-TriCP-d2), y pentaclorofenol-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> (PeCP-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>), como surrogados internos en la determinación de bromofenoles en aguas. También se han utilizado <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-TBBPA y <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-TCBPA en el análisis de bisfenoles halogenados en suelos<sup>[65]</sup>.

Debido a la polaridad de los bromofenoles y los bisfenoles, resulta necesario derivatizar los grupos hidroxilo de sus estructuras para convertirlos en compuestos apolares y más volátiles previamente a su análisis por GC. Esto, a su vez, ayuda a mejorar la forma del pico cromatográfico, y con ello la resolución, así como a incrementar la sensibilidad y selectividad de detección en MS. Como reactivos de derivatización se han utilizado los agentes sililantes MTBSTFA<sup>[26]</sup> y BSTFA<sup>[65]</sup>, el anhídrido acético<sup>[73,131]</sup> y el diazometano<sup>[2-3,57]</sup>. Empleando la SPME<sup>[24]</sup> y la SFE<sup>[73]</sup> como técnicas de extracción de muestras de agua y lodos de depuradora respectivamente, se ha comprobado la efectividad de la derivatización *in-situ* con anhídrido acético, derivatizante más barato que los sililantes y el diazometano, favoreciendo la aplicabilidad de GC a los bromofenoles y bisfenoles halogenados. Aunque no en todos los casos estos compuestos han sido derivatizados<sup>[27]</sup>.

En algunas de las aplicaciones de GC-MS, se han registrado los espectros de masas en modo barrido (*full-scan*), para la correcta identificación de los bromofenoles y bisfenoles halogenados en muestras reales, por comparación con los espectros de la librería correspondientes a los analitos derivatizados<sup>[24,65]</sup>. Además, en la mayoría de los casos, se han monitorizado los cromatogramas por iones *m/z* (masa/carga) seleccionados, esto es, en modo SIM (*single ion monitoring*)<sup>[42,65,73,131]</sup>. Normalmente, el ion más intenso se emplea en la cuantificación, mientras que para la identificación de los compuestos se consideran dos o tres iones característicos más<sup>[24,65]</sup>. Cuando se trabaja con ionización ECNI, todos los analitos bromados son detectados como iones fragmentados Br<sup>-</sup> (*m/z* 79 y 81)<sup>[2-3,42,57]</sup>.

Como ya se ha visto, para la separación y cuantificación de los fenoles y bisfenoles halogenados en muestras complejas mediante GC-MS, es necesario derivatizar los analitos (durante o tras la etapa de extracción), además de limpiar los extractos, y en algunos casos, cambiar de disolvente antes de su inyección en el sistema cromatográfico. Estas etapas adicionales suelen ser laboriosas, y por tanto, consumen tiempo y dinero. Además pueden conducir a pérdidas sustanciales de muestra y analitos<sup>[219]</sup>.

Por el contrario, la cromatografía líquida no requiere derivatización de los analitos polares<sup>[219]</sup>, y presenta la ventaja adicional de que, normalmente, la preparación de muestra es más simple. En consecuencia, es la técnica de determinación preferida para el análisis de TBBPA en muestras complejas, como las matrices medioambientales.

Se trabaja con LC en fase inversa, empleando columnas cromatográficas de fase estacionaria de naturaleza apolar, del tipo C18<sup>[61-62,64,69-70,72,210-218]</sup> y C8<sup>[70]</sup>, aunque en algún caso se ha empleado una columna C30<sup>[60]</sup>. Estas columnas cromatográficas suelen

## 2. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS

tener entre 5 y 25 cm de longitud, siendo las de 15 cm<sup>[60,69-70,72,210-211,214-215,217]</sup> las más habituales, normalmente con tamaños de partícula de 5  $\mu\text{m}$ <sup>[60-61,64,69-70,211,218]</sup> (también, aunque menos usual, de 3  $\mu\text{m}$ <sup>[210,212,216]</sup>, 3.5  $\mu\text{m}$ <sup>[70,214-215]</sup> y 4  $\mu\text{m}$ <sup>[72]</sup>), y 1.7  $\mu\text{m}$ <sup>[62,217]</sup> en los casos de cromatografía líquida ultrarrápida (*ultra-performance liquid chromatography*, UPLC). La separación del TBBPA de otros compuestos y de las interferencias de la matriz depende mucho de la fase móvil empleada<sup>[22]</sup>. Además, se ha comprobado que empleando MeOH se obtiene un 30% más de respuesta en comparación con acetonitrilo (AcN), y una línea base más estable, lo que resulta en mejores LOQs<sup>[72]</sup>. Como fase móvil se han utilizado mezclas de disolventes como MeOH-agua<sup>[64,70,72,214-218]</sup>, AcN-agua<sup>[60,62,69,211,213]</sup>, MeOH-AcN-agua<sup>[210,212]</sup>, y MeOH-acetona-agua<sup>[61]</sup>, y flujos de 0.2 mL·min<sup>-1</sup><sup>[60-61,72,210-213,215-216]</sup>, 0.25 mL·min<sup>-1</sup><sup>[69,218]</sup>, 0.3 mL·min<sup>-1</sup><sup>[70]</sup>, 0.45 mL·min<sup>-1</sup><sup>[62]</sup>, 0.5 mL·min<sup>-1</sup><sup>[217]</sup>, y hasta 1 mL·min<sup>-1</sup><sup>[64]</sup>. Como aditivo añadido a la fase móvil para lograr mejorar la forma del pico cromatográfico, así como para incrementar la señal, se han utilizado ácido acético<sup>[211,216]</sup>, acetato amónico<sup>[69,212,214,218]</sup> y cloruro amónico<sup>[212]</sup>.

El uso de TBBPA marcado isotópicamente como estándar interno compensa el efecto matriz que afecta a la intensidad de iones, la exactitud y la reproducibilidad, mejorando así la calidad de los resultados analíticos<sup>[22,48]</sup>. Por ello, estos métodos utilizan normalmente como surrogado interno el <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-TBBPA<sup>[60,72,210]</sup>.

Respecto a los modos de ionización, la ionización por *electrospray* (ESI) en polaridad negativa<sup>[62,69-70,72,210-218]</sup> hace posible la monitorización de la molécula intacta, lo que ayuda a mejorar la selectividad y exactitud del método<sup>[69,214]</sup>. Algunos autores han demostrado que este modo de ionización proporciona mayor sensibilidad que la ionización química a presión atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) en la determinación de TBBPA<sup>[60,214]</sup>. En el LC-MS, los cromatogramas se registran en modo SIM<sup>[69,211-213]</sup>, seleccionando el ion [M-H]<sup>-</sup>. Este mismo ion molecular es empleado como ion precursor para la segunda fragmentación por colisión en MS/MS, y se registran los iones producto obtenidos, esto es, las transiciones en modo MRM (*multiple reaction monitoring*)<sup>[60-62,70,72,210,214-218]</sup>: la transición que da lugar al ion producto más intenso se utiliza normalmente para la cuantificación de los analitos, mientras que para la identificación de los mismos se toma otra transición más (junto con el tiempo de retención). Cuando se trabaja en modo MRM, los iones producto obtenidos para los compuestos bromados corresponden a iones fragmentados Br<sup>-</sup> (m/z 79 y 81)<sup>[60,72]</sup>.

Aparte del triple cuadrupolo<sup>[60,62,210,214-218]</sup>, la trampa de iones se ha empleado para la determinación de TBBPA en aguas<sup>[61]</sup>, sedimentos y lodos de depuradora<sup>[70]</sup>. Aunque los extractos de sedimento no presentan supresión iónica de la señal, no ocurre lo mismo con los extractos de lodos, en los que se necesita una exhaustiva y laboriosa etapa adicional de limpieza para minimizar estos efectos<sup>[70]</sup>.

En las siguientes tablas II.2.4 y II.2.5, se recogen los límites de detección y cuantificación alcanzados con los métodos de GC-MS y LC-MS aplicados al análisis de bromofenoles y bisfenoles halogenados en muestras de agua y sólidas medioambientales.

**Tabla II.2.4:** Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) instrumentales y del método alcanzados en la determinación de bromofenoles, TBBPA y TCBPA en muestras acuosas, empleando técnicas cromatográficas de separación.

Método	Compuestos analizados	Lím. Instrumentales		Límites Método		Ref.
		LOD (ng·mL <sup>-1</sup> )	LOQ (ng·mL <sup>-1</sup> )	LOD (ng·L <sup>-1</sup> )	LOQ (ng·L <sup>-1</sup> )	
SPE-GC-MS	2,4-DiBP, 2,6-DiBP	0.1		0.1		[27]
SPME-GC-MS	2-BrP, 2-Br-4-MeP, 4-Br-3-MeP, 2,4-DiBP, 2,6-DiBP, 2,4,6-TriBP, PeBP, TBBPA, TCBPA			1.3-46		[24]
SBSE-GC-MS	2-BrP, 4-Br-3-MeP, 2,4-DiBP, 2,6-DiBP, 2,4,6-TriBP, PeBP			11-125		[26]
SPE-LC-MS	TBBPA			0.2		[60]
LLE-LC-MS/MS	TBBPA	0.2		0.2	0.3	[61]
SPE-LC-MS/MS	TBBPA	0.2		0.2	0.3	[61]

**Tabla II.2.5:** Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) instrumentales y del método alcanzados en la determinación de bromofenoles, TBBPA y TCBPA en muestras sólidas medioambientales, empleando técnicas cromatográficas de separación.

Método	Compuestos analizados	Lím. Instrumentales		Límites Método		Ref.
		LOD (ng·mL <sup>-1</sup> )	LOQ (ng·mL <sup>-1</sup> )	LOD (ng·g <sup>-1</sup> )	LOQ (ng·g <sup>-1</sup> )	
SAESC-GC-MS	TBBPA, TCBPA			0.09, 0.05	1.1, 0.14	[65]
UAE-SBS-HPLC-UV	TBBPA				140	[64]
UAE-LC-MS	TBBPA			0.2		[60]
Soxhlet-LLE-SPE-LC-MS	TBBPA		3.3		0.5	[69]
Soxhlet-LLE-SPE-LC-MS/MS	TBBPA, TCBPA				0.05, 0.03	[72]

En cuanto a la electroforesis capilar, la única aplicación publicada hasta la fecha relacionada con los compuestos aquí estudiados consiste en la separación y determinación de 2,4,6-TriBP y PeCP en muestras de serrín mediante MEKC acoplada a detector de espectrometría de absorción ultravioleta-visible (UV-vis) con red de diodos conectados en serie (DAD)<sup>[132]</sup>. En este método se utiliza un capilar de 75/68 cm de longitud total/efectiva y 50 µm de diámetro interno (i.d.), y una disolución tampón 15 mM de hidrogenofosfato sódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) y 20 mM de ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) a pH 8 conteniendo 100 mM de dodecilsulfato sódico (SDS) como surfactante. La separación se

## 2. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS

---

lleva a cabo aplicando un voltaje de 25 kV a 18 °C, tras la inyección hidrodinámica del extracto de muestra a 50 mbar durante 5 s. La detección de estos halofenoles se realiza a 210 nm. En comparación con la determinación mediante GC-MS<sup>[131]</sup>, el método MEKC-DAD es simple, rápido y de bajo coste, y presenta una sensibilidad adecuada (LOD y LOQ instrumentales de 0.4 y 1.4 µg·mL<sup>-1</sup>, respectivamente) y suficiente para la detección de estos compuestos en muestras de serrín extraídas mediante la técnica de UAE (LOD y LOQ del método de 0.8 y 2.5 µg·g<sup>-1</sup>, respectivamente)<sup>[132]</sup>.

Dado que tanto sus estructuras como sus propiedades físico-químicas son similares a otros compuestos fenólicos como los clorofenoles, los metilfenoles (cresoles) o los nitrofenoles, a la hora de optimizar un método de CE para la determinación de bromofenoles y bisfenoles halogenados podría tenerse en cuenta (como referencia) la metodología basada en CE previamente desarrollada para los primeros. En el Anexo I de esta memoria se ha incluido el capítulo de una enciclopedia<sup>[220]</sup> relacionado con el análisis de fenoles mediante CE, fruto de un estudio bibliográfico desarrollado en paralelo a esta tesis doctoral.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- [1] M. Riess, R. Van Eldik, *J. Chromatogr. A* 827 (1998) 65-71.
- [2] C. Thomsen, H. Leknes, E. Lundanes, G. Becher, *J. Chromatogr. A* 923 (2001) 299-304.
- [3] C. Thomsen, E. Lundanes, G. Becher, *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 282-290.
- [4] J. Christensen, J. Platz, *J. Environ. Monit.* 3 (2001) 543-547.
- [5] T. Hyötyläinen, K. Hartonen, *Trends Anal. Chem.* 21 (1) (2002) 13-29.
- [6] M. Spiegelstein, The 2<sup>nd</sup> Internacional Workshop on Brominated Flame Retardants., *BFR 2001 Stockholm* May 14-16 at Stockholm University, Sweden.
- [7] M. L. Hardly, *Chemosphere* 46 (2002) 717-728.
- [8] F. Rahman, K. H. Kangford, M. D. Scrimshaw, J. N. Lester, *Sci. Tot. Environ.* 275 (2001) 1-17.
- [9] H. Wichmann, F. T. Dettmer, M. Bahadir, *Chemosphere* 47 (4) (2002) 349-355.
- [10] R. Weber, B. Kuch, *Environ. Int.* 29 (2003) 699-710.
- [11] J. Ebert, M. Bahadir, *Environ. Int.* 29 (2003) 711-716.

- [12] J. de Boer, C. Allchin, R. Law, B. Zegers, J.P. Boon, *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 591-599.
- [13] J. P. Boon, W. E. Lewis, M. R. Tjoen-A-Choy, C. R. Allchin, R. J. Law, J. de Boer, C. C. ten Hallers-Tjabbes, B. N. Zegers, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 4025-4032.
- [14] J. de Boer, P.G.Wester, A. van der Horst, P.E.G. Leonards, *Environ. Poll.* 122 (2003) 63-74.
- [15] A. Covaci, S. Voorspoels, J. de Boer, *Environ. Int.* 29 (2003) 735-756.
- [16] R. Hites, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 945-956.
- [17] L. Y. Zhu, R. Hites, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 3488-3494.
- [18] C. A. De Wit, *Chemosphere* 46 (2002) 583-624.
- [19] E. Eljarrat, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 727-736.
- [20] M. Remberger, J. Sternbeck, A. Palm, L. Kaj, K. Strömberg, E. Brorström-Lundén, *Chemosphere* 54 (2004) 9-21.
- [21] H. J. C. Klamer, P. E. G. Leonards, M. H. Lamoree, L. A. Villerius, J. E. Akerman, J. F. Bakker, *Chemosphere* 58 (2005) 1579-1587.
- [22] A. Covaci, S. Voorspoels, L. Ramos, H. Neels, R. Blust, *J. Chromatogr. A* 1153 (2007) 145-171.
- [23] S. Kemmlin, D. Herzke, R. J. Law, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 320-333.
- [24] M. Polo, M. Llompart, C. García-Jares, G. Gómez-Noya, M.-H. Bollaín, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1124 (2006) 11-21.
- [25] N. Reineke, S. Biselli, S. Franke, W. Francke, N. Heinzl, H. Hühnerfuss, H. Iznaguen, U. Kammann, N. Theobald, M. Vobach, W. Wosniok, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51 (2006) 186-196.
- [26] J. B. Quintana, R. Rodil, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, *J. Chromatogr. A* 1174 (2007) 27-39.
- [27] P. López, S. A. Brandsma, P. E. G. Leonards, J. De Boer, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 334-345.
- [28] K. Kuosmanen, T. Hyötyläinen, K. Hartonen, M. Riekkola, *J. Chromatogr. A* 943 (2001) 113-122.
- [29] WHO (World Health Organization), Environmental Health Criteria 172, *Tetrabromobisphenol A And Derivatives.*, World Health Criteria, Geneva, Switzerland (1995).
- [30] J. B. Manchester-Neesvig, K. Valters, W. C. Sonzogni, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 1072-1077.
- [31] WHO (World Health Organization), Environmental Health Criteria 192, *Flame Retardants: A General Introduction.*, World Health Criteria, Geneva, Switzerland (1997).

## 2. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS

---

- [32] S. Huber, K. Ballschmitter, *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001) 882-890.
- [33] J. M. Vandenbelt, C. Heinrich, S. G. Vanden Berg, *Anal. Chem.* 26 (1954) 726-727.
- [34] L. Lepri, P. G. Desideri, D. Heimler, *J. Chromatogr.* 195 (1980) 339-348.
- [35] F. Rived, M. Rosés, E. Bosch, *Anal. Chim. Acta* 374 (1998) 309-324.
- [36] S. J. Broderius, M. D. Kalh, M. D. Høglund, *Environ. Toxicol. Chem.* 14 (1995) 1591-1605.
- [37] J. Eriksson, S. Rahm, N. Green, A. Bergman, E. Jakobsson, *Chemosphere* 54 (2004) 117-126.
- [38] Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software Solaris V4.67 (© 1994-2009 ACD/Labs), Chemical Abstracts Service (CAS), American Chemical Society, Washington DC, 2009.
- [39] Interactive PhysProp Database, Syracuse Research Corporation, <http://www.syrres.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=386> (acceso 13 de junio de 2009)
- [40] H. Kuramochi, K. Maeda, K. Kawamoto, *Organohalogen. Comp.* 63 (2003) 337-340.
- [41] U. Sellström, A. Kierkegaard, C. De Wit, B. Jansson, *Environ. Toxic. Chem.* 17 (6) (1998) 1065-1072.
- [42] U. Sellström, B. Jansson, *Chemosphere* 31 (1995) 3085-3092.
- [43] U. Sellström, *Determination of Some Polybrominated Flame Retardants in Biota, Sediment and Sewage Sludge.*, Doctoral Dissertation, Stockholms Universitet, Stockholm (1999).
- [44] M. Alee, R. J. Wenning, *Chemosphere* 46 (2002) 579-582.
- [45] R. J. Law, C. R. Allchin, J. de Boer, A. Covaci, D. Herzke, P. Lepom, S. Morris, J. Tronczynski, C. A. de Wit, *Chemosphere* 64 (2006) 187-208.
- [46] *European Risk Assessment Report on 2,2',6,6'-tetrabromo-4,4'-isopropylidenediphenol (tetrabromobisphenol-A or TBBP-A). Part I. Environment.*, European Commission, Joint Research Center. European Chemicals Bureau, draft, 2008.
- [47] *European Risk Assessment Report on 2,2',6,6'-tetrabromo-4,4'-isopropylidenediphenol (tetrabromobisphenol-A or TBBP-A). Part II. Human health.* Vol. 63, European Commission, Joint Research Center. European Chemicals Bureau, EUR22161E, 2006.
- [48] A. Covaci, S. Voorspoels, M. A.-E. Abdallah, T. Geens, S. Harrad, R. J. Law, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 346-363.
- [49] Bromine Science Environmental Forum (BSEF), <http://www.bsef.com> (acceso 15 de diciembre de 2007).
- [50] P. A. Arias, The 2<sup>nd</sup> International Workshop on Brominated Flame Retardants., *BFR 2001 Stockholm* May 14-16 at Stockholm University, Sweden.

- [51] B. Jansson, The 2<sup>nd</sup> Internacional Workshop on Brominated Flame Retardants., *BFR 2001 Stockholm* May 14-16 at Stockholm University, Sweden.
- [52] G. W. Gribble, *Chem. Soc. Rev.* 28 (1999) 335-346.
- [53] W. C. J. Ma, H. Y. Chung, P. O. Ang, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 2133-2139.
- [54] W. Vetter, G. W. Gribble, *Environ. Toxicol. Chem.* 26 (2007) 2249-2252.
- [55] R. Bloom, A. Eklund, P. Hedemalm, J. Hägsström, *Brominated Flame Retardants, A Global Status Report.*, Orango Miljökonserter, Gothenburg, 2000.
- [56] F. Smedes, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 57 (1994) 215-229.
- [57] C. Thomsen, K. Jának, E. Lundanes, G. Becher, *J. Chromatogr. B* 750 (2001) 1-11.
- [58] M. Osako, Y. J. Kim, S. I. Sakai, *Chemosphere* 57 (2004) 1571-1579.
- [59] T. A. Verslycke, A. D. Vethaak, K. Arijs, C. R. Janssen, *Environ. Pollut.* 136 (2005) 19-31.
- [60] S. Suzuki, A. Hasegawa, *Anal. Sci.* 22 (2006) 469-474.
- [61] A. Bacaloni, L. Callipo, E. Corradini, P. Giansanti, R. Gubbiotti, R. Samperi, A. Laganà, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6400-6409.
- [62] J. Jin, H. Peng, Y. Wang, R. Yang, J. Cui, *Organohalogen Compds.* 68 (2006) 85-88.
- [63] H. Peng, J. Jin, Y. Wang, W. Z. Liu, R. M. Yang, *Chinese J. Anal. Chem.* 35 (2007) 549-551.
- [64] C. Yu, B. Hu, *J. Chromatogr. A* 1160 (2007) 71-80.
- [65] C. Sánchez-Brunete, E. Miguel, J. L. Tadeo, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5497-5503.
- [66] I. Watanabe, T. Kashimoto, R. Tatsukawa, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 31 (1983) 48-52.
- [67] J. de Boer, C. Allchin, B. Zegers, J. P. Boon, S. H. Brandsma, S. Morris, A. W. Kruijt, I. van der Veen, J. M. van Hesseligen, J. J. H. Haftka, *HBCD and TBBP-A in sewage sludge, sediments and biota, including interlaboratory study*, RIVO Report No. C033/02, Septiembre 2002.
- [68] S. C. Quade, M. Alaei, C. Marvin, R. Hale, K. R. Solomon, N. J. Bunce, A. T. Fisk, *Organohalogen Compds.* 62 (2003) 327-330.
- [69] S. Morris, C. R. Allchin, B. N. Zegers, J. J. H. Haftka, J. P. Boon, C. Belpaire, P. E. G. Leonards, S. P. J. van Leeuwen, J. de Boer, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 5497-5504.
- [70] R. Saint-Louis, E. Pelletier, *Analyst* 129 (2004) 724-730.
- [71] M. Schlabach, E. Fjeld, H. Gundersen, E. Mariussen, G. Kjellberg, E. Breivik, *Organohalogen Compds.* 66 (2004) 3730-3736.
- [72] S. Chu, G. D. Haffner, R. J. Letcher, *J. Chromatogr. A* 1097 (2005) 25-32.

## 2. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS

---

- [73] H. B. Lee, T. E. Peart, *Water Qual. Res. J. Canada* 37 (2002) 681-696.
- [74] K. Öberg, K. Warman, T. Öberg, *Chemosphere* 48 (2002) 805-809.
- [75] C. de Wit, K. Nylund, U. Eriksson, A. Kierkegaard, L. Asplund, *Organohalogen Compds.* 69 (2007) 137/1-137/4.
- [76] A. Sjödin, H. Carlsson, K. Thuresson, S. Sjölin, A. Bergman, C. Ostman, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 448-454.
- [77] H. Takigami, G. Suzuki, Y. Hirai, S. Sakai, *Organohalogen Compds.* 69 (2007) 2785-2788.
- [78] M. Alaei, D. Muir, C. Cannon, P. Helm, T. Harner, T. Bidleman, *New persistent chemicals in air*. En: T. Bidleman, R. Macdonald, J. Stow (Eds.), *Sources, Occurrence, Trends and Pathways in the Physical Environment*, Canadian Arctic Contaminants Assessment Report II, Indian and Northern Affairs Canada, Ottawa, ON, Canada (2003) p. 116-124.
- [79] J. L. Acero, P. Piriou, U. von Gunten, *Water Res.* 39 (2005) 2979-2993.
- [80] J. B. Adams, S. J. Lock, M. R. Toward, B. M. Williams, *Food Chem.* 64 (1999) 377-381.
- [81] R. C. Brandli, T. Kupper, T. D. Bucheli, M. Zennegg, S. Huber, D. Ortelli, J. Müller, C. Schaffner, S. Iozza, P. Schmid, U. Berger, P. Edder, M. Oehme, F. X. Stadelman, J. Tarradellas, *J. Environ. Monit.* 9 (2007) 465-472.
- [82] J. Voordeckers, D. Fennell, K. Jones, M. Haggblom, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 696-701.
- [83] Y.-C. Na, J. Hong, K.-J. Kim, *B. Kor. Chem. Soc.* 28 (2007) 547-552.
- [84] L. S. Bimbaum, D. F. Staskal, *Environ. Health Perspect.* 112 (2004) 9-17.
- [85] M. Ghosh, I. A. T. M. Meerts, A. Cook, A. Bergman, A. Brouwer, L. N. Johnson, *Acta Cryst. D56* (2000) 1085-1095.
- [86] I. A. T. M. Meerts, J. J. van Zanden, E. A. C. Luijckx, I. van Leeuwen-Bol, G. Marsh, E. Jakobsson, A. Bergman, *Toxicol. Sci.* 56 (2000) 95-104.
- [87] S. Kitamura, N. Jinno, S. Ohta, H. Kuroki, N. Fujimoto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293 (2002) 554-559.
- [88] C. M. Olsen, E. T. M. Meussen-Elholm, J. A. Holme, J. K. Hongslo, *Toxicol. Lett.* 129 (2002) 55-63.
- [89] J. Legler, A. Brouwer, *Environ. Int.* 29 (2003) 879-885.
- [90] M. Ghisari, E. C. Bonefeld-Jorgensen, *Mol. Cell. Endocrinol.* 244 (2005) 31-41.
- [91] Directiva 75/440/EEC de la Comunidad Europea, *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, nº L 194 de 25.7.1975, p. 26.
- [92] Directiva 2000/60/EC de la Unión Europea, *Diario Oficial de la Unión Europea*, nº L 327 de 22.12.2000, p. 1.

- [93] Directiva 2008/105/EC de la Unión Europea, *Diario Oficial de la Unión Europea*, nº L 348 de 24.12.2008, p. 84.
- [94] Normativa 2364/2000/EC de 25 de octubre de 2000, relativa a la cuarta lista de contaminantes prioritarios prevista en la Norma del Consejo (ECC) No. 793/93, *Off. J. Eur. Comm. I.* 273 (2000) 5.
- [95] Directiva 2002/96/EC del Parlamento Europeo y del Consejo de Europa de 27 de enero de 2003 relativa a desechos de equipamiento eléctrico y electrónico (WEEE), *Off. J. Eur. Comm. I.* 037 (2003) 24.
- [96] M. H. Wong, S. C. Wu, W. J. Deng, X. Z. Yu, Q. Luo, A. O. W. Leung, C. S. C. Wong, W. J. Luksemburg, A. S. Wong, *Environ. Pollut. A* 149 (2007) 131-140.
- [97] K. Akutsu, M. Kitagawa, H. Nakazawa, T. Makino, K. Iwazaki, H. Oda, S. Hori, *Chemosphere* 53 (2003) 645-654.
- [98] D. Gutzman, R. Chenier, J. Pasternak, L. Suffredine, K. Taylor, *Proceedings of the Third International Workshop on Brominated Flame Retardants, BFR 2004*, Toronto, ON, Canada, 2004.
- [99] Y. Yoshida, T. Kawamura, K. Yamamoto, H. Sekki, S. Komoto, *Organohalogen Compds.* 67 (2005) 2127-2129.
- [100] OSPAR Commission, 2005: *OSPAR background document on tetrabromobisphenol-A*. ISBN 1-904426-39-5.
- [101] *EU Risk Assessment of TBBPA - Update*. EU's Technical Committee on New and Existing Substances (TCNES), European Brominated Flame Retardant Industry Panel, Bruselas, Bélgica, Diciembre 2004.
- [102] Normativa 1907/2006/EC del Parlamento Europeo y del Consejo de Europa de 18 de diciembre de 2006, que establece una Agencia Europea de Sustancias Químicas, y que enmienda la Directiva 1999/45/EC, y revoca la Normativa del Consejo (EEC) No. 793/93, la Normativa de la Comisión (EC) No. 1488/94, la Directiva del Consejo 76/769/EEC y las Directivas de la Comisión 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EEC y 2000/21/EC, *Off. J. Eur. Comm. I.* 396 (2006) 1.
- [103] Decisión 2455/2001/EC de 20 de noviembre de 2001, que establece la lista de sustancias prioritarias en el campo de la política del agua y enmienda la Directiva 2000/60/EC, *Off. J. Eur. Comm. I.* 331 (2001) 1.
- [104] *Polybrominated Flame Retardants (PBFRs)*. Priority Existing Chemical Assessment Report. No. 20. National Industrial Chemicals Notification and Assessments Scheme (NICNAS), Australian Government, Marrickville, New South Wales, Junio 2001.
- [105] E. Z. Harrison, S. R. Oakes, M. Hysell, A. Hay, *Sci. Tot. Environ.* 367 (2006) 481-497.
- [106] P. Fedotov, D. Thiébaud, *J. Liq. Chrom. Rel. Techn.* 23 (2000) 897-907.
- [107] S. Pérez, M. Guillamón, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 57-65.
- [108] D. Barceló, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 10-11.

## 2. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS

---

- [109] M. Carballa, F. Omil, J. M. Lema, M. Llompart, C. García-Jares, I. Rodríguez, M. Gómez, T. A. Ternes, *Wat. Res.* 38 (2004) 2918-2926.
- [110] C. Salgado Petinal, *Nuevas aproximaciones basadas en microextracción en fase sólida para la determinación de contaminantes emergentes en muestras medioambientales y biológicas.*, Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela (2006).
- [111] F. Pauné, J. Rivera, I. Espalder, J. Caixach, *J. Chromatogr. A* 684 (1994) 289-296.
- [112] J. D. Berset, P. Bigler, D. Herren, *Anal. Chem.* 72 (2000) 2124-2131.
- [113] D. Herren, J. D. Berset, *Chemosphere* 40 (2000) 565-574.
- [114] X. Zeng, G. Sheng, Y. Xiong, J. Fu, *Chemosphere* 60 (2005) 817-823.
- [115] L. Aparicio, J. L. Santos, E. Alonso, *Waste Manag.* 29 (2009) 1747-1753.
- [116] G. Carbonell, J. Pro, N. Gómez, M. M. Babín, C. Fernández, E. Alonso, J. V. Tarazona, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 72 (2009) 1309-1319.
- [117] S. C. Wilson, R. Duarte-Davidson, K. C. Jones, *Sci. Tot. Environ.* 185 (1996) 45-57.
- [118] K. C. Jones, *Sci. Tot. Environ.* 185 (1996) 1.
- [119] E. Eriksson, N. Christensen, J. E. Schmidt, A. Ledin, *Desalination* 226 (2008) 371-388.
- [120] E. Abad, J. Sauló, J. Caixach, J. Rivera, *J. Chromatogr. A* 893 (2000) 383-391.
- [121] S. Pérez, D. Barceló, *Analyst* 125 (2000) 1273-1279.
- [122] L. I. Osemwengie, S. L. Gerstenberger, *J. Environ. Monit.* 6 (2004) 533-539.
- [123] G. Karlaganis, P. Frost, R. Camenzind, A. Mägert, R. Bonjour, *J. Chromatogr.* 643 (1993) 369-378.
- [124] E. M. Thurmann, M. S. Mills, *Solid Phase Extraction, Principles and Practice.*, Ed. Wiley Interscience Publication (1998).
- [125] I. Rodríguez, M. P. Llompart, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 291-304.
- [126] R. Cela, R. A. Lorenzo, M. C. Casais, *Técnicas de separación en Química Analítica.*, Biblioteca de químicas, Editorial Síntesis, Madrid (2002).
- [127] V. Camel, *Solid-phase extraction.* En: D. Barceló (ed.), *Comprehensive Analytical Chemistry*, v. 41, Elsevier (2003) p. 393-457.
- [128] R. E. Majors, *LC-GC North America* 26 (2008) 1074-1090.
- [129] J. Llorca-Porcel, G. Martínez-Sánchez, B. Álvarez, M. A. Cobollo, I. Valor, *Anal. Chim. Acta* 569 (2006) 113-118.
- [130] G. Gallet, A. García Pérez, S. Karlsson, The 2<sup>nd</sup> Internacional Workshop on Brominated Flame Retardants., *BFR 2001 Stockholm* May 14-16 at Stockholm University, Sweden.

- [131] C. Mardones, J. Palma, C. Sepúlveda, A. Berg, D. von Baer, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 923-926.
- [132] C. Mardones, D. von Baer, A. Hidalgo, A. Contreras, C. Sepúlveda, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1124-1129.
- [133] S. A. Barker, A. R. Long, C. R. Short, *J. Chromatogr.* 475 (1989) 353-361.
- [134] S. A. Barker, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 115-127.
- [135] S. A. Barker, *LC·GC Int.* 11 (1998) 719-724.
- [136] E. M. Kristenson, L. Ramos, U. A. T. Brinkman, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 96-111.
- [137] S. Bogialli, A. Di Corcia, *J. Biochem. Biophys. Methods.* 70 (2007) 163-179.
- [138] S. A. Barker, *J. Biochem. Biophys. Methods.* 70 (2007) 151-162.
- [139] M. G. Dantas Silva, A. Aquino, H. Silveira Dórea, S. Navickiene, *Talanta* 76 (2008) 680-684.
- [140] M. P. García de Llasera, M. L. Reyes-Reyes, *Food Chem.* 114 (2009) 1510-1516.
- [141] A. N. Macedo, A. R. A. Nogueira, S. H. Govoni Brondi, *Chromatographia* 69 (2009) 571-573.
- [142] C. Blasco, Y. Picó, J. Mañes, G. Font, *J. Chromatogr. A* 947 (2002) 227-235.
- [143] A. Kruve, A. Kunnapas, K. Herodes, I. Leito, *J. Chromatogr. A* 1187 (2008) 58-66.
- [144] T. Glaser, A. Lienau, D. Zeeb, M. Krucker, M. Dachtler, K. Albert, *Chromatographia* 57 (2003) S19-S25.
- [145] C. Ferrer, M. J. Gómez, J. F. García-Reyes, I. Ferrer, E. M. Thurman, A. R. Fernández-Alba, *J. Chromatogr. A* 1069 (2005) 183-194.
- [146] S. C. Cunha, J. O. Fernandes, M. B. P. P. Oliveira, *Food Addit. Contam.* 24 (2007) 156-164.
- [147] J. F. García-Reyes, C. Ferrer, M. J. Gómez-Ramos, A. Molina-Días, A. R. Fernández-Alba, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 239-251.
- [148] S. A. Barker, A. R. Long, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 15 (1992) 2071-2089.
- [149] M. García-López, P. Canosa, I. Rodríguez, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 963-974.
- [150] Z.-Y. Li, Z.-C. Zhang, Q.-L. Zhou, R.-Y. Gao, Q.-S. Wang, *J. Chromatogr. A* 977 (2002) 17-25.
- [151] X. Shen, C. Jibao, G. Yun, S. Qingde, *Chromatographia* 64 (2006) 71-77.
- [152] C. Sánchez-Brunete, E. Miguel, J. L. Tadeo, *J. Chromatogr. A* 1148 (2007) 219-227.
- [153] M. T. Pena, M. C. Casais, M. C. Mejuto, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1165 (2007) 32-

## 2. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS

---

38.

- [154] M. García, I. Rodríguez, R. Cela, *Anal. Chim. Acta* 590 (2007) 17-25.
- [155] L. Minuti, R. Pellegrino, *J. Chromatogr. A* 1185 (2008) 23-30.
- [156] C. Sánchez-Brunete, E. Miguel, J. L. Tadeo, *Talanta* 74 (2008) 1211-1217.
- [157] T. F. Santana dos Santos, A. Aquino, H. S. Dórea, S. Navickiene, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 1425-1430.
- [158] A. M. Carro, R. A. Lorenzo, F. Fernández, R. Rodil, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1071 (2005) 93-98.
- [159] S. Bogialli, R. Curini, A. Di Corcia, M. Nazzari, R. Samperi, *Anal. Chem.* 75 (2003) 1798-1804.
- [160] S. Bogialli, R. Curini, A. Di Corcia, M. Nazzari, M. Sergi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 1146-1156.
- [161] X. Hu, J. Yu, Z. Yan, L. Ni, Y. Lin, P. Wang, L. Jing, H. Xin, X. Chu, Y. Zhang, *J. AOAC Int.* 87 (2004) 972-985.
- [162] D. Perret, A. Gentili, S. Marchese, M. Sergi, L. Caporossi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 1989-1994.
- [163] S. Grujic, M. Radisic, T. Vasiljevic, M. Lausevic, *Food Addit. Contam.* 22 (2005) 1132-1137.
- [164] M. Radišić, S. Grujić, T. Vasiljević, M. Laušević, *Food Chem.* 113 (2009) 712-719.
- [165] N. Furusawa, *J. Chromatogr. Sci.* 44 (2006) 498-503.
- [166] M. S. S. Curren, J. W. King, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 2175-2180.
- [167] M. S. S. Curren, J. W. King, *J. Chromatogr. A* 954 (2002) 41-49.
- [168] T. Bajer, M. Adam, L. Galla, K. Ventura, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 122-127.
- [169] H. Yan, F. Qiao, K.-H. Row, *Anal. Chem.* 79 (2007) 8242-8248.
- [170] L. Guo, M. Guan, C. Zhao, H. Zhang, *Anal. Bioanal. Chem.* 392 (2008) 1431-1438.
- [171] N. Furusawa, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 2004-2007.
- [172] J. Cai, Y. Gao, X. Zhu, Q. Su, *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (2005) 869-874.
- [173] A. Martínez, M. Ramil, R. Montes, D. Hernanz, E. Rubí, I. Rodríguez, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1072 (2005) 83-91.
- [174] M. Ramil Criado, D. Hernanz Fernández, I. Rodríguez Pereiro, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1056 (2004) 187-194.
- [175] Y. Y. Hu, P. Zheng, Y. Z. He, G. P. Sheng, *J. Chromatogr. A* 1098 (2005) 188-193.
- [176] V. I. Valsamaki, V.I. Boti, V.A. Sakkas, T. A. Albanis, *Anal. Chim. Acta* 573-574 (2006) 195-201.
- [177] Y. Y. Hu, P. Zheng, Z. X. Zhang, Y. Z. He, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 4126-

4130.

- [178] P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, *Anal. Chem.* 79 (2007) 1675-1681.
- [179] S. C. Cunha, J. O. Fernandes, M. Beatriz, P. P. Oliveira, *Talanta* 73 (2007) 514-522.
- [180] H. S. Dorea, F. M. Lanças, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 367-375.
- [181] M. Navarro, Y. Picó, R. Marián, J. Manes, *J. Chromatogr. A* 968 (2002) 201-209.
- [182] A. Garrido Frenich, P. Plaza Bolanos, J. L. Martínez Vidal, *J. Chromatogr. A* 1153 (2007) 194-202.
- [183] K. Kishida, N. Furusawa, *J. Chromatogr. A* 937 (2001) 49-55.
- [184] K. Kishida, N. Furusawa, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 26 (2003) 2931-2939.
- [185] A. Ziacova, E. Brandsteterova, E. Blahova, *J. Chromatogr. A* 983 (2003) 271-275.
- [186] A. L. Dawidowicz, D. Wianowska, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 1155-1159.
- [187] D. Martins Teixeira, C. Teixeira da Costa, *J. Chromatogr. A* 1062 (2005) 175-181.
- [188] M. J. Ruiz, A. M. Camean, I. M. Moreno, Y. Picó, *J. Chromatogr. A* 1073 (2005) 257-262.
- [189] L. Ramos, E. M. Kristenson, U. A. T. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 3-29.
- [190] S. Morales-Muñoz, J. L. Luque-García, M. D. Luque de Castro, *Anal. Chim. Acta* 557 (2006) 278-286.
- [191] S. Bogialli, G. D'Ascenzo, A. Di Corcia, A. Laganà, G. Tramontana, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 794-800.
- [192] L. Pensado, M. C. Casais, M. C. Mejuto, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1077 (2005) 103-109.
- [193] S. A. Barker, *J. Chromatogr. A* 880 (2000) 63-68.
- [194] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, P. Revilla-Ruiz, J. Hernández-Méndez, *J. Chromatogr. A* 1089 (2005) 1-17.
- [195] A. Kot-Wasik, A. Wasik, *Anal. Chim. Acta* 543 (2005) 46-51.
- [196] A. Garrido Frenich, J. L. Martínez Vidal, A.D. Cruz Sicilia, M. J. González Rodríguez, P. Plaza Bolanos, *Anal. Chim. Acta* 558 (2006) 42-52.
- [197] J. L. Gómez-Ariza, M. Bujalance, I. Giráldez, A. Velasco, E. Morales, *J. Chromatogr. A* 946 (2002) 209-219.
- [198] P. Canosa, D. Pérez-Palacios, A. Garrido-López, M. T. Tena, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1161 (2007) 105-112.
- [199] J. J. Ramos, C. Dietz, M. J. González, L. Ramos, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 254-261.
- [200] J. Tolls, M. Haller, D. T. H. M. Sjim, *Anal. Chem.* 71 (1999) 5242-5247.

## 2. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS

---

- [201] J. Tolls, R. Samperi, A. Di Corcia, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 314-320.
- [202] A. I. Valenzuela, R. Lorenzini, M. J. Redondo, G. Font, *J. Chromatogr. A* 839 (1999) 101-107.
- [203] A. I. Valenzuela, Y. Picó, G. Font, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14 (2000) 572-577.
- [204] P. C. Abhilash, S. Jamil, N. Singh, *J. Chromatogr. A* 1176 (2007) 43-47.
- [205] M. Fernández, Y. Picó, J. Mañes, *J. Chromatogr. A* 871 (2000) 43-56.
- [206] J. Blesa, J. M. Soriano, J. C. Molto, R. Marin, J. Mañes, *J. Chromatogr. A* 1011 (2003) 49-54.
- [207] Z.-Y. Li, Z.-C. Zhang, Q.-L. Zhou, C.-S. Zhu, Q.-M. Wang, R.-Y. Gao, Q.-S. Wang, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 521-528.
- [208] A. Zafra, M. del Olmo, B. Suárez, E. Hontoria, A. Navalón, J. L. Vilchez, *Water Res.* 37 (2003) 735-742.
- [209] M. del Olmo, A. Zafra, B. Suárez, A. González-Casado, J. Taoufiki, J. Vilchez, *J. Chromatogr. B* 817 (2005) 167-172.
- [210] T. Hayama, H. Yoshida, S. Onimaru, S. Yonekura, H. Kuroki, K. Todoroki, H. Nohta, M. Yamaguchi, *J. Chromatogr. B* 809 (2004) 131-136.
- [211] K. Inoue, S. Yoshida, S. Nakayama, R. Ito, N. Okanouchi, H. Nakazawa, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51 (2006) 503-508.
- [212] R. J. Law, P. Bersuder, C. Allchin, J. Barry, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 2177-2183.
- [213] H. Sambe, K. Hoshina, K. Hosoya, J. Haginaka, *J. Chromatogr. A* 1134 (2006) 16-23.
- [214] J. Tollbäck, C. Crescenzi, E. Dyremark, *J. Chromatogr. A* 1104 (2006) 106-112.
- [215] H. Gallart-Ayala, E. Moyano, M.T. Galceran, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 4039-4048.
- [216] K. Granby, T. S. Cederberg, *Proceedings of the Fourth International Workshop on Brominated Flame Retardants BFR 2007*, Amsterdam, Holanda, 2007.
- [217] K. Worrall, P. Hancock, A. Fernandes, M. Driffield, *Organohalogen Compds.* 69 (2007) 541/1-541/4.
- [218] B. Johnson-Restrepo, D. Adams, K. Kannan, *Chemosphere* 70 (2008) 1935-1944.
- [219] J. de Boer, D. E. Wells, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 364-372.
- [220] E. Blanco, M. C. Casais, M. C. Mejuto, R. Cela, *Capillary Electrophoresis / Phenols*. En: Colin F. Poole and Ian D. Wilson, (Editors-in-Chief) *Encyclopedia of Separation Science, online update*, Oxford: Elsevier Science Ltd. (2007) p. 1-9.

### CAPÍTULO II.3. PARABENOS Y ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO

Dentro de los contaminantes emergentes estudiados en este trabajo de investigación se encuentran los ésteres del ácido *p*-hidroxibenzoico, comúnmente conocidos como parabenos. Aunque la toxicidad de estos compuestos es muy baja, se consideran disruptores endocrinos, pues presentan una actividad estrogénica débil. Estudios recientes han relacionado las exposiciones a estas sustancias a largo plazo con el cáncer de mama.

La actividad antimicrobiana de los parabenos fue descubierta en 1924<sup>[1-2]</sup>. Desde entonces, estos compuestos se han utilizado ampliamente como bactericidas, fungicidas y agentes preservativos de amplio espectro en un gran número de cosméticos, fármacos y productos de cuidado e higiene personal (PPCPs), y alimentos, entre otros productos de consumo. Hoy en día, resulta difícil encontrar en nuestros hogares algún producto de uso cotidiano que no contenga como ingrediente en su formulación química algún parabeno. Lociones hidratantes, geles de baño, champús, cremas de protección solar, pasta dentífrica, espumas de afeitarse, toallitas limpiadoras, etc., productos muy comunes y de uso diario que contienen estas sustancias, y que entran en contacto directo con la piel, no sólo de personas adultas, sino también de bebés (ver figura II.3.1).



**Figura II.3.1.** Productos de cuidado e higiene personal de consumo diario, destinados a adultos y bebés, presentes en un hogar común.

Teniendo en cuenta sus características físico-químicas, y que además son eliminados eficazmente durante los tratamientos en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), los parabenos no deberían ser compuestos de elevada persistencia en el medio ambiente. Sin embargo, estos compuestos se consideran pseudo-persistentes, ya que su continua descarga, especialmente al medio acuático, compensa la rápida eliminación y/o transformación de los mismos, pudiendo ejercer igualmente efectos negativos a corto y largo plazo en el medio ambiente. Por ello, en

### 3. PARABENOS Y ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO

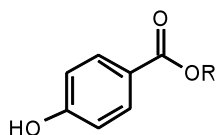
los últimos años ha ido creciendo el interés por el estudio de la presencia de estos compuestos en el medio acuático y sus rutas de transporte.

Existen abundantes referencias bibliográficas relacionadas con la determinación de los parabenos en cosméticos, PPCPs y alimentos. Sin embargo, pocos son los métodos desarrollados para su análisis en muestras medioambientales, y en consecuencia, apenas existe información sobre su presencia y distribución en el medio ambiente.

Una parte del trabajo de investigación que se recoge en esta memoria se ha centrado en el desarrollo de un procedimiento analítico basado en la extracción en fase sólida (SPE) y posterior determinación mediante electroforesis capilar en medio no acuoso (NACE) para el análisis del ácido *p*-hidroxibenzoico (PHBA) y un grupo de parabenos en muestras de aguas superficiales y residuales (capítulos IV.2.2 y IV.2.3). A continuación se presenta una revisión bibliográfica como introducción a la problemática del uso de los parabenos y el interés de su estudio, y que resume la metodología analítica más reciente.

#### 3.1. DEFINICIÓN, ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

Se conoce comúnmente (comercialmente) con el nombre de parabenos a la serie homóloga de los ésteres del ácido *p*-hidroxibenzoico (o ácido 4-hidroxibenzoico), o lo que es lo mismo, los derivados *p*-hidroxibenzoatos. La estructura química general de estos compuestos se muestra en la figura II.3.2, donde R representa a un grupo alquilo (metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, heptilo) o arilo (bencilo). Entre los más conocidos se incluyen metilparaben (MePB), etilparaben (EtPB), propilparaben (PrPB) y butilparaben (BuPB), aunque existen otros derivados como isopropilparaben (iPrPB), isobutilparaben (iBuP), heptilparaben (HpPB), bencilparaben (BnPB), y sus sales sódicas.



Ácido *p*-hidroxibenzoico (PHBA)  $\Rightarrow$  R= H

Parabenos  $\Rightarrow$  R= Me, Et, Pr, iPr, Bu, iBu, Bn

**Figura II.3.2.** Estructura química general de los parabenos.

Los parabenos son sólidos cristalinos, incoloros, poco volátiles y lipofílicos, aunque relativamente solubles en agua en un amplio rango de pH<sup>[3]</sup>. Se trata de compuestos químicamente estables, relativamente poco tóxicos<sup>[4,6]</sup>, y que presentan una fuerte absorción a la radiación ultravioleta (UV)<sup>[3]</sup>. En la tabla II.3.1 se recogen información y las principales propiedades o características físico-químicas de los compuestos objeto de estudio.

**Tabla II.3.1:** Propiedades físico-químicas del ácido *p*-hidroxibenzoico y de los parabenos considerados en este estudio.

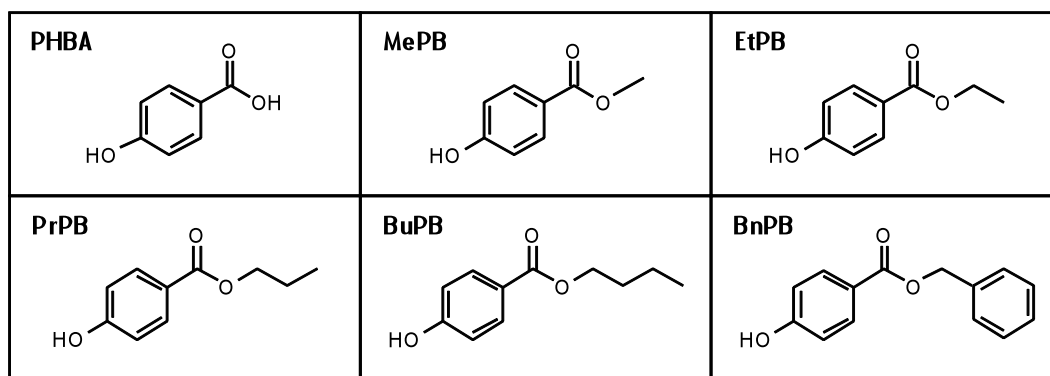
Compuesto	Abrev.	N° CAS	Fórmula molec.	P <sub>m</sub>	pK <sub>a</sub> <sup>(a)</sup>	log K <sub>ow</sub> <sup>[11-12]</sup>	S (mg·L <sup>-1</sup> ) <sup>(b)</sup>
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	PHBA	99-96-7	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	138.12	pK <sub>a1</sub> : 4.47 <sup>[8]</sup> -4.57 pK <sub>a2</sub> : 8.4 <sup>[9]</sup> -9.2 <sup>[8,10]</sup>	1.58 <sup>(a)</sup>	5000
Metilparaben	MePB	99-76-3	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	152.15	8.17 <sup>[1]</sup> - 8.30	1.96	2500
Etilparaben	EtPB	120-47-8	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	166.17	8.22 <sup>[1]</sup> -8.30	2.47	885
Propilparaben	PrPB	94-13-3	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	180.20	8.23-8.35 <sup>[1]</sup>	3.04	500
Butilparaben	BuPB	94-26-8	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	194.23	8.22-8.37 <sup>[1]</sup>	3.57	207
Bencilparaben	BnPB	94-18-8	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	228.24	8.18	3.64 <sup>(a)</sup>	100

K<sub>ow</sub>: Coeficiente de partición octanol-agua; S: solubilidad en agua

<sup>(a)</sup> Datos calculados usando Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software Solaris V4.67 (© 1994-2009 ACD/Labs)<sup>[7]</sup>.

<sup>(b)</sup> Solubilidad a 25 °C<sup>[13]</sup>.

En la figura II.3.3 se muestran sus estructuras moleculares. Como puede observarse en la figura, estos compuestos tan sólo difieren entre sí por el sustituyente de su grupo éster, manteniendo todos ellos el grupo fenólico en su estructura.

**Figura II.3.3.** Estructuras moleculares del PHBA y los parabenos considerados.

La actividad antimicrobiana de los parabenos incrementa con el tamaño de la cadena carbonada del grupo éster<sup>[14]</sup> (ver figura II.3.3), mientras que, por el contrario, su solubilidad en agua va disminuyendo<sup>[4,15]</sup> (ver tabla II.3.1).

En concentraciones entre 0.05% y 0.2% en peso, los parabenos son conservantes efectivos frente al crecimiento de hongos, tales como mohos y levaduras, de bacterias Gram positivas, y en menor grado, de bacterias Gram negativas como *Salmonella*, *Escherichia Coli*, y algunas pseudomonas<sup>[1]</sup>. Comparativamente, el MePB es más eficaz contra mohos, mientras que el PrPB lo es contra levaduras. Pueden complementarse

### 3. PARABENOS Y ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO

con otros agentes de protección microbiológica con efectos especiales contra los organismos Gram negativos.

#### 3.2. PRODUCCIÓN Y APLICACIONES

Todos los parabenos utilizados comercialmente son producidos sintéticamente, aunque algunos de ellos son idénticos a los encontrados en la naturaleza. Estos compuestos se obtienen por esterificación del PHBA con el correspondiente alcohol, empleando medio ácido como catalizador del proceso<sup>[1]</sup>.

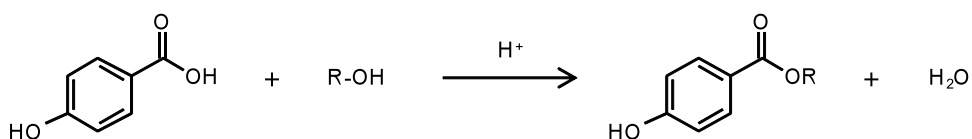


Figura II.3.4. Reacción de síntesis de los parabenos.

A su vez, el PHBA se sintetiza industrialmente a través de la reacción de *Kolbe-Schmitt* modificada, usando fenóxido de potasio, rubidio o cesio, y dióxido de carbono<sup>[16-18]</sup> (ver figura II.3.5). Sin embargo, la alta presión y elevada temperatura del proceso de carboxilación, junto con el bajo rendimiento de la reacción, hacen que se trate de una síntesis relativamente cara a escala industrial.

En términos de producción industrial, MePB, EtPB, PrPB y PHBA aparecen en las listas de sustancias químicas de bajo volumen de producción (*low volume production chemicals*, LVPC). Así, son producidos y/o importados en la Unión Europea (EU) en cantidades entre 10 y 1000 Ton/año. El resto de los parabenos se producen en cantidades menores<sup>[19]</sup>.

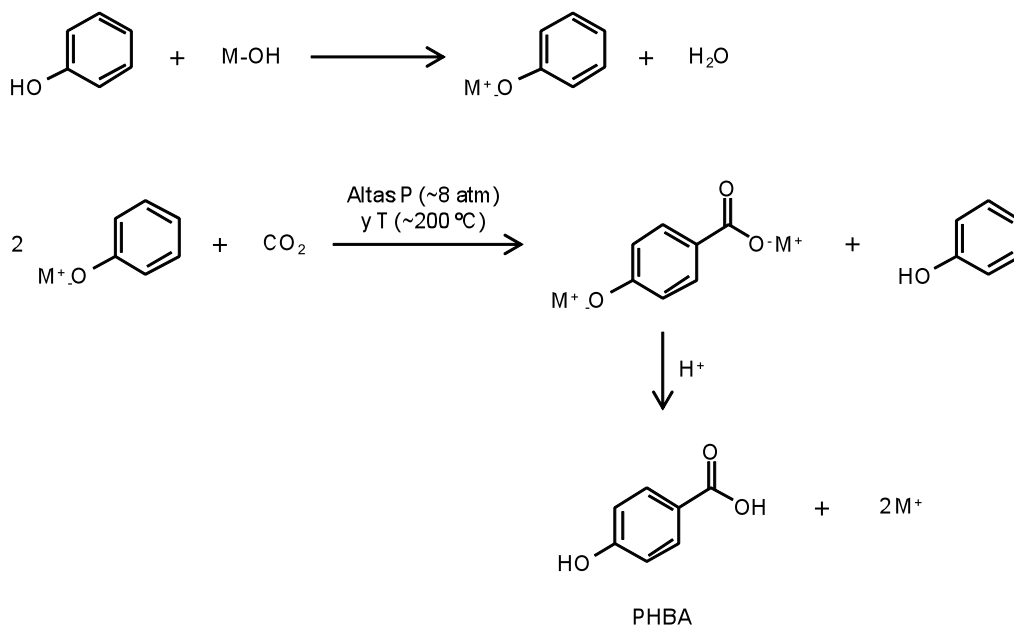


Figura II.3.5. Reacción de síntesis del PHBA.

Los parabenos inhiben el desarrollo de microorganismos dañinos y prolongan así la vida útil de diversos cosméticos, fármacos y PPCPs<sup>[4,14,20-21]</sup>. A pesar de que su efectividad como agentes antimicrobianos aumenta con el tamaño del grupo éster, en la práctica MePB y PrPB son los parabenos más usados por su mayor solubilidad en agua<sup>[1,5,9]</sup>. Habitualmente, se utilizan combinaciones de dos o más parabenos, o mezclas de diferentes agentes preservativos, por su efecto sinérgico, lo que incrementa la eficacia de resistencia del sistema a contaminaciones microbianas<sup>[4,22]</sup>. Los parabenos MePB, EtPB, PrPB, iPrPB, BuPB y iBuPB aparecen incluidos en el Diccionario Japonés de Ingredientes de Cosméticos (*Japan Cosmetic Ingredients Dictionary*, o JCID), que autoriza el uso de estos seis preservativos de forma individual o en combinaciones en los productos cosméticos<sup>[6]</sup>.

El popular y recurrente uso de estos preservativos en cosméticos y otros artículos de perfumería viene dado por su estabilidad química, su baja toxicidad y su amplio espectro de actividad antimicrobiana. Además, no producen decoloración, son biodegradables, están aceptados legalmente en todo el mundo, y presentan un bajo coste<sup>[5,23]</sup>. Así, en 1984 se estimó el uso de los parabenos en unos 13200 productos cosméticos diferentes<sup>[14]</sup>. Más adelante, en un estudio realizado en 1995 con 215 cosméticos<sup>[24]</sup>, se encontró que los parabenos estaban presentes en un 77% de productos de aclarado y enjuague (*rinse-off*) y en un 99% de productos de aplicación sin aclarado (*leave-on*). En investigaciones más recientes<sup>[19,25]</sup>, se ha detectado su presencia, principalmente de MePB y PrPB, en la mayoría de los análisis de cosméticos para el cuidado del cuerpo, incluyendo desodorantes, cremas y lociones.

### 3. PARABENOS Y ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO

En los fármacos, los parabenos se utilizan para prevenir o inhibir el crecimiento de microbios que pueden causar riesgo de infección en los pacientes, o la descomposición del propio producto<sup>[26]</sup>, por ejemplo, en jarabes, supositorios, píldoras, complejos vitamínicos, colirios y anestésicos, entre otros<sup>[19]</sup>.

Los parabenos se usan en muchos países como aditivos para la conservación de bebidas y comidas procesadas. Al contrario que otros conservantes alimentarios, que solamente son eficaces a pH ácido, su principal ventaja radica en su comportamiento prácticamente independiente del pH en un rango muy amplio, pues no poseen grupos fácilmente ionizables (se mantienen sin disociar a valores de pH elevados). Los derivados sódicos son más fáciles de manejar, y se transforman en parabenos en el seno de los alimentos.

**Tabla II.3.2:** Códigos de los parabenos y sus derivados sódicos en la lista de aditivos alimentarios de la Unión Europea.

Compuesto	Código EU
<i>p</i> -hidroxibenzoato de etilo (EtPB)	E 214
derivado sódico del <i>p</i> -hidroxibenzoato de etilo	E 215
<i>p</i> -hidroxibenzoato de propilo (PrPB)	E 216
derivado sódico del <i>p</i> -hidroxibenzoato de propilo	E 217
<i>p</i> -hidroxibenzoato de metilo (MePB)	E 218
derivado sódico del <i>p</i> -hidroxibenzoato de metilo	E 219

Estos conservantes tienen un cierto olor y sabor fenólico característico, especialmente el MePB con su ligero olor picante (incluso a dosis menores de los límites legales), lo que limita su uso como aditivos en los alimentos. Se utilizan fundamentalmente para la protección de derivados cárnicos (especialmente los tratados por el calor), conservas vegetales y productos grasos, repostería, y en salsas de mesa. Asimismo, también se emplean en relleno de pasteles, gelatinas, refrescos, bebidas alcohólicas, jugos, zumos de frutas, mermeladas, aderezos, ensaladas, jaleas en edulcorantes artificiales, y en la cerveza (derivado heptilado)<sup>[1,19]</sup>.

Los parabenos también se han empleado, aunque en menor medida, en productos de uso doméstico e industrial, tales como papel de cocina, film transparente de polietileno para conservación y almacenaje de alimentos, juguetes viscosos, detergentes y otros limpiadores domésticos, colorantes textiles, pinturas de base acuosa o *spray*, lacas, barnices, pegamentos, aceites, pesticidas para embalsamamiento de animales, medicamentos de veterinaria, productos de cuidado de mascotas<sup>[19]</sup>, entre otros.

En cuanto a la legislación aplicable a estos compuestos, las Directivas 76/768/EC y 95/17/EC<sup>[27]</sup> que regulan los productos cosméticos en la EU permiten el uso de los parabenos (y sus sales) con una concentración máxima individual de 0.4% (peso/peso, p/p), y una concentración total de 0.8% (p/p), ambas expresadas como PHBA. Por otro lado, aunque no aparecen regulados, el contenido máximo en alimentos

se ha establecido en un 0.1% (p/p), mientras que en fármacos, la cantidad de parabenos no suele exceder el 1% (p/p)<sup>[1]</sup>.

### 3.3. DISTRIBUCIÓN Y PRESENCIA EN EL MEDIOAMBIENTE

Algunos parabenos se encuentran de forma natural en las plantas y sus frutos, por ejemplo, en la canela, el arándano, la frambuesa, el pomelo y la ciruela pasa<sup>[1]</sup> en donde actúan como agentes antimicrobianos. También se han encontrado parabenos en el vino blanco, el zumo de la fruta de la pasión, e incluso se ha descubierto que el MePB es uno de los componentes principales de las feromonas en los perros<sup>[1,28]</sup>.

Debido a su uso indiscriminado como agentes preservativos en productos de consumo humano, los parabenos aparecen ampliamente distribuidos en el medio ambiente. Muchos cosméticos, PPCPs, alimentos y productos de limpieza doméstica, entre otros, pueden contribuir a la introducción directa de los parabenos en el medio ambiente. Por ejemplo, los geles de baño, los champús, los desodorantes, las cremas, y las pastas de dientes, entre otros, se utilizan diariamente en diversas actividades de higiene y cuidado personal. Debido a la continua liberación de estos productos a través de la descarga de aguas de recreo, aguas grises (aguas desecho de lavadoras, lavavajillas, ducha, etc.) y residuales domésticas (excreción de fármacos metabolizados a través de la orina), efluentes hospitalarios, aguas residuales urbanas e industriales (desechos de procesos de fabricación)<sup>[19,29]</sup>, los parabenos pueden alcanzar el medio ambiente, especialmente los ecosistemas acuáticos<sup>[30-38]</sup>, y en particular, las fuentes de agua potable. Por otro lado, los vertidos directos de productos que contienen los parabenos en sus formulaciones, como jabones y detergentes, o la deposición de residuos alimentarios, animales (utilización de fármacos en veterinaria) o industriales<sup>[35]</sup>, también contribuyen, aunque en menor medida, a la presencia de los parabenos en los distintos compartimentos medioambientales.

Teniendo en cuenta sus características físico-químicas (ver tabla II.3.1), y que además se eliminan eficazmente durante los tratamientos en las EDAR, los parabenos no deberían ser compuestos de elevada persistencia en el medio ambiente. Sin embargo, estos compuestos se consideran pseudo-persistentes, ya que su continua descarga, especialmente al medio acuático, compensa la rápida eliminación y/o transformación de los mismos, pudiendo ejercer igualmente efectos negativos a corto y largo plazo en el medio ambiente. Por ello, recientemente el estudio de la presencia de estos compuestos en el medio acuático, así como sus rutas de transporte, han recibido una particular atención. Algunas investigaciones han confirmado la presencia de los parabenos y PHBA en aguas de río<sup>[12,31,35-37,39-40]</sup>, de piscina<sup>[37-38,41]</sup>, y residuales tratadas (efluente)<sup>[12,31-32,34,36-37,42]</sup> a concentraciones de  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ . En agua residual sin tratar (influyente)<sup>[12,32-34,36-38,43]</sup>, estos niveles aumentan hasta alcanzar los  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . En la tabla II.3.3 se resumen los datos de concentraciones de los compuestos considerados en este estudio, encontrados en las referencias bibliográficas consultadas relacionadas con el análisis de muestras reales de agua.

### 3. PARABENOS Y ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO

**Tabla II.3.3:** Concentraciones de parabenos y PHBA encontradas en muestras reales de agua. Las matrices se han ordenado de menor a mayor grado de complejidad.

Tipo de matriz	Procedencia	Concentración detectada (ng·L <sup>-1</sup> )						Ref.
		PHBA	MePB	EtPB	PrPB	BuPB	BnPB	
Río	Bélgica	---	85.1	53.8	78.4	---	n.d.	[31]
Río	China	---	<LOQ-1062	---	5-3142	n.d.	---	[40]
Río	Reino Unido	---	2-48	0.2-8	<LOQ	<LOQ	---	[35]
Río	Reino Unido	---	<0.3-400	<0.5-15	<0.2-24	<0.3-52	---	[39]
Río	Reino Unido	---	<LOQ-10	6-13	6-7	<LOQ	---	[12]
Río	España	---	1.8-17.3	<LOQ-3.0	1.0-69	1.0-7.0	<LOQ	[36]
Río	España	---	<LOQ	<LOQ	<LOQ-23.8	<LOQ-54.1	---	[37]
Río	España	---	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	---	[38]
Agua de piscina	Japón	---	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	28	[41]
Agua de piscina	España	---	<LOQ	<LOQ	32.3	77.5	---	[37]
Agua de piscina	España	---	<LOQ	<LOQ	<LOQ	13.7	---	[38]
Efluente	Canadá	---	20-30	<10	<10-40	<10-10	---	[32]
Efluente	Bélgica	---	2.1	n.d.	3.1	---	n.d.	[31]
Efluente	Reino Unido	---	<LOD	50	63	<LOD	---	[12]
Efluente	España	---	n.d.	n.d.	n.d.-64	n.d.	n.d.	[34]
Efluente	España	---	<LOQ-1.5	<LOQ	<LOQ	<LOQ-3.6	<LOQ	[36]
Efluente	España	---	<LOQ	<LOQ	14.0	<LOQ	---	[37]
Efluente	España	---	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOQ	---	[38]
Efluente	Suecia	---	n.d.-300	<100-200	<100-300	---	n.d.-1000	[42]
Efluente industrial	Bélgica	---	3.9	n.d.	6.1	---	n.d.	[31]
Efluente hospitalario	España	---	65-2400	n.d.-100	180-1220	n.d.-19	n.d.	[34]
Aguas grises	Dinamarca	1000	2600	600	---	---	---	[43]
Influente	Canadá	---	100-1470	20-270	200-2430	20-260	---	[32]
Influente	Reino Unido	---	2642	1036	1393	52	---	[12]
Influente	España	---	60-1888	<LOD	670-12960	<LOD	---	[33]
Influente	España	---	430-2920	52-210	230-810	20-86	n.d.	[34]
Influente	España	---	1926-5138	452-549	4.6-1302	83.6-181	<LOQ	[36]
Influente	España	---	<LOQ	199	2640	344	---	[37]
Influente	España	---	<LOQ	<LOQ	2784	318	---	[38]

---: no analizado; n.d.: no detectado; <LOD: por debajo del límite de detección; <LOQ: por debajo del límite de cuantificación

Como puede observarse en la tabla II.3.3, MePB y PrPB son los parabenos detectados a concentraciones más altas en la mayoría de las muestras analizadas. Esto se corresponde con su uso preferente como agentes preservativos en los productos de consumo en comparación con otros parabenos, y con la creciente tendencia a emplear combinaciones de parabenos (junto con otros conservantes) como sistema de preservación más efectivo por su efecto sinérgico<sup>[31]</sup>.

En aguas de río, se han detectado normalmente concentraciones de parabenos inferiores a  $86 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (en muestras procedentes de Gales, en algún caso se han encontrado hasta  $400 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  de MePB<sup>[39]</sup>), excepto en China<sup>[40]</sup>, donde los niveles de MePB y PrPB alcanzan los  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Mientras que en las aguas residuales efluentes generalmente los niveles de parabenos no superan los  $300 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ , en las muestras de efluente hospitalario e influente, las concentraciones máximas encontradas de MePB y PrPB son de  $5.1$  y  $13.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente. Por otro lado, en Dinamarca se han llegado a detectar hasta  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de PHBA y  $2.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de MePB en aguas grises<sup>[43]</sup>.

Algunos autores han afirmado que la principal fuente de contaminación de las aguas naturales en Gales son los efluentes de salida de las plantas de tratamiento de aguas residuales<sup>[34-35]</sup>, dado que han observado un incremento de las concentraciones de parabenos en aguas de río recogidas en puntos de muestreo posteriores a la incorporación del efluente de salida de las depuradoras. Sin embargo, en otros estudios realizados en Canadá<sup>[32]</sup> y España<sup>[34,36-38]</sup> se ha demostrado la alta eficacia de los tratamientos de depuración de las EDAR, donde se consigue la eliminación prácticamente total de los parabenos en las aguas residuales, encontrándose concentraciones bajas de estos compuestos en las muestras de efluente analizadas, con valores cercanos e incluso por debajo de los límites de detección (LOD) (ver tabla II.3.3). De acuerdo con esto, Peng y col.<sup>[40]</sup> han comprobado que en China la principal fuente de emisión de los parabenos encontrados en las aguas de río analizadas (hasta  $1.1$  y  $3.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para MePB y PrPB, respectivamente) son las descargas, vertidos y/o fugas de aguas residuales domésticas, y no así los efluentes de los centros hospitalarios ni de las EDAR.

Dado su carácter lipofílico moderado (especialmente de los compuestos más pesados, ver  $\log K_{ow}$  en tabla II.3.1), su estabilidad química y su alta pseudo-persistencia en el medio ambiente, los parabenos pueden quedarse adsorbidos a la materia sólida. Así, por ejemplo, se han encontrado parabenos a bajas concentraciones en sedimentos de río y rías, y en suelos forestales y destinados a la agricultura, de diferentes zonas de España<sup>[22]</sup>. Las concentraciones más altas correspondieron a MePB y PrPB, entre  $0.59$  y  $6.35 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ , aunque también se han detectado trazas de iPrPB, BuPB y BnPB. Hasta el momento, todavía no se ha investigado la presencia de estos compuestos en lodos residuales procedentes de plantas de depuración de agua residual.

También, probablemente teniendo como origen el uso de productos de consumo, tales como desodorantes y lacas en *spray*, o los vertidos de PPCPs líquidos, los parabenos han sido detectados en muestras de aire de atmósferas interiores y polvo doméstico<sup>[44-47]</sup>. Así, en un estudio realizado con muestras de aire y polvo de 120 hogares del noreste de Estados Unidos, se encontraron concentraciones de MePB, EtPB

### 3. PARABENOS Y ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO

---

y BuPB por encima de  $1 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-3}$  en aire y  $0.2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  en polvo, siendo mayoritario el MePB, en unos rangos entre  $2.9\text{-}21 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-3}$  y  $0.98\text{-}8.24 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectivamente<sup>[44]</sup>. En España, también se han detectado MePB, EtPB, PrPB y BuPB en muestras de polvo doméstico, aunque en menor concentración<sup>[46-47]</sup>.

#### 3.4. EXPOSICIÓN Y TOXICIDAD

Como se ha visto anteriormente (en la sección 3.2 del presente capítulo), los parabenos se utilizan ampliamente como bactericidas y agentes preservativos en una gran diversidad de productos de consumo, dada su alta eficacia, su bajo coste y su bajo perfil tóxico. Sin embargo, investigaciones recientes han comenzado a replantearse su toxicidad, y los posibles efectos nocivos que puede ocasionar la exposición continua y a largo plazo a concentraciones bajas de parabenos sobre los seres humanos y el medio ambiente.

Desde los años 50, se han realizado múltiples estudios acerca de la posible toxicidad de los parabenos, demostrándose que estos compuestos son relativamente poco tóxicos, e incluso menos que el PHBA. Algunas investigaciones sobre sus efectos agudos, subcrónicos y crónicos en roedores indican que estos compuestos son prácticamente no tóxicos<sup>[1,28]</sup>. Los parabenos son adsorbidos inmediatamente por el tracto gastrointestinal y la sangre, donde se metabolizan (transformándose principalmente en PHBA y ácido *p*-hidroxihipúrico<sup>[14]</sup>), y son rápidamente excretados por la orina<sup>[28]</sup>, evitándose así su acumulación en el organismo. Aunque no existe una legislación respecto a las dosis a las que se les considera tóxicos, el comité científico de alimentación de la EU ha establecido una ingesta diaria aceptable (*acceptable daily intake*, ADI) de  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  para MePB, EtPB y PrPB, y sus sales sódicas<sup>[48-49]</sup>.

Los parabenos también se adsorben con gran rapidez a través de la piel, donde las carboxilesterasas los hidrolizan a PHBA<sup>[50]</sup>. En individuos alérgicos, pueden provocar irritación de la piel y dermatitis de contacto<sup>[51]</sup>. Ingeridos por personas sensibles, los parabenos causan dermatitis graves o enrojecimiento, inflamación, comezón y dolor de la piel. Algunas de las personas alérgicas a la aspirina también pueden ser sensibles a estos aditivos.

Además, estudios recientes han demostrado que la exposición a los parabenos puede perturbar el desarrollo del sistema endocrino, pues posee una débil actividad estrogénica y hormonal, y por tanto, pueden resultar perjudiciales para la salud humana, los animales y las plantas<sup>[1,50,52]</sup>. Experimentos con animales han demostrado que los parabenos poseen una débil actividad como xenoestrógenos<sup>[53]</sup> (del griego *xenos*, extraño). Así, se sospecha que los parabenos pueden provocar efectos disruptores endocrinos en la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[54]</sup> y el medadas (*Oryzias latipes*, pescado de agua dulce de Japón)<sup>[55]</sup>. Asimismo, en un estudio *in vivo*, se ha comprobado que el efecto del BuPB es 100000 veces menor que el del  $17\beta$ -estradiol (E2), empleado a dosis 25000 veces mayores que las empleadas actualmente para preservar los productos de consumo<sup>[52]</sup>. Dado que el efecto estrogénico está

directamente relacionado con la dosis, a concentraciones normales de uso, el efecto del BuPB es  $2.5 \times 10^9$  veces más débil que el  $17\beta$ -estradiol. Además, se ha observado que la actividad *in vivo* es 3 órdenes de magnitud menor que *in vitro*, probablemente debido a la rápida metabolización de los parabenos.

La actividad estrogénica de los parabenos aumenta con la longitud o ramificación de la cadena del grupo éster<sup>[52,56]</sup>. Por lo tanto, si el BuPB ha mostrado una actividad estrogénica casi despreciable, y se cree que el PrPB es también estrogénico hasta un cierto grado<sup>[57]</sup>, se puede concluir lo mismo para los parabenos más pequeños. Es por ello que la exposición a los niveles de concentración en que se encuentran los parabenos en los productos de consumo o en el medio ambiente no deberían causar efectos nocivos al ser humano<sup>[48,53]</sup>.

En 2004, Darbre y col.<sup>[20]</sup> publicaron los primeros datos relacionados con la presencia de parabenos intactos en tejidos mamarios humanos de 20 individuos afectados por cáncer de mama. El MePB fue el parabeno detectado a mayor concentración, a niveles de hasta  $12.8 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ , lo que puede ser debido al mayor uso de este compuesto en productos cosméticos, o a una mayor tendencia a la adsorción por el tejido. Tras este estudio, diversos autores han propuesto que el uso de parabenos, especialmente en desodorantes y antitranspirantes de aplicación axilar, puede contribuir a la creciente incidencia del cáncer de mama en humanos<sup>[1,20,48]</sup>.

Más recientemente, se ha evaluado su habilidad para penetrar intactos a través de la piel, mediante estudios *in vivo* e *in vitro*<sup>[29]</sup>. En contacto con la piel, los parabenos presentan tendencia a acumularse en la materia grasa de los tejidos humanos debido a sus moderados coeficientes de partición  $K_{ow}$  (ver tabla II.3.1). Así, en estudios realizados con sujetos humanos a los que se les había aplicado una crema conteniendo un 2% de BuPB, se ha confirmado la habilidad de este compuesto para absorberse sistemáticamente mediante aplicaciones tópicas, incrementándose los niveles encontrados en suero, sangre y orina<sup>[58-59]</sup>. Debido tanto a la aplicación dérmica como a la ingestión vía oral, Ye y col. también han detectado la presencia de los parabenos en leche materna<sup>[60]</sup>, suero<sup>[61]</sup> y orina<sup>[62-63]</sup> a niveles de concentración de  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Los estudios mencionados anteriormente han dado lugar a un extenso debate científico acerca del uso continuado de los parabenos como preservativos en productos de consumo, y los efectos nocivos observados en el ser humano por exposiciones prolongadas. A pesar de que la comunidad científica todavía no ha encontrado una relación directa con el cáncer<sup>[48]</sup>, sigue existiendo una cierta controversia acerca de los posibles efectos carcinogénicos y estrogénicos. Al menos, sí parece existir consenso acerca de la insignificancia del efecto estrogénico causado por las dosis normales de parabenos en los productos de consumo en comparación con los estrógenos naturales y otros xenoestrógenos<sup>[52]</sup>. No hay nada concluyente, y el debate sigue abierto.

#### 3.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PARABENOS Y ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO

Debido al creciente interés que han suscitado los componentes de formulaciones de productos cosméticos y PPCPs como contaminantes emergentes en el medio ambiente, ha surgido la necesidad de realizar estudios de distribución, persistencia y bioacumulación de estos compuestos, así como de evaluar sus efectos nocivos en la naturaleza. Por ello, se ha producido un incremento en la demanda de procedimientos analíticos para la extracción, identificación y cuantificación de un amplio rango de sustancias, entre las que se encuentran los parabenos y el PHBA.

Hasta ahora, las investigaciones se habían dirigido fundamentalmente hacia la determinación de estos compuestos directamente en los productos de consumo, centrándose en el análisis multiresiduo de los componentes (ingredientes y/o excipientes) de las formulaciones de cosméticos y PPCPs. Más recientemente, se han desarrollado nuevas metodologías analíticas para evaluar la distribución de los parabenos en el medio ambiente, tanto en matrices acuosas<sup>[12,30-43,64-66]</sup> como en muestras sólidas<sup>[22,44-47]</sup>. A pesar de la creciente tendencia a usarlos en combinación para incrementar su poder antimicrobiano, y de que el PHBA es su principal metabolito y/o producto de degradación<sup>[15,50,67-68]</sup>, siguen siendo escasas las referencias bibliográficas que proponen métodos para la determinación conjunta de los parabenos y el PHBA<sup>[15]</sup>.

A continuación se expone la metodología analítica relacionada con el análisis de los parabenos y el PHBA en muestras de agua, encontrada en la bibliografía consultada. En concreto, se resumen los procedimientos empleados en la preparación de las muestras acuosas (o relacionadas), y las técnicas más habituales de determinación de estos compuestos en todo tipo de matrices. Conviene mencionar aquí que la publicación de algunos de estos estudios, especialmente los referentes a matrices acuosas, son posteriores al trabajo de investigación que se presenta en esta memoria, realizado durante los años 2005-2007 (capítulo IV.2).

##### 3.5.1. PROCEDIMIENTOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA. EXTRACCIÓN, CONCENTRACIÓN Y LIMPIEZA.

Como ya se ha comentado con anterioridad para los bromofenoles y bisfenoles halogenados (sección II.2.6), a la hora de analizar muestras complejas es necesario aplicar un procedimiento de pretratamiento para proporcionar una fracción de muestra concentrada con los analitos, y lo más libre posible de otros componentes de la matriz. La preparación de muestra es una de las etapas más críticas; junto con la popular técnica de SPE, han surgido la extracción líquido-líquido (LLE), la microextracción en fase sólida (SPME) y la microextracción por emulsificación asistida por ultrasonidos (*ultrasound-assisted emulsification-microextraction*, USAEME) como alternativas en el análisis de muestras medioambientales de agua.

Generalmente, los procedimientos para el análisis de los parabenos en muestras de agua emplean la SPE como técnica de extracción y concentración de los analitos. Los fundamentos teóricos de esta técnica ya han sido descritos anteriormente (sección II.2.6.1.2). Como fases sólidas adsorbentes suelen utilizarse sílices funcionalizadas<sup>[30,40,42-43]</sup>, materiales poliméricos de fase inversa<sup>[31,33,36,43,65-66]</sup> y/o intercambiadores iónicos<sup>[12,32,35,39]</sup>.

Así, por ejemplo, se han empleado cartuchos C18 (octadecilsilano)<sup>[30,40]</sup> y Oasis HLB (polimérico de poli(divinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona)<sup>[31,65-66]</sup> para la extracción simultánea de hasta 35 compuestos disruptores endocrinos de muestras de aguas superficiales y residuales, entre otros, algunos parabenos, y diversos estrógenos, fenoles, bisfenoles, fármacos ácidos, pesticidas y benzofenonas. Para evitar la adsorción de los analitos en el material de vidrio utilizado en el proceso de SPE, se añaden a las muestras de agua entre 1%<sup>[30]</sup> y 5%<sup>[31]</sup> de metanol (MeOH) como aditivo. Asimismo, el lavado del cartucho, tras el paso de la muestra, con agua conteniendo entre 5%<sup>[40]</sup> y 30%<sup>[31,65]</sup> de MeOH, y en algunos casos, seguido de una mezcla de MeOH-amoniaco al 2% 10:90 a pH 11.5<sup>[31,65]</sup>, permite eliminar de forma efectiva la mayoría de las interferencias de ácidos húmicos y otra materia orgánica presentes en las muestras medioambientales de agua<sup>[31,65]</sup>. La elución de los analitos retenidos en la fase adsorbente se lleva a cabo empleando MeOH<sup>[66]</sup>, o mezclas de disolventes, tales como MeOH-acetato de etilo 1:1<sup>[40]</sup>, diclorometano-isopropanol 80:20<sup>[30]</sup>, y metil-tert-butil éter-isopropanol 90:10<sup>[31,65]</sup>. Finalmente, tras la elución, en la mayoría de estos casos se realiza una etapa de concentración por evaporación a sequedad y cambio de disolvente a acetato de etilo (AcOEt)<sup>[40]</sup> o agua-acetonitrilo 80:20<sup>[30-31,65]</sup>, para que el extracto final sea compatible con su posterior método de determinación, cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida (LC) acopladas a espectrometría de masas (MS), respectivamente.

Por otro lado, González-Mariño y col.<sup>[36]</sup> han seleccionado los cartuchos Oasis HLB para la extracción y preconcentración de los parabenos (MePB, EtPB, PrPB, iPrPB, BuPB, iBuPB y BnPB), el triclosán y el triclocarbán en muestras de agua de río y residuales. Para la elución de los analitos se emplean 4 mL de MeOH. El extracto se concentra con corriente de nitrógeno a 0.5 mL, y éste se diluye a 1 mL con agua ultrapura, para su posterior determinación mediante LC acoplada a MS en tándem (LC-MS/MS).

Canosa y col.<sup>[33]</sup> también han utilizado los cartuchos Oasis HLB para la extracción y concentración de cuatro parabenos (MePB, EtPB, PrPB y BuPB) y sus productos de halogenación en aguas de grifo y residuales. En este caso, es necesario acidificar las muestras a pH 2.5 para favorecer la retención de los analitos en forma neutra en la fase polimérica. Como eluyente se emplean 2 mL de AcOEt, un disolvente muy adecuado para la subsiguiente etapa de derivatización con N-tert-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA), y su posterior determinación mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

También se han empleado materiales adsorbentes mixtos, compuestos por polímeros de fase apolar e intercambiadores aniónicos (Oasis MAX, con grupos amonio

### 3. PARABENOS Y ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO

---

cuaternario  $N^+R_4$ ) o catiónicos (Oasis MCX, con grupos sulfónicos ácidos<sup>[12,35,39]</sup>), como fases sólidas para la extracción conjunta de hasta más de 50 ingredientes comunes en PPCPs (ácidos orgánicos, fenoles, triclosán y parabenos) de aguas de río<sup>[12]</sup> y residuales<sup>[12,32]</sup>. Las muestras se acidifican a pH 2<sup>[12]</sup> o 3<sup>[32]</sup>, para convertir a los compuestos con grupos fenólicos en su forma neutra. Asimismo, empleando los cartuchos Oasis MAX, tras el paso de la muestra, es necesario realizar un lavado con acetato sódico en agua conteniendo 5% de MeOH. Así, los compuestos más ácidos estarán en su forma aniónica, y quedan retenidos fuertemente en los grupos  $N^+R_4$  del adsorbente<sup>[32]</sup>. En ambos casos, los parabenos se adsorben al material polimérico por interacciones de fase inversa, mientras que la fase de intercambiador iónico se emplea para retener selectivamente a otros disruptores endocrinos analizados. Esto es muy útil cuando se extraen matrices complejas como las aguas residuales<sup>[32]</sup>. Así, los distintos grupos de compuestos se eluyen selectivamente en diferentes fracciones de extracto, lo que posteriormente permite incluso derivatizar los analitos con diferentes reactivos<sup>[32]</sup>. La elución de los parabenos del cartucho Oasis MAX se lleva a cabo con MeOH<sup>[32]</sup>, y para los Oasis MCX, con MeOH conteniendo 5% de disolución acuosa de amoniaco<sup>[12]</sup>. Cuando estos extractos se analizan mediante GC-MS<sup>[32]</sup>, los parabenos se derivatizan con anhídrido del ácido pentafluoropropiónico (*pentafluoropropionic acid anhydride*, PFPA). Para ello, es necesario realizar previamente un cambio de disolvente del extracto de SPE de MeOH a metil-*tert*-butil éter (MTBE) por evaporación, etapa en la que se han observado pérdidas de los analitos, lo que finalmente se consigue evitar añadiendo una pequeña cantidad de acetato sódico.

Por otro lado, Ye y col. han empleado la SPE acoplada en línea con la cromatografía líquida (*on-line* SPE-LC-MS/MS) para la extracción de parabenos (MePB, EtPB, PrPB, BuPB y BnPB), triclosán y otros fenoles en leche materna<sup>[60]</sup>, suero<sup>[61]</sup> y orina<sup>[62-63]</sup>. Las muestras, de entre 100 y 700  $\mu$ L, se bombean con fase móvil 20% MeOH y 80% agua a 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  durante 3 min a través de una columna C18 de 2.5 cm, utilizada como fase adsorbente. Los analitos retenidos en la columna se eluyen hacia la columna cromatográfica de separación empleando la fase móvil 50% MeOH y 50% agua a 0.5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  durante 2 min.

Cabe destacar en este punto que, además de estas aplicaciones en matrices acuosas, la SPE se ha utilizado en algunos procedimientos como técnica de extracción de los parabenos en formulaciones líquidas de PPCPs<sup>[69]</sup> y cosméticos<sup>[70-71]</sup>, e incluso en muestras de aire interior<sup>[44]</sup>. Por ejemplo, Kokolets y col.<sup>[69]</sup> extraen MePB y PrPB de una solución oral, utilizando cartuchos Oasis HLB y la mezcla acetone-tri-*n*-butanol:agua 60:40 como eluyente. También se han empleado cartuchos C18 con muestras de cosméticos y un jarabe<sup>[71]</sup>, eluyendo MePB, EtPB, PrPB y BuPB con MeOH. Por otro lado, Han y col.<sup>[70]</sup> han combinado la SPE en línea con la cromatografía electrocinética micelar (MEKC) para el análisis de MePB, EtPB y PrPB en geles, cremas y lociones, mediante análisis por inyección en flujo-SPE-MEKC. Como fase adsorbente se emplea una columna C8 (octilsilano), y la elución se lleva a cabo con una mezcla 40:60 de tampón 10 mM de tetraborato sódico ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ) a pH 9.3 y etanol.

En otras ocasiones, se ha empleado la técnica SPE para la limpieza de extractos orgánicos de muestras de cosméticos<sup>[6,25]</sup> y PPCPs<sup>[72]</sup>, obtenidos tras su extracción con

disolvente. Las altas concentraciones de los ingredientes activos principales y algunos excipientes enmascaran los bajos niveles de los parabenos presentes en los productos, dificultando su cuantificación. Con la utilización de cartuchos C18<sup>[25]</sup>, Sep-Pak Florisil<sup>[6]</sup>, o intercambiadores catiónicos fuertes (SCX)<sup>[72]</sup>, algunos autores consiguen eliminar estas interferencias de la matriz en la determinación de los parabenos.

Más recientemente se han desarrollado otros métodos de preparación de muestras acuosas, basados en la LLE<sup>[41]</sup>, la SPME<sup>[34,37]</sup> y la USAEME<sup>[38]</sup>, como alternativas a la SPE para el análisis de muestras medioambientales de agua.

Así, Terasaki y col.<sup>[41]</sup> extraen los parabenos (MePB, EtPB, PrPB, iPrPB, BuPB, iBuPB y BnPB) de muestras de agua de piscina mediante LLE, empleando como disolvente de extracción AcOEt. En la recogida de las muestras, por cada 3 L de agua se añade 1 mL de tiosulfato sódico ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) para eliminar el exceso de cloro. Para favorecer el paso de los analitos a la fase orgánica, las muestras de agua de 0.5 L de volumen se ajustan a pH 3 y se añaden 15 g de cloruro sódico (NaCl). Se extraen con 2 fracciones de 100 mL de AcOEt, y los extractos combinados, tras secarse con sulfato sódico ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) anhidro, se evaporan con nitrógeno hasta residuo. Finalmente, se reconstituye el extracto con 1 mL de AcOEt, y los analitos se derivatizan con N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) para su posterior determinación mediante GC-MS.

En el procedimiento basado en SPME desarrollado por Canosa y col.<sup>[34]</sup>, se ha empleado la fibra de poliacrilato (PA) como fase adsorbente polar para la extracción, concentración y derivatización *on-fibre* de cinco parabenos (MePB, EtPB, PrPB, BuPB y BnPB) en muestras de agua de río y residuales. El pH de las muestras, de volumen 10 mL, se ajusta a 6 y se añaden  $150 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de NaCl para favorecer el paso de los analitos a la fase sólida. Tras un tiempo de exposición de 40 min, la fibra se introduce y se mantiene durante 10 min en el espacio de cabeza de otro vial conteniendo MTBSTFA, para que tenga lugar la derivatización *on-fibre* de los analitos, previa a su determinación mediante GC acoplada a MS en tándem (GC-MS/MS). Por otro lado, Regueiro y col.<sup>[37]</sup> han optado por la derivatización *in-situ* con anhídrido acético de parabenos alquilados (MePB, EtPB, PrPB y BuPB), triclosán y fenoles relacionados, que ocurre simultáneamente a la extracción y concentración de estos analitos en muestras de agua de río, de piscina y residuales sobre la fibra divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS). En este caso, el tiempo de exposición a 100 °C al espacio de cabeza de las muestras saturadas con NaCl y agitación se ha reducido a 15 min. Ambos procedimientos están libres de efecto matriz, lo que permite cuantificar la concentración de los analitos mediante calibración externa.

La nueva técnica de microextracción USAEME, recientemente desarrollada por Regueiro y col.<sup>[38]</sup>, también ha sido aplicada satisfactoriamente a la extracción y concentración de los parabenos alquilados (MePB, EtPB, PrPB y BuPB), triclosán y fenoles relacionados de muestras de aguas de río, de piscina y residuales. De nuevo estos autores han considerado la acetilación *in-situ* con anhídrido acético para la derivatización de los analitos. Un volumen de 10 mL de muestra se introduce en un

### 3. PARABENOS Y ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO

---

tubo de fondo cónico de 15 mL, en el que se añaden 0.1 g hidrogenofosfato sódico (NaHPO<sub>4</sub>), 100 µL tricloroetano como disolvente extractante, y 200 µL de anhídrido acético. Para lograr la emulsificación de esta mezcla, el tubo se introduce en baño de ultrasonidos durante 10 min (frecuencia 40 kHz, potencia 100 W). A continuación, la emulsión formada se rompe por centrifugación a 5000 rpm durante 3 min, depositándose una gota de fase orgánica en el fondo del tubo cónico. Esta gota conteniendo los analitos acetilados se transfiere a un vial, utilizando una jeringa de 100 µL, para su posterior determinación mediante GC-MS/MS.

#### 3.5.2. DETERMINACIÓN DE PARABENOS Y ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO

Además de las muestras de agua (matriz de interés en esta memoria de investigación), las referencias que se citan a continuación incluyen también métodos de determinación desarrollados recientemente para el análisis de los parabenos y el PHBA en otras matrices, tales como fármacos, cosméticos y alimentos.

La mayoría de los métodos de determinación de parabenos y PHBA publicados en la bibliografía están basados fundamentalmente en su separación cromatográfica mediante GC<sup>[25,32-34,37-38,40-44,46-47,66]</sup> o LC<sup>[4-6,12,22,25,30-31,35-36,39,65,67-69,73-75,77-86]</sup>. Para el análisis de matrices complejas, como las muestras medioambientales, en las cuales los parabenos están presentes en bajas concentraciones, se requieren sistemas de detección de alta sensibilidad y selectividad. Por ello, en estos casos, los acoplamientos con la MS<sup>[5,25,30,32-33,40-44,66]</sup> o masas en tándem (MS/MS)<sup>[12,22,31,34-39,46-47,65]</sup> son los sistemas de detección más habituales. A continuación se explican con más detalle estos procedimientos.

Todos los métodos encontrados en la bibliografía basados en la separación por GC, tanto para el análisis de los parabenos en muestras medioambientales como en productos de consumo, se basan en la determinación mediante GC-MS<sup>[25,32-33,40-44,66]</sup> o GC-MS/MS<sup>[34,37-38,46-47]</sup>. Normalmente, la fragmentación de los compuestos ionizados tiene lugar en sistemas GC-MS con cuadrupolo<sup>[25,32,40-44,66]</sup>, aunque algunos autores han utilizado las trampas de iones, tanto para GC-MS<sup>[33]</sup> como para GC-MS/MS<sup>[34,37-38,46-47]</sup>. En todos los casos, la ionización de los analitos se lleva a cabo mediante impacto electrónico (EI).

Para la separación mediante GC se emplean columnas capilares con fases conteniendo 5% difenil y 95% dimetilpolisiloxano (HP-5, DB-5, CP-Sil 8<sup>[47]</sup> o Rtx-5Sil MS<sup>[32]</sup>), de 30 m de longitud, con diámetros internos de 0.25 mm, y espesores de fase de 0.25 µm. Sólo en algún caso particular se ha utilizado una fase con 35% difenil y 65% dimetilpolisiloxano (Rtx-35)<sup>[66]</sup>, una longitud de columna de 60 m (para la separación de hasta 137 contaminantes orgánicos)<sup>[42]</sup>, o un diámetro interno de 0.32 mm<sup>[41]</sup>.

En algunos casos, para corregir y compensar la variabilidad del proceso de extracción y/o de la señal cromatográfica, se han utilizado surrogados y/o patrones internos, respectivamente. Así, por ejemplo, Eriksson y col.<sup>[43]</sup> emplearon 4-ácido

fluorobenzoico y 4-cloro-anilina como surrogados, y 2-cloro-4-metil-quinolina como patrón interno. Otros autores han seleccionado también otros compuestos halogenados como surrogado (2,4,6-tribromofenol<sup>[44]</sup>), o como patrón interno (3,4,5-triclorofenol<sup>[44]</sup>). En otros casos, se han usado compuestos marcados isotópicamente, entre ellos, metilparaben-d4 (MePB-d4)<sup>[37-38]</sup>, pireno-d10<sup>[41]</sup>, naftaleno-d8<sup>[42]</sup>, 17β-estradiol-d3 (E2-d3)<sup>[32,40]</sup>, etinilestradiol (EE2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>)<sup>[40]</sup>, y bisfenol A-d16 (BPA-d16)<sup>[32,40]</sup>.

Debido a la polaridad de los parabenos y el PHBA, con grupos hidroxilo en sus estructuras, resulta necesario derivatizarlos previamente a su análisis por GC para convertirlos en compuestos apolares y más volátiles. Esto, a su vez, ayuda a mejorar la forma del pico cromatográfico, y con ello la resolución, así como a incrementar la sensibilidad y selectividad de detección en MS. Como reactivos de derivatización sililados se han utilizado MTBSTFA<sup>[33-34,46-47]</sup>, N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA)<sup>[40]</sup> y el BSTFA<sup>[41,44]</sup>. Empleando la SPME y la USAEME como técnicas de extracción de muestras de agua, se ha comprobado la efectividad tanto de la derivatización *on-fibre*<sup>[34]</sup> con el agente sililante MTBSTFA como de la derivatización *in-situ* con anhídrido acético<sup>[37-38]</sup>, favoreciendo en ambos casos la aplicabilidad de GC a los parabenos. Asimismo, SPME-GC-MS/MS combina la alta selectividad proporcionada por MS/MS con la alta sensibilidad obtenida empleando inyecciones de gran volumen<sup>[76]</sup>.

En otros casos, se ha utilizado el PFFA para formar derivados pentafluoropropionilados de los parabenos<sup>[32]</sup>. Las principales ventajas de los reactivos pentafluorados en comparación con los agentes sililantes son que su reacción es rápida y cuantitativa, y que convierten a los parabenos en derivados estables muy electrofílicos, introduciendo 5 o 10 átomos de flúor para aumentar la sensibilidad y la selectividad en la detección por MS<sup>[32,76]</sup>.

En algunas de estas aplicaciones de GC-MS, se han registrado los espectros de MS en modo barrido (*full-scan*), para la identificación de los parabenos en muestras reales por comparación con los espectros de la librería correspondientes a los analitos derivatizados<sup>[42-43,66]</sup>. Sin embargo, en la mayoría de los casos, se han monitorizado los cromatogramas por iones m/z (masa/carga) seleccionados, esto es, en modo SIM (*single ion monitoring*). Normalmente, el ion más intenso se emplea en la cuantificación, mientras que para la identificación de los compuestos se consideran dos o tres iones característicos más<sup>[32,40-41]</sup>. En la mayoría de los métodos GC-MS/MS<sup>[34,46-47]</sup>, se selecciona como ion precursor [M-57]<sup>+</sup> (ion característico de los derivados sililados con MTBSTFA empleado también en GC-MS en modo SIM<sup>[33]</sup>) para la segunda fragmentación por colisión, y se registran los iones producto obtenidos, esto es, las transiciones en modo MRM (*multiple reaction monitoring*): la transición que da lugar al ion producto más intenso se utiliza para la cuantificación de los analitos, mientras que para su identificación se toman otras dos transiciones más (junto con el tiempo de retención). Las fragmentaciones tienen lugar por sustitución del grupo éster de los parabenos por un hidrógeno, seguido de las pérdidas de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. En el caso concreto del BnPB, tras la pérdida de CO<sub>2</sub> ocurre una reestructuración de la molécula<sup>[34]</sup>.

Aunque no en todos los casos estos compuestos han sido derivatizados. Shen y col.<sup>[25]</sup> analizaron MePB, EtPB, PrPB y BuPB, junto con 7 ftalatos, en productos

### 3. PARABENOS Y ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO

---

cosméticos, empleando como método de determinación GC-MS en modo SIM. La  $m/z$  121 se selecciona para la identificación de los parabenos (en el *screening* de muestras), mientras que para análisis cuantitativo se han considerado además el ion molecular y otros dos iones característicos de cada compuesto.

Para la separación y cuantificación de los parabenos en muestras complejas mediante GC-MS, normalmente serán necesarias la derivatización de los analitos como derivados acetilados, sililados o pentafluoropropionilados, en combinación con los procesos de extracción y limpieza de extractos, y en muchos casos, cambios de disolvente antes de su inyección en el sistema cromatográfico. Estas etapas adicionales suelen ser laboriosas, por tanto, consumen tiempo, son costosas, y además pueden conducir a pérdidas sustanciales de muestra, y por tanto, de sensibilidad.

En contraposición, la cromatografía líquida no requiere derivatización de los analitos polares, y presenta la ventaja adicional de que, normalmente, la preparación de muestra es más simple, y las matrices acuosas pueden manejarse más fácilmente<sup>[30]</sup>. Por ello, es la técnica de determinación preferida para el análisis de los parabenos en muestras complejas, como los productos de consumo y las matrices medioambientales<sup>[12]</sup>.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica ampliamente utilizada para la determinación de los parabenos en muestras de PPCPs, cosméticos y alimentos. Normalmente las condiciones en que se realiza la separación vienen determinadas no sólo por los parabenos y el PHBA, sino también por la presencia de otros ingredientes y/o excipientes en la matriz. En general, suele trabajarse con HPLC en fase inversa, empleando columnas cromatográficas de fase estacionaria de naturaleza apolar, del tipo C18<sup>[6,67-69,73,75,77-84]</sup> y C8<sup>[4,25,74,85]</sup>. Estas columnas cromatográficas suelen tener entre 12.5 y 30 cm de longitud, siendo las de 15 cm<sup>[25,68,75,77,85]</sup> y 25 cm<sup>[6,69,74,80-81]</sup> las más habituales, normalmente con un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$  (también, aunque menos usual, de 3  $\mu\text{m}$ <sup>[25]</sup> y 3.5  $\mu\text{m}$ <sup>[77]</sup>). En algún caso, la columna BDS ciano-propil de 20 cm<sup>[86]</sup> ha proporcionado ventajas respecto a las anteriores, C8 y C18, en términos de menor tiempo de equilibrado, tan sólo 5 min, sin pérdida de resolución en la separación de los parabenos. Como fase móvil suelen utilizarse mezclas de disolventes como MeOH-agua o acetonitrilo-agua, e incluso mezclas triples agua-acetonitrilo-MeOH<sup>[69,77]</sup> o cuaternarias agua-acetonitrilo-MeOH-tetrahidrofurano<sup>[80]</sup>, y flujos entre 0.3 y 1.5 mL/min, normalmente 1 mL/min<sup>[6,25,68,73,79,86]</sup>. Dada la complejidad de alguna de las matrices analizadas, especialmente en los cosméticos, para lograr la separación de los compuestos es necesario trabajar con elución en gradiente<sup>[6,25,73,81,86]</sup>. Para mejorar los perfiles de los picos cromatográficos, y con ello la resolución, y en algunos casos disminuir el tiempo de análisis, suelen añadirse (normalmente a la fase acuosa) aditivos tampones o modificadores, tales como ácido acético<sup>[73]</sup>, acetato sódico<sup>[68,75]</sup> o amónico<sup>[69]</sup>, ácido fosfórico<sup>[77,83-84]</sup>, fosfato sódico<sup>[74,78,86]</sup> o potásico<sup>[79]</sup>, sulfato sódico<sup>[67]</sup>, citrato<sup>[85]</sup>, trietilamina<sup>[68]</sup>, o propanol<sup>[82-83]</sup>, o también surfactantes aniónicos como el dodecil sulfato sódico (SDS)<sup>[82]</sup> o no-iónicos como Brij-35<sup>[83]</sup> para la cromatografía líquida micelar (*micellar liquid chromatography*, MLC).

El sistema de detección empleado habitualmente en la determinación de parabenos en muestras de PPCPs, cosméticos y alimentos es la espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible (UV-vis). Normalmente, se seleccionan longitudes de onda de detección UV, entre 230 y 276 nm, siendo 254 nm<sup>[4,6,67-68,75,77,79-80,82-83]</sup> y 260 nm<sup>[25,73,85]</sup> las más habituales. También se ha utilizado la detección electroquímica (*electrochemical*, EC) amperométrica con electrodo de carbono vitrificado, usando el sistema Ag/AgCl como electrodo de referencia<sup>[84]</sup>. Los cromatogramas EC están libres de interferencias, y la señal es más sensible que para la detección UV. Asimismo, la detección por quimioluminiscencia (*chemiluminescence*, CL)<sup>[4]</sup> ofrece una alternativa sensible y simple para la determinación simultánea de los parabenos en matrices complejas por HPLC, empleando el sistema rodamina 6G-Ce(IV) en medio ácido fuerte. Los parabenos se hidrolizan en medio ácido fuerte, y sus productos se oxidan por el Ce(IV), incrementando la quimioluminiscencia del sistema rodamina 6G-Ce(IV).

Más recientemente, la LC acoplada a MS ha ganado interés en análisis de rutina<sup>[30]</sup> y medioambiental<sup>[31]</sup>. Tanto la LC-MS<sup>[5,30]</sup> como la LC-MS/MS<sup>[12,22,31,35-36,39,65]</sup> poseen adecuadas especificidad y sensibilidad, además de unas mejoradas posibilidades de identificación y cuantificación de los parabenos en matrices complejas, incluso a bajas concentraciones. Los espectros de masas de los iones precursores fragmentados generados por LC-MS/MS proporcionan una herramienta selectiva para la identificación de compuestos desconocidos presentes en el medio ambiente en cantidades traza. En términos de sensibilidad, la disminución del ruido de fondo por la fragmentación específica del ion precursor aislado proporciona un incremento en las relaciones señal/ruido (*signal-to-noise*, S/N), y con ello, menores LODs. Normalmente, el triple cuadrupolo<sup>[5,12,22,35-36,39]</sup> ofrece mejor sensibilidad, pero debido a su mayor coste, en análisis de rutina se prefiere la trampa de iones<sup>[30-31,65]</sup>.

Cuando se analizan los parabenos en muestras medioambientales, y en algún caso en productos cosméticos<sup>[5]</sup>, mediante LC-MS, las columnas cromatográficas C18<sup>[5,12,30-31,35-36,39,65]</sup> y C8<sup>[22]</sup> suelen ser de menor tamaño que las empleadas en HPLC. Su longitud está comprendida entre 5.5 y 25 cm (las más habituales, de 10 cm<sup>[12,31,35-36,39,65]</sup>), y tienen tamaños de partícula de 1.7  $\mu\text{m}$ <sup>[12,35,39]</sup>, 2.7  $\mu\text{m}$ <sup>[36]</sup>, 3  $\mu\text{m}$ <sup>[30-31,65]</sup> y 5  $\mu\text{m}$ <sup>[5,22]</sup>. Como fase móvil se utilizan mezclas agua-MeOH<sup>[5,12,22,35-36,39]</sup> y agua-acetonitrilo<sup>[30-31,65]</sup>, añadiendo, en la mayoría de los casos, modificadores como ácido acético<sup>[12,35,39]</sup>, tributilamina<sup>[35,39]</sup>, disolución acuosa de amoníaco<sup>[12,39]</sup>, acetato amónico<sup>[36]</sup> y formiato amónico<sup>[22,31,65]</sup>, trabajando a flujos más bajos, entre 0.05 y 1.25 mL·min<sup>-1</sup>, y con elución en gradiente.

Normalmente, la ionización de los analitos se lleva a cabo mediante *electrospray* (ESI) en polaridad negativa<sup>[5,12,22,31,35-36,39,65]</sup>. En LC-MS<sup>[5,30]</sup>, los cromatogramas se registran en modo SIM, seleccionando los iones  $[\text{M-H}]^-$  correspondientes a cada uno de los compuestos analizados. Estos mismos iones moleculares son empleados como iones precursores para la segunda fragmentación por colisión en MS/MS<sup>[12,22,31,35-36,39,65]</sup> en modo MRM. En estos casos, los cromatogramas se registran seleccionando los iones producto obtenidos de las transiciones características de cada compuesto: la transición que da lugar al ion producto más intenso se utiliza normalmente para la cuantificación de los analitos<sup>[31,65]</sup>, mientras que para la

### 3. PARABENOS Y ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO

---

identificación de los analitos se toma otra transición más (junto con el tiempo de retención)<sup>[12,22,35,39]</sup>.

Benijts y col.<sup>[30]</sup> realizaron un estudio comparativo de las tres interfases disponibles comercialmente para LC-MS: la ESI, la ionización química a presión atmosférica (APCI), y la nueva ionización con *spray* iónico (*sonic spray ionization*, SSI). Estos autores observaron que los espectros de MS obtenidos con las tres interfases son muy similares, aunque en ESI y SSI existe una mayor tendencia a la formación de clúster de iones con las moléculas de disolvente, lo que produce un aumento de la señal de fondo en *full-scan*. Este ruido químico no afecta a la sensibilidad del método en modo SIM.

En general, la principal limitación de la determinación mediante LC-MS y LC-MS/MS es fundamentalmente la influencia que los componentes coextraídos de la matriz pueden ejercer sobre el proceso de ionización de los analitos, que tiene lugar en las interfases. Este efecto matriz puede provocar tanto la supresión como el incremento de la señal. Así, en ESI los componentes de la matriz compiten con los analitos para acceder a la superficie de las gotas de emisión en fase gas, mientras que en APCI, la precipitación de los analitos, o la coprecipitación con otros componentes no volátiles de la matriz, provoca supresión iónica<sup>[30]</sup>. Además, las interferencias pueden afectar a la reproducibilidad y exactitud del procedimiento, conduciendo a resultados comprometidos o erróneos. Por tanto, en LC-MS es muy importante la eficacia de la etapa de limpieza de los extractos de las muestras y la utilización de un estándar interno adecuado: una buena limpieza se traduce en una menor supresión iónica, mientras que la utilización de estándares marcados conduce a una mayor reproducibilidad de la señal y compensa la variabilidad de la señal debida al efecto matriz<sup>[65]</sup>. En la mayoría de las aplicaciones se emplean surrogados o patrones internos deuterados, tales como 17 $\beta$ -estradiol-d2 (E2-d2)<sup>[30-31,65]</sup>, bisfenol A-d16 (BPA-d16)<sup>[12,35,39]</sup> y MePB-d4<sup>[36]</sup>. Otras opciones para evitar el efecto de supresión iónica han sido, bien dividir el flujo de eluyente de la columna cromatográfica (split 9:1 al MS)<sup>[5]</sup>, o inyectar en modo *diverter*<sup>[31,65]</sup>, de forma que sólo se inyecta la fracción del eluyente que contiene a los analitos, eliminando parte de la matriz al desecho.

Por tanto, las técnicas LC-MS y LC-MS/MS requieren habitualmente limpiezas exhaustivas de los extractos de muestra, así como eluciones en gradiente (lo que implica tiempos de análisis relativamente largos), para la eliminación de las interferencias presentes en las matrices complejas. Estas etapas adicionales consumen tiempo, y con ello, aumentan los costes de los análisis.

En la siguiente tabla II.3.4, se recogen los límites de detección y cuantificación alcanzados con los métodos de determinación GC-MS y LC-MS aplicados al análisis de parabenos en muestras de agua.

**Tabla II.3.4:** Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) instrumentales y del método alcanzados en la determinación de parabenos y PHBA en muestras acuosas, empleando técnicas cromatográficas de separación.

Método	Parabenos analizados	Lím. Instrumentales		Límites Método		Ref.
		LOD (ng·mL <sup>-1</sup> )	LOQ (ng·mL <sup>-1</sup> )	LOD (ng·L <sup>-1</sup> )	LOQ (ng·L <sup>-1</sup> )	
SPE-GC-MS	MePB, PrPB, BuPB	0.5-2.5		0.1-0.5		[40]
SPE-GC-MS	MePB, EtPB, PrPB, BuPB		1.5-5		3-10	[33]
SPE-GC-MS	MePB, EtPB, PrPB, BuPB	10		10		[32]
LLE-GC-MS	MePB, EtPB, PrPB, BuPB, BnPB		10-15		10-15	[41]
SPME-GC-MS/MS	MePB, EtPB, PrPB, BuPB			4.0-17		[37]
SPME-GC-MS/MS	MePB, EtPB, PrPB, BuPB, BnPB		0.1-1.0		1-25	[34]
USAEME-GC-MS/MS	MePB, EtPB, PrPB, BuPB			3.9-16.4		[38]
SPE-LC-MS	MePB, EtPB, PrPB, BnPB	1.7-2		3.4-4.0		[30]
SPE-LC-MS/MS	MePB, EtPB, PrPB, BnPB	0.5-1.25	2.5-5	0.2-0.5	1-2	[31]
SPE-LC-MS/MS	MePB, EtPB, PrPB, BuPB, BnPB		0.02-0.08		0.05-1.11	[36]
SPE-UPLC-MS/MS	MePB, EtPB, PrPB, BnPB			0.1-0.2	0.3-0.5	[35,39]
SPE-UPLC-MS/MS	MePB, EtPB, PrPB, BnPB				0.3-4	[12]

UPLC: cromatografía líquida ultrarrápida

La electroforesis capilar representa una alternativa muy atractiva a las técnicas de separación cromatográficas, dada su simplicidad, alta eficacia de separación, selectividad, sencilla instrumentación, bajo consumo de disolventes, baja producción de desechos, y bajo coste. Recientemente se han empleado diferentes modos de electroforesis capilar (CE), tales como electroforesis capilar de zona (CZE)<sup>[26,67,71,73,81,87-88]</sup>, MEKC<sup>[3,21,70,89-90]</sup>, cromatografía electrocinética de microemulsión (*microemulsion electrokinetic chromatography*, MEEKC)<sup>[9,89,91-92]</sup>, o electrocromatografía capilar (CEC)<sup>[15,93]</sup>, para la separación de los parabenos en cosméticos, PPCPs y alimentos. Hasta el momento de la realización del trabajo de investigación presentado en esta memoria de tesis, la única aplicación de la NACE se ha desarrollado para la determinación de MePB y PrPB en un producto farmacéutico, empleando carbonato de propileno como disolvente del medio de separación (BGE) y bromuro de tetradecilamonio como aditivo<sup>[94]</sup>.

### 3. PARABENOS Y ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO

---

En la tabla II.3.5 se resumen los métodos de determinación de parabenos y/o PHBA basados en la electroforesis capilar encontrados en la bibliografía consultada. En todos los casos la detección de los analitos se lleva a cabo por espectrofotometría de absorción UV-vis. Para mejorar la linealidad y/o la precisión en la respuesta, en ocasiones se han empleado patrones internos<sup>[3,9,26,70-71]</sup>. No se han encontrado trabajos de investigación referentes al análisis de estos compuestos en muestras medioambientales mediante técnicas electroforéticas.

En todos los casos, el SDS es el surfactante utilizado en MEKC para formar las micelas, mientras que en MEEKC se emplea como aditivo para estabilizar la dispersión de las gotas de aceite<sup>[89]</sup>. La separación de los parabenos no ionizados se basa en su reparto entre la fase micelar que se mueve electrocinéticamente y la fase acuosa que se mueve por acción del flujo electroosmótico (EOF)<sup>[21]</sup>.

Tal y como puede observarse en la tabla II.3.5, la técnica de concentración en línea conocida como concentración de muestra con campo amplificado y eliminación de matriz (LVSS) ha sido combinada eficazmente con MEKC acoplada a detección UV para la determinación de parabenos neutros en medio ácido<sup>[21]</sup>, alcanzando unos LODs entre 0.041 y 0.054  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 300 veces menores que con MEKC con inyección normal. En estas condiciones se mejora la sensibilidad y la resolución.

Aunque para compuestos neutros como los parabenos normalmente se emplean métodos MEKC, donde se forman micelas en el seno de la disolución de electrolito, también se ha aplicado el modo más sencillo de CE, la CZE, basado en la ionización de los analitos en presencia de un tampón básico, sin adición de ningún tipo de aditivo. De esta forma, los analitos se mueven a través del capilar bajo la influencia del EOF, y su velocidad es función de su masa y carga. Por lo tanto, como los parabenos tienen unos valores de pKa muy similares (ver tabla II.3.1), sus velocidades de migración en CZE dependerán fundamentalmente de su tamaño. En estas condiciones, parece que el acetonitrilo (AcN) añadido como modificador de la disolución tampón<sup>[81]</sup> aumenta la movilidad electroforética y mejora las diferencias entre las movilidades de los analitos.

**Tabla II.3.5:** Métodos de determinación de parabenos y PHBA basados en la electroforesis capilar encontrados en la bibliografía

Técnica	Matriz	Parabenos analizados	Capilar ( $L_e/L_{eff}$ , i.d.)	Electrolito	Otras condiciones	$\lambda$ (nm)	LODs ( $ng \cdot mL^{-1}$ )	Ref.
CZE-UV	Alimentos	EtPB, PrPB, BuPB	---	20 mM $NaB_4O_7$ pH 9.65	---	200	---	[87]
CZE-UV	Cosméticos	MePB, EtPB, PrPB, BuPB	70/63 cm y 75 $\mu m$	15 mM $NaB_4O_7$ pH 9.2 con 15% MeOH	40 °C, 20 kV, inyección 2.5 s (15 nL)	295	160-210	[73]
CZE-UV	Cosméticos	MePB, EtPB, PrPB, BuPB	96/60 cm y 75 $\mu m$	30 mM $NaB_4O_7$ pH 9.18 con 5% ACN	30 °C, 25 kV, inyección 1 s (45.88 nL)	255	21-29	[81]
CZE-UV	Fármacos	PHBA, MePB	64.5/56 cm y 50 $\mu m$	20 mM borato pH 10	25 °C, 22 kV, inyección 5 s a 50 mbar	275, 300	130, 3800	[67]
CZE-UV	Fármacos	PHBA, MePB, PrPB IS: bencil alcohol	60/52 cm y 75 $\mu m$	Borato pH 8.4 (50 o 100 mM $H_3BO_3$ se ajusta con NaOH)	20 °C, 25 kV, inyección 10 s	214	500	[26]
CZE-UV	Cosméticos y fármacos	MePB, EtPB, PrPB, BuPB IS: moxoflazin	75/50 cm y 75 $\mu m$	20 mM $NaB_4O_7$ pH 9 con 10% MeOH	20 kV, inyección 10 s	200	260-560	[71]
CZE-UV	Fármacos, cosméticos y alimentos	MePB, EtPB, PrPB, BuPB	57/50 cm y 75 $\mu m$	35 mM $NaB_4O_7$ pH 10	20 °C, 25 kV, inyección 5 s	294	650-920	[88]
MEKC-UV	Cosméticos	MePB, EtPB, PrPB IS: BuPB	70/40 cm y 50 $\mu m$	20 mM $NaB_4O_7$ pH 9.3 y 100 mM SDS	15 kV, inyección 20 s a 6 kV	254	5040-6800	[70]

**Tabla II.3.5 (continuación):** Métodos de determinación de parabenos y PHBA basados en la electroforesis capilar encontrados en la bibliografía

Técnica	Matriz	Parabenos analizados	Capilar (L <sub>t</sub> /L <sub>eff</sub> , i.d.)	Electrolito	Otras condiciones	λ (nm)	LODs (ng·mL <sup>-1</sup> )	Ref.
MEKC-UV	Cosméticos	MePB, EtPB, PrPB, BuPB	58.5/50 cm y 50 μm	50 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 2.28 y 100 mM SDS con 1% MeOH	35 °C, -30 kV, inyección 1 s a 50 mbar	210	11100-14400	[21]
LVSS-MEKC-UV	Cosméticos	MePB, EtPB, PrPB, BuPB	58.5/50 cm y 50 μm	50 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 2.28 y 150 mM SDS con 1% MeOH	25 °C, -20 kV, inyección 30 s a 50 mbar	210	41-54	[21]
MEKC-UV	Fármacos	MePB, PrPB IS: EtPB	31.2/21 cm y 50 μm	10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> y 40 mM SDS pH 6.1	25 °C, 30 kV, inyección 10 s a 0.1 psi (3.5 nL)	200	---	[3]
MEKC-UV	Fármacos	PHBA, MePB, EtPB, PrPB, BuPB	72/50 cm y 50 μm	Fosfato pH 7 y 10 mM SDS con 15% etanol	45 °C, 30 kV, inyección 3 s (9 nL)	200	610-780	[90]
MEKC-UV	Cosméticos y fármacos	MePB, EtPB, PrPB, BuPB	50.2/40 cm y 50 μm	100 mM bórax y 40 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> pH 9, y 20 mM SDS	25 °C, 25 kV, inyección 3 s a 0.5 psi	200	40-770	[89]
MEEKC-UV	Cosméticos y fármacos	MePB, EtPB, PrPB, BuPB	31.2/21 cm y 50 μm	89.3% borato pH 9.5, 3.3% SDS, 6.6% butanol y 0.8% octano	34 °C, 11 kV, inyección 3 s a 0.5 psi	200	130-1490	[89]

**Tabla II.3.5 (continuación): Métodos de determinación de parabenos y PHBA basados en la electroforesis capilar encontrados en la bibliografía**

Técnica	Matriz	Parabenos analizados	Capilar ( $L_t/L_{\text{eff}}$ , i. d.)	Electrolito	Otras condiciones	$\lambda$ (nm)	LODs ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Ref.
MEEKC-UV	Fármacos	MePB, EtPB, PrPB	30/22 cm y 50 $\mu\text{m}$	89.27% 10 mM $\text{NaB}_4\text{O}_7$ pH 9.5, 3.31% SDS, 6.61% butanol y 0.81% octano	40 °C, 15 kV, inyección 3 s a 0.1 psi (2 nL)	200	---	[91-92]
MEEKC-UV	Fármacos	PHBA, MePB, EtPB, PrPB, BuPB IS: 4-hidroxiacetofenona	32/21 cm y 50 $\mu\text{m}$ , celda de burbuja (x3)	89.27% 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 2.1, 3.31% SDS, 6.61% butanol y 0.81% octano	40 °C, -11 kV, inyección 3 s a 20 mbar	200	0.1% *	[9]
CEC-UV	Alimentos	EtPB, PrPB, BuPB	33/21 cm, fase estacionaria monolítica polimérica de éster de metacrilato	Fase móvil: 5 mM fosfato y AcN 35:65 pH 3	25 °C, 25 kV, inyección 2 s a 5 kV	200	1080-1760	[93]
CEC-UV	Cosméticos y fármacos	PHBA, MePB, EtPB, PrPB, BuPB, BnPB	31/8 cm y 75 $\mu\text{m}$ , fase estacionaria C18 de 5 $\mu\text{m}$	Fase móvil: 50 mM formiato amónico pH 3 con 65% AcN	25 °C, -30 kV, inyección 0.5 min a -12 bar	195	400-500	[15]

$L_t$ : longitud total;  $L_{\text{eff}}$ : longitud efectiva; i. d.: diámetro interno;  $\lambda$ : longitud de onda; IS: patrón interno (*internal standard*)

\* Estos valores se han expresado tal como aparecen en la literatura. Los autores no proporcionan datos suficientes para el cálculo de LODs en  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

### 3. PARABENOS Y ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO

---

Además de los métodos de CE ya descritos, por otro lado, Bodor y col.<sup>[95]</sup> analizaron PHBA, MePB, EtPB, PrPB y BuPB mediante isotacoforesis (*isotacophoresis*, ITP) en cosméticos y alimentos, utilizando un chip de poli(metilmacrilato) provisto de dos canales de separación acoplados en el sistema y sensores de detección en columna (*on-column*) por conductividad. Como sistema electrolítico se han empleado 10 mM de cloruro como anión precedente, 10 mM de β-alanina a pH 10 como anión terminal, 1,3-bis[tris(hidroximetilamino)]propano (BTP) como contraión en ambos casos, y 0.2% metilhidroxietilcelulosa (MHEC) (peso/volumen, p/v) a pH 9.5 como supresor del EOF. En este caso, la separación tiene lugar básicamente por sus diferencias en los valores de pK<sub>a</sub>. Para conseguir una buena repetibilidad, es necesario conservar la disolución de electrolito en un desecador, para minimizar las distorsiones producidas por las variaciones en la concentración del carbonato.

### **BIBLIOGRAFÍA**

- [1] M. G. Soni, I. G. Carabin, G. A. Burdock, *Food Chem. Toxicol.* 43 (2005) 985-1015.
- [2] *Van Nostrand's Encyclopedia of Chemistry*, fifth ed., John Wiley & Sons, Inc., 2005.
- [3] B. Baalbaki, M.-D. Blanchin, H. Fabre, *Anal. Chim. Acta* 463 (2002) 15-20.
- [4] Q. Zhang, M. Lian, L. Liu, H. Cui, *Anal. Chim. Acta* 537 (2005) 31-39.
- [5] M.-R. Lee, C.-Y. Lin, Z.-G. Li, T.-F. Tsai, *J. Chromatogr. A* 1120 (2006) 244-251.
- [6] Y. Maeda, M. Yamamoto, K. Owada, S. Sato, T. Masui, *J. Chromatogr.* 410 (1987) 413-418.
- [7] Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software Solaris V4.67 (© 1994-2009 ACD/Labs), Chemical Abstracts Service (CAS), American Chemical Society, Washington DC, 2009.
- [8] H. Miklultz, D. Keller, F. Lopez Holguin, R. Woloszczak, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 1191-1195.
- [9] P.-E. Mahuzier, K. D. Altria, B. J. Clark, *J. Chromatogr. A* 924 (2001) 465-470.
- [10] V. S. Kurakina, O. M. Medvedeva, S. G. Dimitrienko, O. A. Shpigun, *Vestnik Moskovskogo Universiteta Seriya 2 Khimiya* 45 (2004) 124-130.
- [11] C. Hansch, A. Leo, *Exploring QSAR. Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology.*, ACS Professional Reference Book, American Chemical Society, Washington DC (1995).

- [12] B. Kasprzyk-Hordern, R. M. Dinsdale, A. J. Guwy, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 1293-1308.
- [13] R.-M. Dannenfelser, S. H. Yalkowski, *Sci. Total Environ.* 109-110 (1991) 625-628.
- [14] R. L. Elder, *J. Am. Coll. Toxicol.* 3 (1984) 147-209.
- [15] A. De Rossi, C. Desiderio, *Electrophoresis* 23 (2002) 3410-3417.
- [16] A. Lindsey, H. Jeskey, *Chem. Rev.* 57 (1957) 583-620.
- [17] Z. Marković, S. Marković, N. Manojlović, J. Predojević-Simović, *J. Chem. Inf. Model* 47 (2007) 1520-1525.
- [18] Z. Marković, S. Marković, *J. Chem. Inf. Model* 48 (2008) 143-147.
- [19] E. Eriksson, H. R. Andersen, A. Ledin, *J. Hazard. Mater.* 156 (2008) 240-259.
- [20] P. D. Darbre, A. Aljarrah, W. R. Miller, N. G. Coldham, M. J. Sauer, G. S. Pope, *J. Appl. Toxicol.* 24 (2004) 5-13.
- [21] S. He, Y. Zhao, Z. Zhu, H. Liu, M. Li, Y. Shao, Q. Zhuang, *Talanta* 69 (2006) 166-171.
- [22] L. Núñez, J. L. Tadeo, A. I. García-Valcárcel, E. Turiel, *J. Chromatogr. A* 1214 (2008) 178-182.
- [23] P. Guadarrama, S. Fomine, R. Salcedo, A. Martínez, *Biophys. Chem.* 137 (2008) 1-6.
- [24] S. C. Rastogi, A. Schouten, N. de Kruijf, J. W. Weijland, *Contact Dermatitis* 32 (1995) 28-30.
- [25] H.-Y. Shen, H.-L. Jiang, H.-L. Mao, G. Pan, L. Zhou, Y.-F. Cao, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 48-54.
- [26] M. Jaworska, Z. Szulinska, M. Wilk, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 137-143.
- [27] EU Cosmetics Directive 76/768/EEC. The Council Directive 76/768/EC (1976) and the Comission Directive 95/17/EC. [www.leffingwell.com/cosmetics/vol\\_1en.pdf](http://www.leffingwell.com/cosmetics/vol_1en.pdf)
- [28] M. G. Soni, S. L. Taylor, N. A. Greenberg, G. A. Burdock, *Food Chem. Toxicol.* 40 (2002) 1335-1373.
- [29] P. D. Darbre, P. W. Harvey, *J. Appl. Toxicol.* 28 (2008) 561-578.
- [30] T. Benijts, W. Günther, W. Lambert, A. De Leenheer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 1866-1872.
- [31] T. Benijts, W. Lambert, A. De Leenheer, *Anal. Chem.* 76 (2004) 704-711.
- [32] H.-B. Lee, T. E. Peart, M. L. Svodoba, *J. Chromatogr. A* 1094 (2005) 122-129.
- [33] P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, N. Negreira, R. Cela, *Anal. Chim. Acta* 575 (2006) 106-113.
- [34] P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, M. H. Bollain, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1124 (2006) 3-10.

### 3. PARABENOS Y ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO

---

- [35] B. Kasprzyk-Hordern, R. M. Dinsdale, A. J. Guwy, *Talanta* 74 (2008) 1299-1312.
- [36] I. González-Mariño, J. B. Quintana, I. Rodríguez, R. Cela, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 1756-1766.
- [37] J. Regueiro, E. Becerril, C. García-Jares, M. Llompart, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4693-4702.
- [38] J. Regueiro, M. Llompart, E. Psillakis, J. C. García-Monteagudo, C. García-Jares, *Talanta* 79 (2009) 1387-1397.
- [39] B. Kasprzyk-Hordern, R. M. Dinsdale, A. J. Guwy, *Water Res.* 42 (2008) 3498-3518.
- [40] X. Peng, Y. Yu, C. Tang, J. Tan, Q. Huang, Z. Wang, *Sci. Total Environ.* 397 (2008) 158-166.
- [41] M. Terasaki, M. Makino, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 88 (2008) 911-922.
- [42] N. Paxéus, *Water Res.* 30 (1996) 1115-1122.
- [43] E. Eriksson, K. Auffarth, A.-M. Eilersen, M. Henze, A. Ledin, *Water SA* 29 (2003) 135-146.
- [44] R. A. Rudel, D. E. Camann, J. D. Spengler, L. R. Korn, J. G. Brody, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 4543-4553.
- [45] R. A. Rudel, L. J. Perovich, *Atmos. Environ.* 43 (2009) 170-181.
- [46] P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, *Anal. Chem.* 79 (2007) 1675-1681.
- [47] P. Canosa, D. Pérez-Palacios, A. Garrido-López, M. T. Tena, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1161 (2007) 105-112.
- [48] P. W. Harvey, D. J. Everett, *J. Appl. Toxicol.* 24 (2004) 1-4.
- [49] P. W. Harvey, P. Darbre, *J. Appl. Toxicol.* 24 (2004) 167-176.
- [50] D. Pugazhendhi, G. S. Pope, P. D. Darbre, *J. Appl. Toxicol.* 25 (2005) 301-309.
- [51] J. E. Nagel, J. T. Fuscaldo, P. Fireman, *JAMA* 237 (1977) 1594-1595.
- [52] E. J. Routledge, J. Parker, J. Odum, J. Ashby, J. P. Sumpter, *Toxicol. Appl. Pharm.* 153 (1998) 12-19.
- [53] J. R. Byford, L. E. Shaw, M. G. Drew, G. S. Pope, M. J. Sauer, P. D. Darbre, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 80 (2002) 49-60.
- [54] K. L. Pedersen, S. N. Pedersen, L. B. Christiansen, B. Korsgaard, P. Bjerregaard, *Pharmacol. Toxicol.* 86 (2000) 110-113.
- [55] M. Inui, T. Adachi, S. Takenaka, H. Inui, M. Nakazawa, M. Uedaa, H. Watanabe, C. Mori, T. Iguchi, K. Miyatake, *Toxicology* 194 (2003) 43-50.
- [56] R. Golden, J. Gandy, G. Vollmer, *Crit. Rev. Tox.* 35 (2005) 435-458.
- [57] A. L. Cashman, E. M. Warshaw, *Dermatitis* 16 (2005) 55-56.
- [58] N. R. Janjua, G. K. Mortensen, A. M. Anderson, B. Kongshoj, N. E. Skakkebaek, H. C. Wulf, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 5564-5570.

- [59] N. R. Janjua, H. Frederiksen, N. E. Skakkebaek, H. C. Wulf, A. M. Anderson, *Int. J. Androl.* 31 (2008) 118-130.
- [60] X. Ye, A. M. Bishop, L. L. Needham, A. M. Calafat, *Anal. Chim. Acta* 622 (2008) 150-156.
- [61] X. Ye, L. J. Tao, L. L. Needham, A. M. Calafat, *Talanta* 76 (2008) 865-871.
- [62] X. Ye, L. Z. Kuklenyik, A. M. Bishop, L. L. Needham, A. M. Calafat, *J. Chromatogr. B* 844 (2006) 53-59.
- [63] X. Ye, A. M. Bishop, J. A. Reidy, L. L. Needham, A. M. Calafat, *Environ. Health Perspect.* 114 (2006) 1843-1846.
- [64] A. M. Peck, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 907-939.
- [65] T. Benijts, R. Dams, W. Lambert, A. De Leenheer, *J. Chromatogr. A* 1029 (2004) 153-159.
- [66] M. Grung, R. Lichtenthaler, M. Ahel, K.-E. Tollefsen, K. Langford, K. V. Thomas, *Chemosphere* 67 (2007) 108-120.
- [67] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch, M. A. Romero, *J. Chromatogr. B* 751 (2001) 29-36.
- [68] D. Kollmorgen, B. Kraut, *J. Chromatogr. B* 707 (1998) 181-187.
- [69] M. X. Kokoletsi, S. Kafkala, M. Tsiaganis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 763-767.
- [70] F. Han, Y.-Z. He, C.-Z. Yu, *Talanta* 74 (2008) 1371-1377.
- [71] U. D. Uysal, T. Güray, *J. Anal. Chem.* 63 (2008) 982-986.
- [72] C. Rebbeck, R. Hammond, J. Wong, L. Nair, N. Raghavan, D. Hepler, W. Campbell, R. Lynn, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 32 (2006) 1095-1102.
- [73] L. Labat, E. Kummer, P. Dallet, J. P. Dubost, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000) 763-769.
- [74] J.-E. Belgaied, H. Trabelsi, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 991-998.
- [75] B. Saad, Md. F. Bari, M. I. Saleh, K. Ahmad, M. K. M. Talib, *J. Chromatogr. A* 1073 (2005) 393-397.
- [76] M. C. Pietrogrande, G. Basaglia, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 1086-1094.
- [77] T. A. M. Msagati, T. Barri, N. Larsson, J. A. Jönsson, *Int. J. Cosmetic Sci.* 30 (2008) 297-307.
- [78] R. Hájková, P. Solich, M. Pospíšilová, J. Šícha, *Anal. Chim. Acta* 467 (2002) 91-96.
- [79] M. J. Akhtar, S. Khan, I. M. Roy, I. A. Jafri, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 1609-1613.
- [80] M. Borremans, J. Van Looco, P. Roos, L. Goeyens, *Chromatographia* 59 (2004) 47-53.

### 3. PARABENOS Y ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO

---

- [81] S.-P. Wang, C. L. Chang, *Anal. Chim. Acta* 377 (1998) 85-93.
- [82] J. F. Nogueira-Orti, R. M. Villanueva-Camanas, G. Ramis-Ramos, *J. Chromatogr. Sci.* 37 (1999) 83-87.
- [83] N. Memon, M. I. Bhangar, M. Y. Khuhawer, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 635-638.
- [84] S. H. Kang, H. Kim, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 1359-1364.
- [85] D. M. Kreuz, A. L. Howard, D. Ip, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19 (1999) 725-735.
- [86] E. Sottofattori, M. Anzaldi, A. Balbi, G. Tonello, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18 (1998) 213-217.
- [87] T. Fujii, S. Kawabe, *Kawasaki J. Medical Welfare* 7 (2001) 33-41.
- [88] C. Cruces Blanco, A. Segura Carretero, L. Gálvez Mata, A. Fernández Gutiérrez, *Chromatographia* 53 (2001) 414-418.
- [89] H.-Y. Huang, Y.-C. Lai, C.-W. Chiu, J.-M. Yeh, *J. Chromatogr. A* 993 (2003) 153-164.
- [90] R. Driouich, T. Takayanagi, M. Oshima, S. Motomizu, *J. Chromatogr. A* 903 (2000) 271-278.
- [91] K. D. Altria, *Chromatographia* 49 (1999) 457-464.
- [92] K. D. Altria, *J. Chromatogr. A* 844 (1999) 371-386.
- [93] H.-Y. Huang, C.-W. Chiu, I.-Y. Huang, J.-M. Yeh, *Electrophoresis* 25 (2004) 3237-3246.
- [94] J. Tjørnelund, S. H. Hansen, *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 475-482.
- [95] R. Bodor, M. Žúborova, E. Ölvecká, V. Madajová, M. Masár, D. Kaniansky, B. Stanislawski, *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 802-809.

## **EXPERIMENTAL**

---

---



En este capítulo se recogen los medios experimentales empleados para la realización de los distintos trabajos de investigación incluidos en la presente memoria. En concreto, se especifican los reactivos y patrones comerciales, utilizados, así como el material, y sus protocolos de limpieza y acondicionamiento. Se indica también de forma general la preparación de las disoluciones de trabajo, así como la recogida de las muestras analizadas y el modo en que se ha realizado la contaminación de las mismas por adición de los analitos considerados. Finalmente, se resumen los cálculos de parámetros relacionados con la optimización de las separaciones electroforéticas desarrolladas.

Más adelante, en el capítulo IV dedicado a la exposición y discusión de los resultados, se especifican para cada caso particular cuáles han sido los patrones empleados, las muestras analizadas y su pretratamiento, la técnica de extracción, los equipos instrumentales, y las condiciones de medida utilizadas.

## **1. PATRONES Y REACTIVOS**

### **1.1. REACTIVOS, GASES Y DISOLVENTES GENERALES**

- **AGUA:** Agua ultrapura (Milli-Q)
- **DISOLVENTES:** Acetato de etilo (AcOEt), acetona, acetonitrilo (AcN), diclorometano (DCM), isopropanol, n-hexano, y metanol (MeOH), todos ellos de grado gradiente HPLC o similar (Merck). Metanol y acetona, grado AnalR NORMAPUR (VWR) para lavado del material. Dimetilsulfóxido (DMSO) grado gradiente HPLC (Aldrich).
- **GASES:** Nitrógeno 99.999% (generador de nitrógeno Nitrox Mini y Carburos Metálicos)
- **ÁCIDOS Y BASES:** Ácido acético glacial para análisis (Merck). Ácido clorhídrico 36% (Prolabo). Ácido fórmico 95-97% (Aldrich). Ácido sulfúrico 96% (AnalytiCals Carlo Erba). Hidróxido sódico en lentejas para análisis, 98% (Merck).
- **ELECTROLITOS:** Tetraborato sódico decahidratado para análisis 99.5% (Merck). Tris(hidroximetil)aminometano (Tris base) (Aldrich).
- **SALES:** Sulfato sódico anhidro 99% (Panreac).
- **OTROS:** Jabón Extran MA 03 alcalino exento de fosfatos (Merck).

### III. EXPERIMENTAL

---

#### 1.2. PATRONES COMERCIALES

- **BROMOFENOL Y BISFENOL HALOGENADOS:** 2-Bromofenol 98% (2-BrP), 2,4-dibromofenol 95% (2,4-DiBP), 2,4,6-tribromofenol 99% (2,4,6-TriBP), pentabromofenol 96% (PeBP), tetrabromobisfenol A 97% (TBBPA), tetraclorobisfenol A 98% (TCBPA), 2-bromo-4-metilfenol 96% (2-Br-4-MeP), y 4-bromo-3-metilfenol 99% (4-Br-3-MeP) (Aldrich). 2,6-Dibromofenol >97% (2,6-DiBP) (Fluka).
- **OTROS FENOLES:** Fenol 99%, bisfenol A 97% (BPA), 4-nonilfenol tech. (4-NonylP), 3-clorofenol 98% (3-CP), 4-clorofenol 99% (4-CP), 2,3-diclorofenol 98% (2,3-DiCP), 2,5-diclorofenol 98% (2,5-DiCP), 2,6-diclorofenol 99% (2,6-DiCP), 3,4-diclorofenol 99% (3,4-DiCP), 3,5-diclorofenol 97% (3,5-DiCP), 2,3,5-triclorofenol 99% (2,3,5-TriCP), 2,4,5-triclorofenol 99% (2,4,5-TriCP), pentaclorofenol 99% (PeCP), 2,4-dimetilfenol 98% (2,4-DiMeP), 2-nitrofenol 99% (2-NP), 4-nitrofenol 99% (4-NP), y 2,4-dinitrofenol 97% (2,4-DiNP) (Aldrich). 2,4-Diclorofenol 98% (2,4-DiCP), y 2-metil-4,6-dinitrofenol 98% (2-Me-4,6-DiNP) (Merck). 2,3,4-Triclorofenol 99% (2,3,4-TriCP), 2,3,6-triclorofenol 99% (2,3,6-TriCP), 2,4,6-triclorofenol 99% (2,4,6-TriCP), 2,3,4,6-tetraclorofenol 99% (2,3,4,6-TetraCP), y 2,3,5,6-tetraclorofenol 99% (2,3,5,6-TetraCP) (Riedel-de Hæn). 2,3,4,5-Tetraclorofenol 99% (2,3,4,5-TetraCP) (Supelco).
- **PARABENOS:** Ácido *p*-hidroxibenzoico 99% (PHBA), *p*-hidroxibenzoato de metilo 99% (metilparaben, MePB), *p*-hidroxibenzoato de etilo 99% (etilparaben, EtPB), *p*-hidroxibenzoato de propilo 99% (propilparaben, PrPB), *p*-hidroxibenzoato de butilo 99% (butilparaben, BuPB), y *p*-hidroxibenzoato de bencilo 98% (bencilparaben, BnPB) (Fluka).

## 2. INSTRUMENTACIÓN Y MATERIAL

### 2.1. MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO

- **AGITACIÓN:** Agitador magnético (Raypa). Barras agitadoras recubiertas de politetrafluoroetileno (PTFE o teflón) de dimensiones 20x6 y 40x8 mm (VWR). Vórtex ZX3 (Velp Scientifica).
- **BALANZAS:** Balanza analítica de precisión BP 211D, y balanza granatario BP 310S (Sartorius).
- **CONCENTRACIÓN Y EVAPORACIÓN:** Estación de concentración por corriente de nitrógeno Turbo-Vap II (Zymark). Mini-Vap de 6 puertos (Supelco). Generador de nitrógeno Mini (Nitrox).

- **FILTRACIÓN:** Equipo de filtración a vacío: kitasato y placa de filtración. Filtros de membrana (diámetro 47 mm) de ésteres de celulosa de tamaño de poro 5  $\mu\text{m}$  (SMWP) y 0.45  $\mu\text{m}$  (HAWP), y Durapore de 0.22  $\mu\text{m}$  (GVHP) (Millipore); Filtros de jeringa (diámetro 25 mm) Durapore Millex de 0.45  $\mu\text{m}$  (SLHV) (Millipore); Filtros de jeringa (diámetro 13 mm) Durapore Millex de 0.22  $\mu\text{m}$  (GV) (Millipore). Jeringas de polietileno y polipropileno Omnifix® de 1 mL (B| Braun), y de 2, 5 y 10 mL (BD Discardit II).
- **INSTRUMENTACIÓN GENERAL DE LABORATORIO:** Baño de ultrasonidos 3000513 (P-Selecta). Bomba de vacío Aspirator A-3S (Eyela). Congelador (-18 °C o inferior). Desecador. Estufa (100 °C o superior). Nevera (4 °C o inferior). Pipetas automáticas fijas de 10, 20, 25, 50, 100, 200, 250, 500 y 1000  $\mu\text{L}$ , y variables de 20-200  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$  y 1-10 mL (Brand, Kartell, Eppendorf).
- **MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO:** Material de vidrio de uso común en el laboratorio: vasos de precipitados, matraces aforados, probetas, pipetas, vidrios de reloj, etc. Espátulas de plástico y metálicas. Soportes y pinzas. Recipientes y botes de plástico. Botellas de vidrio ámbar de 2.5 L.
- **MEDIDA DE pH:** Medidor de pH Metrohm 654 con electrodo de membrana de vidrio (Crison), calibrado con disoluciones tampón acuosas de pH 4.01, 7.02 y 9.21 (Hamilton). Papel indicador de pH 1-14 (Albet).
- **SISTEMA DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE):** Cartuchos SPE Oasis HLB 60 mg y 3  $\text{cm}^3$  (Waters). Conexiones y conducciones realizadas en tubos de PTFE y silicona de diferentes diámetros, entre 2 y 8 mm. Fritas de vidrio.
- **SISTEMA DE EXTRACCIÓN DE DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA (MSPD):** Adsorbentes SPE: C18 (silica gel funcionalizada con grupos octadecilo) (carga de carbono 9-12%), Florisil (malla 60-100), y alúmina (óxido de aluminio) neutra activada (malla 150) (Aldrich); Silica gel 60 (0.040-0.063 mm) (Merck). Cartuchos Isolute SPE de polipropileno de 15 mL de capacidad, y fritas de polietileno de 20  $\mu\text{m}$  (IST, International Sorbent Technology). Mano y mortero de vidrio de 100 mm de diámetro (Afora).
- **SISTEMA DE PURIFICACIÓN DE AGUA:** Equipo de purificación de agua Milli-Q gradient A-10ZMQ S5V0T4 (Millipore). Sistema de producción de agua ultrapura (destilador) (Multiply).
- **TRATAMIENTO DE MUESTRA SÓLIDA:** Liofilizador Cryodos (Telstar). Tamizador de placas de distinta luz de malla (Retsch). Mano y mortero de porcelana.
- **VIALES:** Viales de vidrio ámbar de 4, 8, 16 y 22 mL con tapa de rosca y septa recubiertos de PTFE (National Scientific). Viales de polipropileno de 1 mL y 300  $\mu\text{L}$  (recomendados para volúmenes de 700 y 100  $\mu\text{L}$ , respectivamente), y tapas con septa de polietileno para inyector de equipo de electroforesis capilar (Agilent Technologies).

#### 2.2. INSTRUMENTACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN

- **ELECTROFORESIS CAPILAR (CE):** Equipo de electroforesis capilar HP<sup>3D</sup> modelo G1600AX (Hewlett-Packard) con detector de espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible (UV-vis) con red de diodos (DAD) y refrigeración forzada por aire. Baño termorregulador de agua externo Chrompack RTE-110B (Neslab Instruments Inc.), para la refrigeración del carro de viales. Capilar de sílice fundida de 75 µm de diámetro interno (i.d.) y 375 µm de diámetro externo (*outer diameter*, o.d.) (Composite Metal Services Ltd.).
- **PROGRAMAS INFORMÁTICOS:** Software de procesamiento de datos HP<sup>3D</sup> ChemStation Rev. A.06.01[403] (Hewlett-Packard). Paquete de estadística gráfica Statgraphics Plus 3.3 (STSC) y software de diseño de experimentos NemrodW V-2000D<sup>[1]</sup>.

#### 2.3. ACONDICIONAMIENTO Y LIMPIEZA DEL MATERIAL

A continuación se describen con detalle los protocolos empleados para la limpieza del material de plástico y de vidrio. Puesto que se trabaja en el análisis de trazas de contaminantes, es necesario extremar las medidas de limpieza, procurando minimizar las interferencias o la contaminación cruzada en los experimentos realizados. También se incluye una pequeña sección donde se explica el acondicionamiento de algunos reactivos o materiales utilizados en la extracción MSPD y en la electroforesis capilar.

##### 2.3.1. LIMPIEZA DEL MATERIAL DE VIDRIO Y PLÁSTICO

Para evitar las interferencias o la contaminación cruzada, todo el material de vidrio y plástico reutilizable empleado en las distintas etapas del proceso de preparación de muestra debe lavarse con sumo cuidado. Para ello, se realiza en primer lugar un lavado con agua de grifo y jabón exento de fosfatos. A continuación, el material se enjuaga sucesivamente con agua de grifo, agua Milli-Q y metanol de lavado. En el caso concreto de los viales y tapas del inyector del equipo de CE, estos lavados se realizan empleando el baño de ultrasonidos. Finalmente, el material de vidrio no volumétrico se seca en estufa, y el resto se deja secar al aire.

Este mismo protocolo de limpieza se sigue también para el lavado de botellas de vidrio y recipientes de plástico empleados para la toma de muestra. Estos recipientes y botellas no se reutilizan, sino que se acondicionan previamente a la toma de muestra, y una vez finalizados los análisis, se desechan como residuos sólidos.

Por último, el protocolo de limpieza del material de polietileno, silicona y teflón empleado en el procedimiento de extracción en fase sólida, esto es, las barritas

agitadoras, los tubos y conectores de SPE, etc., consiste en tres lavados sucesivos con mezcla triple de metanol-hexano-acetona 1:1:1 durante 15 min en baño de ultrasonidos.

### 2.3.2. PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE MATERIALES ADSORBENTES

Durante la optimización del proceso de extracción MSPD de muestras sólidas medioambientales, como materiales adsorbentes en la co-columna se emplean, entre otros, el Florisil activado y la sílica ácida.

La sílica ácida se prepara en el laboratorio por adición de un 40% en peso (peso/peso, p/p) de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) concentrado sobre sílica gel comercial, a la que previamente se le ha eliminado la humedad, manteniéndola en estufa a 120 °C durante al menos 12 h.

Para acondicionar y activar ambos adsorbentes, tanto la sílica ácida como el Florisil comercial (cuando se utiliza activado) se calientan en horno a 120 °C durante un período mínimo de 12 h. Transcurrido este tiempo, se dejan enfriar a temperatura ambiente en el interior de un desecador, conservándose en recipientes cerrados hasta el momento de su uso.

### 2.3.3. ACONDICIONAMIENTO Y MANTENIMIENTO DE CAPILARES

Uno de los aspectos más importantes para obtener una buena reproducibilidad en electroforesis capilar es el acondicionamiento del capilar.

#### - Secuencia de acondicionamiento de capilar nuevo

Los capilares de sílice fundida se obtienen por un proceso de calentamiento, partiendo de tubos de mayor diámetro. En ese proceso, los grupos silanol Si-OH de las paredes internas se funden entre sí. El primer paso a realizar al utilizar un capilar nuevo va dirigido a regenerar esos grupos.

El procedimiento más usado es el acondicionamiento con medios básicos: los grupos silanol de las paredes internas del capilar pueden ser regenerados haciendo fluir a través del capilar una disolución concentrada de hidróxido sódico (NaOH).

Acondicionamiento capilar nuevo  $\Rightarrow$  Disolución NaOH 1 M durante 20 min

Después, durante la separación electroforética, los grupos silanol estarán protonados o desprotonados en función del pH de la disolución tampón utilizada para el análisis.

#### - Secuencias de pre- y post-acondicionamiento de capilar en uso

El proceso de acondicionamiento anterior sólo es necesario con los capilares nuevos, pues en capilares usados, el acondicionamiento entre inyecciones sucesivas para garantizar una superficie interna reproducible se lleva a cabo con disoluciones básicas menos concentradas.

El proceso de preacondicionamiento del capilar tiene lugar antes de la inyección de muestra, y se lleva a cabo en varias etapas. Así, en la primera etapa de lavado se hace fluir a través del capilar una disolución de NaOH 0.1 M, con la finalidad de regenerar la superficie del capilar y eliminar componentes de la muestra que hayan podido quedar adsorbidos. A continuación, se lava el capilar con agua, de forma que los residuos de sal no entren en contacto con la disolución de electrolito. La última etapa consiste en hacer fluir la disolución del electrolito por el capilar para obtener un medio homogéneo y adecuado donde tenga lugar la separación de los analitos al aplicar corriente eléctrica.

Después de cada inyección, en la etapa de post-acondicionamiento, se lava el capilar con agua y/o el disolvente del electrolito con el fin de arrastrar los restos de la disolución tampón, y preparar el medio interno del capilar para iniciar una nueva etapa de acondicionamiento. Si el capilar no se lava adecuadamente, tanto entre inyecciones sucesivas como al finalizar una secuencia, debido a la limitada solubilidad del hidróxido sódico en metanol se pueden producir problemas por precipitación de sales del tampón, lo que puede obturar el capilar y/o bloquear los electrodos.

Para prevenir este problema se emplea la siguiente secuencia de acondicionamiento del capilar:

Preacondicionamiento:	Disolución de NaOH 0.1 M durante 5 min Agua Milli-Q durante 5 min Disolución de electrolito durante 15 min
Post-acondicionamiento:	Metanol (o agua) durante 5 min Agua Milli-Q durante 5 min

La duración de cada una de estas etapas de acondicionamiento depende de las dimensiones del capilar, pues el volumen que pasa a través del capilar por unidad de tiempo está relacionado con su longitud y diámetro.

En ocasiones, es recomendable llevar a cabo previamente algunas separaciones para equilibrar el sistema antes de comenzar con secuencias de análisis de muestras. Esto permite que el capilar se acondicione adecuadamente<sup>[2]</sup>.

El capilar se mantiene toda la noche con agua en su interior, y dos viales de agua en sus extremos. En períodos de tiempo de inactividad en el instrumento de CE, el capilar se vacía y se seca con aire, aplicando presión sobre un vial vacío. Una vez seco, el capilar se conserva con dos viales vacíos en sus extremos.

### **3. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES**

#### **3.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES ESTÁNDAR DE ANALITOS**

Las disoluciones *stock* individuales de los compuestos estudiados se preparan por pesada en balanza analítica a partir de los correspondientes patrones comerciales, sólidos o líquidos según el caso, a una concentración entre 2000 y 4000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  en metanol. Así, teniendo en cuenta el porcentaje de pureza del patrón comercial, se pesa la cantidad correspondiente del compuesto, ésta se disuelve en el volumen requerido de disolvente, y finalmente se pesa la mezcla total. Luego, estas disoluciones se agitan durante unos minutos en el vórtex, dejándolas equilibrar a continuación durante al menos 15 min a temperatura ambiente antes de su utilización.

A partir de estas disoluciones *stock* se preparan también por pesada las disoluciones de trabajo intermedias utilizadas para la optimización de los métodos electroforéticos y la contaminación de las muestras analizadas. Para ello, se preparan disoluciones estándar individuales conteniendo sólo uno de los analitos de interés, o bien mezclas de varios de los compuestos objeto de estudio, a diferentes concentraciones. Los disolventes empleados para preparar los distintos patrones de calibración han sido, según el caso, metanol o acetonitrilo. En todos los casos, las disoluciones estándar empleadas para la contaminación de las muestras se preparan por dilución en metanol.

Todas estas disoluciones estándar se guardan en viales de vidrio ámbar adecuadamente cerrados, y se conservan en congelador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y debidamente protegidas de la luz para evitar en lo posible su degradación. En estas condiciones, las disoluciones *stock* son estables durante al menos seis meses. Los patrones de concentraciones intermedias se prepararon cada mes.

#### **3.2. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES TAMPÓN DE DESARROLLO**

En cualquier trabajo de electroforesis capilar es esencial proporcionar las especificaciones necesarias para la preparación del electrolito, pues su composición, pH y concentración influyen directamente sobre el proceso de separación<sup>[3]</sup>.

Todos los compuestos estudiados, tanto los fenoles y bisfenoles halogenados, como los parabenos y el PHBA, poseen grupos hidroxílicos débilmente ácidos. Los valores de  $\text{pK}_a$  de estos analitos en agua se encuentran en el rango 4.4 a 9.5 para los fenoles y bisfenoles (ver tabla II.2.1 en sección 2.1 del capítulo II), y entre 4.5 y 9.2 para los parabenos y PHBA (ver tabla II.3.1 en sección 3.1 del capítulo II). Para garantizar la total ionización de los analitos, el pH de la disolución tampón debe ser dos unidades mayor que los  $\text{pK}_a$  de los compuestos<sup>[4]</sup>. A valores de pH por encima de sus  $\text{pK}_a$ , es de esperar que los compuestos estén al menos parcialmente disociados, resultando posible su separación electroforética mediante electroforesis capilar de zona (CZE).

### III. EXPERIMENTAL

---

El tetraborato sódico ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ) y el Tris base se utilizan como sales electrolíticas en el proceso, habituales para el trabajo a pH básico. Como disolventes se emplean el agua y el metanol, muy usados en CE, y en los que ambas sales son solubles. Para los diversos estudios de separación electroforética, se preparan disoluciones tampón de tetraborato sódico o Tris, según el caso, a diferentes concentraciones y pH, para determinar cuál es la más adecuada para el análisis de los compuestos a estudiar. Como disolventes de la disolución tampón se utilizan agua, para la CE en medio acuoso, y metanol, para la electroforesis capilar en medio no acuoso (NACE).

En función de la concentración de electrolito deseada para el análisis, y teniendo en cuenta la pureza del producto comercial, se realizan los cálculos necesarios para determinar la masa de reactivo que se requiere para preparar la disolución tampón. En una balanza de precisión se pesa la cantidad correspondiente de sólido (tetraborato sódico o Tris), y se disuelve en 45 mL de disolvente (agua o metanol, según sea el caso) con ayuda de un baño de ultrasonidos durante 4-5 min. Se mide el pH de la disolución con un pH-metro, y se ajusta al pH deseado. A continuación, la disolución se filtra a vacío, a través de filtros de 0.22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, y se lleva a 50 mL con disolvente.

Por motivos prácticos, y considerando que se trata de una medida más adecuada para estos sistemas, en las disoluciones tampón en medio orgánico se empleará como medida el pH aparente<sup>[5]</sup> (*apparent pH*,  $\text{pH}_{\text{app}}$ ) en lugar del pH termodinámico. De esta forma, todas las medidas del pH se realizarán con un pH-metro calibrado con disoluciones acuosas, independientemente del medio del tampón.

Para ajustar el pH de las disoluciones tampón se considera el método de adición ácido-base. La molaridad exacta del ácido o la base es importante porque afecta a los volúmenes de las disoluciones utilizadas para ajustar el pH, y por tanto, también influye en la fuerza iónica del tampón<sup>[3]</sup>. Es importante destacar que el pH de la disolución tampón debe determinarse sólo después de haber añadido todos los componentes y cuando la temperatura se haya estabilizado.

Dependiendo del medio que se trate, el ajuste del pH se hace añadiendo diferentes disoluciones:

- En medio acuoso, se utiliza una disolución de ácido acético 1 M en agua para disminuir el pH de la disolución tampón, o una disolución de hidróxido sódico aproximadamente 1 M en agua para aumentar el pH.
- En medio orgánico, para disminuir el  $\text{pH}_{\text{app}}$  del electrolito se emplea una disolución de ácido acético 1 M en metanol, o una disolución de hidróxido sódico aproximadamente 0.5 M en metanol para aumentar el  $\text{pH}_{\text{app}}$ .

Las disoluciones tampón deben almacenarse en recipientes de plástico adecuadamente cerrados, y no de vidrio, para prevenir posibles contaminaciones, que a

su vez provocarían variaciones en el pH<sup>[3]</sup>. Estas disoluciones se mantienen a temperatura ambiente.

Cuando se lleva a cabo una cantidad elevada de análisis es necesario optimizar el tiempo que la disolución tampón de trabajo se mantiene estable con el fin de obtener resultados reproducibles en cuanto a tiempos de migración, áreas y alturas de pico. Por ello, debido a su rápida degradación, la disolución de electrolito se prepara cada dos días.

Antes de ser utilizadas, las disoluciones tampón se filtran a través de filtros de 0.22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro para eliminar posibles partículas que se puedan formar durante su almacenamiento, por precipitación de sales y formación de carbonatos, ya que podrían adsorberse a las paredes del capilar y/u obturarlo, o podrían provocar señales de ruido en la línea base del detector. También se desgasifican durante 5 min en un baño de ultrasonidos para eliminar los gases disueltos, y evitar así la formación de burbujas en el interior del capilar durante el análisis, que también podrían causar ruido, e incluso discontinuidad o una caída de corriente.

### 3.3. PREPARACIÓN DE OTRAS DISOLUCIONES

Las disoluciones de hidróxido sódico empleadas, tanto para acondicionar el capilar como para ajustar el pH de la disolución tampón, se preparan pesando la cantidad correspondiente de sólido, y disolviéndolo, con ayuda de un baño de ultrasonidos, en el volumen adecuado de disolvente. De esta forma se lleva a cabo la preparación de las siguientes disoluciones:

- Disolución de NaOH aproximadamente 1 M en agua para acondicionamiento de capilares nuevos, y para el ajuste del pH de la disolución tampón en medio acuoso.
- Disolución de NaOH aproximadamente 0.1 M en agua para el acondicionamiento de capilares en uso.
- Disolución de NaOH aproximadamente 0.5 M en metanol para el ajuste del pH<sub>app</sub> de la disolución tampón en medio orgánico.

Todas estas disoluciones se guardan en recipientes de plástico adecuadamente cerrados, y se almacenan en nevera a 4 °C para una adecuada conservación. Su preparación se lleva a cabo quincenalmente. Es necesario filtrar y desgasificar todas estas disoluciones momentos antes de su utilización.

La disolución de ácido acético 1 M, utilizada para el ajuste de pH, se prepara tomando el volumen necesario de ácido acético glacial, y diluyéndolo con el disolvente correspondiente, agua o metanol, según que los análisis se realicen en medio acuoso o

### III. EXPERIMENTAL

---

en medio orgánico, respectivamente. Esta disolución se guarda en una botella de vidrio adecuadamente cerrada, a temperatura ambiente.

Asimismo se preparan disoluciones de ácido clorhídrico (HCl) 0.1, 1 y 6 M por dilución de la disolución comercial en agua. Estas disoluciones se emplean en la acidificación de las muestras de agua analizadas. También por dilución se preparan disoluciones al 10% y 20% en volumen (volumen/volumen, v/v), que junto con la disolución al 36% comercial, se emplean para acidificar las muestras sólidas medioambientales (sedimentos y lodos). Todas estas disoluciones se guardan en botellas de vidrio adecuadamente cerradas, a temperatura ambiente.

## **4. MUESTREO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS**

### **4.1. TOMA DE MUESTRA Y PRETRATAMIENTO**

A lo largo de los distintos trabajos de investigación recogidos en esta memoria se han analizado diversos tipos de muestras medioambientales, tanto acuosas como sólidas. Así, se han estudiado desde matrices relativamente sencillas, como las aguas de grifo y río y los sedimentos de río y marinos, hasta muestras más complejas tales como las aguas residuales y los lodos de depuradora.

Para la recogida y almacenamiento de las muestras de agua se utilizan botellas de vidrio ámbar de 2.5 L con tapón de rosca recubierto de teflón. Para las muestras sólidas se emplean recipientes de plástico de diversos tamaños. En cualquier caso, todas las botellas y recipientes empleados para la recogida de muestras se lavan y acondicionan previamente tal y como se indica en la sección 2.3.1 del presente capítulo.

Las muestras de agua de río analizadas se tomaron en diversas localizaciones de Galicia, concretamente, en el río Sarela (Santiago de Compostela) y en el río Asma (Chantada, Lugo), en puntos de muestreo próximos a la zona urbana. Las muestras de agua residual, tanto de entrada (influyente) como de salida (efluente), proceden de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR) cercana a Santiago de Compostela, que recibe descargas de aguas domésticas urbanas y hospitalarias (no industriales). Las muestras de agua de grifo se tomaron, momentos antes de su análisis, en el propio laboratorio de investigación.

Antes de la adición de los analitos para la contaminación de las aguas, las muestras acuosas a analizar se ajustan al valor de pH requerido en cada caso, con una disolución de HCl. Luego, es necesario eliminar los posibles sólidos en suspensión de las muestras. Para ello, se realiza una filtración a vacío, utilizando filtros de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. En algunos casos, cuando se trata de muestras de agua residual de entrada en la planta de tratamiento (influyente) que presentan un alto contenido de

materia particulada, es necesaria una filtración a vacío previa a través de filtros de 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.

Normalmente, las muestras de agua se procesan inmediatamente después de su recogida y preparación. Si esto no fuese posible, se conservan en nevera a 4 °C en ausencia de luz por un período máximo de una semana.

Por otro lado, las muestras de sedimento de río se recogieron en el mismo punto de muestreo del río Sarela que las muestras de agua analizadas. Las muestras de sedimento marino se tomaron en la ría de Pontevedra, en un punto cercano a una industria de papel. Las muestras de lodo de depuradora proceden de la misma EDAR urbana donde se recogieron las muestras de aguas residuales. Se han analizado diversas muestras de lodo de depuradora, tanto del reactor primario o espesador, como del secundario o biológico (ver esquema de una EDAR urbana en figura II.2.2 del capítulo II.2).

Tanto los sedimentos como los lodos de depuradora requieren de un pretratamiento de muestra previo a su extracción mediante MSPD, consistente en la tamización o la liofilización de los mismos, respectivamente. Así, las muestras de sedimento se secan en estufa a 110 °C durante al menos 72 h para eliminar su contenido en humedad. A continuación, se homogeneizan en un mortero de porcelana, y luego se tamizan a través de un tamiz de 300  $\mu\text{m}$  de tamaño de malla, tomando la fracción de tamaño de partícula menor de 300  $\mu\text{m}$ . Por otro lado, las muestras de lodo fresco se reciben en el laboratorio en recipientes de plástico de 1 L de capacidad. A su llegada se separan en porciones de 200 mg aproximadamente en botes de plástico previamente lavados, y se conservan en congelador a -18 °C durante al menos 24 h. Tras su congelación, estos lodos se introducen en el liofilizador para eliminar el agua por desecación a vacío y a bajas temperaturas (sublimación), durante un período mínimo de una semana, hasta que haya tenido lugar la completa liofilización de los mismos.

Todas estas muestras sólidas se guardan en botes de plástico a temperatura ambiente y en ausencia de luz hasta proceder a su análisis.

#### 4.2. CONTAMINACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para la optimización del proceso de extracción SPE de las muestras de agua y el estudio de los parámetros analíticos de calidad de los métodos desarrollados (eficacia de extracción y precisión), ha sido necesario contaminar las muestras de aguas Milli-Q, de grifo, de río y residuales con los compuestos objeto de estudio. Así, estas muestras de agua contaminadas se preparan por adición de un volumen conocido de disolución estándar mezcla de los analitos en metanol, en la concentración requerida en cada caso, a volúmenes de muestra conocidos. Para obtener una distribución homogénea de los analitos en la matriz acuosa, tras la adición del patrón las muestras se agitan durante 10 min, y luego se dejan reposar a temperatura ambiente durante 15 min.

La presencia de metanol en la matriz acuosa puede dar lugar a un descenso en la cantidad de analito adsorbido en el cartucho de SPE durante el paso de muestra. Por ello, siempre se ha mantenido la cantidad de disolvente adicionado a la muestra por debajo del 0.2% del volumen total. Además, se ha mantenido constante la cantidad de disolvente añadida en todos los experimentos, independientemente de la concentración de la adición realizada, especialmente en el estudio de los parámetros analíticos de calidad de los métodos propuestos.

Con respecto a las muestras sólidas secas (sedimento y lodo liofilizado), una vez pesada la cantidad de muestra a analizar, se realiza sobre ésta la adición de un volumen conocido (siempre menor de 500  $\mu\text{L}$ ) de una disolución patrón mezcla de los analitos en metanol, a la concentración que corresponda en cada caso. A continuación, para asegurar una distribución homogénea de los analitos en toda la muestra sólida, ésta se agita manualmente empleando la mano de un mortero. La muestra se deja a temperatura ambiente, con el mortero cubierto con un papel de aluminio, hasta que el disolvente se haya evaporado totalmente. Las muestras se analizan tras un tiempo de estabilización de al menos 2 h.

## **5. MEDIDA DEL FLUJO ELECTROSMÓTICO Y CÁLCULO DE PARÁMETROS ANALÍTICOS**

Durante el desarrollo y optimización de los métodos de determinación basados en electroforesis capilar es necesario evaluar los parámetros analíticos relacionados con las separaciones electroforéticas. A continuación se muestran las expresiones empleadas para calcular las movilidades del flujo electrosmótico (EOF) y los analitos, así como la eficacia de separación en términos de resolución y número de platos teóricos.

### **- Movilidad electrosmótica ( $\mu_{eo}$ ) y movilidades electroforéticas efectivas ( $\mu_{eff}$ )**

El DMSO se utiliza como marcador neutro para la medida del EOF. Su disolución de trabajo se prepara diluyendo el producto comercial en metanol, a una concentración de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  aproximadamente. En aquellas ocasiones en las que los compuestos estudiados se analizan en polaridad positiva, esta disolución contendrá también a su vez a todos los analitos considerados.

Para evaluar la movilidad electrosmótica, se inyecta en el capilar la disolución de DMSO, y se aplica el voltaje de separación en polaridad positiva. En estas condiciones, la movilidad electrosmótica  $\mu_{eo}$  se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\mu_{eo} = \frac{L_t \times L_{eff}}{V \times t_{DMSO}}$$

donde  $L_t$  es la longitud total del capilar,  $L_{eff}$  es la longitud efectiva (hasta la ventana de detección),  $V$  es el voltaje aplicado para la separación, y  $t_{DMSO}$  es el tiempo de migración del DMSO.

La movilidad electroforética efectiva  $\mu_{eff}$  de los analitos se obtiene a partir de sus movilidades aparentes  $\mu_{app}$  y de la movilidad electroosmótica  $\mu_{eo}$ , según la siguiente expresión:

$$\mu_{eff} = \mu_{app} - \mu_{eo} = \frac{L_t \times L_{eff}}{V \times t_i} - \mu_{eo}$$

donde  $t_i$  es el tiempo de migración de cada analito  $i$ , extraído del electroferograma correspondiente a una disolución estándar inyectada en el capilar, y analizada bajo las mismas condiciones electroforéticas utilizadas para la medida del EOF.

#### - Parámetros relacionados con la eficacia de separación electroforética

La resolución  $R_s$  se calcula para cada par de compuestos adyacentes 1 y 2 en el electroferograma, teniendo en cuenta sus tiempos de migración  $t_1$  y  $t_2$ , y sus anchuras de pico en la base  $w_1$  y  $w_2$ , empleando la ecuación:

$$R_s = 2 \times \frac{(t_2 - t_1)}{(w_1 + w_2)}$$

La eficacia de la separación electroforética viene dada por el número de platos teóricos  $N$ :

$$N = 16 \times \left( \frac{t_i}{w_i} \right)^2 = 5.54 \times \left( \frac{t_i}{w_{1/2(i)}} \right)^2$$

donde  $w_{1/2(i)}$  es la anchura de pico a media altura para cada analito  $i$ .

#### **BIBLIOGRAFÍA**

- [1] D. Mathieu, J. Nony, R. Phan-Tan-Luu, *Nemrod® W*, ver. 2000, LPRAI, Marsella, Francia, 2000.
- [2] K. D. Altria, H. Fabre, *Chromatographia* 40 (1995) 313-320.
- [3] K. Altria, T. Kelly, B. Clark, *LC·GC Int.* July (1996) 408-413.
- [4] S. P. Porras, M.-L. Riekkola, E. Kenndler, *Electrophoresis* 23 (2002) 367-374.
- [5] S. Porras, E. Kenndler, *J. Chromatogr. A* 1037 (2004) 455-465.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---

---



## **CAPÍTULO IV.1. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS**

### **1.1. RESUMEN**

En la introducción de este trabajo se ha planteado el interés de establecer los niveles de concentración en el medio ambiente de compuestos fenólicos y bisfenólicos halogenados utilizados como retardantes de llama, o relacionados con su proceso de fabricación y/o degradación. Considerando la problemática en torno a los compuestos ignífugos, así como el conocimiento y la experiencia del grupo de investigación en el desarrollo de metodología analítica para grupos de compuestos similares, las investigaciones se han centrado en la optimización de la separación y determinación de fenoles y bisfenoles halogenados mediante electroforesis capilar de zona (CZE) acoplada a detección por absorción ultravioleta-visible (UV-vis) con red de diodos conectados en serie (DAD), y su posterior aplicación al análisis de muestras medioambientales. Puesto que la metodología analítica existente al respecto es escasa y está poco desarrollada, resulta de especial interés el desarrollo de nuevos procedimientos que puedan ser empleados de modo eficaz en campañas de *screening* y en estudios de tipo ambiental y toxicológico.

En este trabajo de investigación, se han desarrollado procedimientos analíticos de CZE con los que se consigue una buena separación, identificación y cuantificación de un grupo de fenoles y bisfenoles halogenados. Estos compuestos son 2-bromofenol (2-BrP), 2,4-dibromofenol (2,4-DiBP), 2,6-dibromofenol (2,6-DiBP), 2,4,6-tribromofenol (2,4,6-TriBP), pentabromofenol (PeBP), 2-bromo-4-metilfenol (2-Br-4-MeP), 4-bromo-3-metilfenol (4-Br-3-MeP), tetrabromobisfenol A (TBBPA) y tetraclorobisfenol A (TCBPA).

El análisis de mezclas complejas de fenoles y bisfenoles suele ser muy complicado debido a la semejanza estructural entre determinados compuestos, y a la similitud de sus constantes de acidez ( $K_a$ ) en medio acuoso. El uso de disolventes orgánicos en electroforesis capilar (CE) va encaminado precisamente a influir en el proceso de disociación de las moléculas de fenoles y bisfenoles, y en la solvatación de los aniones formados para, de esa forma, aprovechar al máximo las pequeñas diferencias en los valores de  $pK_a$  que existen entre muchos de estos compuestos.

Antes de comenzar a realizar estudios de separación mediante electroforesis capilar en medio no acuoso (NACE), se ha llevado a cabo la optimización de la separación de estos compuestos mediante CE en medio acuoso. Con este estudio se ha pretendido tener un primer contacto con la técnica de CE, y observar las variaciones en la separación electroforética producidas al modificar parámetros básicos de la técnica como son la concentración y pH de la disolución tampón, la temperatura o el voltaje aplicado. Los resultados han servido como referencia para los trabajos posteriores, donde se aplica el sistema NACE en la resolución de estos mismos analitos (en este mismo capítulo IV.1), así como de otros compuestos aniónicos, como los parabenos y el ácido *p*-hidroxibenzoico (capítulo IV.2).

## 1. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS

---

En NACE, la naturaleza y propiedades del disolvente orgánico ejercen una mayor influencia en la eficacia de la separación y en la resolución. El metanol es un disolvente orgánico de baja viscosidad, moderada polaridad y excelente transparencia a la radiación ultravioleta. Su carácter prótico puede influir en el proceso de disociación de los fenoles y los bisfenoles halogenados, y con ello, en su comportamiento electroforético. Por estos motivos, se intenta mejorar la eficacia y la resolución obtenidas en la separación mediante CE en medio acuoso, utilizando metanol como disolvente del electrolito.

Teniendo en cuenta la presencia de otros muchos compuestos fenólicos similares en todo tipo de muestras medioambientales, se han evaluado las interferencias que éstos pueden causar en el análisis de los fenoles y bisfenoles halogenados estudiados mediante el método de electroforesis capilar utilizado. Hay que garantizar que con el procedimiento optimizado la posibilidad de interferencias sea mínima a la hora de analizar muestras reales, o lo que es lo mismo, la efectividad del medio de separación y la fiabilidad del método analítico desarrollado.

La metodología NACE desarrollada se ha aplicado al análisis de los fenoles bromados y bisfenoles halogenados en muestras de aguas continentales, esto es, naturales de río y residuales, y en muestras sólidas medioambientales, tales como sedimentos de río y marino, y lodos de depuradora de aguas residuales, poniendo a punto procedimientos de pretratamiento de las mismas. Así, se han considerado la técnica de extracción en fase sólida (SPE) fuera de línea (*off-line*) para las muestras acuosas, y la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) para las muestras sólidas. Asimismo, se ha estudiado la combinación de estas técnicas de extracción *off-line* con la concentración de muestras en línea (*on-line*) mediante inyección de grandes volúmenes para la concentración de muestra con campo amplificado y eliminación de matriz (LVSS), para alcanzar mejores niveles de sensibilidad. Se ha evaluado el posible efecto que puede tener la matriz sobre la efectividad del proceso LVSS. Estos trabajos se han centrado en los compuestos PeBP, 2,4,6-TriBP, 2,6-DiBP, TBBPA y TCBPA por su mayor interés analítico.

En el caso de las muestras de agua, se han estudiado los diferentes factores influyentes en el proceso de SPE, evaluando la recuperación de los analitos, la concentración y limpieza de las muestras, y la compatibilidad del disolvente del extracto con la determinación electroforética. Así, se han optimizado parámetros como pH de muestra, disolvente y volumen de elución, volumen de corte, etc. Una vez optimizados los métodos SPE-NACE-DAD y SPE-LVSS-NACE-DAD, se ha evaluado su aplicabilidad mediante el análisis de muestras reales de agua de río y residuales.

Como pretratamiento de las muestras sólidas, y por primera vez, se ha aplicado la MSPD a la extracción de contaminantes orgánicos en matrices medioambientales, tales como sedimentos de río y marino, y lodos de depuradora. Se ha estudiado la influencia de las condiciones experimentales en el rendimiento del proceso de extracción y en la eficacia de la etapa de limpieza, utilizando para su optimización muestras de lodo de depuradora. Se han optimizado parámetros como agente dispersante, adsorbente en co-columna, disolvente y volumen de elución, etc.

Finalmente, las metodologías desarrolladas MSPD-NACE-DAD y MSPD-LVSS-NACE-DAD se han aplicado al análisis de los fenoles bromados y bisfenoles halogenados en diversas muestras sólidas reales procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, así como en sedimentos de río y marino.

Los resultados obtenidos se resumen en las publicaciones que se incluyen a continuación.

### **1.2. SEPARACIÓN DE FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR**

Véase el artículo I “*Comparative study of aqueous and non-aqueous capillary electrophoresis in the separation of halogenated phenolic and bisphenolic compounds in water samples*” (pág. 143).

### **1.3. DETERMINACIÓN DE BROMOFENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS EN MUESTRAS DE AGUA**

Véase el artículo II “*Analysis of tetrabromobisphenol A and other phenolic compounds in water samples by non-aqueous capillary electrophoresis coupled to photodiode array ultraviolet detection*” (pág. 157).

### **1.4. DETERMINACIÓN DE BROMOFENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS EN MUESTRAS SÓLIDAS MEDIOAMBIENTALES**

Véase el artículo III “*Approaches for the simultaneous extraction of tetrabromobisphenol A, tetrachlorobisphenol A, and related phenolic compounds from sewage sludge and sediment samples based on matrix solid-phase dispersion*” (pág. 167).



Artículo I

Estudio comparativo de la electroforesis capilar en medio acuoso y no acuoso en la separación de fenoles y bisfenoles halogenados en muestras de agua

*Comparative study of aqueous and non-aqueous capillary electrophoresis in the separation of halogenated phenolic and bisphenolic compounds in water samples*

*Journal of Chromatography A 1068 (2005) 189-199*





## Comparative study of aqueous and non-aqueous capillary electrophoresis in the separation of halogenated phenolic and bisphenolic compounds in water samples

E. Blanco, M.C. Casais\*, M.C. Mejuto, R. Cela

*Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química, Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela, Avda. de las Ciencias s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain*

### Abstract

Capillary zone electrophoresis methods, based on either aqueous and non-aqueous solutions as running buffers and UV spectrophotometric detection, have been developed and optimized for the separation of several halogenated phenolic and bisphenolic compounds, suspected or proved to exhibit hormonal disrupting effects. Both aqueous capillary electrophoresis (CE) and non-aqueous capillary electrophoresis (NACE) methods were suitable for the analysis of compounds under study. The separation of the analytes from other 25 potentially interfering phenolic derivatives was achieved with NACE method. Large-volume sample stacking using the electroosmotic flow pump (LVSEP) was assayed as on-column preconcentration technique for sensitivity enhancement. LVSEP–CE and LVSEP–NACE improved peak heights by 5–26 and 16–330 folds, respectively. To evaluate their applicability, the capillary electrophoresis methods developed were applied to the analysis of water samples, using solid-phase extraction as sample pre-treatment process.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Brominated flame retardants; Bromophenols; TBBPA; TCBPA; Aqueous capillary electrophoresis; Non-aqueous capillary electrophoresis (NACE); Large-volume sample stacking

### 1. Introduction

Flame retardants are substances used in plastics, textiles, electronics circuitry and other materials to prevent fires. Some of the technical flame-retardant products contain brominated organic compounds that comprise an estimated 30% of the volume of all flame retardants employed [1].

Tetrabromobisphenol A (TBBPA) is a widely used brominated flame retardant [2]. Pentabromophenol (PeBP), 2,4,6-tribromophenol (2,4,6-TriBP), 2,4-dibromophenol (2,4-DiBP) and tetrachlorobisphenol A (TCBPA) are also used as halogenated flame retardants [3]. The halogenated phenols 2-bromophenol (2-BP), 2,4-DiBP, 2,6-dibromophenol (2,6-DiBP) and 2,4,6-TriBP were products generated in the thermal decomposition of TBBPA and/or from plastics treated with a polybrominated epoxy type flame

retardants [4,5]. 2,4,6-TriBP is the main breakdown product from the decomposition of TBBPA when it is exposed to UV light [6]. Also it has been observed the presence of methylmonobromophenols on technical mixtures of brominated flame retardants (BFRs) [7].

So far, knowledge on the toxicity of the halogenated flame retardants is limited to a few congeners. Concerning phenolic compounds with one or two hydroxyl groups, due to structural similarities with hormones may play a key role as competitors of the natural hormones [8]. Compounds like TBBPA, 2,4,6-TriBP, PeBP, TCBPA and 2,4-DiBP have proved toxicity [9–13] and some of them may have comparable effects to the thyroid-disrupting effects of PCBs [11].

Halogenated phenolic compounds accumulate in the food chain and finally in humans, and are thus a potential environmental health problem. Not surprisingly, the levels of these compounds in the environment have increased as well [6,14], and thus, halogenated flame retardants levels in the environment must be monitored.

\* Corresponding author. Tel.: +34 981 563100x14265; fax: +34 981 547141.

E-mail address: [qnccl@usc.es](mailto:qnccl@usc.es) (M.C. Casais).

Currently, several analytical methods are available for the determination of halogenated flame retardants in a variety of sample types [14]. By far, gas chromatography (GC) is the analytical technique of choice for the determination of this class of compounds [15–23]. TBBPA has been found in sewage sludge [15,16], sediments [15,17], indoor air [18], eggs from birds [19] and human serum [20]. TBBPA, 2,4,6-TriBP, PeBP, and TCBPA were determined in human plasma [21] and milk [22]. 2,4,6-TriBP also has been found in human serum [20], adipose tissue [23] and sewage sludge [16]. Also, liquid chromatography (HPLC–UV) has been used for the analysis of TBBPA and 2,4,6-TriBP from polymeric materials [14,24,25].

Capillary electrophoresis (CE) is a powerful technique of separation. The separation power in aqueous solution can be affected by various factors, like pH, nature of the buffering ion or organic modifiers in the electrolyte. The flexible adjustment of many chemical, physical and instrumental parameters allows stable performance to be achieved in aqueous CE. Nowadays, there is no reason to consider water as the only useful solvent in CE. Organic solvents have been used successfully in background electrolytes (BGE), extending the application range of the technique [26–30].

One of the major drawbacks of most widespread CE apparatus is the low sensitivity of conventional UV detection, limiting its application in trace analysis. To overcome this problem, samples can be concentrated directly on the capillary (on-column stacking). Large-volume sample stacking using the electroosmotic flow pump (LVSEP) has emerged as a highly efficient sample stacking method in aqueous media [31]. Chien and Burgi [32] demonstrated that large-volume hydrodynamic injection followed by the removal of the sample matrix out of the capillary using polarity switching is a powerful tool for sensitivity enhancement in CE. Later, this method was simplified by adding an electroosmotic flow (EOF) modifier to the running buffer [33], such as methanol as BGE solvent. Under a reverse electric field, the sample plug was removed from the capillary by itself and anionic analytes were separated without polarity switching [31].

In this paper, the application of CE as an alternative technique for the separation of several phenolic and bisphenolic compounds of environmental concern is shown. Aqueous and non-aqueous capillary electrophoresis (NACE) procedures have been developed and compared. A study of potential interferences has been carried out in order to assess the applicability of developed methods to environmental samples. Also, LVSEP was evaluated as on-column preconcentration technique allowing significant sensitivity enhancements.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and materials

Methanol (HPLC gradient grade) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany) and dimethyl sulfoxide

(DMSO) (HPLC gradient grade) from Aldrich (Madrid, Spain). 2-Bromophenol (2-BrP, 98%), 2,4-dibromophenol (2,4-DiBP, 95%), 2,4,6-tribromophenol (2,4,6-TriBP, 99%), pentabromophenol (PeBP, 96%), tetrabromobisphenol A (TBBPA, 97%), tetrachlorobisphenol A (TCBPA, 98%), 2-bromo-4-methylphenol (2-Br-4-MeP, 96%), 4-bromo-3-methylphenol (4-Br-3-MeP, 99%), phenol (99%), bisphenol A (BPA, 97%), 4-nonylphenol (4-NonylP, tech.), 3-chlorophenol (3-CP, 98%), 4-chlorophenol (4-CP, 99%), 2,3-dichlorophenol (2,3-DiCP, 98%), 2,5-dichlorophenol (2,5-DiCP, 98%), 2,6-dichlorophenol (2,6-DiCP, 99%), 3,4-dichlorophenol (3,4-DiCP, 99%), 3,5-dichlorophenol (3,5-DiCP, 97%), 2,3,5-trichlorophenol (2,3,5-TriCP, 99%), 2,4,5-trichlorophenol (2,4,5-TriCP, 99%), pentachlorophenol (PeCP, 99%), 2,4-dimethylphenol (2,4-DiMeP, 98%), 2-nitrophenol (2-NP, 99%), 4-nitrophenol (4-NP, 99%) and 2,4-dinitrophenol (2,4-DiNP, 97%) were obtained from Aldrich (Madrid, Spain). 2,6-Dibromophenol (2,6-DiBP, >97%) was from Fluka (Buchs, Switzerland). 2,3,4,5-Tetrachlorophenol (2,3,4,5-TetraCP, 99%) was purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA). 2,3,4-Trichlorophenol (2,3,4-TriCP, 99%), 2,3,6-trichlorophenol (2,3,6-TriCP, 99%), 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TriCP, 99%), 2,3,4,6-tetrachlorophenol (2,3,4,6-TetraCP, 99%) and 2,3,5,6-tetrachlorophenol (2,3,5,6-TetraCP, 99%) were from Riedel-de Hën (Seelze, Germany). 2,4-Dichlorophenol (2,4-DiCP, 98%), 2-methyl-4,6-dinitrophenol (2-Me-4,6-DiNP, 98%), sodium tetraborate decahydrate (GR, 99.5%) and sodium hydroxide (pellets GR for analysis, 99%) were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q system purchased from Millipore (Bedford, MA, USA).

Cellulose ester membrane filters (SMWP, 47 mm, 5  $\mu$ m; HAWP, 47 mm, 0.45  $\mu$ m), Durapore membrane filters (GVHP, 47 mm, 0.22  $\mu$ m), and Durapore Millex syringe filters (SLHV, 25 mm, 0.45  $\mu$ m) were supplied by Millipore (Bedford, MA, USA). Oasis SPE cartridge columns packed with polystyrene–divinylbenzene (PS–DVB) sorbent (HLB, 60 mg, 3 cm<sup>3</sup>) were obtained from Waters (Milford, MA, USA).

### 2.2. Preparation of standard solutions

Stock solutions (4.0 mg/mL) of each phenol derivative were prepared in methanol. Standard's mixtures for calibrations were diluted in methanol to appropriate concentration levels. All solutions were refrigerated at 4 °C and protected against daylight. These solutions were used to make daily working standards solutions by appropriate dilution.

In the measurements of the electroosmotic flow, DMSO was used as EOF marker at a concentration of c.a. 10  $\mu$ g/mL. This solution was either mixed with the analytes under study or directly diluted with methanol.

### 2.3. CE analysis

Capillary electrophoresis was performed using a HP<sup>3D</sup> system (Hewlett–Packard, Waldbronn, Germany) equipped with a photodiode array detection (DAD) system. Absorbances at 210, 230 and 370 nm (direct UV detection) were monitored for the detection of the analytes, depending of species considered in each particular mixture.

Uncoated narrow-bore silica capillary (supplied by Composite Metal Services Ltd., Ilkley, UK) with an effective/total length of 61.5/70 cm and 75  $\mu\text{m}$  I.D. was used. The capillary was thermostated to 25.0  $^{\circ}\text{C}$ , unless otherwise stated.

A Chrompack RTE-110B external water bath (Neslab Instruments Inc., Newington, NH, USA) was used for thermostating the samples to 25  $^{\circ}\text{C}$ .

Standards and samples were injected hydrodynamically by applying a pressure of 50 mbar. Depending on the experiment injection time ranged from 2 to 300 s. The applied voltage for separation was 30 kV, either positive or negative.

The migration order was determined by injecting the individual solution of each compound and by the spectral comparison of each peak in electropherograms with a spectral library.

Independently of the BGE solvent, new capillaries were rinsed with 1 M sodium hydroxide for 20 min. Before injections, capillaries were conditioned by washing them with 0.1 M sodium hydroxide for 5 min, Milli-Q water for 5 min, and 15 min with the separation electrolyte. After each run the capillary was flushed with the solvent corresponding to the electrophoretic medium for 5 min and with Milli-Q water for 5 min. The inlet and outlet of the capillary were kept overnight in Milli-Q water.

Water and methanol were assayed as solvents for BGE preparation. Sodium tetraborate, being readily soluble in both solvents, was used as electrolytic salt. The pH of the solution was adjusted by addition of a sodium hydroxide solution in the same BGE solvent. Measured pH values of buffer solutions were obtained with a Metrohm 654 pH-meter (Herisau, Switzerland) calibrated with aqueous standard buffer solutions. For practical reasons, in methanolic running buffers the apparent pH ( $\text{pH}_{\text{app}}$ ) [34], instead of the thermodynamic pH, was considered more suitable to describe our systems. The electrolyte solution was prepared freshly every two days, sonicated in a P-Selecta ultrasonic bath (Barcelona, Spain) for at least 4 min and filtered through a membrane of 0.22  $\mu\text{m}$  pore size. Every day all remaining solutions were filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  syringe filter before use.

Data acquisition was done by means of HP<sup>3D</sup> ChemStation Software (Rev. A.06.01[403]) (Hewlett–Packard, Waldbronn, Germany). Statistical analysis of the response variables was carried out using the statistical package Statgraphics Plus 3.3 (STSC, Rockville, MD, USA).

Oasis SPE cartridges were dried using a Turbo-Vap II Nitrogen Evaporator supplied by Zymark (Hopkinton, MA, USA).

### 2.4. LVSEP

All analytes were dissolved in methanol and introduced hydrodynamically into the capillary with a pressure of 50 mbar for different periods of time, depending on the experiment. In methanolic medium, and for those analytes that must be analysed in negative polarity, after sample injection a negative voltage of  $-30$  kV was applied for both sample stacking and subsequent separation of analytes. However, in aqueous CE and in NACE separations carried out in positive polarity, after the stacking with negative voltage, the separation was carried out with polarity switching ( $+30$  kV), when it was achieved about 95% of the corresponding buffer conductivity.

Fresh electrolyte and sample solutions were always used for each injection.

### 2.5. Sample preparation

An off-line solid-phase extraction (SPE) step was used to cleanup and preconcentrate the samples before CE analysis. Details of this preconcentration stage have been described elsewhere [35]. Real water samples were collected in a wastewater-treatment plant near Santiago de Compostela (North-West Spain).

Water samples, at their natural pH (pH 6.8–7), were filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  cellulose ester membrane filters before the SPE (in some cases, for influent wastewater samples with high content of particulate matter, samples needed prefiltering through 5  $\mu\text{m}$  membrane filters). The SPE Oasis cartridges were conditioned by passing 4 mL of methanol and 4 mL of Milli-Q water. After that, the water sample was loaded through the cartridge. Finally, the cartridge was washed with 10 mL of Milli-Q water, and then dried under nitrogen stream for 45 min at a pressure of 12 psi. The analytes trapped on the sorbent were eluted with 3 mL of methanol, and this extract was subsequently subjected to CE analysis.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Optimization of electrophoretic separation by CE in aqueous and non-aqueous media

All of the compounds under investigation have weakly acid hydroxyl groups so capillary zone electrophoresis (CZE) at high or moderate pH might be suitable for their determination. The  $\text{p}K_{\text{a}}$  values in water of the considered bromophenols and halogenated bisphenols range from 4.4 to 9.5 which means that at pH values over 9.5 they are expected to be all at least partially dissociated (see Table 1), ready for CE analysis. Sodium tetraborate was chosen as electrolyte salt, either in aqueous and non-aqueous CE.

For every assayed electrolyte, it has been proved that electric field strength did not affect significantly the separation efficiency. As expected migration times decreased as the

Table 1  
 $pK_a$  values in water of the compounds studied at  $T=25\text{ }^\circ\text{C}$  (electroosmotic mobility ( $\mu_{eo}$ ) and effective mobilities ( $\mu_{eff}$ ) of the analytes in 20 mM sodium tetraborate solutions at optimum pH value)

Aqueous CE $\Rightarrow$ BGE solvent: water			Non-aqueous CE $\Rightarrow$ BGE solvent: methanol	
Compound	$pK_a$	$\mu_{eff}$ ( $10^{-4}\text{ cm}^2\text{ V}^{-1}\text{ s}^{-1}$ ) pH 9.6	Compound	$\mu_{eff}$ ( $10^{-4}\text{ cm}^2\text{ V}^{-1}\text{ s}^{-1}$ ) pH <sub>app</sub> 9.4
4-Br-3-MeP	9.50 <sup>a</sup>	-1.97	4-Br-3-MeP	-0.26
2-Br-4-MeP	8.73 <sup>a</sup>	-2.67	2-Br-4-MeP	-0.34
PeBP	4.43 <sup>a</sup>	-2.77	2-BrP	-0.55
2,4,6-TriBP <sup>b</sup>	6.10 <sup>c</sup>	-2.86	2,4-DiBP	
2,4-DiBP	6.31 <sup>d</sup>		TCBPA	-2.18
2-	7.80 <sup>e</sup>	-2.97	TBBPA	-2.24
BrP	8.44 <sup>e</sup>	-3.17	2,6-DiBP	-2.59
2,6-DiBP	8.29 <sup>f</sup>		PeBP	-2.67
TBBPA	6.60 <sup>e</sup>	-3.22	2,4,6-TriBP	-2.69
TCBPA	7.50 ( $pK_{a1}$ ) <sup>g</sup>	-3.41		
	8.50 ( $pK_{a2}$ ) <sup>g</sup>			
	7.50 ( $pK_{a1}$ ) <sup>h</sup>	-3.51		

$\mu_{eo} = 6.68 \times 10^{-4}\text{ cm}^2\text{ V}^{-1}\text{ s}^{-1}$

$\mu_{eo} = 1.27 \times 10^{-4}\text{ cm}^2\text{ V}^{-1}\text{ s}^{-1}$

<sup>a</sup> Calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software Solaris V4.67 (© 1994–2004 ACD/Labs), from [36].

<sup>b</sup>  $pK_a^* = 10.10$  in methanol [37].

<sup>c</sup> From [37].

<sup>d</sup> From [38].

<sup>e</sup> From [39].

<sup>f</sup> From [40].

<sup>g</sup> From [3].

<sup>h</sup> From [41].

potential was increased. Then the highest allowable voltage (30 kV) was applied to speed up separations.

Capillary and sample tray temperatures were tested in the range of 18.5–30.0 °C in aqueous CE, and between 18.5 and 25.0 °C in NACE. In the remaining experiments, a temperature of 25 °C was selected as a good compromise between analysis time in aqueous CE and easy control of temperature in NACE.

### 3.1.1. Aqueous BGE

As electrophoretic separations are based on differential rates of migration of charged particles in the bulk of a running buffer, the effective mobility of weakly acid compounds is strongly affected by the pH of the electrolyte solution, as it determines the extent of ionization of the analytes [42].

The dependence of the mobility of the compounds studied with the pH was evaluated by calculating the effective electrophoretic mobilities ( $\mu_{eff}$ ) of the analytes working with 20 mM aqueous sodium tetraborate solutions at different pH values. According to results, the studied analytes may be grouped into two classes. The first group includes the compounds exhibiting higher  $pK_a$  values (4-Br-3-MeP, 2-Br-4-MeP and 2-BrP). As expected, this group appears heavily affected by changes in the electrolyte pH value in the range considered (9.2–9.8). On the other side, the remaining compounds are fully deprotonated in the pH range considered, so their effective mobilities are hardly affected.

At pH 9.2, some of the compounds co-migrated, such as 2,4-DiBP and 2-BrP, while others like PeBP and 2,4,6-TriBP were not fully separated. Electrolyte solutions at pH 9.4 and 9.6 provided enhanced resolution of all peaks, and pH 9.6

leads to a fully satisfactory separation (see Fig. 1A). However, increasing pH buffer to 9.8, worsen the separation, because some analytes (2-Br-4-MeP and PeBP, in addition to 2-BrP and 2,6-DiBP) co-migrate appreciably.

Under the finally optimised conditions, the electroosmotic mobility ( $\mu_{eo}$ ) was higher (in absolute value) than the electrophoretic mobilities ( $\mu_{eff}$ ) of the analytes (see Table 1).

The selection of buffer concentration depends also on separation requirements: high ionic strengths must be used for closely related analytes [43], because the double layer compression causes a reduction in EOF, increasing the migration times of anions in positive polarity mode, and therefore, leading to slow separations.

Three concentration levels of the running buffer were assayed: 20, 40 and 60 mM. The results indicated that although a slightly better resolution can be attained on increasing electrolyte concentration from 20 to 60 mM, this change produced an increase of about twice in the migration time of the analytes thus increasing the total analysis time unacceptably.

### 3.1.2. Non-aqueous BGE

Methanol is the most commonly used organic solvent in CE [44]. It has favourable properties, such as dielectric constant, viscosity, and a useful UV range for detection [45]. It is an appropriate solvent for common electrolyte salts, and it allows LVSEP as field-amplified technique for on-line concentration in NACE (see the next section). Moreover, is a solvent used as extractant in many sample pretreatment processes, like SPE, allowing the direct injection of the extracts in the NACE system. For these reasons, it was chosen as the running buffer solvent.

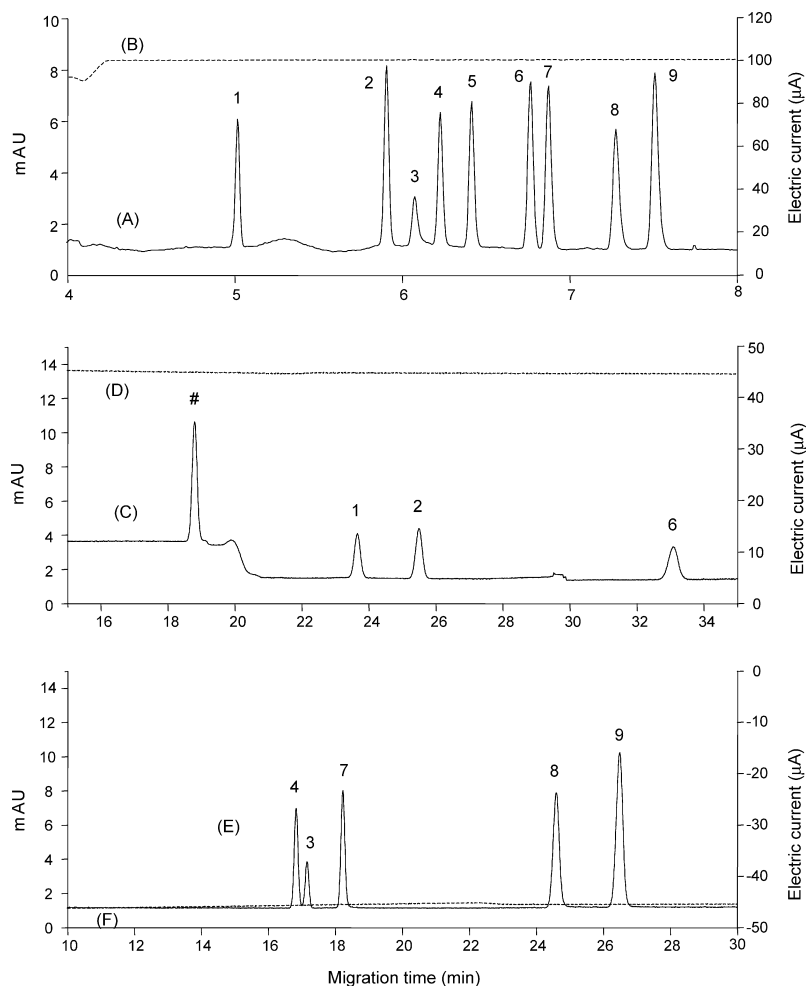


Fig. 1. (A, C, E) Electropherograms of a standard solution in methanol of the nine compounds in study at concentration level of 10  $\mu\text{g/mL}$ . (B) Electric current during the separation process in aqueous media. (D and F) Electric current during the separation process in methanolic media. Capillary: 70 cm  $\times$  75  $\mu\text{m}$  I.D.; detection: 210 nm; capillary and sample tray temperature: 25.0  $^{\circ}\text{C}$ ; hydrodynamic injection: 50 mbar by 2 s; running buffer: (A) 20 mM aqueous sodium tetraborate at pH 9.6 and (C and E) 20 mM methanolic sodium tetraborate at  $\text{pH}_{\text{app}}$  9.4; applied voltage: (A–D) +30 kV and (E and F) –30 kV. Peak assignment: (1) 4-Br-3-MeP, (2) 2-Br-4-MeP, (3) PeBP, (4) 2,4,6-TriBP, (5) 2,4-DiBP, (6) 2-BrP, (7) 2,6-DiBP, (8) TBBPA, (9) TCBPA, and (#) EOF marker.

Non-aqueous capillary electrophoresis methods may be developed, using as starting values the buffer composition and pH conditions optimised for aqueous CE separations. Obviously, it has to be considered that electrolytes including organic solvents may have very different chemical and physical properties as compared to aqueous electrolytes, so direct comparison of separations for the same analytes in aqueous running buffers and in organic electrolyte solutions may be difficult or even unfeasible. The  $\text{pK}_{\text{a}}$  values in water (see Table 1) only gave us an idea for choosing the starting experimental conditions, because the solute  $\text{pK}_{\text{a}}$  may change

for organic solvents by some orders of magnitude, and their values are sometimes unknown. In methanol, the  $\text{pK}_{\text{a}}$  values of some phenols, e.g. 2,4,6-TriBP are shifted to higher values up to more than four units [37,44]. Optimum electrolyte  $\text{pH}_{\text{app}}$  was determined by testing values in the range between 9.0 and 9.7. Satisfactory results were obtained at  $\text{pH}_{\text{app}}$  9.4 (see Fig. 1C and E). Working at lower  $\text{pH}_{\text{app}}$  values, compounds like TBBPA and TCBPA were not detected, either in positive or negative polarity mode inside a practical analysis time range, probably because their  $\mu_{\text{eff}}$  were too low or have similar magnitudes to  $\mu_{\text{e0}}$  under these conditions. At higher

$\text{pH}_{\text{app}}$  values, the analysis time in positive polarity was too long (more than 40 min). On the other hand, in inverse polarity the separation was incomplete, and some compounds coeluted (2,4,6-TriBP and 2,6-DiBP) or were not baseline resolved with PeBP.

In NACE, as compared to aqueous CE, the trend of effective mobility of the analytes has changed. Variations in migration order when methanol was used as running buffer

solvent can be attributed to the fact that  $\text{pH}^*$  is 2.3 units higher than  $\text{pH}_{\text{app}}$  [46], and then the ionization degree was lower for all analytes in comparison to that obtained in aqueous media. Also ion association (with solvent separated ion pairs) and contact ion-pair formation is a phenomenon often occurring in organic solvents with low or moderate dielectric constants [44], and this could contribute to the reduction of  $\mu_{\text{eff}}$ .

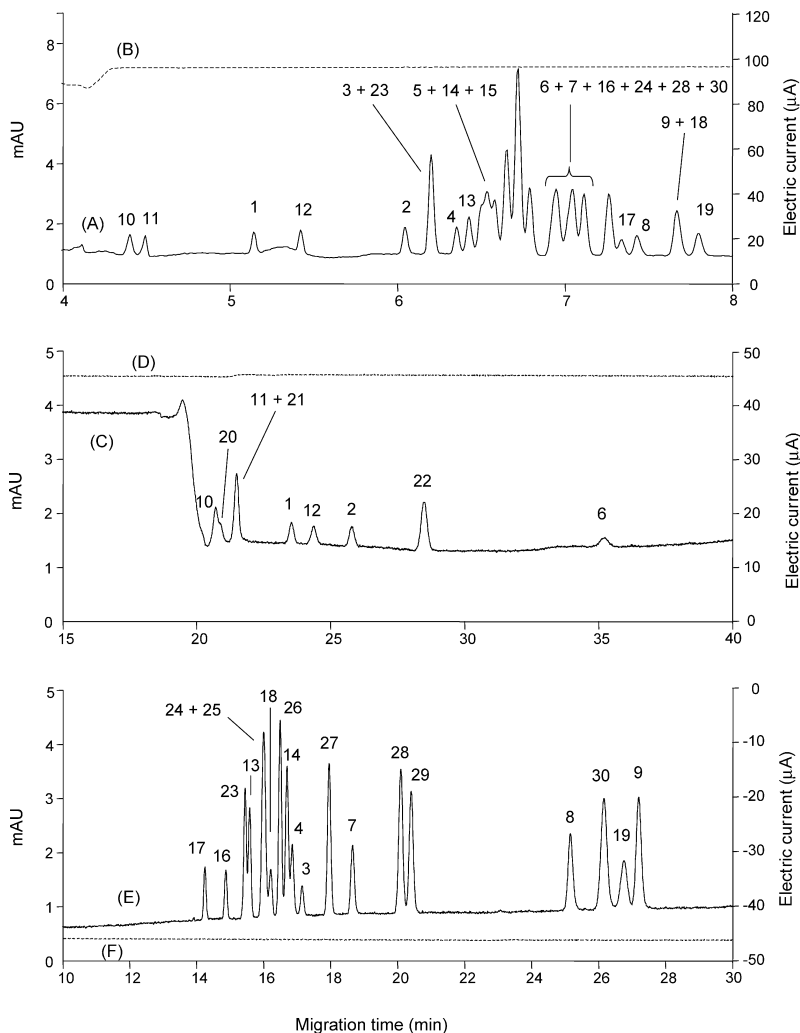


Fig. 2. (A, C, E) Electropherograms of a standard solution in methanol of the mixture of the nine compounds in study and 25 phenol derivatives (enumerated in Section 2.1) in concentration of  $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ . (B) Electric current during the separation process in aqueous media. (D and F) Electric current during the separation process in methanolic media. CE conditions as in Fig. 1. Peak assignment: (1) 4-Br-3-MeP, (2) 2-Br-4-MeP, (3) PeBP, (4) 2,4,6-TriBP, (5) 2,4-DiBP, (6) 2-BrP, (7) 2,6-DiBP, (8) TBBPA, (9) TCBPA, (10) 2,4-DiMeP, (11) Phenol, (12) 4-CP, (13) PeCP, (14) 2,4,6-TriCP, (15) 2,4-DiCP, (16) 2-Me-4,6-DiNP, (17) 2,4-DiNP, (18) 4-NP, (19) 2-NP, (20) 4-NonylP, (21) BPA, (22) 3-CP, (23) 2,3,5,6-TetraCP, (24) 2,3,6-TriCP, (25) 2,3,4,6-TetraCP, (26) 2,3,5-TriCP, (27) 2,4,5-TriCP, (28) 2,6-DiCP, (29) 2,3,4-TriCP, (30) 2,5-DiCP.

So, under the non-aqueous conditions optimised and inside the investigated  $\text{pH}_{\text{app}}$  range the compounds can be divided into three groups based on their electrophoretic behaviour. The first group consisting of 4-Br-3-MeP, 2-Br-4-MeP and 2-BrP exhibits lower  $\mu_{\text{eff}}$  (absolute values) than  $\mu_{\text{eo}}$ , and therefore, amenable to separations in positive polarity mode (see Fig. 1C); these compounds show the

highest increase of mobility with  $\text{pH}_{\text{app}}$ . The second group, consisting of TCBPA, TBBPA and 2,6-DiBP, has mobilities less influenced by  $\text{pH}_{\text{app}}$ . And finally, a third group formed by PeBP and 2,4,6-TriBP with practically constant mobilities. These second and third groups of compounds show higher  $\mu_{\text{eff}}$  (in absolute values) than  $\mu_{\text{eo}}$  (see Table 1) and can be detected applying reverse polarity (see Fig. 1E). 2,4-DiBP

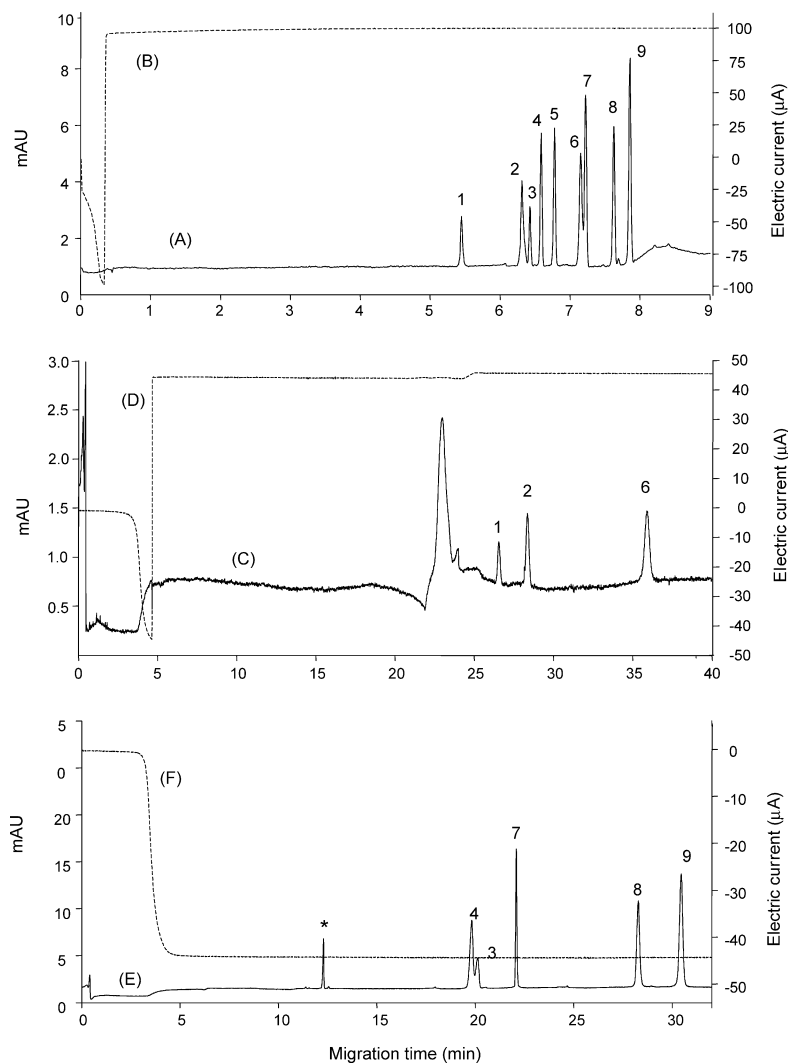


Fig. 3. (A) Electropherogram of a standard solution in methanol of the nine compounds in study in concentration of  $0.5 \mu\text{g/mL}$ . (B) Electric current during the LVSEP process in aqueous media. (C and E) Electropherogram of a standard solution in methanol of the nine compounds in study in concentration of  $0.1 \mu\text{g/mL}$ . (D and F) Electric current during the LVSEP process in methanolic media. Running buffer: (A and B) 20 mM sodium tetraborate at  $\text{pH} 9.6$  and (C–F) 20 mM sodium tetraborate at  $\text{pH}_{\text{app}} 9.4$ ; applied voltage: (A and B)  $-30 \text{ kV}$  by 0.4 min for removing the matrix and  $+30 \text{ kV}$  in the separation step, (C and D)  $-30 \text{ kV}$  by 4.5 min for removing the matrix and  $+30 \text{ kV}$  in the separation step and (E and F)  $-30 \text{ kV}$ ; hydrodynamic injection: (A and B) 50 mbar by 30 s and (C–F) 50 mbar by 300 s. Other CE conditions and peak assignment as in Fig. 1. (\*) Tetraborate ions.

was detected only in negative polarity mode at buffer  $\text{pH}_{\text{app}}$  9.7, due to its low ionization degree below this  $\text{pH}_{\text{app}}$  value.

Three concentration levels of the running buffer were assayed: 20, 30 and 40 mM sodium tetraborate in methanol. As could be expected, the resolution in negative polarity mode was improved with the decrease in the ionic strength because of EOF increasing and the apparent solute mobility decreasing, at the expense of higher analysis time.

### 3.1.3. Study of potential interferences

To assess the applicability of the developed CE methods in the analysis of bromophenols and halogenated bisphenols in environmental samples, it must be taken into account that many other phenolic compounds (with more or less similar chemical and electrophoretic behaviour) could be present in all kinds of matrix samples. Thus to evaluate the real possibilities of applying the developed methods to real samples a study of several potential interferences was carried out. With this aim, aqueous and non-aqueous CE under the optimal conditions established were applied to the separation of a standard mixture of the bromophenols and bisphenols here studied and a wide variety of phenol derivatives (including phenol, bisphenol A, 17 polychlorinated phenols, 3 nitrophenols, a methylphenol, a nonylphenol and a methylnitrophenol, enumerated in Section 2.1) most of them included in the US Environmental Protection Agency list of priority pollutants and European Union directive 76/464/EEC concerning dangerous substances discharged into the aquatic environment [47,48].

Fig. 2A shows the electropherogram obtained for the analysis in aqueous CE of a mixture containing our analytes and the group of 25 phenolic compounds investigated as potential interferences. As it can be seen in this figure, some peaks on the electropherogram appeared overlapped, and the resolution achieved was far from satisfactory. 4-Br-3-MeP, 2-Br-4-MeP, 2,4,6-TriBP and TBBPA were nicely resolved. 4-NP and TCBPA were not fully separated, although selective detection for nitrophenols could be achieved at

370 nm. However, the other bromophenols comigrated with some chlorophenols, and therefore, could not be determined under these electrophoretic conditions. These results could be expected, due to the sample complexity (34 components) and the structural similarity between some of the phenolic derivatives (several compounds being positional isomers with similar charge to mass ratio).

Comparatively electropherograms obtained in NACE for the analysis of the same complex mixture of analytes and phenolic interferences are shown in Fig. 2C and E. In that case, a good resolution was achieved by using 20 mM sodium tetraborate in methanol at  $\text{pH}_{\text{app}}$  9.4 as electrophoretic medium. As shown in these figures, the system successfully resolved the compounds of interest, and only 2,4,6-TriBP appeared partially overlapped. Compounds like 2,3-DiCP, 3,5-DiCP and 3,4-DiCP exhibit migration times larger than 40 min using negative polarity. It is evident that the use of non-aqueous BGE provides a significant enhancement in resolution power, thus enabling the application of common widespread UV-DAD for the analysis of such a complex samples.

### 3.2. Large-volume sample stacking using the electroosmotic flow pump (LVSEP)

In aqueous capillary electrophoresis, the sample was injected during 30 seconds (c.a. 10% of total capillary volume). Under the electric field of reversed polarity (−30 kV), the analytes migrated towards a high conductive buffer zone, while the methanol matrix of low conductivity was simultaneously removed from the capillary by the EOF pump in the opposite direction. Once the capillary was refilled with the running buffer (95% of the buffer conductivity), the anions had been focused into a small zone at the injection end of the capillary. Then, the electrophoretic separation was started by switching polarity to positive mode (approximately 0.4 min after beginning the analysis time). It has been shown that increasing injection time over 60 s causes significant losses in resolution.

Table 2  
Limits of quantification (LOQs) and enhancement in sensitivity (concentration factor) using sample stacking in both aqueous and non-aqueous CE

Compound	Limits of quantification <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/L}$ )					
	Aqueous CE			Non-aqueous CE		
	CE-DAD <sup>b</sup>	LVSEP-CE-DAD <sup>c</sup>	Concentration factor	NACE-DAD <sup>d</sup>	LVSEP-NACE-DAD <sup>e</sup>	Concentration factor
4-Br-3-MeP	1095	234	5	1754	110.6	16
2-Br-4-MeP	364	70	5	1396	76.5	18
PeBP	935	124	8	450	5.5	82
2,4,6-TriBP	566	49	12	416	4.6	90
2,4-DiBP	487	47	10			
2-BrP	835	47	18	2287	70.7	32
2,6-DiBP	801	31	26	433	1.3	333
TBBPA	683	42	16	485	1.6	303
TCBPA	468	28	16	280	1.3	215

<sup>a</sup> LOQ: ratio signal-to-noise (S/N) of 10; detection at 210 nm, except for PeBP at 230 nm.

<sup>b</sup> CE conditions as in Fig. 1A.

<sup>c</sup> CE conditions as in Fig. 3A.

<sup>d</sup> CE conditions as in Fig. 1C and E.

<sup>e</sup> CE conditions as in Fig. 3C and E.

When analyses were performed in non-aqueous CE system, the capillary was (c.a. 95%) filled with the sample employing 300 s of hydrodynamic injection time. Since methanol was used as the running buffer solvent, appropriate suppression of EOF made LVSEP possible without polarity switching (except for those analytes with lower  $\mu_{\text{eff}}$  than  $\mu_{\text{eo}}$  that must be analysed in positive polarity, see Table 1; in this case, the LVSEP process was carried out with polarity switching like in aqueous media). Thus, after injection, before removing of the methanol matrix and stacking of the anions, the capillary was refilled with the running buffer of high conductivity, and the overall EOF became further reduced due to the increased ionic strength. When the EOF and the electrophoretic velocities of analytes were balanced, the

migration direction of the stacked analytes was self-switched toward the detector by their own electrophoretic mobility, while the reduced EOF moved in the opposite direction, and thus the separation of the highly stacked sample occurs.

Fig. 3A, C and E show the separation and the enhancement in sensitivity achieved using LVSEP, in comparison with normal hydrodynamic injection (see Fig. 1A, C and E, respectively). The process of removing the methanol plug out of the capillary imposed the differences in migration times between the electropherograms in Figs. 1A and 3A, and between the electropherograms in Figs. 1C and E, 3C and E. Borate ions in the inlet buffer are also injected hydrodynamically and stacked at the concentration boundary while the methanol plug is being removed [49].

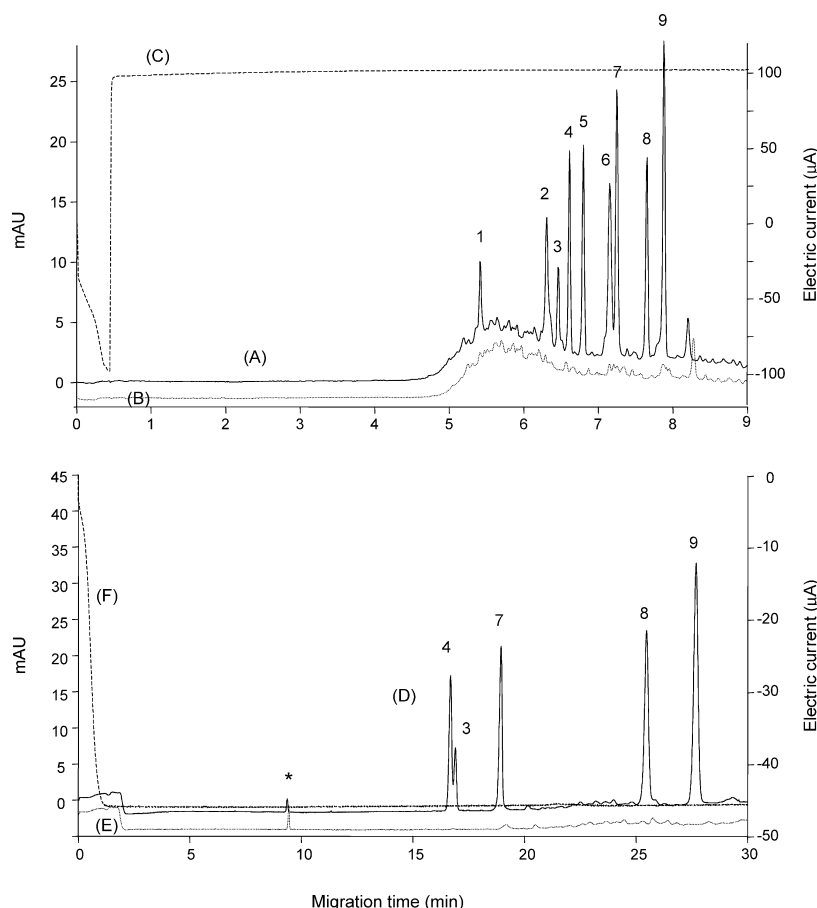


Fig. 4. Electropherograms obtained from SPE extracts of (A and D) 500 mL of wastewater sample spiked at a concentration of 12  $\mu\text{g/L}$  for all compounds, and (B and E) 500 mL of raw wastewater sample. (C) Electric current during the LVSEP process in aqueous media. (F) Electric current during the LVSEP process in methanolic media. Hydrodynamic injection: 50 mbar by 30 s; running buffer: (A–C) 20 mM sodium tetraborate at pH 9.6 and (D–F) 20 mM sodium tetraborate at  $\text{pH}_{\text{app}}$  9.4; applied voltage: (A–C)  $-30$  kV by 0.4 min for removing the matrix and  $+30$  kV in the separation step, and (D–F)  $-30$  kV. Other CE conditions and peak assignment as in Fig. 1. (\*) Tetraborate ions.

Fig. 3B, D and F shows the electric current during the LVSEP process. The intensity of the electric current increased rapidly (absolute values), while the sample matrix was removed and the ionic strength of the medium in the capillary increased close to the value registered when the capillary was filled with the running buffer. Note that the polarity was switched in that moment for the separation in aqueous CE (see Fig. 3B) and in NACE separations in positive polarity (Fig. 3D).

The sensitivity improvement achieved by LVSEP was evaluated through the increase in detector response by comparing normal hydrodynamic injections (50 mbar by 2 s) and sample stacking injections (50 mbar by 30 s or 300 s, in aqueous or non-aqueous CE, respectively). Table 2 shows the estimated values for the limits of quantification (LOQs) in both techniques. Coupling LVSEP to CE improved the LOQs about one and two orders of magnitude in aqueous CE and NACE, respectively. This allows the application of the procedure for samples in the  $\mu\text{g/L}$  level using conventional UV absorption detection.

### 3.3. Analysis of water samples

For the application of developed procedures to real wastewater samples, the analytes were extracted using SPE Oasis cartridges, as it has been described in Section 2.5. Employing methanol as solid-phase eluent, the SPE extracts of water samples can be directly injected into the CE system, making the extraction process compatible with the electrophoretic analysis.

As it has been reported previously [35], in NACE matrix components affects the ionic strength of sample extracts so the removing time of sample plug in the stacking process in methanolic medium increased. As a consequence, injection time had to be reduced to a level enabling quantitative injection of analytes in wastewater samples [35]. Using injection times of 30 s, comparable results were attained in both LVSEP–CE and LVSEP–NACE. As an example, Fig. 4 shows the electropherograms obtained in the analysis of a wastewater SPE extract using both aqueous and non-aqueous CE methods under the described conditions.

## 4. Conclusions

CZE methods based either on aqueous and non-aqueous running buffers, for the separation and quantification of phenolic and bisphenolic compounds in environmental samples were developed and optimized. Both aqueous electrophoresis (CE) and non-aqueous electrophoresis (NACE) methods were suitable for the analysis of compounds under study. The separation of the analytes from many potential interferences was demonstrated with NACE method.

Using LVSEP, for the in-line concentration of the analytes, quantification limits in the range of  $\mu\text{g/L}$  levels may be achieved with conventional UV absorption detection.

Additionally, the application of SPE sample preconcentration allows the analysis of the studied bromophenols and halogenated bisphenols in wastewater and other water samples of environmental concern.

Employing methanol as eluent in SPE, the extracts containing the analytes can be directly injected into the capillary electrophoresis system. It allows a good compatibility between extraction and electrophoretic processes, simplifying the whole analytical process.

## Acknowledgments

The Spanish Ministry of Science and Technology (MCYT-DGI) (project BQU2002-01944) and the Xunta de Galicia (project PGIDT01PXI23701PN) supported this research financially. E.B. acknowledges her doctoral grant from the Fundación Segundo Gil Dávila.

## References

- [1] F.A. Simonsen, M.L. Moller, T. Madsen, M. Stavnsbjerg, Brominated Flame Retardants: Toxicity and Ecotoxicity, Danish Environmental Protection Agency, Project no. 568, Kobenhavn, Denmark, 2000.
- [2] World Health Organization (WHO), Environmental Health Criteria 172, Tetrabromobisphenol A and Derivatives, World Health Criteria, Geneva, 1995.
- [3] World Health Organization (WHO), Environmental Health Criteria 192, Flame Retardants: A General Introduction, World Health Criteria, Geneva, 1997.
- [4] F. Barontini, V. Cozzani, K. Marsanich, V. Raffa, L. Petarca, J. Anal. Appl. Pyrol. 72 (2004) 41.
- [5] M. Brebu, T. Bhaskar, K. Murai, A. Muto, Y. Sakata, Md. A. Uddin, Chemosphere 56 (2004) 433.
- [6] C.A. de Wit, Brominated Flame Retardants, Swedish Environmental Protection Agency, Report 5065, Stockholm, 2000, p. 20.
- [7] S. Huber, K. Ballschmitter, Fresenius J. Anal. Chem. 371 (2001) 882.
- [8] J.A. Dodge, Pure Appl. Chem. 70 (1998) 1725.
- [9] C.M. Olsen, E.T.M. Meussen-Elholm, M. Samuelsen, J.A. Holme, J.K. Hongslo, Pharmacol. Toxicol. 92 (2003) 180.
- [10] C.M. Olsen, E.T.M. Meussen-Elholm, J.A. Holme, J.K. Hongslo, Toxicol. Lett. 129 (2002) 55.
- [11] I.A.T.M. Meerts, J.J. van Zanden, E.A.C. Luijckx, I. van Leeuwen-Bol, G. Marsh, E. Jakobsson, A. Bergman, A. Brouwer, Toxicol. Sci. 56 (2000) 95.
- [12] M. Ghost, I.A.T.M. Meerts, A. Cook, A. Bergman, A. Brouwer, L.N. Johnson, Acta Crystallogr. 56 (2000) 1085.
- [13] S. Kitamura, N. Jinno, S. Ohta, H. Kuroki, N. Fujimoto, Biochem. Biophys. Res. Commun. 293 (2002) 554.
- [14] T. Hyötyläinen, K. Hartonen, Trends Anal. Chem. 21 (2002) 13.
- [15] U. Sellström, B. Jansson, Chemosphere 31 (1995) 3085.
- [16] K. Öberg, K. Warman, T. Öberg, Chemosphere 48 (2002) 805.
- [17] K. Kuosmanen, T. Hyötyläinen, K. Hartonen, M.L. Riekkola, J. Chromatogr. A 943 (2001) 113.
- [18] A. Sjödin, H. Carlsson, K. Thuresson, S. Sjölin, A. Bergman, C. Ösman, Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 448.
- [19] U. Berger, D. Herzke, T.M. Sandanger, Anal. Chem. 76 (2004) 441.
- [20] C. Thomsen, K. Janák, E. Lundanes, G. Becher, J. Environ. Sci. Technol. 36 (2002) 1414.

- [21] C. Thomsen, K. Jának, E. Lundanes, G. Becher, J. Chromatogr. B 750 (2001) 1.
- [22] C. Thomsen, H. Leknes, E. Lundanes, G. Becher, J. Anal. Toxicol. 26 (2002) 129.
- [23] A. Smeds, P. Saukko, Chemosphere 53 (2003) 1123.
- [24] M. Riess, R. van Eldik, J. Chromatogr. A 827 (1998) 65.
- [25] A.M. Altwaiq, M. Wolf, R. Van Eldik, Anal. Chim. Acta 491 (2003) 111.
- [26] S. Morales, R. Cela, J. Chromatogr. A 896 (2000) 95.
- [27] S.P. Porras, M.L. Riekkola, E. Kenndler, J. Chromatogr. A 905 (2001) 95.
- [28] M.L. Riekkola, Electrophoresis 23 (2002) 3865.
- [29] C.W. Huie, Electrophoresis 24 (2003) 1508.
- [30] A. Macià, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, Electrophoresis 25 (2004) 428.
- [31] B. Kim, D.S. Chung, Electrophoresis 23 (2002) 49.
- [32] R.-L. Chien, D.S. Burgi, Anal. Chem. 64 (1992) 489A.
- [33] D.S. Burgi, Anal. Chem. 71 (1999) 995.
- [34] S. Porras, E. Kenndler, J. Chromatogr. A 1037 (2004) 455.
- [35] E. Blanco, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, J. Chromatogr. A (2005) doi:10.1016/j.chroma.2004.10.075.
- [36] Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software Solaris V4.67 (© 1994–2004 ACD/Labs), Chemical Abstracts Service (CAS), American Chemical Society, Washington, DC, 2004.
- [37] F. Rived, M. Rosés, E. Bosch, Anal. Chim. Acta 374 (1998) 309.
- [38] S.J. Broderius, M.D. Kalh, M.D. Hoglund, Environ. Toxicol. Chem. 14 (1995) 1591.
- [39] L. Lepri, P.G. Desideri, D. Heinler, J. Chromatogr. 195 (1980) 339.
- [40] J.M. Vandenbelt, C. Heinrich, S.G. Vanden Berg, Anal. Chem. 26 (1954) 726.
- [41] J. Eriksson, S. Rahm, N. Green, A. Bergman, E. Jakobsson, Chemosphere 54 (2004) 117.
- [42] I. Canals, E. Bosch, M. Rosés, Anal. Chim. Acta 458 (2002) 355.
- [43] S. Morales, R. Cela, J. Chromatogr. A 846 (1999) 401.
- [44] S.P. Porras, M.-L. Riekkola, E. Kenndler, Electrophoresis 23 (2002) 367.
- [45] H. Salimi-Moosavi, R.M. Cassidy, J. Chromatogr. A 790 (1997) 185.
- [46] C.L. de Ligny, M. Rehbach, Rec. Trav. Chim. 79 (1960) 727.
- [47] Federal Register, EPA Method 604, Phenols, Environmental Protection Agency, Part VIII, 40 CFR Part 136, 26 October 1984, pp. 58–66.
- [48] Federal Register, EPA Method 625, Base/Neutrals and Acids, Environmental Protection Agency, Part VIII, 40 CFR Part 136, 26 October 1984, pp. 153–174.
- [49] A. Macià, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, Electrophoresis 24 (2003) 2779.



Artículo II

Análisis del tetrabromobisfenol A y otros compuestos fenólicos en muestras de agua mediante electroforesis capilar en medio no acuoso acoplada a detección de absorción ultravioleta con red de diodos en serie

*Analysis of tetrabromobisphenol A and other phenolic compounds in water samples by non-aqueous capillary electrophoresis coupled to photodiode array ultraviolet detection*

*Journal of Chromatography A 1071 (2005) 205-211*





# Analysis of tetrabromobisphenol A and other phenolic compounds in water samples by non-aqueous capillary electrophoresis coupled to photodiode array ultraviolet detection

E. Blanco, M.C. Casais, M.C. Mejuto\*, R. Cela

*Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química, Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela, Avda. de las Ciencias s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain*

Available online 21 November 2004

## Abstract

Non-aqueous capillary electrophoresis (NACE) with large-volume sample stacking injection using the electroosmotic flow pump (LVSEP) has been developed for the determination of tetrabromobisphenol A (TBBPA) and other phenolic compounds in environmental matrices. Methanol has been used as run buffer solvent to reduce the electroosmotic flow (EOF). Identification and quantification of the analytes was performed by photodiode array ultraviolet detection. LVSEP–NACE improved sensitivity of the peak height by 90–300-fold. The method developed was applied to the analysis of TBBPA in river water and wastewater samples, using solid-phase extraction (SPE) as sample pretreatment process. The average recoveries of the analytes were in the range of 96–106% and 73–103% for 1 L of river water and 0.5 L of wastewater samples, respectively. When the method was based on off line SPE–LVSEP–NACE, sensitivity was improved by 3300–4500-fold and 1600–2200-fold for river water and wastewater samples, respectively.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Brominated flame retardants; Bromophenols; Tetrabromobisphenol A; Tetrachlorobisphenol A; Solid-phase extraction; Non-aqueous capillary electrophoresis; Large-volume sample stacking; Water analysis

## 1. Introduction

Some organic halogenated compounds are widely used by industry as flame retardant additives in different polymeric materials, like plastics, electronic applications, . . . , to protect products from catching fire. Halogenated flame retardants represent about 45% of the world-wide production [1], and within this group, tetrabromobisphenol A (TBBPA) is the most commonly used, as well as some brominated phenolic compounds, such as 2,4,6-tribromophenol (2,4,6-TriBP) and pentabromophenol (PeBP).

These chemicals can be released to the environment during industrial processes, during the entire life-time of the flame-retarded product and after disposal [2]. Recently, they

have been received attention from chemists and biologists because they are both lipophilic and persistent, some of them are either known or suspected endocrine disruptors, and have the ability to bioaccumulate in the food chain, being a potential environmental and human health problem [3].

Chromatographic techniques have been employed for the analysis of polymer additives, being gas chromatography preferred [4,5]. Due to the low concentrations as additives present in a large variety of environmental matrices, different sample pretreatment processes, like extraction and pre-concentration, are needed before its separation, detection and quantification.

Capillary electrophoresis (CE) has been proven to be an efficient technique for the separation of charged species. The application of organic solvents in CE as an alternative to aqueous solutions has been constantly increasing [6,7]. This analytical technique usually permits the use of simpler sample

\* Corresponding author. Tel.: +34 981 563100x14269;

fax: +34 981 547141.

E-mail address: [qnmamen@usc.es](mailto:qnmamen@usc.es) (M.C. Mejuto).

pretreatments than others, although CE applications are often limited by sensitivity. To overcome this problem, some authors use CE with sample concentration directly on the capillary (on-column stacking). These techniques include field-amplified methods that are based on conductivity differences between the sample and the electrophoretic medium, such as large-volume sample stacking injection using the EOF pump (LVSEP) [6,8,9]. This on-column concentration could stack trace amounts of negatively charged species without polarity switching, and enhanced the sensitivity in comparison with hydrodynamic injection. The electrophoretic mobility of the sample ions must be greater than and opposite to the EOF during both sample stacking and subsequent separation processes, so that they can proceed consecutively under the same voltage [8].

In this work, a new method for the determination of TBBPA and other phenolic compounds in environmental matrices by non-aqueous capillary electrophoresis (NACE) coupled to photodiode array ultraviolet detection has been developed. It has been used LVSEP, with methanol as the run buffer solvent to reduce the EOF. Finally, to test the applicability of the developed method, river water and wastewater samples extracted by SPE were analysed.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and materials

Methanol (HPLC gradient grade), ethyl acetate (for liquid chromatography), acetone (for gas chromatography), hexane (for organic trace analysis), and acetic acid glacial were obtained from Merck (Darmstadt, Germany), dimethyl sulfoxide (DMSO) (HPLC gradient grade) from Aldrich (Madrid, Spain), and hydrochloric acid from Prolabo (Fontenay-Sous-Bois, France). 2,4,6-Tribromophenol (99%), pentabromophenol (96%), tetrabromobisphenol A (97%) and tetrachlorobisphenol A (TCBPA, 98%) were obtained from Aldrich. 2,6-Dibromophenol (2,6-DiBP, 97%) was from Fluka (Buchs, Switzerland). Sodium tetraborate decahydrate and sodium hydroxide were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q system purchased from Millipore (Bedford, MA, USA).

Stock solutions of each phenol derivative were prepared at 4000 µg/mL in methanol. Chemical mixture standards for calibrations were dissolved in methanol to appropriate concentration levels. All solutions were refrigerated at 4 °C and protected against daylight. These solutions were used to make daily working standards solutions by appropriate dilution.

Cellulose ester membrane filters (SMWP, 47 mm, 5 µm; HAWP, 47 mm, 0.45 µm), Durapore membrane filters (GVHP, 47 mm, 0.22 µm), and Durapore Millex syringe filters (SLHV, 25 mm, 0.45 µm) were supplied from Millipore. Oasis SPE cartridges (HLB, 60 mg, 3 mL) were obtained from Waters (Milford, MA, USA).

### 2.2. CE analysis

Capillary electrophoresis was performed using a HP<sup>3D</sup> system (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany) equipped with an on-column diode array detection (DAD) system. Absorbances at 210 and 230 nm (direct UV detection) were monitored for the detection of the analytes. The migration order was determined by injecting the individual solution of each compound and by the spectral comparison of each peak in electropherograms with an UV spectra library.

Uncoated narrow-bore silica capillary (supplied by Composite Metal Services, UK) with an effective/total length of 61.5/70 cm and 75 µm i.d. was used. The capillary was thermostated to 25.0 °C. A Chrompack RTE-110B external water bath was used for thermostating the samples to 25 °C.

Standards and samples were injected hydrodynamically by applying a pressure of 50 mbar for 2 s and 300 s, depending on the experiment, and the applied voltage for separation was –30 kV, unless otherwise stated.

New capillaries were rinsed with 1 M sodium hydroxide for 20 min. Before injections, capillaries were conditioned by washing them with 0.1 M sodium hydroxide for 5 min, Milli-Q water for 5 min, and 15 min with the separation electrolyte. After each run (once the electrophoretic separation has finished) the capillary was flushed with organic solvent corresponding to the electrophoretic medium for 5 min and with Milli-Q water for 5 min. The inlet and outlet of the capillary were kept overnight in Milli-Q water.

Methanol was assayed as solvent for non-aqueous background electrolyte preparation. Sodium tetraborate, being readily soluble in methanol, was used as electrolytic salt. The apparent pH (pH<sub>app</sub>) [10] of the solution was 9.4, adjusted by addition of a sodium hydroxide solution, and measured using a Metrohm 654 pH-meter (Herisau, Switzerland) calibrated with aqueous standard buffer solutions. This solution was prepared freshly each two days, sonicated in a P-Selecta ultrasonic bath (Barcelona, Spain) for at least 4 min and filtered through a membrane of 0.22 µm pore size. Every day all remaining solutions were filtered through a 0.45 µm syringe filter before use.

Data acquisition was done by means of HP<sup>3D</sup> ChemStation Software (Rev. A.06.01[403]) (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany). Statistical analysis of the response variables were supported by the statistical graphics software system Statgraphics Plus 3.3 (STSC, Rockville, MD, USA).

Oasis SPE cartridges were dried using a Turbo-Vap II Nitrogen Evaporator supplied by Zymark (Hopkinton, MA, USA).

### 2.3. Sample preparation

An off-line solid-phase extraction (SPE) step was used to cleanup and preconcentrate the samples before analysis. Environmental water samples were collected in a river and a wastewater-treatment plant near Santiago de Compostela (NW Spain).

Milli-Q water and real water samples, non-spiked or spiked with the appropriate standard, were acidified when needed at different pH values between 2.5 and 6.8 with hydrochloric acid. They were filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  cellulose ester membrane filters before the SPE to eliminate particulate matter (in some cases, for influent wastewater samples with high content of particulate matter, samples were prefiltered through 5  $\mu\text{m}$  membrane filters). We used Oasis SPE cartridge columns from Waters packed with 60 mg of polystyrene–divinylbenzene (PS–DVB) sorbent. Three organic solvents were assayed as eluents: methanol, ethyl acetate and acidified hexane (containing 2% acetic acid). The SPE Oasis cartridges were conditioned by passing 4 mL of organic solvent, 4 mL of acetone (in the case of solvent incompatibility with water) and 4 mL of Milli-Q water at adequate pH. After that the water sample was loaded through the cartridge, then the cartridge was washed with 10 mL of Milli-Q water at the corresponding pH, and then dried under nitrogen stream for 45 min at a pressure of 12 psi (1 psi = 6894.76 Pa). The analytes trapped on the column were eluted with organic solvent.

In all cases, in order to determine the optimum elution volume, eluent was subdivided in 1 mL fractions that were subsequently subjected to CE analysis.

#### 2.4. LVSEP

All analytes were dissolved in methanol and introduced hydrodynamically into the capillary with a pressure of 50 mbar for 300 s, unless otherwise stated. After sample injection, a negative voltage of  $-30$  kV was applied for both sample stacking and subsequent separation. Fresh electrolyte and sample solutions were always used for each injection. The compounds, which are present in the anionic form at the  $\text{pH}_{\text{app}}$  of the background electrolyte (9.4), migrate to the detection window by their own electrophoretic mobility while the EOF moves in the opposite direction because they were injected on the cathodic side.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Separation by non-aqueous capillary electrophoresis

In NACE, the nature and properties of the organic solvent have the strongest influence on the separation efficiency and resolution [11]. Methanol is the most commonly used organic solvent in CE [12]. It has favourable properties, such as dielectric constant, viscosity, and a useful UV range for detection [13], it is an appropriate solvent for common electrolyte salts, and allows LVSEP as field-amplified technique of on-line concentration in NACE (see the next section). Moreover, is a usual solvent used as extractant in many sample pretreatment processes, like SPE, allowing the direct injection of the extracts in the NACE

system. For these reasons, it was chosen as the run buffer solvent.

Some parameters affecting the electrophoretic separation were studied with a test mixture of the studied compounds, being salt concentration, electrolyte  $\text{pH}_{\text{app}}$ , and capillary and solutions temperatures the most important.

All of the compounds under investigation have weakly acid hydroxyl groups, so capillary zone electrophoresis (CZE) at high or moderate pH might be suitable for their determination. The  $\text{pK}_{\text{a}}$  values in water of the bromophenols and halogenated bisphenols considered range from 4.4 and 8.5 [14–19], which means that at a pH value over 8.5 they are expected to be all at least partially dissociated, present in their anionic forms and therefore ready for CE analysis. But this only gave us an idea for choosing the starting experimental conditions, because the solute  $K_{\text{a}}$  may change for organic solvents by some orders of magnitude, and their values are unknown. So, optimum electrolyte  $\text{pH}_{\text{app}}$  was determined by testing values in the range of 8.6 and 9.6, obtaining better results at 9.4. Working at lower  $\text{pH}_{\text{app}}$  values the analysis time was too long, and at higher  $\text{pH}_{\text{app}}$  values the separation was incomplete, and some compounds coeluted.

Electrolyte concentration depends on separation requirements. In earlier investigations, three levels of molarity of the running buffer were assayed: 20, 30 and 40 mM sodium tetraborate in methanol. As could be expected, the resolution was improved with the decrease in the ionic strength because of the EOF increasing and the apparent solute mobility decreasing, at the expense of higher analysis time. Best results were reached by using a concentration electrolyte salt of 20 mM, with an analysis time lower than 30 min. So, a 20 mM solution of sodium tetraborate in methanol adjusted at  $\text{pH}_{\text{app}}$  9.4 was finally chosen as running buffer.

In first runs, capillary and sample tray temperatures in the range of 18.5 and 25.0  $^{\circ}\text{C}$  were tested. Although at 18.5  $^{\circ}\text{C}$  somewhat better results as for resolution for the pair 1 and 2 (for peak assignation see Fig. 1) were obtained, in general, it is not easy to consistently maintain this temperature under usual laboratory conditions so 25.0  $^{\circ}\text{C}$  was the temperature finally chosen.

Fig. 1(A) shows the separation of the standard mixture in the optimised conditions. As it can be seen, all the analytes were baseline separated. Electroosmotic mobility ( $\mu_{\text{eo}}$ ) and effective electrophoretic mobilities ( $\mu_{\text{ef}}$ ) of the analytes were evaluated.  $\mu_{\text{eo}}$  was measured using DMSO as EOF marker and in positive polarity. Negative values of  $\mu_{\text{ef}}$  were in the range of  $-2.72 \times 10^{-4}$  for 2,4,6-TriBP and  $-2.16 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  for TCBPA, and were higher (absolute values) than  $\mu_{\text{eo}}$  of methanol run buffer ( $1.27 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). So, under these conditions, these anionic compounds could reach the detector placed on the anodic side of the capillary.

Linearity, precision, and detection and quantification limits (LODs and LOQs) were evaluated in order to assess the

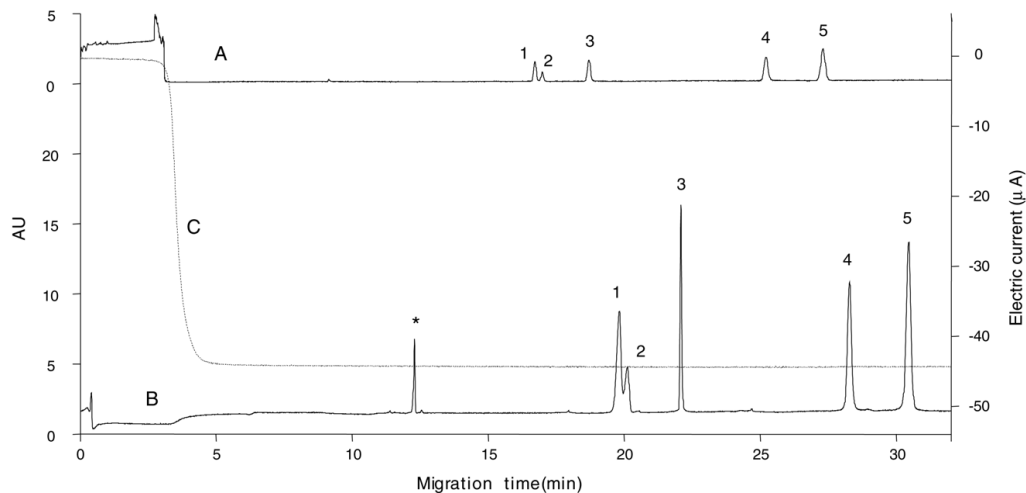


Fig. 1. Electropherograms of standard solutions in methanol of the five compounds in study in concentration of (A) 2  $\mu\text{g/mL}$  and (B) 0.1  $\mu\text{g/mL}$ . (C) Electric current during the LVSEP process. Running buffer: 20 mM sodium tetraborate at apparent pH 9.4; capillary: 70 cm  $\times$  75  $\mu\text{m}$  i.d.; applied voltage:  $-30$  kV; detection: 210 nm; capillary and sample tray temperature: 25  $^{\circ}\text{C}$ ; hydrodynamic injection: (A) 50 mbar by 2 s, (B) 50 mbar by 300 s. Peak designation: (1) 2,4,6-TriBP, (2) PeBP, (3) 2,6-DiBP, (4) TBBPA, and (5) TCBPA.

performance of this electrophoretic method under the optimal conditions established. Results have been summarized in Table 1. Calibration curves were linear in the concentration ranges studied (from 500 to 10,000  $\mu\text{g/L}$ ), and the correlation factor  $r$  values were higher than 0.999 for all the compounds. Precision was examined by performing six replicate injections of a mixture of the analytes at a concentration of 2 mg/L for all compounds, in the same day (repeatability) and in different days (reproducibility), and were in the range 3–8% R.S.D. in analyte response. The LODs and LOQs were calculated considering peak height and signal-to-noise ratios (S/N) of 3 and 10, respectively.

### 3.2. LVSEP in the methanol run buffer

The sensitivity achieved with the NACE developed method previously described can be improved significantly by concentrating the samples directly on the capillary using LVSEP. When methanol was used as the running buffer solvent, appropriate suppression of EOF and an increase in the electrophoretic mobilities of the anionic analytes made LVSEP possible [6].

The capillary was (c.a. 95%) filled with the sample solution in methanol when 300 s were used as hydrodynamic injection time. After injection, the methanol matrix was

Table 1  
Regression analysis, LODs and LOQs of NACE methods developed in standard solutions

Method	Compound	Calibration curves	Slope standard error	Intercept standard error	LOD ( $\mu\text{g/L}$ ) <sup>a</sup>	LOQ ( $\mu\text{g/L}$ ) <sup>a</sup>
NACE, $t_{\text{inj}} = 2$ s <sup>b</sup>	2,4,6-TriBP	$y = 4.422x + 0.504$	0.028	0.145	125	416
	PeBP	$y = 3.071x + 0.394$	0.025	0.129	135	450
	2,6-DiBP	$y = 5.321x + 0.528$	0.038	0.194	130	433
	TBBPA	$y = 8.262x + 0.535$	0.080	0.403	146	485
	TCBPA	$y = 12.746x + 0.883$	0.118	0.594	84	280
LVSEP–NACE, $t_{\text{inj}} = 300$ s <sup>b</sup>	2,4,6-TriBP	$y = 0.693x + 8.528$	0.016	3.043	1.4	4.6
	PeBP	$y = 0.472x + 6.312$	0.015	3.156	1.7	5.5
	2,6-DiBP	$y = 0.504x + 5.398$	0.011	2.145	0.4	1.3
	TBBPA	$y = 0.882x + 5.295$	0.016	3.261	0.5	1.6
	TCBPA	$y = 1.249x + 24.324$	0.043	9.808	0.4	1.3
LVSEP–NACE, $t_{\text{inj}} = 30$ s <sup>b</sup>	2,4,6-TriBP	$y = 81.157x - 1.553$	0.663	1.830	11.6	38.6
	PeBP	$y = 51.707x + 0.378$	0.329	0.901	13.6	45.4
	2,6-DiBP	$y = 8.624x + 0.934$	0.166	0.400	9.7	32.3
	TBBPA	$y = 12.113x - 0.143$	0.183	0.500	11.9	39.6
	TCBPA	$y = 15.963x + 0.160$	0.177	0.481	7.6	25.2

<sup>a</sup> LOD: S/N = 3; LOQ: S/N = 10; detection at 210 nm, except of PeBP at 230 nm.

<sup>b</sup>  $t_{\text{inj}}$  = injection time; other CE conditions as in Fig. 1.

removed by the EOF pump while the anions were stacked under the electric field of reverse polarity of  $-30$  kV, because of the differences in conductivity between the sample and the electrophoretic medium. As the capillary was filled with the run buffer of high conductivity, the overall EOF became further reduced due to the increased ionic strength. When the EOF and the electrophoretic velocities of analytes were balanced, the migration direction of the stacked analytes was switched toward the detector, and thus the separation of the highly stacked sample occurs.

Fig. 1(B) shows the separation and the enhancement in sensitivity achieved using LVSEP–NACE. The process of removing the methanol plug out of the capillary imposed the differences in migration times between the electropherograms A and B. The mobile anions in the inlet buffer vial, such as borate ions, were also injected hydrodynamically and stacked at the concentration boundary while the methanol plug was being removed [8]. In the electropherogram the peak corresponding to borate is identified by the symbol \*.

Fig. 1(C) shows the electric current during the LVSEP process. The intensity of the electric current increased rapidly (in absolute values) for nearly 5 min, while the sample matrix was removed and the ionic strength of the medium in the capillary increased to  $-44$   $\mu$ A, close to the value registered when the capillary was filled with the run buffer. Then the current stabilised, indicating that most of the methanol sample matrix was replaced with the run buffer, and the analytes were stacked at the beginning of the capillary, reversing their migration direction towards the outlet vial overcoming the reduced EOF [6,8].

The analytical performance of LVSEP–NACE was also evaluated, and the method developed showed good linearity and precision within the concentration range studied (20–400  $\mu$ g/L), with correlation factor  $r$  values higher than 0.99 and % R.S.D. between 5 and 9% for all the compounds (see Table 1).

Coupling LVSEP to NACE improved the LODs about two orders of magnitude in comparison with normal hydrodynamic injection. This allows the application of the procedure for samples in the  $\mu$ g/L level using conventional UV absorption detection.

### 3.3. Analysis of water samples

For the application of the developed procedure to real river water and wastewater samples, the analytes were extracted using SPE Oasis cartridges. Parameters affecting the SPE process (e.g. sample pH, eluent volumes and composition) were studied. Preliminary experiments were conducted on ultrapure (Milli-Q) water samples spiked with all studied compounds at the 0.8  $\mu$ g/L level. In the view of  $pK_a$  values (see Section 3.1) pH of samples was adjusted at 2.5 to enhance the retention of analytes in the polymeric sorbent. Volume of samples was 500–1000 mL. In these experiments recoveries were ranging between 86 and 117% for all analytes. Further experiments, however, evidenced that sample's

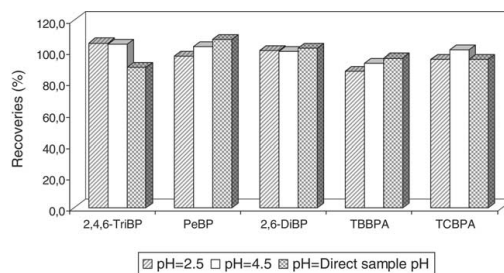


Fig. 2. Effect of the water sample pH on SPE recoveries in the analysis of 1 L of river water samples spiked at a concentration of 6  $\mu$ g/L for all compounds.

pH has not significance in the overall efficiency of the SPE process as can be seen in Fig. 2. This means that samples can be processed without pH adjustment. Moreover, since lower pH values favour the adsorption of matrix components in samples (mainly humic and fulvic acids) on the polymeric sorbent, it is advisable to not acidify the samples before extraction [11,20–22].

Three solvents of different polarity, methanol, ethyl acetate and hexane acidified with 2% of acetic acid, were assayed as cartridge eluting solvents in the SPE process. Acidified hexane is the less favourable approach because the need of evaporation and solvent exchange due to incompatibility with the solvent background electrolyte. This solvent was soon abandoned in the view of its low efficiency to elute the analytes retained in the cartridge. Ethyl acetate exhibit good behavior as eluting solvent but caused current breakdown in the separation process unless fully exchanged by other compatible solvent. Losses of analytes were registered in the evaporation and solvent exchange processes so the experiences with ethyl acetate were also abandoned. Methanol provided the better performance in removing effectively the analytes from the sorbent and giving an extract fully compatible with the background electrolyte which reduces sample preparation stages and error chances.

Optimal elution volume was evaluated as described in Section 2.3 by measuring successive eluting fractions until no signal for analytes can be seen and the sum of signal in the accumulated fractions demonstrated that quantitative recoveries have been attained. A volume of 3 mL of methanol was found to completely elute all the analytes from the cartridges.

At the time of testing these conditions on real river and wastewater samples some added difficulties appeared as expected. Matrix components affects the ionic strength of sample extracts so the removing time of sample plug in the stacking process increased. As a consequence, recoveries were affected because a fraction of the sample kept out the capillary during stacking. Logically, this effect was more noticeable for longer injection times. For samples spiked at 1  $\mu$ g/L level, losses of 40–50% were observed using injection times of 300 s. Consequently, injection time was reduced to a level enabling quantitative injection of analytes in samples. Using injection times of 30 s recoveries equivalent to those

previously reported were attained. Also good precision (% R.S.D. between 3 and 7% for all the compounds) and linearity (correlation factor  $r$  values higher than 0.99) within the concentration range studied (100–5000  $\mu\text{g/L}$  for all compounds) were obtained at the logical expense of LODs (Table 1). Fig. 3 shows the electropherograms obtained in the analysis of river water and wastewater extract using the described conditions.

As can be seen in the electropherograms in Fig. 3, non-spiked samples of influent wastewater exhibit several small peaks, some of them in the vicinity of 2,6-DiBP, TBBPA and TCBPA. Experiments using longer injection times and decreasing the tray temperature to enhance separation and to provide more clear spectral information evidenced that these small peaks did not correspond to the analytes studied. In any case, it is advisable to prepare calibration lines based on peak height data to avoid the effect of these small peaks in the tail of analyte peaks.

Table 2 summarized the average recoveries for the studied analytes from four independent 1 L river water samples, four effluent and three influent wastewater samples (500 mL each). These recovery values were checked for consistency in the spiking range 1.2–12  $\mu\text{g/L}$  for all studied compounds. Recoveries in Table 2 are in good agreement with those reported for ultrapure water thus showing that matrix effects in SPE processes were adequately controlled when samples were processed at their natural pH.

Recoveries for river and effluent wastewater samples grant the use of external calibration. However, for influent wastewater samples an evident matrix effect appears, thus making advisable the use of standard additions in the analysis of these samples.

In any case, breakdown volumes must be evaluated in cartridges to confirm that the sample volumes proposed (1 L in the case of river water and 0.5 L for wastewater) can be routinely handled. To verify this point experiences of sample extraction by passing samples through two cartridges connected in tandem were carried out. Both cartridges were eluted independently and extracts analysed. In no case, eluates from the second cartridge evidenced detectable amounts of analytes. Further series of experiments extracting double sample vol-

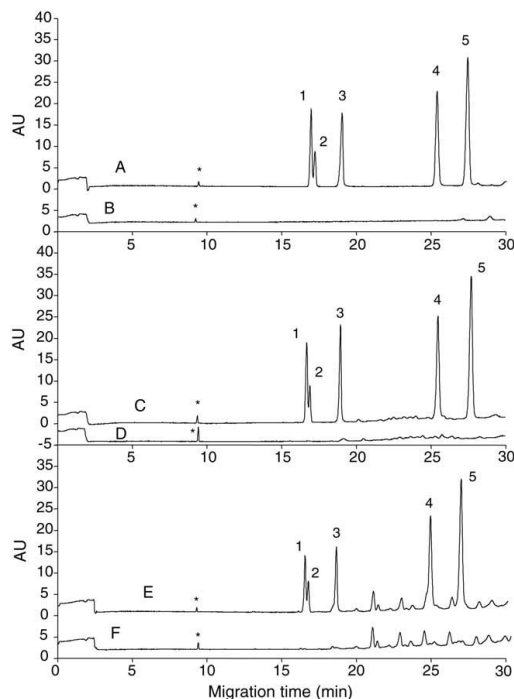


Fig. 3. Electropherograms obtained from SPE extracts of (A) 1 L of river water sample spiked at a concentration of 6  $\mu\text{g/L}$  for all compounds, (B) 1 L of river water non-spiked sample (C) 500 mL of effluent wastewater sample spiked at a concentration of 12  $\mu\text{g/L}$  for all compounds, (D) 500 mL of non-spiked effluent wastewater sample, (E) 500 mL of influent wastewater sample spiked at a concentration of 12  $\mu\text{g/L}$  for all compounds, (F) 500 mL of non-spiked influent wastewater sample; hydrodynamic injection, 50 mbar by 30 s. Other CE conditions and peak assignment as in Fig. 1.

umes confirm excellent retention of analytes in the cartridges. This means that quantification limits can be decreased by processing up to 2 L of river water samples or 1 L of wastewater samples if needed at the expense of considerably higher processing times.

Table 2

Recoveries of compounds on the Oasis cartridge from spiked river water and wastewater samples

Compound	SPE recoveries (%)			SPE–NACE: LOQ ( $\mu\text{g/L}$ ) <sup>b</sup>			SPE–LVSEP–NACE: LOQ (ng/L) <sup>b</sup>			
	River water	R.S.D. (%) <sup>a</sup>	Effluent	R.S.D. (%) <sup>a</sup>	Influent	R.S.D. (%) <sup>a</sup>	River water <sup>c</sup>	Wastewater <sup>d</sup>	River water <sup>c</sup>	Wastewater <sup>d</sup>
2,4,6-TriBP	101.4	3.4	100.5	1.1	73.0	3.7	1.2	2.4	116	232
PeBP	105.8	3.4	102.6	0.9	82.0	0.2	1.4	2.8	136	272
2,6-DiBP	102.2	3.4	103.4	0.3	88.2	8.3	1.3	2.6	97	194
TBBPA	95.5	1.9	101.2	3.7	93.6	7.5	1.5	3.0	119	238
TCBPA	96.2	2.5	102.3	2.7	94.0	2.2	0.8	1.6	76	151

LOQs of SPE–NACE and SPE–LVSEP–NACE in real water samples.

<sup>a</sup>  $n = 4$  for river water and effluent wastewater, and  $n = 3$  for influent wastewater.

<sup>b</sup> LOQ: S/N = 10; detection at 210 nm, except of PeBP at 230 nm.

<sup>c</sup> Water volume: 1 L.

<sup>d</sup> Water volume: 0.5 L.

The LOQs including the SPE procedure were considerably improved for both NACE and LVSEP–NACE methods (see Tables 1 and 2). Thus, sensitivity for SPE–LVSEP–NACE method was enhanced between 3300–4500-fold and 1600–2200-fold for river waters and wastewater samples, respectively.

#### 4. Conclusions

This work describes a simple NACE method developed to stack trace amounts of negatively charged halogenated phenolic and bisphenolic compounds without polarity switching using methanol to suppress the EOF flow. Stacking can produce concentration factors that can increase the sensitivity of the method to the low  $\mu\text{g/L}$  levels, being about 100 times greater than with usual hydrodynamic injection.

Solid-phase extraction using Oasis cartridges provide excellent recoveries of compounds under study from water samples at neutral pH. Employing the background electrolyte solvent as eluent, the SPE extracts of anionic samples can be directly injected into the NACE system without any dilution or solvent exchange. It allows a good compatibility between extraction and electrophoretic processes.

Using LVSEP, it enhanced the on-line concentration of the analytes studied, giving quantification limits under  $\mu\text{g/L}$  levels with conventional UV absorption detection, and consequently SPE–LVSEP–NACE can be successfully applied to the quantitative determination of the compounds studied at trace levels in water samples.

#### Acknowledgments

This research was supported financially by the Spanish Commission for Research and Development MCYT-DGI

(project BQU2002-01944) and the Xunta de Galicia (project PGIDT01PXI23701PN). E.B. acknowledges her doctoral grant from the Fundación Segundo Gil Dávila.

#### References

- [1] C. Thomsen, E. Lundanes, G. Becher, *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 282.
- [2] U. Sellström, Doctoral Dissertation, Stockholm University, 1999.
- [3] C. Thomsen, K. Jának, E. Lundanes, G. Becher, *J. Chromatogr. B* 750 (2001) 1.
- [4] M. Riess, R. van Eldik, *J. Chromatogr. A* 827 (1998) 65.
- [5] T. Hyötyläinen, K. Hartonen, *Trends Anal. Chem.* 21 (1) (2002) 13.
- [6] B. Kim, D.S. Chung, *Electrophoresis* 23 (2002) 49.
- [7] M.L. Riekkola, *Electrophoresis* 23 (2002) 3865.
- [8] A. Macià, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, *Electrophoresis* 24 (2003) 2779.
- [9] A. Macià, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, *Electrophoresis* 25 (2004) 428.
- [10] S. Porras, E. Kenneder, *J. Chromatogr. A* 1037 (2004) 455.
- [11] S. Morales, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 896 (2000) 95.
- [12] S.P. Porras, M.L. Riekkola, E. Kenneder, *Electrophoresis* 23 (2002) 367.
- [13] H. Salimi-Moosavi, R.M. Cassidy, *J. Chromatogr. A* 790 (1997) 185.
- [14] F. Rived, M. Rosés, E. Bosch, *Anal. Chim. Acta* 374 (1998) 309.
- [15] WHO (World Health Organization), *Environmental Health Criteria 192, Flame Retardants: A General Introduction*, World Health Criteria, Geneva, 1997.
- [16] Chemical Abstracts Service (CAS), American Chemical Society, Washington, DC, 2004.
- [17] S.J. Broderius, M.D. Kahl, M.D. Hoglund, *Environ. Toxicol. Chem.* 14 (1995) 1591.
- [18] L. Lepri, P.G. Desideri, D. Heinler, *J. Chromatogr.* 195 (1980) 339.
- [19] J. Eriksson, S. Rahm, N. Green, A. Bergman, E. Jakobsson, *Chemosphere* 54 (2004) 117.
- [20] A. Di Corcia, A. Bellioni, M.D. Madbouly, J. Marchese, *J. Chromatogr. A* 733 (1996) 383.
- [21] C. Crescenzi, A. Di Corcia, G. Passariello, R. Samperi, M.I. Turnes, *J. Chromatogr. A* 733 (1996) 41.
- [22] A. Di Corcia, S. Marchese, R. Samperi, *J. Chromatogr.* 642 (1993) 175.



Artículo III

Aproximaciones para la extracción simultánea del tetrabromobisfenol A, el tetraclorobisfenol A, y compuestos fenólicos relacionados de muestras de lodos de depuradora y sedimentos mediante la dispersión de la matriz en fase sólida

*Approaches for the simultaneous extraction of tetrabromobisphenol A, tetrachlorobisphenol A, and related phenolic compounds from sewage sludge and sediment samples based on matrix solid-phase dispersion*

*Analytical Chemistry* 78 (2006) 2772-2778



# Approaches for the Simultaneous Extraction of Tetrabromobisphenol A, Tetrachlorobisphenol A, and Related Phenolic Compounds from Sewage Sludge and Sediment Samples Based on Matrix Solid-Phase Dispersion

E. Blanco, M. C. Casais, M. C. Mejuto, and R. Cela\*

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química, Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela, E-15782 Santiago de Compostela, Spain.

A procedure based on matrix solid-phase dispersion (MSPD) for sample preparation in the analysis of some bromophenols and halogenated bisphenols in sediments and sludges has been developed. For the first time ever, MSPD was applied for the extraction of organic contaminants from sediment and sewage sludge samples. The influence of experimental conditions on the yield of the extraction process and on the efficiency of the built-in cleanup step was thoroughly evaluated. Analysis of the extracts was performed by nonaqueous capillary electrophoresis coupled with photodiode array ultraviolet detection, using large-volume sample stacking injection based on the electroosmotic flow pump as an on-column pre-concentration technique. The method was applied to the analysis of real sludges from urban sewage treatment plants, as well as river and marine sediment samples.

Brominated flame retardants (BFRs) are ubiquitous substances used in paints, building materials, synthetic textiles, and plastic products, including electronic circuit boards and other electronic equipment, to reduce their flammability and thus to prevent fires.<sup>1,2</sup> Tetrabromobisphenol A (TBBPA) is probably the most widely used flame retardant worldwide.<sup>3,4</sup> Pentabromophenol (PeBP), 2,4,6-tribromophenol (2,4,6-TriBP), and tetrachlorobisphenol A (TCBPA) are also used as halogenated flame retardants,<sup>5</sup> although to a lesser extent than TBBPA. Although some bromophenols are ubiquitous to the marine environment, being readily detected in marine fish, crustaceans, molluscs, polychaetes (which have been

shown to contaminate the sediments of their borrows and surroundings to an extent sufficient to influence other biota<sup>6</sup>), and marine algae,<sup>7</sup> 2,6-Dibromophenol (2,6-DiBP) and 2,4,6-TriBP are also generated in the thermal decomposition of TBBPA or from plastics treated with polybrominated epoxy-type flame retardants.<sup>8,9</sup> 2,4,6-TriBP is also the main breakdown product from the degradation of TBBPA when it is exposed to UV light.<sup>10</sup> Biodegradation studies have shown that TBBPA can be partly degraded to lesser brominated analogues under both aerobic and anaerobic conditions in soil and river sediment.<sup>4</sup> Thus, both natural and anthropogenic origins might be attributed to bromophenols in marine environment.

Extensively used under the assumption that BFRs are a safe class of flame retardants, they are widely distributed in the environment. Recently, some concerns have been expressed regarding their persistence and potential bioaccumulation.<sup>5</sup> TBBPA, PeBP, 2,4,6-TriBP, and TCBPA have proved toxicity.<sup>11–15</sup> Some of them (TBBPA, TCBPA) have shown significant thyroid hormonal activities (similar to chlorinated biphenyls), as well as estrogenic activity,<sup>2</sup> and are suspected to be carcinogenic.<sup>12</sup> Although at this moment there is no regulated restriction on the usage of these BFRs, a revision of TBBPA is currently underway in the EU.<sup>16</sup>

\* Corresponding author. Phone: +34-981-563100, Ext 14271. Fax: +34-981-547141. E-mail: qnrcrd@usc.es.

- (1) Simonsen, F. A.; Møller, M. L.; Madsen, T.; Stavnsbjerg, M. *Brominated flame retardants: toxicity and ecotoxicity*; Danish Environmental Protection Agency, Project 568, København, Denmark, 2000.
- (2) Kitamura, S.; Jinno, N.; Ohta, S.; Kuroki, H.; Fujimoto, N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *293*, 554–559.
- (3) WHO (World Health Organization), Environmental Health Criteria 172, Tetrabromobisphenol A and derivatives, World Health Criteria, Geneva, Switzerland, 1995.
- (4) Hakk, H.; Letcher, R. J. *Environ. Int.* **2003**, *29*, 801–828.
- (5) WHO (World Health Organization), Environmental Health Criteria 192, Flame retardants: A General Introduction, World Health Criteria, Geneva, Switzerland, 1997.

- (6) Marinelli, R. L.; Woodin, S. A. *Biochem. System. Ecol.* **2005**, *33*, 559–570.
- (7) Joyce Ma, W. C.; Chung, H. Y.; Ang, P. O. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2133–2139.
- (8) Barontini, F.; Cozzani, V.; Marsanich, K.; Raffa V.; Petarca, L. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2004**, *72*, 41–53.
- (9) Brebu, M.; Bhaskar, T.; Murai, K.; Muto, A.; Sakata Y.; Uddin, Md. A. *Chemosphere* **2004**, *56*, 433–440.
- (10) de Wit, C. A. Brominated flame retardants, Swedish Environmental Protection Agency, Report 5065, Stockholm, Sweden, 2000.
- (11) Ghost, M.; Meerts, I. A. T. M.; Cook, A.; Bergman, A.; Brouwer A.; Johnson, L. N. *Acta Crystallogr.* **2000**, *56*, 1085–1095.
- (12) Meerts, I. A. T. M.; Van Zanden, J. J.; Luijckx, E. A. C.; Van Leeuwen-Bol, I.; Marsh, G.; Jakobsson, E.; Bergman, A.; Brouwer, A. *Toxicol. Sci.* **2000**, *56*, 95–104.
- (13) Olsen, C. M.; Meussen-Elholm, E. T. M.; Samuelsen, M.; Holme J. A.; Hongslo, J. K. *Toxicol. Lett.* **2005**, *129*, 55–63.
- (14) Olsen, C. M.; Meussen-Elholm, E. T. M.; Samuelsen, M.; Holme J. A.; Hongslo, J. K. *Pharmacol. Toxicol.* **2003**, *92*, 180–188.
- (15) Strack, S.; Sander, M.; Detzel, T.; Kuch, B.; Krug, H. F. *Organohalogen Compd.* **2004**, *66*, 3795–3800.

On the other hand, sewage sludges are disposed and used as an economical organic fertilizer in agriculture. However, it is well known that their field disposal if allowed, or its incineration, may cause the reintroduction and dispersion of toxic compounds in the environment. This can be the case of halogenated phenols and bisphenols, including the formation of polybrominated dibenzodioxins, polybrominated dibenzofurans, or both.<sup>17</sup> Thus, monitoring the levels of these compounds in sewage sludge would be needed to classify and define sludge disposal. TBBPA (log  $K_{ow}$  4.5, solubility in water 0.72 mg/L) and TCBPA and its halogenated analogues are expected to associate with particulates or be adsorbed to organic matter in sludge and sediments.<sup>18</sup> Several environmental studies have shown the presence of significant concentrations of these compounds in sludges from sewage treatment plants in Sweden,<sup>19,20</sup> England,<sup>21</sup> and Canada,<sup>22</sup> as well as in sediments of Japan<sup>23</sup> and England (up to 9.8  $\mu\text{g/g}$  TBBPA in river and estuarine sediments<sup>21</sup>). Additionally, some of these studies have shown the correlation of high TBBPA levels in sludges with electronic<sup>19</sup> or plastic<sup>20</sup> industrial activity or facilities.

Selective extraction of specific compounds from sewage sludge and sediments is recognized as a complicate task because real samples contain a large variety of contaminants differing in polarity and chemical nature, thus requiring highly efficient methods of extraction and sample cleanup. High content of organic matter in sludge makes difficult the attainment of good recoveries and makes necessary exhaustive extraction processes using large amounts of solvents and further multistep cleanup processes of the extract to provide an analyzable solution. Few analytical procedures have been reported for determination of TBBPA, TCBPA, or brominated phenolic compounds in sediment or sewage sludge samples, resorting generally to highly selective detection techniques (LC-MS<sup>18</sup> or GC/MS<sup>19,24,25</sup>). To our knowledge, only liquid-liquid extraction, solid-phase extraction (SPE), centrifugation,<sup>18,24</sup> and pressurized hot water extraction<sup>24</sup> have been successfully applied to the extraction of TBBPA from sediments and sludges. Sample preparation procedures dealing with the simultaneous extraction of TBBPA, TCBPA, and related bromophenols from solid environmental samples have not been reported.

Matrix solid-phase dispersion (MSPD) is a sample preparation method that allows the simultaneous sample homogenization, disruption, extraction of the analyzed compounds, and further cleanup in a single step using solid sorbents without resorting to dedicated or expensive instrumentation, thus providing significant

reduction in both sample size and solvent consumption, as well as in analysis time and costs.<sup>26,27</sup> Currently, MSPD has been applied to extracting different types of microcontaminants (drugs, pesticides, PCBs, PAHs) and naturally occurring compounds from a wide variety of solid or semisolid materials (food, serum, blood, tissues, plants, biota).<sup>27-33</sup> Recently, MSPD has been combined with pressurized solvent extraction, thus automating the final elution stages in MSPD.<sup>28</sup> Li et al.<sup>34,35</sup> have used this technique for the determination of pesticides in soil samples. However, from our knowledge, MSPD has not been reported for the extraction of organic contaminants from sewage sludge and sediment samples.

In this study, a one-step procedure for the simultaneous extraction and cleanup of some brominated phenols and halogenated bisphenols from sewage sludge and river and marine sediment samples using MSPD is described. The influence of important parameters, such as solid sorbent types and eluting solvent, on the yield of MSPD extraction process and on the cleanup efficiency was investigated, to achieve the best performance of the method. Analysis of the extracts was performed by nonaqueous capillary electrophoresis (NACE) coupled with photodiode array ultraviolet detection (DAD). Large-volume sample stacking injection using the electroosmotic flow pump (LVSEP) was applied as an on-column preconcentration technique allowing significant sensitivity enhancements. Finally, the developed method was applied for the determination of TBBPA, TCBPA, and related bromophenols in sewage sludge and river and marine sediment real samples.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Reagents, Standards, and Materials.** Methanol and acetonitrile (LiChrosolv gradient grade), ethyl acetate (LiChrosolv), and dichloromethane (Suprasolv) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Formic acid (95-97%) was purchased from Aldrich (Madrid, Spain), sulfuric acid (96%) was from AnalytiCals Carlo Erba (Milano, Italy), and hydrochloric acid (36%) was supplied by Prolabo (Fontenay-Sous-Bois, France). Ultrapure water was obtained in the laboratory from a Milli-Q system purchased from Millipore (Bedford, MA).

2,4,6-TriBP (99%), PeBP (96%), TBBPA (97%), and TCBPA (98%) were obtained from Aldrich (Steinheim, Germany). 2,6-DiBP (97%) was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Stock solutions of each phenol derivative were prepared at 2000  $\mu\text{g/mL}$  in methanol. Diluted standard mixtures were prepared in both acetonitrile (used as calibration solutions) and methanol (used

(16) Alaei, M.; Arias, P.; Sjödin, A.; Bergman, A. *Environ. Int.* **2003**, *29*, 683-689.

(17) Wichmann, H.; Dettmer, F. T.; Bahadir, M. *Chemosphere* **2002**, *47*, 349-355.

(18) Chu, S.; Haffner, G. D.; Letcher, R. J. *J. Chromatogr., A* **2005**, *1097*, 25-32.

(19) Öberg, K.; Warman, K.; Öberg, T. *Chemosphere* **2002**, *48*, 805-809.

(20) Sellström, U. Determination of some polybrominated flame-retardants in biota, sediment and sewage sludge. Ph.D. dissertation, Stockholm University, Stockholm, Sweden, 1999.

(21) Morris, S.; Allchin, C. R.; Zegers, B. N.; Haftka, J. J. H.; Boon, J. P.; Belpaire, C.; Leonards, P. E. G.; Van Leeuwen, S. P. J.; De Boer, J. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 5497-5504.

(22) Lee, H. B.; Peart, T. E. *Water Qual. Res. J. Can.* **2002**, *37*, 681-696.

(23) Watanabe, I.; Kashimoto, T.; Tatsukawa, R. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1983**, *31*, 48-52.

(24) Hyötyläinen, T.; Hartonen, K. *Trends Anal. Chem.* **2002**, *21*, 13-29.

(25) Eljarrat, E.; Barceló, D. *Trends Anal. Chem.* **2004**, *23*, 727-736.

(26) Barker, S. A. *LC-GC Int.* **1998**, *11*, 719-724.

(27) Barker, S. A. *J. Chromatogr., A* **2000**, *885*, 115-127.

(28) Kristenson, E. M.; Ramos, L.; Brinkman, U. A. Th. *Trends Anal. Chem.* **2005**, *25*, 96-111.

(29) Barker, S. A. *J. Chromatogr., A* **2000**, *880*, 63-68.

(30) Ramil, M.; Hernández, D.; Rodríguez, I.; Cela, R. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1056*, 187-194.

(31) Carro, A. M.; Lorenzo, R. A.; Fernández, F.; Rodil, R.; Cela, R. *J. Chromatogr., A* **2005**, *1071*, 93-98.

(32) Martínez, A.; Ramil, M.; Montes, R.; Hernández, D.; Rubi, E.; Rodríguez, I.; Cela, R. *J. Chromatogr., A* **2005**, *1072*, 83-91.

(33) Pensado, L.; Casais, M. C.; Mejuto, M. C.; Cela, R. *J. Chromatogr., A* **2005**, *1077*, 103-109.

(34) Li, Z.-Y.; Zhang, Z.-C.; Zhou, Q.-L.; Gao, R.-Y.; Wang, Q.-S. *J. Chromatogr., A* **2002**, *977*, 17-25.

(35) Li, Z.-Y.; Zhang, Z.-C.; Zhou, Q.-L.; Zhu, C.-S.; Wang, Q.-M.; Gao, R.-Y.; Wang, Q.-S. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 521-528.

for spiking sludge and sediment samples) to appropriate concentration levels. All solutions were refrigerated at  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  and protected against daylight when not in use.

Sodium tetraborate decahydrate and sodium hydroxide were supplied by Merck, and sodium sulfate anhydrous was obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Octyldecyl-functionalized silica gel  $\text{C}_{18}$  (9–12% carbon loading), Florisil (60–100 mesh), and aluminum oxide activated neutral (150 mesh) were purchased from Aldrich, and silica gel 60 (0.040–0.063 mm) was obtained from Merck. Acidic silica gel (40% sulfuric acid) was prepared in the laboratory by mixing neutral silica, previously dried at  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  for at least 12 h, with concentrated sulfuric acid. Florisil (when used activated) and acidic silica were heated in an oven at  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  for at least 12 h and then allowed to cool at room temperature in a desiccator before use. All these sorbents were stored in sealed bottles until analysis.

Durapore membrane filters (GVHP, 47 mm,  $0.22\text{ }\mu\text{m}$ ) and Durapore syringe filters (Millex GV, 13 mm,  $0.22\text{ }\mu\text{m}$ ) were supplied by Millipore. Isolute SPE syringe barrels (15-mL capacity) fitted with a single bottom frit and additional  $20\text{-}\mu\text{m}$  polyethylene frits were obtained from International Sorbent Technology (Mid Glamorgan, UK).

**Samples.** Spiked and nonspiked sewage sludge and river and marine sediment samples were used in this study. Sludge samples were obtained from an urban sewage treatment plant near Santiago de Compostela (northwest Spain) equipped with primary and secondary treatments, which receives mostly municipal nonindustrial wastewaters. River and marine sediments were collected in different points in northwest Spain. All samples were kept at  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  until being lyophilized. After sieving, the fraction with a particle size below  $300\text{ }\mu\text{m}$  was taken.

Optimization of sample preparation conditions was performed using a room-temperature air-dried primary sludge material spiked with different concentration levels of analytes.

**Sample Preparation.** Under finally optimized conditions, accurately weighed  $0.2\text{ g}$  of lyophilized sewage sludge sample is first soaked and acidified with  $200\text{ }\mu\text{L}$  of 10% aqueous hydrochloric acid and then thoroughly dried with  $0.75\text{ g}$  of anhydrous sodium sulfate in a glass mortar. Then  $2\text{ g}$  of Florisil is added and the mixture thoroughly blended with the pestle until homogeneous.

The dispersed sample is transferred to the top of a syringe barrel fitted with a single bottom frit containing a layer of  $2\text{ g}$  of Florisil (cleanup sorbent in the mixed-mode column, or cocolumn), and the whole solid phase is covered with another  $20\text{-}\mu\text{m}$  frit. The column is slightly compressed with a syringe plunger to eliminate voids and channeling.

The analytes are eluted from the cartridge with  $2.5\text{ mL}$  of acetonitrile by gravity, allowing the eluate to drip slowly. Extracts are filtered through  $0.22\text{-}\mu\text{m}$  Durapore syringe filters and subsequently subjected to CE analysis.

Regarding river and marine sediment samples, the procedure is analogous, except  $200\text{ }\mu\text{L}$  of 20% aqueous hydrochloric acid and  $300\text{ }\mu\text{L}$  of 36% hydrochloric acid are used respectively to soak and acidify the sample before drying. In both cases, only  $1\text{ g}$  of Florisil was used as mixed-mode column.

**CE Analysis.** Capillary electrophoresis was performed using a HP<sup>3D</sup> system (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany) equipped

with an on-column DAD system. Analytes were monitored at 210 and 230 nm.

Uncoated narrow-bore silica capillary (supplied by Composite Metal Services Ltd.) with an effective/total length of 61.5/70 cm and  $75\text{-}\mu\text{m}$  i.d. was used. Both the capillary and the samples were thermostated to  $25.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Unless otherwise stated, standards and sample extracts were injected hydrodynamically by applying a pressure of 50 mbar for 2 s. The applied voltage for separation was  $-30\text{ kV}$ .

New capillaries were rinsed with 1 M sodium hydroxide for 20 min. Before injections, capillaries were conditioned by washing them with 0.1 M sodium hydroxide for 5 min, Milli-Q water for 5 min, and separation electrolyte for 15 min. After each run, the capillary was flushed with Milli-Q water for 10 min. The inlet and outlet of the capillary were kept overnight in Milli-Q water. The background electrolyte solution was 20 mM sodium tetraborate prepared in methanol. The apparent pH of the solution was 9.4, adjusted by addition of a sodium hydroxide solution in methanol, and measured using a Metrohm 654 pH meter (Herisau, Switzerland) calibrated with aqueous standard buffer solutions. This solution was prepared fresh each 2 days, sonicated for 4 min, and filtered through a  $0.22\text{-}\mu\text{m}$  pore size Durapore membrane. Everyday all solutions were filtered through  $0.22\text{-}\mu\text{m}$  Durapore syringe filters before use. Data acquisition was carried out by means of HP<sup>3D</sup> ChemStation Software (Rev. A.06.01[403]) (Hewlett-Packard).

**LVSEP.** Standard solutions and sample extracts dissolved in acetonitrile were introduced hydrodynamically into the capillary with a pressure of 50 mbar for 30 or 50 s, depending on the experiment. After sample injection, a negative voltage of  $-30\text{ kV}$  was applied for both sample stacking and subsequent separation. Fresh electrolyte and sample solutions were always used for each injection.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Optimization of MSPD Extraction Conditions.** Simplicity is one of the most attractive features in MSPD. Performance of MSPD is mainly affected by column packing and elution procedure, so it is important to select an appropriate sorbent enabling homogenization and disruption of samples, acting at the same time as separation material. Most of the reported MSPD applications have utilized reversed-phase materials, especially  $\text{C}_{18}$ .<sup>27</sup> Thus, preliminary experiments were performed with the sludge material using  $\text{C}_{18}$ , and then other sorbent materials were tested. Considering  $\text{pK}_a$  values of analytes (that range from 4.4 to  $8.5$ <sup>36</sup>), samples were acidified with formic acid (actual pH of analyzed sludge material was 6.8). Also, a drying step of the acidified sample with sodium sulfate was included to help the sorbent extracting the hydrophobic fraction of samples. In these preliminary experiments, methanol was selected as eluting solvent for compatibility reasons (direct injection of extracts) with the NACE separation and detection system.

In these initial experiments, colorful dark yellow extracts were obtained, even after additional cleanup stages involving  $2\text{ g}$  of  $\text{C}_{18}$  mixed-mode column. NACE injections (not shown) of extracts indicated that analytes were extracted in the first 5-mL eluting

(36) Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software Solaris V4.67 (© 1994–2004 ACD/Labs), Chemical Abstracts Service (CAS), American Chemical Society, Washington, DC, 2004.

**Table 1. Recoveries of Analytes from a Primary Sewage Sludge Sample Processed in Different Conditions<sup>a</sup>**

MSPD conditions		recovery (%)					comments
mixed-mode column	solvent	2,4,6-TriBP	PeBP	2,6-DiBP	TBBPA	TCBPA	
1 g C <sub>18</sub> + 2 g Alu	MeOH	74.7 <sup>b</sup>	83.6 <sup>b</sup>	nd	nd	nd	clean extracts, large solvent volume
1 g C <sub>18</sub> + 0.5 g Alu	MeOH	84.5	82.8	57.8	55.9	58.1	many interferences
1 g C <sub>18</sub> + 2 g Sil	MeOH	63.4	73.7	50.4	54.5	52.4	low recoveries
1 g C <sub>18</sub> + 2 g Flo	MeOH	91.3	86.9	87.5	80.4	80.7	best sorbent option
1 g C <sub>18</sub> + 3 g Flo	MeOH	70.4	73.7	65.0	68.9	71.0	decrease in recoveries
1 g C <sub>18</sub> + 2 g Flo	DCM <sup>c</sup>	9.6	nd	26.6	4.4	nd	clean extracts, loses in evaporation
1 g C <sub>18</sub> + 2 g Flo	AcOEt	43.7	16.9	19.0	46.1	40.1	clean extracts, loses in evaporation
1 g C <sub>18</sub> + 2 g Flo	DCM–MeOH (70:30)	78.8 <sup>b</sup>	87.3 <sup>b</sup>	72.3 <sup>b</sup>	74.2 <sup>b</sup>	74.2	dirty extracts, large volume
1 g C <sub>18</sub> + 2 g Flo	DCM–MeOH (1:1)	53.9 <sup>b</sup>	50.7	42.6	47.1 <sup>b</sup>	39.7	dirty extracts, large volume
1 g C <sub>18</sub> + 2 g Flo	AcN <sup>d</sup>	79.8	47.0	84.7	62.9	62.8	clean extracts, best solvent option

<sup>a</sup> Solvent volume for elution 5 mL except in marked cases. Alu, neutral alumina; Sil, neutral silica; Flo, Florisil; MeOH, methanol; DCM, dichloromethane; AcOEt, ethyl acetate; AcN, acetonitrile; nd, nondetected. <sup>b</sup> Two successive 5-mL fractions were collected and measured for analytes. <sup>c</sup> One fraction of 10 mL. <sup>d</sup> Fractions of 5 + 2 mL were collected.

fraction although very poor recoveries appeared. Moreover, a lot of peaks, some of them interfering with the analytes, appeared in the electropherograms. Consequently, other sorbents (including activated and nonactivated Florisil, neutral aluminum oxide, and acidic and neutral silica) were assayed as a mixed-mode column. Also, some other eluents (dichloromethane, ethyl acetate, acetonitrile, dichloromethane–methanol mixtures) were tested to screen the possibilities of developing a practical sample preparation procedure. The most significant results in these series of preliminary experiments have been summarized in Table 1.

When 2 g of aluminum oxide was used as a mixed-mode column, clean, colorless extracts were produced although two solvent fractions were needed to elute 2,4,6-TriBP, PeBP, and 2,6-DiBP. Only traces of TBBPA and TCBPA were eluted under those conditions. Reducing four times the amount of alumina allows eluting all the analytes from the cartridge, but the number of interferences also grows.

Better results in terms of recoveries were obtained with nonactivated Florisil. Neutral silica provided results similar to those with Florisil regarding the interference level although lower recoveries. On the other hand, higher amounts of Florisil do not improve recoveries as can be seen in Table 1.

Regarding solvents, dichloromethane produced clean, colorless extracts although with very low recoveries. Mixtures of dichloromethane with methanol allow better recoveries although yet unsatisfactory, and large volumes of solvent are needed to extract the analytes from the cartridge.

Acetonitrile provided the better performance in effectively removing the analytes from the cartridge using low solvent volumes and keeping the interferences under reasonable levels. Yellowish extracts fully compatible with the NACE procedure are produced. It should be noticed that some of the above comments regarding extracting solvents and the eventual need of solvent exchange before injecting the extracts are a consequence of the separation–detection NACE technique applied in this study. Other determination approaches or the use of more selective detection techniques (e.g., MS) probably would alleviate some these aspects. However, the use of NACE has allowed not only enlarging the analytical possibilities of this technique but also clearly showing the ability of the proposed sample preparation procedure to produce clean, easily analyzable extracts

After these preliminary experiments, it was clear that MSPD might be applied for the extraction of TBBPA, TCBPA, and the remaining related phenols from sludge although the experimental conditions need a systematic optimization procedure. Also, Florisil appeared as the most promising sorbent with these aims. Thus, it was decided to thoroughly evaluate the process using a mixed-level experimental design in 24 runs. Some experimental factors (sample amount 0.2 g; anhydrous sodium sulfate 0.75 g; 2 g of Florisil as dispersant material; and 2.5 mL of acetonitrile as eluent) were fixed on the basis of the described preliminary observations. Factors included into the experimental design were the predispersion additive and the column building layers structure. Both experimental design generation and data treatment were performed using the NemrodW V-2000D package.<sup>37</sup> Table 2 summarizes the assignment of factor levels in the experiment and the standardized main effects for the analytes. Significant factors (95% confidence level) are in boldface type in Table 2. The higher the absolute value of an effect, the larger the influence of the corresponding variable in the extraction yields. A positive sign indicates an improvement in the extraction efficiency and oppositely for negative signs.

Surprisingly (see Table 2), the type of additive was the important factor in all cases and not the kind of sorbent used as mixed-mode column for cleanup, although this second factor appeared important for PeBP extraction (the higher the ratio Florisil/C<sub>18</sub>, the higher the recovery for PeBP). The use of formic or hydrochloric acid in the first stage of the procedure clearly improves the extraction efficiency. Regression analysis of the experimental results indicated that the maximum recoveries were attained using HCl 5% as additive and Florisil as mixed-mode column. Under these conditions, recoveries around 95% were obtained for all analytes except for PeBP (77%). Using more concentrated hydrochloric acid solutions allows increasing the extraction efficiency (87%) for PeBP that exhibits the lower pK<sub>a</sub> value among the considered analytes.

**LVSEP. Sensitivity Improvement.** As mentioned previously, NACE-DAD in this study allowed us to evaluate the ability of MSPD to produce clean extracts, not needing additional time-consuming cleanup stages or resorting to highly selective analyti-

(37) NemrodW, Mathieu, D.; Nony J.; Phan-Tan-Luu, R.; LPRAL, Marseille, France, 2000.

**Table 2. Experimental Domain for the Selected Factors in the Mixed Design and Effects Significance for the Considered Analytes**

factor	level	key	2,4,6-TriBP	PeBP	2,6-DiBP	TBBPA	TCBPA
mixed-mode column	2 g C <sub>18</sub>	A1	-0.050	<b>-0.193</b>	-0.262	0.117	-0.134
	1.34 g C <sub>18</sub> + 0.66 g Florisil	A2	-0.007	-0.071	0.102	-0.143	0.157
	0.66 g C <sub>18</sub> + 1.34 g Florisil	A3	-0.027	0.083	0.082	-0.046	-0.089
	2 g Florisil	A4	0.085	<b>0.181</b>	0.078	0.072	0.066
additive	without additive	B1	<b>-0.986</b>	<b>-0.562</b>	<b>-0.367</b>	<b>-1.234</b>	<b>-1.702</b>
	200 $\mu$ L Milli-Q water	B2	<b>-0.306</b>	-0.139	-0.184	<b>-1.254</b>	<b>-1.455</b>
	200 $\mu$ L formic acid 2%	B3	0.061	0.036	0.048	-0.419	-0.350
	200 $\mu$ L formic acid 5%	B4	<b>0.396</b>	<b>0.201</b>	0.218	<b>0.921</b>	<b>1.198</b>
	200 $\mu$ L HCl 2%	B5	<b>0.389</b>	0.106	0.146	<b>0.599</b>	<b>0.990</b>
	200 $\mu$ L HCl 5%	B6	<b>0.446</b>	<b>0.358</b>	0.138	<b>1.384</b>	<b>1.320</b>

<sup>a</sup> Coefficients in boldface type correspond to significant effects (95% confidence level).

cal techniques for the analysis of the extracts. However, the NACE-DAD technique may only be applied for the analysis of environmental samples provided low detection limits are attained. In a previous paper,<sup>38</sup> we have proven that detection limits achieved with the NACE-DAD method, using methanol as running buffer solvent could be improved significantly by concentrating methanolic sample extracts directly in the capillary using LVSEP. In this case, acetonitrile has been used as eluting solvent so the LVSEP procedure needs adjustments to be applied.

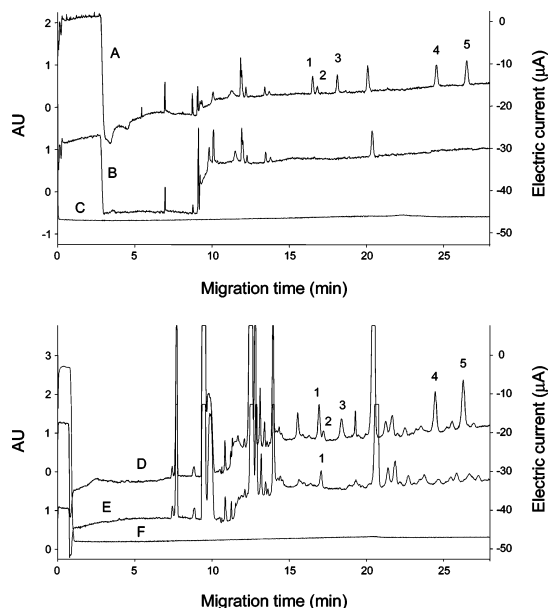
Figure 1 shows the separation produced and the enhancement obtained using LVSEP-NACE-DAD with 50 s of hydrodynamic injection time. Graphs in Figure 1 compares the electropherograms for the spiked and nonspiked sludge sample, including also the electric current registry during the process. As can be seen (Figure 1, E trace), the sludge sample contains quantifiable amounts of 2,4,6-TriBP and, probably, traces of TBBPA and TCBPA although under the quantification limits. Enhancement of analytical signals is clearly visible, and calculated recoveries in spiked samples for LVSEP-NACE-DAD agreed with those calculated for NACE-DAD procedure.

Another obvious option to produce higher signals is processing higher sample amounts. Figure 2 shows the LVSEP-NACE-DAD separation obtained by processing 0.4 g of sample. In that case, 30 s of hydrodynamic injection was used to avoid peak splitting by overloading. Of course, in that case, the concentration of hydrochloric acid must be doubled as well.

**Performance of the Method.** The analytical performances of both the NACE-DAD (using 2 s of injection time) and LVSEP-NACE-DAD (50 s of injection time) procedures were compared using standard mixtures of the analytes. Results have been summarized in Table 3. Calibration curves were built by triplicate injections at four concentration levels in the range shown in the third column of Table 3. Precision was examined by performing six replicate injections of a 500 (in NACE-DAD) and 50 ng/mL (for LVSEP-NACE-DAD) standard mixtures in the same day or along different days). Instrumental detection and quantification limits were calculated at signal-to-noise ratios of 3 and 10, respectively, following IUPAC recommendations.<sup>39</sup> As can be seen, LVSEP improved 14–21-fold LODs and LOQs depending of the analytes.

(38) Blanco, E.; Casais, M. C.; Mejuto, M. C.; Cela, R. *J. Chromatogr., A* **2005**, *1071*, 205–211.

(39) Currie, L. A. *Pure Appl. Chem.* **1995**, *67*, 1699–1723.



**Figure 1.** Electropherograms obtained for MSPD extracts of 0.2 g of primary sludge sample (A, D) spiked at a concentration of (A) 5 and (D) 0.5  $\mu$ g/g for all compounds and (B, E) nonspiked. (C) Electric current during the NACE process. (F) Electric current during the LVSEP-NACE process. Hydrodynamic injection: 50 mbar during 2 s (A–C) and (D–F) 50 s. Peak assignment: (1) 2,4,6-TriBP, (2) PeBP, (3) 2,6-DiBP, (4) TBBPA, and (5) TCBPA.

At the time of conducting these experiments, to the best of our knowledge, no certified reference material for bromophenols and halogenated bisphenols in sludge or sediment was available, so a true validation could not be carried out. Recoveries of the MSPD extraction method were evaluated using six independent 0.2-g portions of primary sludge sample, freshly spiked at two concentration levels (5  $\mu$ g/g and 500 ng/g), for all studied compounds. Nonspiked samples (blanks,  $n = 3$ ) were also processed and taken into account for calculations. Only 2,4,6-TriBP was quantified in primary sewage sludge at a concentration of  $252 \pm 10$  ng/g. Table 4 summarized the average recoveries obtained for each compound, ranging from 75.7 to 105.4%, with relative standard deviations below 7.7%. As shown in the table,

**Table 3. Linearity, Precision, Detection, and Quantification Limits of NACE Methods**

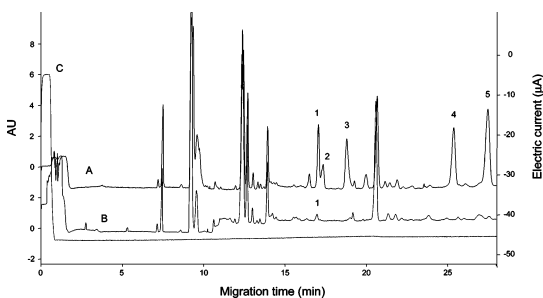
method	compound	calib range (ng/mL)	corr coeff ( <i>r</i> )	repeatability <sup>a</sup> (RSD %)	reproducibility <sup>a</sup> (RSD %)	LOD (ng/mL) <sup>b</sup>	LOQ (ng/mL) <sup>b</sup>
NACE <i>t</i> <sub>inj</sub> = 2 s <sup>c</sup>	2,4,6-TriBP	400–10000	0.9999	5.2	5.6	80.6	268.5
	PeBP		0.9999	4.7	4.6	76.0	253.3
	2,6-DiBP		0.9978	4.1	4.2	77.7	259.1
	TBBPA		0.9980	3.3	3.9	75.4	251.4
	TCBPA		0.9979	5.5	4.8	51.0	170.0
LVSEP-NACE <i>t</i> <sub>inj</sub> = 50 s <sup>c</sup>	2,4,6-TriBP	25–600	0.9998	3.1	2.9	3.9	12.9
	PeBP		0.9999	3.5	3.2	5.3	17.7
	2,6-DiBP		0.9997	5.0	4.7	4.8	16.1
	TBBPA		0.9988	2.9	2.5	4.3	14.3
	TCBPA		0.9981	3.3	3.6	2.7	9.1

<sup>a</sup> *n* = 6 replicate injections. <sup>b</sup> Limit of detection (LOD), S/N = 3; limit of quantification (LOQ), S/N=10; detection at 210 nm, except of PeBP at 230 nm. <sup>c</sup> *t*<sub>inj</sub> = injection time; other CE conditions as described in CE Analysis.

**Table 4. MSPD Extraction Recoveries from Spiked Sewage Sludge and River and Marine Samples, Obtained under Optimized Conditions<sup>a</sup>**

compound	primary sludge			secondary sludge		river sediment		marine sediment	
	recovery <sup>b</sup> (RSD %)	recovery <sup>c</sup> (RSD %)	LOQ <sup>c</sup> (ng/g)	recovery <sup>c</sup> (RSD %)	LOQ <sup>c</sup> (ng/g)	recovery <sup>d</sup> (RSD %)	LOQ <sup>d</sup> (ng/g)	recovery <sup>d</sup> (RSD %)	LOQ <sup>d</sup> (ng/g)
2,4,6-TriBP	99.6 (6.9)	98.2 (3.8)	129	106.4 (4.2)	162	78.1 (7.1)	232	92.2 (8.5)	232
PeBP	87.2 (4.8)	75.7 (3.0)	176	87.8 (2.5)	221	77.1 (7.0)	336	81.3 (8.0)	336
2,6-DiBP	91.7 (5.6)	97.1 (5.4)	161	105.0 (6.4)	202	92.2 (6.2)	182	92.6 (4.7)	182
TBBPA	101.3 (5.6)	102.3 (5.5)	143	98.0 (6.3)	179	83.6 (10.9)	285	90.5 (4.1)	285
TCBPA	105.4 (7.0)	100.3 (7.7)	91	102.3 (5.1)	114	79.4 (7.9)	236	96.8 (6.5)	236

<sup>a</sup> Limits of quantification of the compounds studied for each matrix using the proposed MSPD-NACE-DAD and MSPD-LVSEP-NACE-DAD methods. Relative standard deviation (RSD) *n* = 6 replicates; limit of quantification (LOQ), S/N=10, expressed in dry weight; detection at 210 nm, except of PeBP at 230 nm. <sup>b</sup> Spiked samples analyzed by MSPD-NACE-DAD, injection time 2 s; level of addition 5 μg/g. <sup>c</sup> Spiked samples analyzed by MSPD-LVSEP-NACE-DAD, injection time 50 s; level of addition 0.5 μg/g. <sup>d</sup> Spiked samples analyzed by MSPD-LVSEP-NACE-DAD, injection time 30 s; level of addition 0.5 μg/g.



**Figure 2.** Electropherograms obtained for MSPD extracts of 0.4 g of primary sludge sample (A) spiked at a concentration of 5 μg/g for all compounds, and (B) nonspiked. (C) Electric current during the LVSEP-NACE process. Hydrodynamic injection: 50 mbar during 30 s. Peak assignation as in Figure 1.

recoveries achieved with MSPD-LVSEP-NACE-DAD analysis were in good agreement with those obtained for MSPD-NACE-DAD, thus showing that under these experimental conditions there were no matrix effects influencing the sample stacking process.

**Application to Spiked Real Samples.** To verify the real applicability of the proposed procedure, several samples of secondary biological sludge and river and marine sediments were analyzed.

For secondary sludges, a slightly decrease in extraction recoveries was observed, although this effect can be avoided by

increasing the eluting solvent volume to 2.5 mL. For sediment samples, especially those containing higher amounts of calcium carbonate, higher concentrations of hydrochloric acid need to be used. Best results in terms of extraction recoveries were obtained using 200 μL of 20% HCl for river sediment samples and 300 μL of 36% HCl for marine sediments. On the contrary, Florisil amount used as mixed-mode column can be reduced to 1 g while granting clean extracts. A 2.5-mL aliquot of acetonitrile allows quantitative elution of analytes from the cartridges. Because of the higher ionic strength of these types of sample extracts, LVSEP injection times have to be reduced to 30 s at the logical expense of LODs. In these conditions, RSDs ranging from 0.9 to 6% were obtained. Results for these sample types are also summarized in Table 4.

## CONCLUSIONS

For the first time ever, MSPD was applied for the extraction of brominated organic contaminants (TBBPA, TCBPA, and related bromophenols) from sediment and sludge samples. MSPD was demonstrated as a suitable preparation technique for the isolation of the compounds under study from sewage sludges and river and marine sediments, obtaining good recoveries and reproducibility. This opens new perspectives in sample preparation for important environmental matrixes of recognized analytical difficulty. Although NACE-DAD methodology was applied here, allowing us to show the cleanup potential of the MSPD technique, other more selective analytical techniques might be tested and

eventually being advantageous in the analysis of MSPD extracts. Employing acetonitrile as eluting solvent, MSPD extracts can be directly injected into the NACE system without any dilution or solvent exchange. It allows good compatibility between extraction and electrophoretic processes, allowing also LVSEP to improve quantification limits.

The whole method is fast as compared with the usual procedures of sludge sample extraction, with very low cost and minimum sample handling, and suitable for the routine determination of TBBPA, TCBPA, and related bromophenols in sewage sludge and river and marine sediment samples. Although not explored here, the combination of the developed MSPD procedure with pressurized solvent extraction could enhance and automate sample processing of this type of material.

#### **ACKNOWLEDGMENT**

This research was supported financially by the Spanish Ministry of Education and Science MEC-DGI (project BQU2003-02090) and the Xunta de Galicia (project PGIDT04PXIC23701PN). The authors thank Emeritus Professor Roger Phan-Tan-Luu (University of Aix-Marseille, France) for his helpful suggestions about experimental design and for giving us NemrodW software. E.B. acknowledges her doctoral grant from the Xunta de Galicia.

Received for review December 20, 2005. Accepted February 20, 2006.

AC0522512



## 1.5. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES ADICIONALES

En este capítulo IV.1 se han expuesto los resultados obtenidos durante el desarrollo de la metodología analítica para la determinación de un grupo de fenoles y bisfenoles halogenados en muestras acuosas y sólidas medioambientales, mediante CZE acoplada a detector de absorción UV-vis (DAD), empleando las técnicas de SPE y MSPD para la extracción de los analitos de la matriz. Es necesario recordar aquí que al inicio de estas investigaciones no se disponía de otros métodos de referencia con los que poder comparar los resultados que se han ido obteniendo.

A continuación se exponen, de un modo más concreto, algunas conclusiones y consideraciones adicionales relacionadas con cada uno de los trabajos de investigación desarrollados en este capítulo IV.1.

### - SEPARACIÓN DE FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR

Se ha optimizado la separación y detección de mezclas de fenoles y bisfenoles halogenados mediante CE en medio acuoso y no acuoso (NACE). Para ello, en ambos casos, se han fijado unas condiciones únicas para los parámetros relacionados con el capilar, esto es, sus dimensiones y las secuencias de acondicionamiento, y a partir de aquí se han ido variando otros parámetros, como el tipo de disolución tampón (concentración, disolvente y pH), el voltaje aplicado para la separación, la polaridad, el tiempo de inyección, etc., hasta alcanzar la separación adecuada.

El control de la temperatura, tanto del capilar como de las disoluciones de trabajo, así como del pH y la fuerza iónica de la disolución tampón, son parámetros especialmente importantes para la separación electroforética. Una termostatación inadecuada produce variabilidad en la inyección, y como consecuencia, errores cualitativos y cuantitativos. Por otro lado, se ha observado que pequeñas variaciones en el pH y/o la fuerza iónica del medio electrolítico conducen a una falta de reproducibilidad en la medida, especialmente en los tiempos de migración, pudiendo dar lugar a identificaciones incorrectas de los analitos en los electroferogramas.

Así, con un estricto control, no sólo de la temperatura, sino también del pH y la fuerza iónica del medio de separación, se han conseguido excelentes repetibilidades y reproducibilidades para ambos métodos, así como una buena linealidad en el rango de concentraciones estudiado, y unos límites de cuantificación (LOQ) estimados de 364 a 1095 ng·mL<sup>-1</sup> en CE en medio acuoso, y de 280 a 2287 ng·mL<sup>-1</sup> en NACE.

Se han estudiado las interferencias causadas por algunos compuestos fenólicos polisustituidos (fenoles clorados, metilados y/o nitrados) en el análisis de los fenoles y bisfenoles halogenados considerados en este trabajo de investigación mediante los procedimientos electroforéticos desarrollados. El empleo de un electrolito no acuoso, utilizando como disolvente el metanol, permite actuar de forma efectiva sobre la selectividad y la eficacia del proceso analítico, con lo que se consigue mantener una buena resolución de la mezcla de los analitos de interés. Se ha demostrado que sólo la

## 1. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS

---

técnica de determinación NACE puede garantizar que la posible presencia de estas sustancias en las muestras medioambientales no va a causar interferencias a la hora de analizar los fenoles y bisfenoles halogenados estudiados. De esta forma, se ha comprobado la efectividad del medio de separación orgánico y la fiabilidad del método NACE desarrollado.

La concentración en columna (*on-column*) mediante LVSS permite mejorar la sensibilidad de la detección de los analitos hasta en dos órdenes de magnitud en relación a la inyección hidrodinámica normal, manteniéndose asimismo excelentes linealidades y reproducibilidades. Empleando tiempos de inyección de 30 s y 300 s, se han conseguido factores de concentración de 5-26 veces y 16-333 veces para CE y NACE, respectivamente, obteniéndose límites de cuantificación entre 28 y 234 ng·mL<sup>-1</sup>, y 1.3 a 111 ng·mL<sup>-1</sup>. El empleo de metanol como disolvente del medio electrolítico permite llevar a cabo el proceso LVSS sin intercambio de polaridad para los analitos separados bajo polaridad negativa, lo que a nivel operacional es mucho más simple, cómodo y reproducible. En cambio, en aquellos casos en que las separaciones se realizan aplicando polaridad positiva (CE en medio acuoso, y NACE sólo para 2-bromofenol y los dos metilbromofenoles), es necesario realizar manualmente un cambio de polaridad tras la etapa de concentración de los analitos en polaridad negativa, con la consecuente posibilidad de introducción de un error sistemático debido al analista.

### - DETERMINACIÓN DE BROMOFENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS EN MUESTRAS DE AGUA

Para la optimización de la extracción del grupo seleccionado de bromofenoles y bisfenoles halogenados de muestras de agua se han estudiado los diferentes parámetros influyentes en el proceso de SPE, tales como el pH y volumen de las muestras acuosas, el disolvente de elución, etc.

La extracción y concentración de los compuestos en muestras de agua, tanto de río como residuales, se ha podido llevar a cabo de manera satisfactoria empleando la técnica de SPE con cartuchos Oasis HLB de 60 mg, sin necesidad de ajuste del pH del agua. Además de ser más simple a nivel operacional, pues se evita la etapa del ajuste de pH, presenta la ventaja adicional de evitarse así la adsorción de los ácidos húmicos y fúlvicos en el material polimérico. La elución del cartucho se realiza con metanol, lo que garantiza la compatibilidad entre el proceso de extracción y la determinación analítica por CE.

Se obtienen valores de recuperación satisfactorios para todos los compuestos, entre 96 y 106% en agua de río, y 73 y 103% en aguas residuales, con volúmenes de corte superiores a 2 L y 1 L, respectivamente. Los límites de cuantificación alcanzados con el método SPE-NACE-DAD están dentro del rango de 0.8 a 1.5 µg·L<sup>-1</sup> para muestras de agua de río, y entre 1.6 y 3.0 µg·L<sup>-1</sup> para aguas residuales.

En el caso de la determinación de muestras reales de agua mediante la técnica SPE-LVSS-NACE-DAD, como consecuencia de la modificación de la fuerza iónica de la muestra (debida a los componentes de la matriz) y su influencia en el proceso de

*sample stacking*, ha sido necesaria una reducción del tiempo de inyección para conseguir una inyección cuantitativa de los analitos. Con un tiempo de inyección de 30 s se obtienen unos límites de cuantificación entre 76 y 136 ng·L<sup>-1</sup>, y de 151 a 272 ng·L<sup>-1</sup> para aguas de río y residuales, respectivamente. Estos valores de LOQs indican que el método es lo suficientemente sensible como para identificar y cuantificar estos compuestos en el rango de concentraciones en el que se encuentran habitualmente en aguas residuales y de vertidos próximos a zonas industriales (ver tabla II.2.2 en capítulo II.2). Además, hay que destacar que estos límites están por debajo de los niveles máximos de fenoles (entre 1 y 100 µg·L<sup>-1</sup>) admisibles por la legislación en aguas superficiales destinadas a consumo (ver sección 2.5 del capítulo II.2).

#### - DETERMINACIÓN DE BROMOFENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS EN MUESTRAS SÓLIDAS MEDIOAMBIENTALES

En el desarrollo del método de extracción de bromofenoles y bisfenoles halogenados de muestras sólidas se ha estudiado la influencia de variables, tales como acidificación de la muestra, adsorbentes para dispersión y co-columna, disolvente de elución, etc., sobre la eficacia de la MSPD empleando lodo primario de depuradora. Algunos de estos factores se han optimizado mediante la utilización de un diseño experimental multinivel (mixto).

Se ha comprobado que el Florisil utilizado como dispersante y co-columna ha proporcionado los mejores resultados, junto con el acetonitrilo, que empleado como disolvente de elución garantiza la compatibilidad entre el proceso de extracción y la determinación mediante NACE.

En efecto, al evaluar la calidad analítica del método NACE-DAD, inyectando en este caso disoluciones estándar de los compuestos estudiados en acetonitrilo, se han conseguido buena linealidad en el rango de concentraciones considerado, así como excelentes repetibilidades y reproducibilidades, y unos límites de cuantificación estimados de 170 a 269 ng·mL<sup>-1</sup>. En cuanto a la eficacia del proceso MSPD, se han obtenido valores de recuperación satisfactorios para todos los compuestos, entre 87 y 105% en lodo primario de depuradora.

En este caso, y tal y como ya ocurría con los extractos de SPE, la fuerza iónica de los extractos de MSPD hace necesaria una reducción del tiempo de inyección en LVSS para conseguir una inyección cuantitativa de los analitos. Con un tiempo de inyección de 50 s, los LOQs alcanzados para el método MSPD-LVSEP-NACE-DAD están dentro del rango de 91 a 176 ng·g<sup>-1</sup> para muestras de lodo primario. Estos valores son adecuados para la detección y cuantificación de bromofenoles y bisfenoles halogenados en muestras sólidas medioambientales contaminadas próximas a vertederos y zonas industriales (ver tabla II.2.3 en capítulo II.2).

El método propuesto ha sido aplicado a muestras de lodo de depuradora primario y secundario, y sedimentos de río y marino. Para los sedimentos ha sido necesario emplear una acidificación más fuerte, debido a su alto contenido en carbonato cálcico. Asimismo, no se necesita una limpieza tan exhaustiva como en el

## 1. FENOLES Y BISFENOLES HALOGENADOS

---

caso de los lodos de depuradora, con lo que se reduce la cantidad de adsorbente utilizado como co-columna. Empleando un tiempo de inyección de 50 s para lodos secundarios y 30 s para sedimentos, las recuperaciones obtenidas fueron de 88 a 106%, y de 77 a 97%, respectivamente. Los límites de cuantificación alcanzados para el método MSPD-LVSEP-NACE-DAD están dentro de los rangos de 114 a 221 ng·g<sup>-1</sup> para lodos secundarios, y de 182 a 336 ng·g<sup>-1</sup> para sedimentos.

Sólo se ha detectado la presencia de 2,4,6-tribromofenol a una concentración de 252 ng·g<sup>-1</sup> en una muestra de lodo primario.

Por primera vez se ha desarrollado un procedimiento de preparación de muestras sólidas medioambientales para la extracción de contaminantes orgánicos basado en MSPD. La metodología es sencilla, rápida, y de bajo coste, tanto en consumo de disolventes como en tiempo de análisis. No han sido necesarias etapas adicionales de fraccionamiento ni concentración del extracto, evitando con esto último que se pierdan los fenoles menos bromados por evaporación.

## **CAPÍTULO IV.2. PARABENOS Y ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO**

### **2.1. RESUMEN**

Con la experiencia adquirida en el manejo del instrumental analítico y en la optimización y desarrollo de métodos de análisis, incluyendo tanto las técnicas de extracción y concentración de muestra como los métodos de determinación, se consideró muy interesante la aplicación de la metodología desarrollada a otros compuestos contaminantes orgánicos de características similares, como es el caso del ácido *p*-hidroxibenzoico (PHBA) y sus derivados ésteres, los parabenos.

Como en el caso de muchas sustancias utilizadas para el cuidado de la higiene personal, estos compuestos se liberan continuamente al medio ambiente, en especial, al sistema acuático a través de las aguas residuales domésticas. Considerando la problemática en torno a los parabenos, y el reciente interés por establecer los niveles en que se encuentran estos compuestos en el medio ambiente, es necesario desarrollar nuevos procedimientos con el objetivo de ser empleados de modo eficaz en campañas de *screening* y estudios de tipo ambiental y toxicológico.

Así, se ha optimizado un método para la identificación y cuantificación de parabenos y el ácido hidroxibenzoico mediante electroforesis capilar en medio no acuoso acoplada a detección por absorción ultravioleta-visible con red de diodos conectados en serie (NACE-DAD). El estudio se ha centrado en el análisis del PHBA y sus ésteres, metilparaben (MePB), etilparaben (EtPB), propilparaben (PrPB), butilparaben (BuPB), y bencilparaben (BnPB). De nuevo, se ha introducido la preconcentración en línea (*on-column*) empleando la técnica de *sample stacking* (LVSS).

Puesto que estos compuestos son relativamente solubles en agua (ver tabla II.3.1 en capítulo II.3), se espera que sean encontrados fundamentalmente en el medio acuático. Por lo tanto, éste es el compartimento medioambiental en el que se ha centrado este trabajo de investigación.

Así, la metodología NACE-DAD desarrollada se ha aplicado al análisis simultáneo de los parabenos y el PHBA en muestras de aguas continentales, empleando como técnica de extracción y concentración la SPE. De nuevo, se ha evaluado la combinación de las técnicas de preconcentración fuera de línea (*off-line*) y en línea (*on-line*), SPE-LVSS.

Con los métodos SPE-NACE-DAD y SPE-LVSEP-NACE-DAD ya optimizados, se analizaron diversas muestras reales de agua de grifo, de río y residuales.

Los resultados obtenidos se resumen en las publicaciones que se incluyen a continuación.

## 2. PARABENOS Y ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO

---

### 2.2. SEPARACIÓN DE PARABENOS Y ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR EN MEDIO NO ACUOSO

Véase el artículo IV “*Simultaneous determination of p-hydroxybenzoic acid and parabens by capillary electrophoresis with improved sensitivity in nonaqueous media*” (pág. 183).

### 2.3. DETERMINACIÓN DE PARABENOS Y ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO EN MUESTRAS DE AGUA

Véase el artículo V “*Combination of off-line solid-phase extraction and on-column sample stacking for sensitive determination of parabens and p-hydroxybenzoic acid in waters by non-aqueous capillary electrophoresis*” (pág. 195).

Artículo IV

Determinación simultánea del ácido *p*-hidroxibenzoico y parabenos mediante electroforesis capilar con sensibilidad mejorada en medio no acuoso

*Simultaneous determination of p-hydroxybenzoic acid and parabens by capillary electrophoresis with improved sensitivity in nonaqueous media*

*Electrophoresis* 29 (2008) 3229-3238



Eva Blanco  
 María del Carmen Casais  
 María del Carmen Mejuto  
 Rafael Cela

Department of Analytical  
 Chemistry,  
 Nutrition and Bromatology,  
 Faculty of Chemistry,  
 Institute of Research  
 and Food Analysis,  
 University of Santiago  
 de Compostela,  
 Santiago de Compostela, Spain

Received December 17, 2007  
 Revised April 18, 2008  
 Accepted April 21, 2008

## Research Article

# Simultaneous determination of *p*-hydroxybenzoic acid and parabens by capillary electrophoresis with improved sensitivity in nonaqueous media

New methods based on nonaqueous capillary electrophoresis (NACE) were developed as promising alternatives for the simultaneous separation and determination of *p*-hydroxybenzoic acid (PHBA) and a group of parabens (methyl, ethyl, propyl, butyl and benzyl *p*-hydroxybenzoates), with good resolution and excellent sensitivity. As an effective on-line preconcentration technique, large-volume sample stacking (LVSS) was successfully combined with NACE allowing significant sensitivity enhancement. Identification and quantification of the analytes were performed by diode array detection (DAD). The influence of different parameters, such as buffer apparent pH, concentration of electrolyte, temperature, applied voltage and sample volume, on the efficiency, resolution and sensitivity of the electrophoretic separation was studied. The analytical performance was evaluated, and both NACE-DAD and LVSS-NACE-DAD methods showed good linearity, precision and instrumental LODs at low ng/mL levels. These LODs were compared with those described in the literature, and it was found that NACE-DAD method was comparable to GC-MS, while LVSS-NACE-DAD procedure achieved sensitivity similar to LC-MS, LC-MS/MS and GC-MS/MS, even using conventional ultraviolet-visible absorption detection. To test their suitability, proposed methods were evaluated for the analysis of PHBA and parabens at low and sub-ng/mL levels in environmental water samples.

### Keywords:

Large-volume sample stacking / Nonaqueous capillary electrophoresis / Parabens / *p*-Hydroxybenzoic acid  
 DOI 10.1002/elps.200700916

## 1 Introduction

Esters of *p*-hydroxybenzoic acid, commonly known as parabens, are widely used as bactericides and preservative agents in cosmetic, pharmaceutical and personal care products (PPCPs) (e.g. bath gels, shampoos, deodorants, anti-

perspirants, creams and toothpastes), as well as in processed food and beverages, for inhibiting the development of microorganisms and therefore prolonging products' shelf-life [1–4]. The antimicrobial activity of parabens seems to increase with the chain length of the ester group [1], but in practice, shorter esters are commonly employed because of their higher solubility in water [3, 5], being methyl- (MePB) and propylparaben (PrPB) the most widely used [6, 7]. Combinations of two or more parabens are often used to increase the ability of the system to withstand microbial contaminations [3].

The European Economic Community (EEC) Directive [8] permits the use of parabens in cosmetics with a maximum concentration for each one of 0.4% w/w and a total maximum concentration of 0.8% w/w, expressed as *p*-hydroxybenzoic acid (PHBA). However, the maximum concentration of parabens in foods is 0.1% w/w. In pharmaceuticals, paraben content seldom exceeds 1% w/w [3, 5, 9, 10].

As extensively used, parabens are widely distributed in the environment. In fact, some cosmetics and PPCPs might contribute to the direct introduction of parabens in the

**Correspondence:** Dr. Rafael Cela, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Facultad de Química, Instituto de Investigación y Análisis Alimentario (IIAA), Universidad de Santiago de Compostela, E-15782 Santiago de Compostela, Spain  
**E-mail:** qnrctd@usc.es  
**Fax:** +34-981-547-141

**Abbreviations:** **BnPB**, benzylparaben; **BuPB**, butylparaben; **CL**, chemiluminescence detection; **EtPB**, ethylparaben; **EEC**, European Economic Community; **FI**, flow injection; **LVSS**, large-volume sample stacking; **MePB**, methylparaben; **N**, number of theoretical plates; **PHBA**, *p*-hydroxybenzoic acid; **pH<sub>app</sub>**, apparent pH; **pK<sub>a</sub>**, acidity constant in aqueous medium; **PPCPs**, pharmaceutical and personal care products; **PrPB**, propylparaben; **μ<sub>eff</sub>**, effective electrophoretic mobility; **μ<sub>eo</sub>**, electroosmotic mobility

aquatic media *via* domestic and industrial wastewater [11–15]. Also, presumably originating from consumer products, parabens were detected in indoor air and household dust samples [16–18].

Nowadays, interest in toxic effects due to long-term exposition to low concentration and information regarding levels of parabens in the environment has arisen because of their possible side effects on humans and wildlife. Recent studies have demonstrated that exposure to parabens may modulate or disrupt the endocrine system, exhibiting weak estrogenic and other hormone-related activity, and thus may have harmful consequences on human health and wildlife [7, 19]. Furthermore, it has been proposed that their use, particularly in underarm deodorants and antiperspirants, may contribute to the rising incidence of human breast cancer [2, 7, 20]. In fact, parabens have been detected in human breast tumor tissues at the low ng/g level [2, 20, 21].

Published methods for the determination of parabens and PHBA are usually based on GC [13–15] or LC [3, 11, 12, 21–25]. Most of these reported methods deal with multi-residue preservative analysis in cosmetic and PPCP samples. However, only few methods for the determination of parabens in environmental matrices have been reported [11–18, 26]. Furthermore, reports on the simultaneous determination of PHBA and parabens are still scarce, despite the increasing trend in using their combination to achieve highest antimicrobial effectiveness, and being PHBA their main metabolite and/or degradation product [5, 19, 23].

CE represents a very interesting alternative to chromatographic techniques due to its many advantages including simplicity, high separation efficiency, selectivity, easy of instrumentation, and low costs. Different CE modes, such as CZE [22, 23, 27–29], MEKC [4], microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC) [6, 30, 31], or CEC [5], have been recently used.

Nonaqueous BGE broaden the application of CE. Organic solvents can be used to advantage in CE, not only to increase the solubility of organic compounds, but also to reduce the EOF and to improve separations by selectively changing the acid-base properties of the analytes, displaying altered separation selectivity and different interactions between analytes and buffer additives compared to aqueous BGE. Up to now, the only application of NACE regarding the analysis of parabens has been developed for the determination of MePB and PrPB in a pharmaceutical product, using propylene carbonate as BGE solvent and tetradecylammonium bromide as additive [32].

To improve significantly the well-known poor sensitivity of conventional diode array detection (DAD) in CE, analytes can be concentrated directly on the capillary by on-column sample stacking. Some reviews have been published about different on-line preconcentration techniques in CE developed over the past 15 years [33–36]. Among the different modes, large-volume sample stacking (LVSS) based on the

EOF pump could stack trace amounts of negatively charged analytes without polarity switching. Sample matrix must be pumped out from the capillary in order to preserve separation efficiency [37, 38].

As an effective on-line preconcentration technique, in this study LVSS using the EOF pump was successfully combined with NACE to concentrate, separate and determine simultaneously a group of parabens (methyl, ethyl, propyl, butyl and benzyl *p*-hydroxybenzoates) and PHBA. The influence of different parameters, such as buffer apparent pH ( $\text{pH}_{\text{app}}$ ), concentration of electrolyte, temperature, applied voltage and sample volume, on the efficiency, resolution and sensitivity of the electrophoretic separation was thoroughly evaluated. The application of optimized NACE-DAD and LVSS-NACE-DAD methods were evaluated by analyzing parabens and PHBA in several real water samples previously extracted off-line by SPE.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Reagents, standards and materials

Methanol (HPLC gradient grade 99.99%) was obtained from VWR Prolabo (Leuven, Belgium), DMSO (HPLC gradient grade) was supplied by Aldrich (Milwaukee, WI), and hydrochloric acid was from Prolabo (Fontenay-Sous-Bois, France). Sodium tetraborate decahydrate and sodium hydroxide (NaOH) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany), and Tris base was from Aldrich. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q system purchased from Millipore (Bedford, MA).

The *p*-hydroxybenzoic acid (PHBA, 99.0%), and methyl (MePB, 99%), ethyl (EtPB, 99%), propyl (PrPB, 99%), butyl (BuPB, 99%) and benzyl (BnPB, 98.0%) *p*-hydroxybenzoates were obtained from Fluka (Steinheim, Germany). Stock standard solutions containing 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  were prepared by dissolving accurately weighed amounts of each compound in methanol, and stored at  $-18^\circ\text{C}$  in darkness until use. Under such storage conditions, these individual solutions proved stable for at least 6 months. Diluted standard mixtures used as calibration solutions, as well as for spiking water samples, were prepared in methanol to appropriate concentration levels. The working solutions were prepared monthly, refrigerated at  $-18^\circ\text{C}$  and protected against daylight when not in use.

DMSO at a concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was used as neutral marker for EOF measurements. This solution was prepared directly diluted with methanol.

Cellulose ester membrane filters (SMWP, 47 mm, 5  $\mu\text{m}$ ; HAWP, 47 mm, 0.45  $\mu\text{m}$ ), Durapore membrane filters (GVHP, 47 mm, 0.22  $\mu\text{m}$ ), and Durapore syringe filters (Millex GV, 13 mm, 0.22  $\mu\text{m}$ ) were supplied by Millipore. Oasis SPE cartridges (HLB, 60 mg, 3 cc) were obtained from Waters (Milford, MA).

## 2.2 CE analysis

CE was performed using an HP<sup>3D</sup> system (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany) equipped with an on-column DAD system. Absorbances at 210, 275 and 295 nm were monitored for DMSO, PHBA and parabens detection, respectively. Ultraviolet-visible (UV-vis) absorption spectra between 200 and 500 nm were used for identification. Instrument control and data acquisition were performed with HP<sup>3D</sup> ChemStation Software (Rev. A.06.01[403]) (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany).

An uncoated narrow-bore silica capillary (supplied by Composite Metal Services, UK) with an effective/total length of 61.5/70 cm and 75  $\mu\text{m}$  ID was used. The capillary was thermostated to 25.0°C, unless otherwise stated. A Chrom-pack RTE-110B external water bath (Neslab Instruments, Newington, NH) was used for thermostating the samples to 20°C.

Standards and sample extracts were injected hydrodynamically by applying an inlet pressure of 50 mbar for 2 to 10 s, depending on the experiment. The applied voltage for separation was  $-30$  kV, unless otherwise specified.

New capillaries were rinsed with 1 M sodium hydroxide for 20 min. Before injections, capillaries were conditioned by flushing sequentially 0.1 M sodium hydroxide for 5 min, Milli-Q water for 5 min, and separation electrolyte for 15 min. After each run, the capillary was washed with Milli-Q water for 10 min. The capillary was kept overnight in Milli-Q water.

Methanol was chosen as solvent for non-aqueous BGE preparation. Sodium tetraborate and Tris, being both readily soluble in methanol, were assayed as electrolytic salts. The pH<sub>app</sub> of the solution was adjusted by addition of a 0.5 M sodium hydroxide solution in methanol, and measured using a Metrohm 654 pH-meter (Herisau, Switzerland) calibrated with aqueous standard buffer solutions. The electrolyte solution was prepared freshly every 2 days, sonicated in a P-Selecta ultrasonic bath (Barcelona, Spain) for at least 4 min and filtered through a membrane of 0.22- $\mu\text{m}$  pore size. Every day all solutions were filtered through a 0.22- $\mu\text{m}$  syringe filter before use.

## 2.3 LVSS using EOF pump

Standard solutions and sample extracts dissolved in methanol were introduced hydrodynamically into the capillary with an inlet pressure of 50 mbar for different periods from 10 to 300 s, depending on the experiment. After sample injection, a negative voltage of  $-30$  kV was applied for both sample stacking and subsequent separation without polarity switching. Fresh electrolyte and sample solutions were always used for each injection.

## 2.4 Samples and sample preparation

An off-line SPE step was used to preconcentrate and cleanup water samples before CE analysis. Details of the optimization

and validation of this procedure have been described elsewhere (to be published). Real water samples were collected in a river and a wastewater-treatment plant near Santiago de Compostela (North-West of Spain). Oasis SPE cartridge columns, packed with 60 mg of polystyrene-divinylbenzene (PS-DVB), were used as solid-phase sorbent.

The 500-mL water samples, spiked or not with the appropriate standard, were acidified at pH 2.5 with 1 M hydrochloric acid solution. Then they were filtered through 5- $\mu\text{m}$  followed by 0.45- $\mu\text{m}$  cellulose ester membrane filters before the SPE to eliminate particulate matter.

Oasis cartridges were conditioned by passing 4 mL of methanol and 4 mL of Milli-Q water at pH 2.5. Thereafter, water sample was loaded through the cartridge, and then the cartridge was washed with 5 mL of Milli-Q water at pH 2.5 with 5% of methanol. After that, the cartridge was dried under nitrogen stream for 45 min at a pressure of 12 psi (827.6 mbar). The analytes trapped on the column were eluted with 2 mL of methanol. The extract was filtered through a 0.22- $\mu\text{m}$  syringe filter, and subsequently subjected to CE analysis.

## 2.5 Calculations

Since DMSO was used as neutral marker for EOF measurements, the electroosmotic mobility  $\mu_{\text{eo}}$  was determined by Eq. (1):

$$\mu_{\text{eo}} = \frac{L_t \times L_{\text{eff}}}{V \times t_{\text{DMSO}}} \quad (1)$$

where  $L_t$  is the total length of the capillary,  $L_{\text{eff}}$  is the length to the detection window,  $V$  is the applied voltage, and  $t_{\text{DMSO}}$  is the observed migration time of DMSO.

The effective electrophoretic mobilities  $\mu_{\text{eff}}$  of the analytes were calculated from their apparent mobilities  $\mu_{\text{app}}$  and the electroosmotic mobility using Eq. (2):

$$\mu_{\text{eff}} = \mu_{\text{app}} - \mu_{\text{eo}} = \frac{L_t \times L_{\text{eff}}}{V \times t_i} - \mu_{\text{eo}} \quad (2)$$

where  $t_i$  is the observed apparent migration time of each analyte  $i$ .

Resolution ( $R_s$ ) was calculated for each pair of adjacent compounds 1 and 2 in electropherograms considering their migration times  $t_1$  and  $t_2$ , and their peak widths at medium height  $w_{1/2(1)}$  and  $w_{1/2(2)}$ , using Eq. (3):

$$R_s = 2 \times \frac{(t_2 - t_1)}{(w_{1/2(1)} + w_{1/2(2)})} \quad (3)$$

The efficiency of the electrophoretic separation was given by the number of theoretical plates  $N$ :

$$N = 5.54 \times \left( \frac{t_i}{w_{1/2(i)}} \right)^2 \quad (4)$$

where  $w_{1/2(i)}$  is the peak width at medium height for each analyte  $i$ .

### 3 Results and discussion

#### 3.1 Separation by NACE

In NACE, the nature and properties of the organic solvent have the strongest influence on the separation selectivity, efficiency and resolution. Due to its favorable properties, such as dielectric constant, viscosity, and a useful UV range for detection, methanol is the most commonly used organic solvent in CE, as both pure solvent in NACE or modifier in aqueous BGE. Furthermore, it is an appropriate solvent for ionizable analytes, like parabens and PHBA among others, and common electrolyte salts, such as sodium tetraborate and Tris. Methanol used as run buffer solvent could allow LVSS as field-amplified technique for on-line preconcentration in NACE [37, 39]. In addition, this organic solvent is often used as extractant in many sample preparation processes allowing the direct injection of extracts in the NACE system without further treatment. For all these reasons, it was chosen as the BGE solvent.

Some parameters affecting the electrophoretic separation were evaluated with a test mixture of the studied compounds using a univariant approach, being buffer pH<sub>app</sub> and concentration, and injection time the most important.

##### 3.1.1 Preliminary assays

PHBA and parabens are weak acids containing hydroxyl groups in their structures. Their acidity constant in aqueous

medium (p*K*<sub>a</sub>) values in water range from 4.47 to 9.2 (see Table 1), which means that at a pH value over 9.2 they are expected to be all at least partially dissociated, present in their anionic forms and therefore ready for CE analysis. However, this only gave us an idea for choosing the starting experimental conditions, because analyte p*K*<sub>a</sub> values are larger in almost all the organic solvents commonly used in NACE when compared to aqueous media. For example, higher acidity constant in organic medium (p*K*<sub>a</sub><sup>\*</sup>) values have been reported for PHBA in aqueous universal buffer mixtures containing 30% of organic modifier, such as methanol and ACN, in comparison with p*K*<sub>a</sub> in water (see Table 1 and notes below).

Based on previous methods reported in literature for PHBA and parabens determination by aqueous CE [22, 23, 27–29], and also on our knowledge and experience regarding the analysis of phenolic compounds by NACE [38, 39], tetraborate buffers in methanol at different pH<sub>app</sub> values between 9 and 12 were tested. In all cases, analytes were detected in negative polarity. Higher pH<sub>app</sub> led to better separations, however, bad reproducibilities were obtained due to the lower buffering capacity of tetraborate in this pH<sub>app</sub> range.

Under such conditions, it was not possible to achieve a reasonable separation between PHBA and EtPB at any BGE composition. In an effort to achieve better resolution of the critical pair, it was decided to look for another buffer with higher working pH range, and therefore, Tris was chosen as electrolyte salt. First results showed that Tris offers better pH<sub>app</sub> conditions to achieve the separation.

**Table 1.** p*K*<sub>a</sub> values in water of the compounds studied at T 25°C

Compound	p <i>K</i> <sub>a</sub>	μ <sub>eff</sub> (10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> ·V <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> )	Resolution ( <i>R</i> <sub>s</sub> )	Efficiency ( <i>N</i> )
MePB	8.17 <sup>b)</sup> – 8.30 <sup>c)</sup>	–2.76		146 659
PHBA	p <i>K</i> <sub>a1</sub> <sup>d)</sup> : 4.47 <sup>e)</sup> – 4.57 <sup>c)</sup> p <i>K</i> <sub>a2</sub> <sup>f)</sup> : 8.49 <sup>g)</sup> – 9.2 <sup>e),h)</sup>	–2.73	3.4	160 781
EtPB	8.22 <sup>b)</sup> – 8.30 <sup>c)</sup>	–2.66	6.8	144 704
PrPB	8.23 <sup>c)</sup> – 8.35 <sup>b)</sup>	–2.58	7.7	141 060
BuPB	8.22 <sup>c)</sup> – 8.37 <sup>b)</sup>	–2.52	7.4	138 006
BnPB	8.18 <sup>c)</sup>	–2.43	9.5	133 702
		μ <sub>eo</sub> = 1.07 10 <sup>-4</sup> cm <sup>2</sup> ·V <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup>		

Electroosmotic mobility (μ<sub>eo</sub>), effective electrophoretic mobilities (μ<sub>eff</sub>) of the analytes, resolution (*R*<sub>s</sub>) and efficiency (*N*) under optimal electrophoretic conditions<sup>a)</sup>

a) NACE conditions: capillary 61.5/70-cm effective/total length × 75 μm id; running buffer, 20 mM Tris and 52 mM sodium hydroxide (pH<sub>app</sub> 12.2) in methanol; hydrodynamic injection at 50 mbar for 5 s; applied voltage –30 kV; detection at 210, 275 and 295 nm for DMSO, PHBA and parabens, respectively; capillary temperature 25.0°C; sample tray temperature 20°C.

b) From reference [7].

c) Calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software Solaris V4.67 (© 1994–2004 ACD/Labs).

d) p*K*<sub>a1</sub><sup>\*</sup> = 5.28 (30% ACN) and 4.96 (30% methanol), from [40].

e) From [40].

f) p*K*<sub>a2</sub><sup>\*</sup> = 9.95 (30% ACN) and 9.72 (30% methanol), from [40].

g) From [6].

h) From [41].

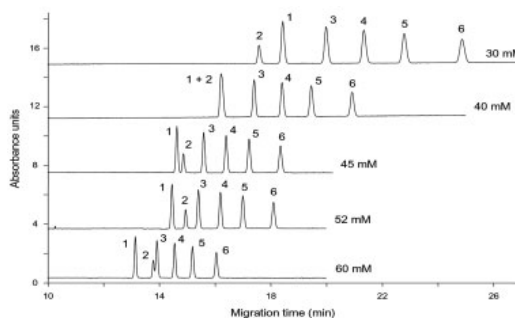
At the time of testing these conditions, for every assayed electrolyte system, it has been proved that both electric field strength (from  $-25$  to  $-30$  kV) and capillary temperature (between  $20$  and  $30^\circ\text{C}$ ) did not affect significantly the separation efficiency. In the remaining experiments, a voltage of  $-30$  kV (the highest allowable in the instrument) and a temperature of  $25^\circ\text{C}$  were selected to speed-up separations and to prevent difficulties arising from the generation of Joule heating. In addition, it has been observed better peak shapes obtained when sample solutions were thermostated to  $20^\circ\text{C}$ .

### 3.1.2 Buffer $\text{pH}_{\text{app}}$ and NaOH concentration

Additional experiments were carried out in order to determine the optimum buffer  $\text{pH}_{\text{app}}$  at a concentration of  $20$  mM of Tris in methanol. Considering the previous screening,  $\text{pH}_{\text{app}}$  values between  $10$  and  $12.5$  were assayed. Within this range, working at lower  $\text{pH}_{\text{app}}$  provided adequate resolution for all compounds, but also analysis time was too long (more than  $45$  min). At higher  $\text{pH}_{\text{app}}$ , the separation was faster but also incomplete because some compounds comigrated. The  $\text{pH}_{\text{app}}$  above  $12.2$  were soon abandoned because of great electrical current values obtained (higher than  $-100$   $\mu\text{A}$  in absolute value), which caused unacceptable Joule heating generation that adversely affected system performance.

Besides the  $\text{pH}_{\text{app}}$ , the ionic strength was also an important parameter related to the optimization of the selectivity, efficiency and resolution of the separation system. As can be seen in Fig. 1, increasing sodium hydroxide concentration in buffer solution from  $40$  to  $52$  mM, although  $\text{pH}_{\text{app}}$  value hardly changed ( $\text{pH}_{\text{app}}$  around  $12.2$ ), an improved resolution was observed for MePB and PHBA, and also a decrease in analysis time. Further increase in sodium hydroxide concentration did not bring any significant improvement in the resolution of PHBA with its adjacent peak EtPB. Therefore, results shown in Fig. 1 clearly indicated that best satisfactory resolution in shorter analysis time was achieved working with a  $20$  mM Tris buffer adjusted at a  $\text{pH}_{\text{app}}$   $12.2$  corresponding to a concentration of  $52$  mM of sodium hydroxide in the methanolic solution.

It is interesting to note that slightly modulating the buffer  $\text{pH}_{\text{app}}$  between  $11.9$  and  $12.2$ , with concentrations of sodium hydroxide from  $30$  to  $52$  mM, respectively, an exchange in the migration order of PHBA and MePB was observed (see Fig. 1). This change was more significant at higher  $\text{pH}_{\text{app}}$  over  $12.2$ , where PHBA migrated after EtPB, and overlapped with PrPB (results not shown). Obviously, this fact was a consequence of the marked influence of  $\text{pH}_{\text{app}}$  on the migration behavior of parabens, which were partially dissociated in the  $\text{pH}_{\text{app}}$  range considered, while the most acidic hydroxyl group of PHBA must be fully deprotonated (see  $\text{pK}_a$  values in Table 1). Therefore, migration velocities of parabens increased significantly with  $\text{pH}_{\text{app}}$ , while similar effect was observed for PHBA but in a less extent.

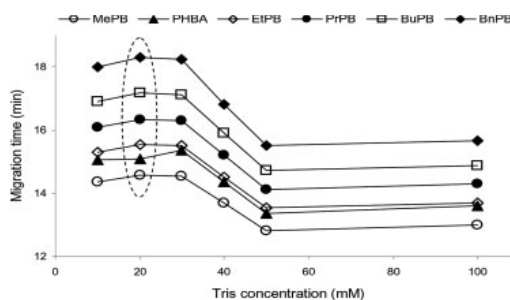


**Figure 1.** Influence of sodium hydroxide concentration on electrophoretic separation. Electropherograms of a standard solution in methanol at a concentration of  $2$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Capillary:  $61.5/70$  cm effective/total length  $\times$   $75$   $\mu\text{m}$  id; running buffer:  $20$  mM Tris in methanol; hydrodynamic injection:  $50$  mbar during  $2$  s; applied voltage:  $-30$  kV; detection:  $295$  nm; capillary temperature:  $25.0^\circ\text{C}$ ; sample tray temperature:  $20^\circ\text{C}$ . Peak designation: (1) MePB, (2) PHBA, (3) EtPB, (4) PrPB, (5) BuPB, and (6) BnPB.

### 3.1.3 Electrolyte concentration

To study the effect of electrolyte concentration on migration times and resolution of the electrophoretic separation, concentration levels between  $10$  and  $100$  mM of Tris in methanol were assayed, maintaining constant the concentration of sodium hydroxide at  $52$  mM.

As can be seen in Fig. 2, the resolution was improved with the decrease in the ionic strength, at the expense of higher analysis time. Furthermore, electrolyte concentrations above  $50$  mM lead to worse separations, coeluting PHBA and EtPB, and to high electric current, and this should be avoided in order to suppress Joule heating generation. Although no significant differences in migration times were observed in the range of  $10$  and  $30$  mM, only an electrolyte concentration of  $20$  mM provided adequate resolution for the critical pair PHBA and EtPB.



**Figure 2.** Influence of the concentration of Tris in buffer solution on the migration times of the compounds studied. Running buffer: Tris and  $52$  mM sodium hydroxide ( $\text{pH}_{\text{app}}$   $12.2$ ) in methanol. Other NACE conditions as in Fig. 1.

In view of these results, a 20 mM solution of Tris in methanol with 52 mM of sodium hydroxide ( $\text{pH}_{\text{app}} 12.2$ ) was finally chosen as running buffer for further study.

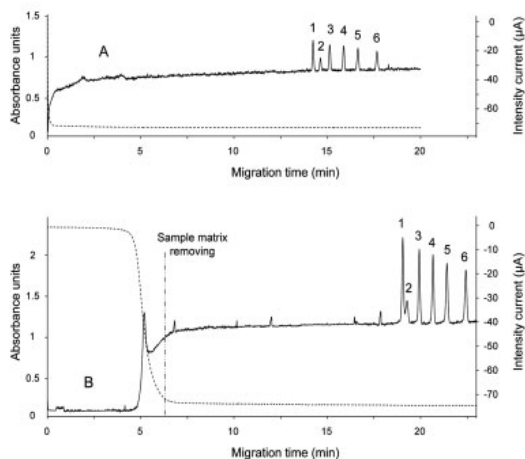
### 3.1.4 Injection time

Finally, the influence of the sample volume introduced into the capillary on the separation efficiency, resolution and sensitivity was evaluated. A standard mixture was hydrodynamically injected into the capillary at different time intervals between 2 and 10 s at an inlet pressure of 50 mbar. Results indicated that peak areas were proportional to the injection time up to 10 s. However, at injection times longer than 5 s, although peak areas continued increasing, also did peak width, peak symmetry became worse and resolution slightly decreased. Thus, an injection time of 5 s was selected as optimum, corresponding to a sample volume of 51 nL (equivalent to 1.6% of the capillary total volume of 3090 nL).

### 3.1.5 Optimal conditions

As a summary, an improved NACE separation of parabens and their hydrolysis product PHBA has been achieved in a buffer of 20 mM Tris with 52 mM sodium hydroxide ( $\text{pH}_{\text{app}} 12.2$ ) in methanol by applying a negative voltage of  $-30$  kV at  $25^\circ\text{C}$  and an injection time of 5 s.

Figure 3A shows an electropherogram corresponding to a standard mixture of parabens and PHBA obtained under these conditions. As it can be seen, all the analytes were baseline separated in less than 18 min.



**Figure 3.** Electropherograms of standard solutions in methanol at concentrations of (A) 100 ng/mL and (B) 8 ng/mL. Dotted lines represent electric current in each case. Detection: 295 nm; hydrodynamic injection: 50 mbar during (A) 5 s and (B) 240 s. Other NACE conditions as in Table 1. Peak designation as in Fig. 1.

Under optimized conditions, the minimum resolution between peaks was 3.4 for the pair MePB and PHBA, and the minimum system efficiency was 133 702 theoretical plates for BnPB (see Table 1). Electroosmotic mobility ( $\mu_{\text{eo}}$ ) and effective electrophoretic mobilities ( $\mu_{\text{eff}}$ ) of the analytes were also evaluated. The  $\mu_{\text{eo}}$  was measured using DMSO as EOF marker and in positive polarity (applied voltage  $+30$  kV). As can be observed in Table 1, negative values of  $\mu_{\text{eff}}$  were in the range of  $-2.762 \times 10^{-4}$  for MePB and  $-2.43 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  for BnPB, and were higher (in absolute values) than  $\mu_{\text{eo}}$  of methanolic run buffer ( $1.07 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ).

### 3.2 Improving sensitivity: LVSS using the EOF pump

In order to increase sensitivity, LVSS using the EOF pump without polarity switching has been applied as on-line pre-concentration methodology. This technique was chosen because the buffer conditions and polarity allowed its use, considering that all analytes were negatively charged at the working  $\text{pH}_{\text{app}}$ , and their mobilities were greater than EOF (see Table 1). When methanol was used as the running buffer solvent, appropriate suppression of EOF and an increase in the electrophoretic mobilities of the anionic analytes made LVSS without polarity switching possible [37, 38].

To achieve the maximum concentration factor, LVSS using EOF pump could allow the hydrodynamic injection of the sample to a volume up to 100% of the capillary total volume [35], in this particular case, 3090 nL. However, sample injection time is limited in each particular case by peak broadening, and this can negatively affect the separation efficiency. To determine the highest sample plug length to be injected without degrading the separation profile by LVSS, different sample volumes were tested. Standard mixtures were hydrodynamically introduced into the capillary at different injection times between 10 and 300 s at an inlet pressure of 50 mbar. Peak areas of all compounds increased as the injection time increased. However, the longer injection time was, the longer it took to stack the analytes, and poor efficiencies and bad peak shapes were obtained for injection times longer than 240 s. For that reason, an injection time of 240 s was selected as a compromise between high stacking efficiency, good peak shape and acceptable resolution (minimum resolution between peaks was 1.8 for the pair MePB and PHBA). In these conditions, about 75% of the capillary was filled with the sample solution, corresponding to a sample volume of 2437 nL.

Figure 3 shows as an example the separation and the enhancement in sensitivity achieved using LVSS-NACE-DAD. Note that both electropherograms A and B are in the same scale in the figure; the duration of the stacking process imposed the differences in migration times between them. During LVSS process, the intensity of the electric current (represented as a dotted line in Fig. 3B) increased (in absolute values) slowly for 5 min at the beginning, and then rapidly for nearly 6 min to  $-75 \mu\text{A}$ , close to the value registered when the capillary was filled with the run buffer (see dotted line in

**Table 2.** Linearity, precision, detection and quantification limits of the NACE methods developed<sup>a)</sup>

Method	Compound	Calibration range (ng/mL)	Correlation coefficient ( <i>r</i> )	Repeatability (RSD %) <sup>b)</sup>		Interm. precision (RSD %) <sup>b)</sup>		LOD (ng/mL) <sup>c)</sup>	LOQ (ng/mL) <sup>c)</sup>
				Low conc.	High conc.	Low conc.	High conc.		
NACE-DAD <i>t</i> <sub>inj</sub> = 5 s	MePB	50-5000	0.9987	5.5	6.0	6.0	5.8	15	50
	PHBA		0.9991	4.3	5.4	5.0	5.3	21	70
	EtPB		0.9989	4.3	6.1	4.8	5.9	13	42
	PrPB		0.9988	5.2	6.0	5.4	5.8	16	53
	BuPB		0.9988	4.5	6.3	4.2	6.0	18	62
	BnPB	0.9988	4.4	5.7	4.3	5.4	13	45	
LVSS-NACE-DAD <i>t</i> <sub>inj</sub> = 240 s	MePB	2-200	0.9980	4.9	5.2	5.9	4.1	0.8	2.5
	PHBA		0.9978	6.6	8.6	7.5	8.0	2.1	7.0
	EtPB		0.9996	6.2	4.8	5.4	4.5	0.8	2.6
	PrPB		0.9996	6.6	5.2	5.7	4.8	0.8	2.5
	BuPB		0.9995	5.1	5.2	4.9	4.6	0.7	2.5
	BnPB	0.9997	4.8	4.7	4.1	4.5	0.8	2.5	

a) *t*<sub>inj</sub> = injection time; detection at 295 nm, except for PHBA at 275 nm; other NACE conditions as in Table 1. Calculations based on peak area.

b) RSD % for *n* = 6 replicate injections, on the same day (repeatability), or within successive days (intermediate precision); low concentration level: 100 ng/mL for NACE-DAD, and 4 ng/mL for LVSS-NACE-DAD; high concentration level: 2 µg/mL for NACE-DAD, and 80 ng/mL for LVSS-NACE-DAD.

c) LOD: S/N = 3; LOQ: S/N = 10.

Fig. 3A). At this moment, the stacking process could be considered complete, and the separation of the highly stacked analytes occurred without polarity switching. The electric current remained constant during the separation.

### 3.3 Analytical performance

The analytical performances of both NACE-DAD and LVSS-NACE-DAD procedures were evaluated in terms of linearity, precision, and limits of detection and quantification, using standard mixtures of the analytes in methanol. Results have been summarized in Table 2.

Calibration curves were built by triplicate injections at six concentration levels in the range shown in Table 2, corresponding to a wide range for PPCPs analysis, and relevant for environmental pollution. Both methods showed good linearity, with correlation factors higher than 0.99 for all the compounds.

Precision was examined by performing six replicate injections of standard mixtures at two concentration levels of 100 ng/mL and 2 µg/mL for NACE-DAD, and 4 and 80 ng/mL for LVSS-NACE-DAD, in the same day (repeatability) or within successive days (intermediate precision). The results, expressed as RSD% for analyte response, are given in Table 2. As can be observed, acceptable precision was obtained for repeatability, as well as for the day-to-day variation, with RSD% below 8.6% in all cases.

Instrumental LODs and LOQs were calculated from three replicate determinations analyzing dilutions of a standard mixture solution up to concentrations at which S/N were 3 and 10, respectively. LOD and LOQ values are shown in Table 2, and were in the low ng/mL level. As can be

observed, coupling LVSS to NACE-DAD improved LODs and LOQs 10–25-fold depending on the analyte, in comparison with normal hydrodynamic injection.

The obtained data demonstrated that the proposed NACE methods provided good performance. In view of the limits set by the EEC [8] and concentrations found in the environment [11–18], both methods enable and seem to be suitable for the accurate determination of parabens and PHBA in commercially available cosmetic and pharmaceutical preparations, as well as in environmental matrices.

LODs and LOQs of optimized NACE methods were compared with those obtained with different analytical techniques described in the literature (see Table 3). It was found that the proposed NACE-DAD method showed improved sensitivity in relation to LODs obtained in reported HPLC-UV [22–25], CZE-UV [22, 23, 27–29], MEKC (even with on-line pre-concentration by LVSS) [4] and CEC [5] methods, and was comparable to that achieved in GC-MS [13]. The LVSS-NACE-DAD procedure, even using conventional UV-vis absorption detection, achieved sensitivity similar to LC-MS [11], LC-MS/MS [12], HPLC-chemiluminescence detection (CL) [3] and flow injection (FI)-CL [10] methods, and was almost as sensitive as GC-MS/MS [14]. In addition, most of these reported methods required tedious clean-up steps or derivatization procedures before the injection of analytes in the instrument.

### 3.4 Application: Analysis of environmental water samples

To demonstrate the feasibility of the proposed NACE-DAD and LVSS-NACE-DAD methods, several real water samples

**Table 3.** Comparison of LOD and LOQ obtained with different reported methods<sup>a)</sup>

Method	Compound	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	Reference
GC-MS	MePB, EtPB, PrPB, BuPB	10		13
GC-MS/MS	MePB, EtPB, PrPB, BuPB, BnPB		0.1 - 1.0	14
SPE-GC-MS	MePB, EtPB, PrPB, BuPB	0.01		13
SPE-GC-MS	MePB, EtPB, PrPB, BuPB		0.003 - 0.010	15
SPME-GC-MS/MS	MePB, EtPB, PrPB, BuPB, BnPB		0.001 - 0.025	14
SPME-IMS	MePB, EtPB, PrPB, BuPB	5 - 10	15 - 30	42
HPLC-UV	PHBA, MePB	160, 6600		23
HPLC-UV	MePB, PrPB	300, 100	1000, 300	25
HPLC-UV	PrPB, BuPB	48, 54	240, 310	24
HPLC-UV	MePB, EtPB, PrPB, BuPB	20 - 50		22
HPLC-CL	MePB, EtPB, PrPB, BuPB	1.9-5.3		3
LC-MS	MePB, EtPB, PrPB, BnPB	1.7 - 2		11
LC-MS/MS	MePB, EtPB, PrPB, BnPB	0.5 - 1.25	2.5 - 5	12
SPE-LC-MS	MePB, EtPB, PrPB, BnPB	0.0034 - 0.0040		11
SFE-LC-MS	MePB, EtPB, PrPB, BuPB	4.7 - 19.3 ng/g <sup>b)</sup>		21
SPE-LC-MS/MS	MePB, EtPB, PrPB, BnPB	0.0002 - 0.0005	0.001-0.002	12
FI-CL	MePB, EtPB, PrPB, BuPB	0.34-5		10
CZE-UV	PHBA, MePB	130, 3800		23
CZE-UV	PHBA, MePB, PrPB	500	2000	29
CZE-UV	MePB, EtPB, PrPB, BuPB	21.1 - 29.0		27
CZE-UV	MePB, EtPB, PrPB, BuPB	160 - 210		22
CZE-UV	MePB, EtPB, PrPB, BuPB	650 - 920	2160 - 3070	28
MEKC	MePB, EtPB, PrPB, BuPB	11050 - 14417	—	4
LVSS-MEKC	MePB, EtPB, PrPB, BuPB	41 - 54	—	4
MEEKC	PHBA, MePB, EtPB, PrPB, BuPB	0.1% <sup>b)</sup>	0.2% <sup>b)</sup>	6
CEC	PHBA, MePB, EtPB, PrPB, BuPB, BnPB	400-500	1250-2500	5
NACE-DAD	PHBA, MePB, EtPB, PrPB, BuPB, BnPB	13-21	42-70	This work
LVSS-NACE-DAD	PHBA, MePB, EtPB, PrPB, BuPB, BnPB	0.7-2.1	2.5-7.0	This work
SPE-NACE-DAD	PHBA, MePB, EtPB, PrPB, BuPB, BnPB	0.050-0.084	0.168-0.280	This work
SPE-LVSS-NACE-DAD	PHBA, MePB, EtPB, PrPB, BuPB, BnPB	0.007-0.009	0.025-0.031	This work

a) FI: flow injection; IMS: ion mobility spectrometry; SFE: supercritical fluid extraction; SPME: solid-phase microextraction

b) These values are expressed as they appeared in the literature. Authors did not provide enough data for calculating LOD and LOQ in ng/mL.

extracted by SPE as off-line preconcentration and clean-up technique were analyzed. Environmental waters representative of different types of water samples, such as river and wastewater, were selected for this study.

For the application of developed procedures to real water samples, the analytes were first extracted using SPE Oasis cartridges, as it has been described in the experimental section (see Section 2.4). Methanol, used as cartridge eluting solvent, provided a good compatibility between extraction and electrophoretic processes, producing extracts fully compatible with the BGE, which could be directly injected into NACE system without further treatment.

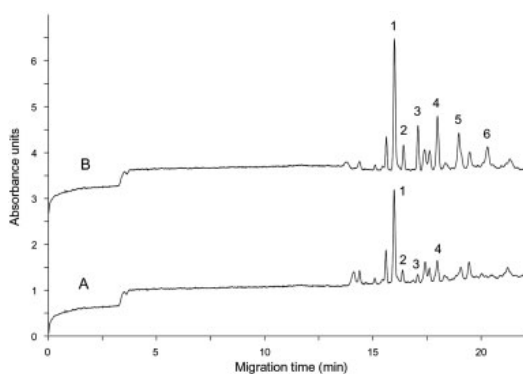
As it was also observed in previous NACE works [38, 43], some additional difficulties appeared when SPE extracts from real samples were analyzed using LVSS-NACE-DAD, especially for those with high salinity and organic matter content. Mainly, matrix components affect the ionic strength of the SPE extracts, so the removing time of sample plug in the stacking process increased. Consequently, recoveries of the

analytes were affected because a fraction of the sample kept out the capillary during stacking. Obviously, this effect was more noticeable for longer injection times. Thus, for river water samples spiked at 0.1 ng/mL level, losses from 40 to 50% were observed using injection times of 240 s. Consequently, injection time need to be reduced to 60 s for enabling quantitative injection of analytes in samples. Under these conditions, analytical performance of LVSS-NACE-DAD was in good agreement with that obtained for 240 s as injection time, although the instrumental LODs increased to 1.8–2.3 ng/mL, corresponding to concentration factors of 6–10.

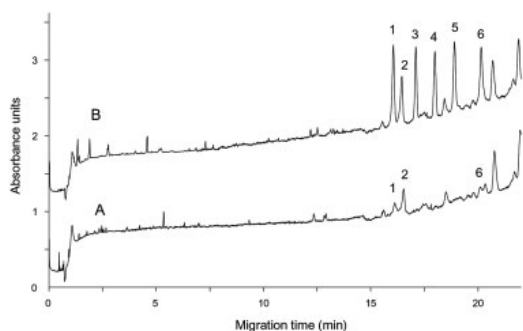
In spite of this fact, the combination of both off-line and on-line preconcentration procedures provided a significant improvement in sensitivity. Considering that the applied SPE process involved a preconcentration factor of 250-fold, the proposed SPE-LVSS-NACE-DAD method allowed the detection of parabens and PHBA at the sub-ng/mL concentration level, between 0.007 and 0.009 ng/mL. In these sense, this method achieved LODs comparable with those obtained

using SPE-GC-MS [13, 15], SPE-GC-MS/MS [14] and SPE-LC-MS [11] for the analysis of water samples (see Table 3).

Figures 4 and 5 show the electropherograms obtained in NACE analysis of SPE extracts of river water and non-treated wastewater samples, respectively. As can be seen in Fig. 4, MePB, PHBA and BnPB were detected in the river water sample at concentrations between 26.4 and 133 ng/L. Nevertheless, BnPB remained under LOD, whereas MePB, PHBA, EtPB and PrPB were found in raw wastewater samples with concentrations up to 3.4 ng/mL for MePB. Therefore, and as it can be seen in Fig. 5, the analysis of SPE extracts by NACE-DAD with an injection time of 5 s was sensitive enough to quantify all analytes detected in non-treated wastewater samples, avoiding the need of sample stacking preconcentration by LVSS, and thus, sample matrix effects.



**Figure 5.** Electropherograms obtained for SPE extracts of non-treated wastewater samples (A) non-spiked and (B) spiked at 1 ng/mL. Detection: 295 nm; hydrodynamic injection: 50 mbar during 5 s. Other NACE conditions as in Table 1. Peak designation as in Fig. 1.



**Figure 4.** Electropherograms obtained for SPE extracts of river water samples (A) non-spiked and (B) spiked at 0.1 ng/mL. Detection: 295 nm; hydrodynamic injection: 50 mbar during 60 s. Other NACE conditions as in Table 1. Peak designation as in Fig. 1.

## 4 Concluding remarks

New methods based on NACE for the simultaneous separation and determination of parabens and their main degradation product PHBA were developed. As an effective on-line preconcentration technique, LVSS using the EOF pump was successfully combined with NACE to improve sensitivity.

The suitability of both NACE-DAD and LVSS-NACE-DAD has been demonstrated as promising alternatives to LC or GC. Linear dynamic range and sensitivity at low ng/mL achieved with proposed NACE methods were relevant and suitable for the determination of the studied compounds in cosmetics, PPCPs and environmental matrices.

Optimized NACE-DAD and LVSS-NACE-DAD methods were applied to the analysis of parabens and PHBA in real water samples previously extracted by SPE. Injection time needs to be reduced for enabling quantitative injection of analytes from sample extracts. Eventually, SPE-NACE-DAD and SPE-LVSS-NACE-DAD procedures proved to be suitable for monitoring parabens and PHBA that can be present even at sub-ng/mL levels in environmental water samples, with concentration factors up to 1500–2500-fold.

*This research was financially supported by the Spanish Ministry of Education and Science MEC-DGI (project CTQ2006-03334/BQU), the Xunta de Galicia (project PGI-DIT06PXIB237039PR) and E. U. FEDER funding. E. Blanco acknowledges her doctoral grant from the Xunta de Galicia.*

*The authors have declared no conflict of interest.*

## 5 References

- [1] Elder, R. L., *J. Am. Coll. Toxicol.* 1984, 3, 147–209.
- [2] Darbre, P. D., Aljarrah, A., Miller, W. R., Coldham, N. G. *et al.*, *J. Appl. Toxicol.* 2004, 24, 5–13.
- [3] Zhang, Q., Lian, M., Liu, L., Cui, H., *Anal. Chim. Acta* 2005, 537, 31–39.
- [4] He, S., Zhao, Y., Zhu, Z., Liu, H. *et al.*, *Talanta* 2006, 69, 166–171.
- [5] De Rossi, A., Desiderio, C., *Electrophoresis* 2002, 23, 3410–3417.
- [6] Mahuzier, P.-E., Altria, K. D., Clark, B. J., *J. Chromatogr. A* 2001, 924, 465–470.
- [7] Soni, M. G., Carabin, I. G., Burdock, G. A., *Food Chem. Toxicol.* 2005, 43, 985–1015.
- [8] European Economic Community (EEC) instruction No. 93/95, *Off. J. Eur. Comm.*, Brussels 1993, LF: 32–37.
- [9] Soni, M. G., Burdock, G. A., Taylor, S. L., Greenberg, N. A., *Food Chem. Toxicol.* 2001, 39, 513–532.
- [10] Myint, A., Zhang, Q., Liu, L., Cui, H., *Anal. Chim. Acta* 2004, 517, 119–124.

- [11] Benijts, T., Günther, W., Lambert, W., De Leenheer, A., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003, 17, 1866–1872.
- [12] Benijts, T., Lambert, W., De Leenheer, A., *Anal. Chem.* 2004, 76, 704–711.
- [13] Lee, H.-B., Peart, T. E., Svoboda, M. L., *J. Chromatogr. A* 2005, 1094, 122–129.
- [14] Canosa, P., Rodríguez, I., Rubí, E., Bollain, M. H., Cela, R., *J. Chromatogr. A* 2006, 1124, 3–10.
- [15] Canosa, P., Rodríguez, I., Rubí, E., Negreira, N., Cela, R., *Anal. Chim. Acta* 2006, 575, 106–113.
- [16] Rudel, R. A., Camann, D. E., Spengler, J. D., Korn, L. R., Brody, J. G., *Environ. Sci. Technol.* 2003, 37, 4543–4553.
- [17] Canosa, P., Rodríguez, I., Rubí, E., Cela, R., *Anal. Chem.* 2007, 79, 1675–1681.
- [18] Canosa, P., Pérez-Palacios, D., Garrido-López, A., Tena, M. T., *et al.*, *J. Chromatogr. A* 2007, 1161, 105–112.
- [19] Pugazhendhi, D., Pope, G. S., Darbre, P. D., *J. Appl. Toxicol.* 2005, 25, 301–309.
- [20] Harvey, P. W., Everett, D. J., *J. Appl. Toxicol.* 2004, 24, 1–4.
- [21] Lee, M.-R., Lin, C.-Y., Li, Z.-G., Tsai, T.-F., *J. Chromatogr. A* 2006, 1120, 244–251.
- [22] Labat, L., Kummer, E., Dallet, P., Dubost, J. P., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000, 23, 763–769.
- [23] Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., Maspocho, S., Romero, M. A., *J. Chromatogr. B* 2001, 751, 29–36.
- [24] Belgaied, J.-E., Trabelsi, H., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 33, 991–998.
- [25] Saad, B., Bari, Md. F., Saleh, M. I., Ahmad, K., Talib, M. K. M., *J. Chromatogr. A* 2005, 1073, 393–397.
- [26] Peck, A. M., *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, 386, 907–939.
- [27] Wang, S.-P., Chang, C. L., *Anal. Chim. Acta* 1998, 377, 85–93.
- [28] Cruces Blanco, C., Segura Carretero, A., Gálvez Mata, L., Fernández Gutiérrez, A., *Chromatographia* 2001, 53, 414–418.
- [29] Jaworska, M., Szulinska, Z., Wilk, M., *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 137–143.
- [30] Altria, K. D., *Chromatographia* 1999, 49, 457–464.
- [31] Altria, K. D., *J. Chromatogr. A* 1999, 844, 371–386.
- [32] Tjørnelund, J., Hansen, S. H., *J. Chromatogr. A* 1997, 792, 475–482.
- [33] Quirino, J. P., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 2000, 902, 119–135.
- [34] Malá, Z., Křivánková, L., Gebauer, P., Boček, P., *Electrophoresis* 2007, 28, 243–253.
- [35] Breadmore, M. C., *Electrophoresis* 2007, 28, 254–281.
- [36] Simpson Jr., S. L., Quirino, J. P., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 2008, 1184, 504–541.
- [37] Kim, B., Chung, D. S., *Electrophoresis* 2002, 23, 49–55.
- [38] Blanco, E., Casais, M. C., Mejuto, M. C., Cela, R., *J. Chromatogr. A* 2005, 1071, 205–211.
- [39] Blanco, E., Casais, M. C., Mejuto, M. C., Cela, R., *J. Chromatogr. A* 2005, 1068, 189–199.
- [40] Miklautz, H., Keller, D., Lopez Holguin, F., Woloszczak, R., *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, 384, 1191–1195.
- [41] Kurakina, V. S., Medvedeva, O. M., Dimitrienko, S. G., Shpigun, O. A., *Vestnik Moskovskogo Universiteta Seriya 2 Khimiya* 2004, 45, 124–130.
- [42] Lokhnauth, J. K., Snow, N. H., *Anal. Chem.* 2005, 77, 5938–5946.
- [43] Blanco, E., Casais, M. C., Mejuto, M. C., Cela, R., *Anal. Chem.* 2006, 78, 2772–2778.

Artículo V

Combinación de la extracción en fase sólida fuera de línea y la concentración de muestra con campo amplificado y eliminación de matriz en línea para la determinación de parabenos y ácido *p*-hidroxibenzoico en aguas mediante electroforesis capilar en medio no acuoso

*Combination of off-line solid-phase extraction and on-column sample stacking for sensitive determination of parabens and p-hydroxybenzoic acid in waters by non-aqueous capillary electrophoresis*

*Analytica Chimica Acta* 647 (2009) 104-111





Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aca](http://www.elsevier.com/locate/aca)

## Combination of off-line solid-phase extraction and on-column sample stacking for sensitive determination of parabens and *p*-hydroxybenzoic acid in waters by non-aqueous capillary electrophoresis

Eva Blanco, María del Carmen Casais, María del Carmen Mejuto, Rafael Cela\*

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry, Institute of Research and Food Analysis, University of Santiago de Compostela, Avda. de las Ciencias s/n, E-15782 Santiago de Compostela, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 February 2009  
 Received in revised form 15 May 2009  
 Accepted 18 May 2009  
 Available online 22 May 2009

#### Keywords:

Large-volume sample stacking  
 Non-aqueous capillary electrophoresis  
 Parabens  
*p*-Hydroxybenzoic acid  
 Solid-phase extraction  
 Water samples

### ABSTRACT

For the first time, a procedure based on solid-phase extraction (SPE) for the simultaneous extraction of a group of parabens (methyl, ethyl, propyl, butyl and benzyl *p*-hydroxybenzoates) and *p*-hydroxybenzoic acid (PHBA), from environmental water samples has been developed. Analysis of the extracts was performed by non-aqueous capillary electrophoresis (NACE) coupled with diode array detection (DAD), using large-volume sample stacking (LVSS) based on the electroosmotic flow pump as on-column preconcentration technique. Several water samples, such as tap, river, and wastewater samples, were analyzed using both SPE–NACE–DAD and SPE–LVSS–NACE–DAD methods. It has been observed that in addition to SPE parameters such as sorbent material, sample pH, breakthrough volume, addition of an organic solvent and elution solvent, also sample characteristics, such as organic matter content, have influence on SPE extraction yields, especially in the case of PHBA. The presence of PHBA and some parabens was detected at trace levels in surface water samples. Concentrations up to 8.4 ng mL<sup>-1</sup> were found in raw wastewater, with the highest levels corresponding to methylparaben, propylparaben, and their main degradation product, PHBA.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Parabens, alkyl and aryl esters of *p*-hydroxybenzoic acid (PHBA) with antimicrobial properties, are one of the most widely used types of preservatives in cosmetics, pharmaceutical and personal care products (PPCPs), and foodstuffs [1–4]. Although their acute toxicity is very low, these compounds are also referred to as endocrine-disrupting chemicals, as they all exhibit weak estrogenic activity [4,5]. Moreover, a relation has been proposed between the prolonged dermal exposure to paraben-containing products, such as underarm deodorants, and human breast cancer [2,6–8]. Due to their absorption from topical application and ingestion of diverse consumer products, parabens have been detected in human breast tissue, milk, urine and serum [7,9–13].

Many cosmetics and PPCPs, such as bath gels, shampoos, deodorants, antiperspirants, skin and body creams, tanning lotions and toothpaste, among others, might contribute to the direct introduction of parabens in the environment. These consumer products are used daily in various human activities. Therefore, due to their continuous release through recreational waters (liberation from

the skin in swimming pools, spas, resorts, etc.), and domestic, urban and industrial wastewaters, parabens might reach the aquatic media, and particularly potable water sources. For this reason, recently the existence and transportation pathways of these compounds into the aquatic ecosystems have been receiving particular attention. A growing concern and interest has arisen in relation to their potential long-term effects not only on humans but also on aquatic organisms. Some studies have confirmed the presence of parabens and PHBA in river [14–18], swimming pool [19] and treated sewage [4,14,17,20,21] water samples at sub-ng mL<sup>-1</sup> levels, and in raw wastewaters [3,4,17,20,22] at low ng mL<sup>-1</sup> concentrations.

Until now, extensive research has been conducted regarding the determination of some parabens in cosmetics and PPCPs, and most investigations have been focused on multicomponent analysis of pharmaceutical and cosmetic formulations. However, there is only one report related to the simultaneous determination of PHBA and parabens (methyl, ethyl, propyl, butyl and benzyl *p*-hydroxybenzoates) in drugs and cosmetics [23]. Recently, various methods to evaluate the occurrence of some parabens in the environment have been introduced [3,4,14–22,24–32]. From the best of our knowledge, this is the first study dealing with the simultaneous determination of alkyl- and aryl-parabens and their main degradation product, PHBA, in water samples.

\* Corresponding author. Tel.: +34 981 563100x14271; fax: +34 981 547141.  
 E-mail address: [rafael.cela@usc.es](mailto:rafael.cela@usc.es) (R. Cela).

Available procedures for the analysis of parabens in water samples are mainly based on solid-phase extraction (SPE) as the concentration technique, usually employing reversed-phase [3,14,18,21,22,25–27] or ion exchange [4,15–17] sorbents. Recently, methods dealing with liquid–liquid extraction (LLE) [19] and solid-phase microextraction (SPME) [20] have been developed.

After the enrichment step, parabens are determined by gas chromatography (GC) [3,4,18–22,27] or liquid chromatography (LC) [14–17,25,26] coupled with mass spectrometry detection (MS). However, these methods usually combine sample extraction with exhaustive clean-up, concentration and solvent exchange steps, as well as derivatization as silyl- [18–20,22] or fluoropropionyl-derivatives [4] for GC analysis. These additional steps are often time-consuming, expensive, and may lead to sample losses, and thus a decrease in sensitivity.

In this study, sensitive methods for the simultaneous determination of five parabens (methyl, ethyl, propyl, butyl and benzyl *p*-hydroxybenzoates) and PHBA in surface and sewage water samples have been developed. SPE was chosen as preconcentration technique for the extraction of the analytes and sample clean-up. Extracts were analyzed by non-aqueous capillary electrophoresis coupled with diode array detection (NACE–DAD). Influence of different parameters on the efficiency of the SPE extraction has been thoroughly investigated. Also, the combination of off-line SPE and on-line large-volume sample stacking (LVSS) followed by NACE–DAD has been tested. The performance of both SPE–NACE–DAD and SPE–LVSS–NACE–DAD methodologies was evaluated, and then developed procedures were applied for the analysis of several water samples. The suitability of both methods for the determination of parabens and PHBA at relevant concentration range in aqueous matrices has been demonstrated.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents, standards and materials

Methanol (HPLC gradient grade) was obtained from VWR Pro-labo (Leuven, Belgium), acetonitrile (LiChrosolv gradient grade) was from Merck (Darmstadt, Germany), and hydrochloric acid was purchased from Prolabo (Fontenay-Sous-Bois, France). Sodium hydroxide was obtained from Merck, tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris base) was purchased from Aldrich (Milwaukee, WI, USA), and sodium humic acid salt was from Aldrich (Steinheim, Germany). Ultrapure water was produced in the laboratory by means of a Milli-Q system purchased from Millipore (Bedford, MA, USA).

*p*-Hydroxybenzoic acid (PHBA, 99.0%), and methyl (MePB, 99%), ethyl (EtPB, 99%), propyl (PrPB, 99%), butyl (BuPB, 99%) and benzyl (BnPB, 98.0%) *p*-hydroxybenzoates were obtained from Fluka (Steinheim, Germany). Stock solutions of each compound were prepared at 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in methanol. Diluted standard mixtures used as calibration solutions, as well as for spiking water samples, were prepared in methanol to appropriate concentration levels. All solutions were refrigerated at  $-18^\circ\text{C}$  and protected against daylight when not in use.

Cellulose ester membrane filters (SMWP, 47 mm, 5  $\mu\text{m}$ ; HAWP, 47 mm, 0.45  $\mu\text{m}$ ), Durapore membrane filters (GVHP, 47 mm, 0.22  $\mu\text{m}$ ), and Durapore syringe filters (Millex GV, 13 mm, 0.22  $\mu\text{m}$ ) were supplied by Millipore. Oasis SPE cartridges (HLB, 60 mg, 3  $\text{cm}^3$ ) were obtained from Waters (Milford, MA, USA).

### 2.2. Samples

Spiked and non-spiked ultrapure, tap, and river waters, and both raw (influent) and treated (effluent) wastewater samples were used in this study. Ultrapure and tap waters were obtained directly

in the laboratory when needed. River water samples were collected in different points in Galicia (northwest Spain). Sewage water samples were obtained from the inlet and outlet of an urban wastewater treatment plant in operation near Santiago de Compostela, equipped with primary and biological treatments, and which receives mostly municipal non-industrial wastewaters. After sampling, river and wastewater samples were prepared as described in the next section, or stored at  $4^\circ\text{C}$  for a maximum of 1 week until being analyzed.

### 2.3. Sample preparation

An off-line solid-phase extraction (SPE) step was used to isolate and preconcentrate the analytes studied from water samples before NACE–DAD analysis. Optimization of sample preparation conditions was performed using ultrapure water spiked with different concentration levels of the six analytes considered in this study. Then to evaluate the overall analytical procedure, and to check accuracy expressed as recovery, tap, river, influent and effluent sewage waters were extracted using the developed SPE process. These samples were spiked at 0.1  $\text{ng mL}^{-1}$  and 1  $\text{ng mL}^{-1}$  of each analyte, ranging over relevant concentration levels usually found in real surface waters [3,4,14–22].

Ultrapure water spiked with the appropriate standard was acidified when needed at different pH values between 2.5 and 6.0 with hydrochloric acid. These samples were extracted using reversed-phase Oasis HLB (60 mg) SPE cartridge columns from Waters. Two organic solvents and their mixture were assayed as eluents: methanol, acetonitrile and methanol–acetonitrile 1:1. The Oasis HLB cartridges were conditioned by passing 4 mL of the same organic solvent used for elution and 4 mL of ultrapure water was adjusted to the same pH as sample. After that the water sample was loaded through the cartridge, which was then washed with ultrapure water at the corresponding pH. Then the cartridge was dried under nitrogen stream for 45 min at a pressure of 12 psi. The analytes trapped on the column were eluted with organic solvent. This extract was filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  syringe filter, and subsequently subjected to NACE analysis.

In the case of real water samples extracted by SPE under finally optimized conditions, after pH adjustment, tap and river water were filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  cellulose ester membrane filters before the SPE enrichment step to eliminate particulate matter. For raw and treated wastewaters with high content of suspended solids, samples were also prefiltered through 5  $\mu\text{m}$  cellulose ester membrane filters.

### 2.4. NACE–DAD analysis

Non-aqueous capillary electrophoresis (NACE) coupled with diode array detection (DAD) was used for the identification and determination of parabens and PHBA. Details of the optimization of the NACE–DAD method have been previously described [33].

Non-aqueous capillary electrophoresis was performed using a HP<sup>3D</sup> system (Agilent, Waldbronn, Germany) equipped with an on-column DAD system. Absorbances at 275 and 295 nm were monitored for PHBA and parabens detection, respectively. Ultraviolet–visible (UV–vis) absorption spectra between 200 and 500 nm were used for identification. Instrument control and data acquisition were performed with HP<sup>3D</sup> ChemStation Software (Rev. A.06.01[403]) (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany).

Uncoated narrow-bore silica capillary (supplied by Composite Metal Services Ltd., UK) with an effective/total length of 61.5/70 cm and 75  $\mu\text{m}$  I.D. was used. The capillary was thermostated to  $25.0^\circ\text{C}$ . A Chrompack RTE-110B external water bath (Neslab Instruments Inc., Newington, NH, USA) was used for thermostating the samples to  $20^\circ\text{C}$ .

Standards and sample extracts were injected hydrodynamically by applying an inlet pressure of 50 mbar for 5 s. The applied voltage for separation was  $-30$  kV.

New capillaries were rinsed with 1 M sodium hydroxide for 20 min. Before injections, capillaries were conditioned by flushing sequentially 0.1 M sodium hydroxide for 5 min, ultrapure water for 5 min, and separation electrolyte for 15 min. After each run, the capillary was washed with ultrapure water for 10 min. The inlet and outlet of the capillary were kept overnight in ultrapure water.

The background electrolyte (BGE) solution was 20 mM Tris and 52 mM sodium hydroxide prepared in methanol. The apparent pH ( $\text{pH}_{\text{app}}$ ) of the solution was 12.2, measured using a Metrohm 654 pH-meter (Herisau, Switzerland) calibrated with aqueous standard buffer solutions. This solution was prepared freshly every 2 days, sonicated in a P-Selecta ultrasonic bath (Barcelona, Spain) for at least 4 min and filtered through a membrane of  $0.22 \mu\text{m}$  pore size. Every day all solutions were filtered through a  $0.22 \mu\text{m}$  syringe filter before use.

### 2.5. LVSS using the EOF pump

Large-volume sample stacking (LVSS) based on the electroosmotic flow (EOF) pump was chosen as on-line preconcentration technique coupled to NACE-DAD analysis. Standard solutions and sample extracts dissolved in methanol were introduced hydrodynamically into the capillary with a pressure of 50 mbar for different periods of time from 30 s to 240 s, depending on the experiment. After sample injection, a negative voltage of  $-30$  kV was applied for both sample stacking and subsequent separation. Fresh electrolyte and sample (standards or extracts) solutions were always used for each injection in order to preserve the system reproducibility.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Optimization of SPE extraction conditions

The influence of different parameters, such as sample pH and volume, elution solvent and volume, and addition of an organic solvent in the washing step, on the extraction efficiency of the SPE process was thoroughly evaluated. Oasis HLB was chosen as SPE cartridge since it has been proven to be efficient in the quantitative extraction of some parabens and/or PHBA from PPCPs [34] and water samples [14,22,25,27]. Then, other SPE conditions were optimized in order to maximize the recoveries for the simultaneous extraction of all the analytes considered.

In this study, quantification was performed using external calibration by the comparison of peak areas (responses) obtained for each analyte in SPE extracts and in standard solutions. The results obtained for PHBA and MePB are summarized in Fig. 1. Due to the similar behaviour observed for all parabens under study, for the sake of simplicity only MePB values are shown in this figure as representative of the other EtPB, PrPB, BuPB and BnPB.

#### 3.1.1. Effect of sample pH

In order to determine the influence of sample pH on the recovery of each analyte, and considering  $\text{pK}_a$  values for PHBA ( $\text{pK}_{a1}$  4.47 and  $\text{pK}_{a2}$  9.2) and parabens ( $\text{pK}_a$  8.17–8.37), the pH of the water sample was tested in the range 2.5–6.0. As a first approach, methanol was selected as elution solvent due to its compatibility with subsequent NACE analysis, and also to its proved ability for eluting phenolic compounds from Oasis cartridges [27,35]. As it was expected, sample pH exhibited a significant effect on PHBA extraction efficiency, while recoveries of parabens were almost unaffected in the pH range considered (see Fig. 1). Therefore, it was necessary to adjust sample pH at 2.5 to enhance the retention of PHBA in the polymeric sorbent for further analysis.

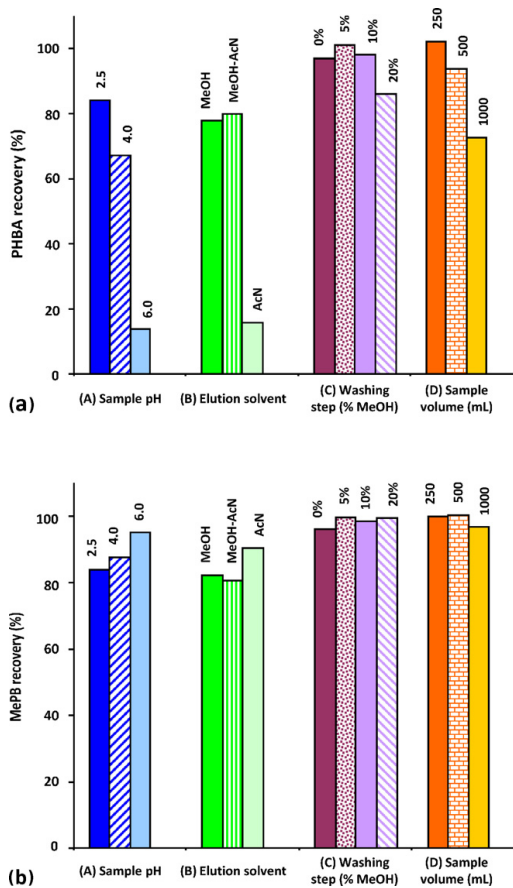


Fig. 1. Influence of (A) sample pH (2.5–6.0), (B) elution solvent (MeOH, MeOH–AcN 1:1, AcN), (C) percentage of methanol used in washing step (0% to 20%), and (D) sample volume (250 mL to 1000 mL) on the efficiency of the SPE process. Ultrapure water samples used in these experiments: (A, B) 500 mL spiked at  $0.3 \text{ ng mL}^{-1}$ , (C) 500 mL spiked at  $2 \text{ ng mL}^{-1}$ , and (D) spiked at different concentrations involving  $2 \mu\text{g}$  of each analyte. Results shown correspond to (a) PHBA and (b) MePB. All parabens under study showed similar pattern, here MePB acts as representative of the other EtPB, PrPB, BuPB and BnPB.

#### 3.1.2. Selection of elution solvent

The SPE recovery is highly dependent on the polarity of the eluents. Losses of parabens in some evaporation processes had been reported elsewhere [4], so only organic solvents that are expected to be compatible with further NACE analysis were tested for the elution of the analytes from the sorbent material. Thus, the need for introducing additional evaporation of the extract to dryness and solvent exchange steps in the whole SPE procedure was avoided.

The nature of the elution solvent in the SPE process was then evaluated. Methanol and acetonitrile, both as pure solvents and as 1:1 mixture, were assayed as eluting agents. In these experiments, acetonitrile showed good behaviour as cartridge eluting solvent for parabens, but on the contrary low recovery was obtained for PHBA. As can be seen in Fig. 1, methanol–acetonitrile 1:1 mixture led to better results in terms of recovery. However, in both cases the presence of acetonitrile often caused salt precipitation into the BGE during the separation process and therefore, current breakdown and capillary blockage. Finally, methanol provided the better per-

formance in removing effectively all the analytes from the sorbent (see Fig. 1), and giving an extract fully compatible with the BGE, which also reduces sample preparation stages and error chances.

In these preliminary experiments, a volume of 3 mL of methanol was found to completely elute all the analytes from the cartridge, since there was no signal for any of them in a second eluting fraction of 2 mL of the organic extract also collected and analyzed by NACE–DAD. Under these conditions, recoveries from 78% to 88% were obtained for all analytes.

### 3.1.3. Adsorption problems: addition of an organic solvent

Additional experiments were carried out in order to improve the extraction yield of the SPE procedure. The adsorption of the analytes on glass [14–17,26] and/or plastic materials [36] may be especially critical at the low concentration levels of parabens and PHBA normally present in water samples. To minimize this problem, after the loading of the sample, all the materials involved in the SPE process (e.g. glass, connections, and the polypropylene body of the cartridge) were rinsed with an aqueous-methanolic solution, and the remaining was then passed through the cartridge. The addition of certain amount of methanol, between 0% and 20%, to the ultrapure water adjusted at pH 2.5 used for washing the material after loading the sample through the cartridge was considered in further experiments to improve solubility of the analytes [18].

As it can be seen in Fig. 1, the addition of 5% of methanol to ultrapure water at pH 2.5 used for washing improved the extraction efficiency for all the analytes. Under these conditions, recoveries were in the range between 99% and 103%. Increasing the amount of methanol over 5% led to losses of PHBA retained due to the partial elution of this analyte from the SPE cartridge before the elution step.

### 3.1.4. Breakthrough volume

The improvement in detection limits based on an increase in the volume of the water sample to be preconcentrated by SPE has some limitations, such as the fact that the retention capacity of the cartridge might be surpassed, or that the breakthrough phenomenon may occur [37]. As a first approach, breakthrough volume of the Oasis HLB sorbent was investigated using ultrapure water samples from 250 up to 2000 mL spiked at different concentration levels and involving the same amount of the analytes (2 µg). These samples were passed through two cartridges connected in tandem, which were disconnected after the enrichment step, and then processed separately.

None of the parabens were detected in the organic extract (eluate) from the second cartridge even after the preconcentration of 2000 mL of ultrapure water. However, in the case of PHBA, cartridge breakthrough was observed for sample volumes over 500 mL, and therefore, low recoveries were obtained (extraction efficiency below 80% for 1000 mL water sample, see Fig. 1). Consequently, a

sample volume of 500 mL was finally chosen as a compromise for the simultaneous quantitative extraction of parabens and PHBA.

### 3.1.5. Elution volume

Eventually, optimal elution volume was evaluated by measuring successive 1 mL eluting fractions of the organic extract until no signal for analytes can be seen, and the sum of responses in the accumulated fractions demonstrated that quantitative recoveries have been attained. Fractions of 1 mL of the organic extract were collected successively up to a total volume of 4 mL, and all of them were subsequently subjected to NACE analysis.

It has been observed that parabens and PHBA were recovered quantitatively from the Oasis sorbent using only 1 mL of methanol, except for BnPB that required an elution volume of 2 mL.

### 3.2. Performance of the method: SPE recovery studies in different sample matrices

Simultaneous analysis of a group of compounds with different behaviour like parabens and PHBA generally requires a compromise in the selection of experimental conditions, which in some cases means not obtaining the best results for all of them. As a summary, the better performance for the simultaneous extraction of parabens and their hydrolysis product PHBA by SPE has been achieved with Oasis HLB cartridges using 500 mL water samples adjusted at pH 2.5, a 5% of methanol as organic modifier in the washing step, and 2 mL of methanol for eluting the analytes retained in the sorbent. Under these optimized conditions, recoveries for 500 mL ultrapure water samples spiked at 1 ng mL<sup>-1</sup> of each analyte were in the range between 93.4% and 99.5% (see Table 1).

The extraction efficiency of the developed SPE procedure was investigated in different water matrices, such as tap, river and sewage water samples. These waters were used for testing the possible matrix effects owing to their different physicochemical characteristics. In order to evaluate the precision and accuracy of the overall analytical process, recovery studies were performed extracting 500 mL samples spiked at 1 ng mL<sup>-1</sup> of each analyte. Six replicates were prepared for each matrix, and each extract was injected in duplicate. Previously sample blanks (non-spiked) were extracted and analyzed following the above-described methodology, and the results were taken into account for recovery calculations.

Table 1 summarized the average recoveries for the studied analytes from tap, river, effluent and influent wastewater samples analyzed by SPE–NACE–DAD. It has been observed that only raw sewage water samples contained significant levels of some parabens, particularly MePB, PHBA and PrPB. Limits of quantification (LOQs) of the whole procedure SPE–NACE–DAD are also given in Table 1. They were estimated from the instrumental LOQs of NACE–DAD method [33], and the preconcentration factor of 250 was achieved in the SPE process.

**Table 1**

SPE extraction recoveries from spiked ultrapure, tap and river water, and treated and raw wastewater samples obtained under optimized conditions and analyzed by NACE–DAD.

Compound	Recovery ± RSD (%)						SPE–NACE–DAD LOQ (ng mL <sup>-1</sup> )
	Water samples			Wastewater samples			
	Ultrapure	Tap	River	Treated	Raw		
MePB	99.5 ± 4.3	100.7 ± 1.9	102.2 ± 2.2	100.2 ± 2.2	108.1 ± 6.0	0.201	
PHBA	93.4 ± 4.6	93.6 ± 3.4	91.9 ± 3.5	94.4 ± 3.0	84.1 ± 12.0	0.280	
EtPB	99.1 ± 4.2	98.1 ± 1.9	101.4 ± 3.5	101.8 ± 1.6	99.8 ± 4.7	0.168	
PrPB	98.4 ± 4.2	98.2 ± 1.0	101.3 ± 3.0	96.9 ± 0.9	106.7 ± 7.4	0.212	
BuPB	99.0 ± 4.0	99.3 ± 2.3	102.3 ± 1.8	101.2 ± 1.2	100.9 ± 4.3	0.247	
BnPB	98.1 ± 3.3	100.7 ± 1.7	102.2 ± 1.6	100.3 ± 1.5	96.9 ± 4.5	0.179	

Average recovery values obtained for spiked samples at 1 ng mL<sup>-1</sup> of each compound, analyzed by SPE–NACE–DAD. Relative standard deviation (RSD %) for *n* = 6 replicates. Limit of quantification (LOQ): S/N = 10.

As can be seen in Table 1, quantitative recoveries have been attained for all the parabens. Recoveries obtained for real matrices were in good agreement with those reported for ultrapure water thus showing that matrix effects in the SPE procedure were adequately controlled when samples were processed under optimized conditions.

However, the results clearly indicated a significant reduction in SPE extraction yield for PHBA occurring in raw wastewater. This decrease is strongly related to the presence of other species, usually at higher levels than target analytes, which can compete for the available sorption sites and saturate the load capacity of the SPE sorbent. In this case, although very good recoveries were obtained for tap, river and effluent waters, PHBA performance was significantly affected in the presence of matrix components of influent water samples.

At this point, investigations were conducted to the study of the influence of sample constituents on the efficiency of the SPE procedure. Firstly, breakthrough volumes must be evaluated again to confirm that for all matrices, and particularly for raw wastewater, the sample volume proposed (500 mL) can be routinely handled without PHBA losses. Thus, breakthrough volume assays were repeated using spiked tap, river and sewage water samples. As it could be expected, the first SPE cartridge was completely blocked for water volumes higher than 500 mL. On the other hand, when 500 mL sample volumes were used, eluates from the second cartridge had not evidenced detectable amounts of any analyte. Therefore, cartridge breakthrough for 500 mL water samples was not the reason for the low recoveries of PHBA.

In view of these results, aqueous matrix composition and physicochemical characteristics and their influence on SPE extraction yield were then examined. In environmental water samples, organic compounds are mainly adsorbed onto organic macromolecules that could influence on the efficiency of their extraction. The interaction of dissolved organic macromolecules with the solid-phase material induces a reduction of the availability of sorption sites leading to a decrease of the efficiency of SPE cartridges, and therefore to low recoveries of the analytes [37–39]. Fulvic and humic acids are normally responsible for this behaviour. In freshwater systems, 80–90% of the natural organic matter is composed of humic substances [39,40]. As it is well known, the main problem of performing the SPE at acid pH is that humic acids are strongly retained on reversed-phase or polymeric sorbents. This could be avoided by performing the SPE extraction at neutral pH, however PHBA cannot be quantitatively extracted at this pH (see Fig. 1).

In laboratory experiments, commercial humic acids are commonly used as a model of natural organic matter [39,41–43]. In order to investigate the influence of natural dissolved organic matter content on the SPE extraction efficiency, solutions of ultrapure water with humic acids at three different concentration levels, 20, 50 and 130  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , and spiked at 1  $\text{ng mL}^{-1}$  for all compounds under study were tested. As can be seen in Fig. 2, while parabens remained unaffected, it has been observed that the recovery of PHBA was decreased by the addition of humic acids, showing a significant matrix effect. These results highlighted the strong influence of organic matter content in water samples on the SPE efficiency for PHBA, which limits the application of the developed SPE procedure to water samples containing less than 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of dissolved organic matter.

### 3.3. Sensitivity improvement: combination of off-line SPE extraction with on-line LVSS preconcentration followed by NACE–DAD

In order to improve the sensitivity achieved with the SPE–NACE–DAD method developed for both parabens and PHBA, and considering the known limitations of CE using on-column

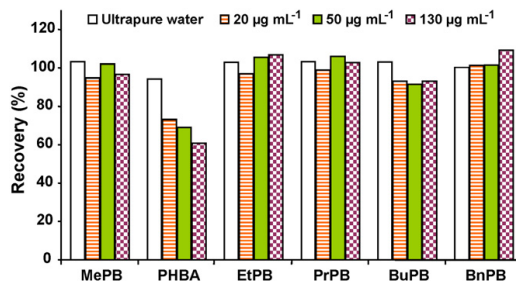


Fig. 2. Comparison of SPE recoveries of each analyte in the presence of defined concentration levels of humic acids (20, 50 and 130  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) in ultrapure water samples spiked at 1  $\text{ng mL}^{-1}$  of each compound.

UV–vis detection, LVSS without polarity switching [44–50] has been proposed as on-line sample stacking procedure after off-line preconcentration by SPE.

When methanol was used as the running buffer solvent, appropriate suppression of the EOF and an increase in the effective electrophoretic mobilities of the anionic analytes made LVSS using the EOF pump possible without polarity switching [33,35,48–50]. Thus, after hydrodynamic sample injection in the capillary, the negative voltage was applied for both sample stacking and subsequent separation. First, the methanol matrix was removed from the capillary into the inlet vial by the EOF pump under the electric field of reverse polarity of  $-30\text{ kV}$ . Most of the applied voltage was distributed over the sample plug of low conductivity, and the electric field in the run buffer region was very small. The anionic analytes in the sample plug were stacked at the concentration boundary, which had been moving backward to the inlet extreme, because of the differences in conductivity between the sample and the buffer. As the capillary was filled with the run buffer of high conductivity from the outlet vial, the overall EOF became further reduced due to the increase in ionic strength. When the EOF and the electrophoretic velocities of analytes were balanced, the migration direction of the stacked analytes was switched towards the detector because of their effective electrophoretic mobilities (higher in absolute values than EOF mobility [33]), and thus the separation of the highly stacked sample occurs without polarity switching [35,48].

In LVSS, the solvent in which the sample is dissolved is very important because the greater the difference in conductivity between the sample and the run buffer, the narrower is the stacking zone of the analytes in comparison with the original sample plug. In this particular case, the solvent is the same for BGE and SPE sample extracts (methanol), and therefore, this difference in conductivity mainly depends on electrolyte and matrix components, respectively. Therefore, it should be noted that both the sample stacking process [33] and recoveries of the analytes [35] would be affected by the presence of coextracted matrix components. Usually, natural organic matter (humic and fulvic acids) and inorganic salts increase the ionic strength of SPE extracts. Thus, the constituents of the real sample could affect the resolution and the migration times could change in the stacking process. Moreover, after injecting a large volume of SPE extract, recoveries of analytes would decrease because a fraction of the extract could leave the capillary during the removal of the sample plug at the same time as stacking occurred.

In order to determine the highest sample plug length to be injected for LVSS preconcentration without degrading the separation profile neither analyte losses occurred, different sample volumes were evaluated. When high sample volumes are involved in the process, anionic analytes could reach the outlet of the capillary before the sample stacking occurred under reverse polarity. This is especially true for those analytes with higher electrophoretic

**Table 2**

Linearity, precision, detection and quantification limits of LVSS–NACE–DAD method developed.

Compound	Calibration range (ng mL <sup>-1</sup> )	Correlation coefficient ( <i>r</i> )	Repeatability (RSD %)		Interm. precision (RSD %)		LOD (ng mL <sup>-1</sup> )	LOQ (ng mL <sup>-1</sup> )
			10 ng mL <sup>-1</sup>	200 ng mL <sup>-1</sup>	10 ng mL <sup>-1</sup>	200 ng mL <sup>-1</sup>		
MePB	5–1000	0.9983	3.9	2.9	3.9	3.7	2.2	7.5
PHBA		0.9987	3.3	5.3	6.2	5.0	2.3	7.7
EtPB		0.9981	3.3	3.4	4.4	4.2	2.3	7.5
PrPB		0.9980	5.4	3.3	5.7	4.1	1.9	6.3
BuPB		0.9977	3.6	3.3	4.4	4.3	1.8	6.2
BnPB		0.9977	2.0	2.8	2.4	3.7	2.3	7.7

Injection time 60 s; other conditions as described in NACE–DAD analysis (Section 2.4). Calculations based on peak area. Relative standard deviation (RSD %) for  $n=6$  replicate injections, in the same day (repeatability), or within successive days (intermediate precision). Limit of detection (LOD):  $S/N=3$ ; limit of quantification (LOQ):  $S/N=10$ .

mobilities. A SPE extract obtained from 500 mL river water sample spiked at 0.1 ng mL<sup>-1</sup> of each compound was introduced into the capillary using a 50 mbar hydrodynamic injection at different time intervals from 30 s to 240 s. Results indicated that peak areas were proportional to the injection time up to 60 s. However, at longer injection times than 60 s, losses from 15% for BnPB at 120 s to 65% for MePB at 240 s were observed. Similar results were obtained when performing the same study with extracts of spiked real sewage water samples. For that reason, an injection time of 60 s was selected for enabling quantitative injection of analytes, as a compromise between high stacking efficiency and minimum analyte losses. In these conditions, about 20% of the capillary was filled with the SPE extract, corresponding to a sample volume of 609 nL.

Once selected the injection time for LVSS, the analytical performance of LVSS–NACE–DAD was evaluated and the results are summarized in Table 2. The method developed showed good linearity and precision within the concentration range studied (5–1000 ng mL<sup>-1</sup>), with correlation factor  $r$  values higher than 0.99 and relative standard deviations (RSD %) between 2.0% and 6.2% for all the compounds. Coupling LVSS to NACE–DAD improved the limits of detection (LODs) up to 10-fold in comparison with normal hydrodynamic injection [33], leading to LOD values from 1.8 to 2.3 ng mL<sup>-1</sup>.

The efficiency of the combination of off-line SPE with on-line LVSS preconcentration techniques before NACE–DAD analysis was tested using water samples of different origin. A new recovery study was performed extracting ultrapure, tap, river and wastewater samples spiked at 0.1 ng mL<sup>-1</sup> of each compound by SPE. In this occasion, the high sensitivity of LVSS–NACE–DAD method evidenced trace levels of some of the analytes in the extracts from sample blanks (non-spiked) of tap, river and effluent waters. These concentration values in blanks (average for  $n=4$  replicates) were taken into account for calculations, and therefore subtracted from that measured for spiked aliquots of the same water sample, and the difference compared to the theoretical value (concentration added). As it is shown in Table 3, recoveries obtained for ultrapure, tap, river and effluent water samples were equivalent to those previ-

ously reported for the same matrices analyzed by SPE–NACE–DAD (see Table 1).

Although injection time for LVSS was reduced to 60 s, a significant matrix effect was observed again for PHBA in influent wastewater samples, leading to a low recovery value of 62% (see in Table 3). Furthermore, signals for PrPB, BuPB and BnPB could not be quantified due to the presence in the electropherograms of some interfering peaks corresponding to coextracted matrix components (interferences) that were also concentrated by LVSS. Therefore, it was not advisable to use SPE–LVSS–NACE–DAD procedure for the analysis of raw sewage water samples. Nevertheless, SPE–NACE–DAD method seems to be suitable for the quantification of parabens at concentration levels present in raw wastewater samples (see next Section 3.4).

The combination of both off-line and on-line preconcentration procedures provided a significant enhancement in sensitivity. Thus, the SPE–LVSS–NACE–DAD method involved a preconcentration factor between 1425–2500-fold, depending on the analyte considered. Consequently, the proposed SPE–LVSS–NACE–DAD method allowed the determination of these compounds in water samples at the sub-ng mL<sup>-1</sup> (see LOQ values in Table 3) using conventional UV absorption detection. Thus, this method is among the most sensitive ones for the analysis of water samples, with LOQ values comparable with those obtained by other authors using LLE–GC–MS [19], SPE–GC–MS [4,22], SPME–GC–MS/MS [20] and SPE–LC–MS [26].

### 3.4. Analysis of water samples

The proposed SPE–NACE–DAD and SPE–LVSS–NACE–DAD methods were applied to investigate the concentration levels of parabens and PHBA in a few number of non-spiked water samples, including tap and river waters, and raw and treated wastewaters.

The results obtained were summarized in Table 4. Fig. 3 shows electropherograms corresponding to SPE extracts of some of the water samples analyzed. Peak identification of parabens and PHBA in water samples was based on the comparison of migration times and were confirmed by the comparison of UV–vis spectra of analytes with those obtained for standard mixtures, and also (in some

**Table 3**

Recoveries from spiked ultrapure, tap and river water, and treated and raw wastewater samples extracted by SPE and further analyzed by LVSS–NACE–DAD.

Compound	Recovery ± RSD (%)					SPE–LVSS–NACE–DAD LOQ (ng mL <sup>-1</sup> )
	Water samples			Wastewater samples		
	Ultrapure	Tap	River	Treated	Raw	
MePB	104.5 ± 1.8	99.9 ± 1.3	100.6 ± 4.3	100.1 ± 5.0	93.7 ± 20.5	0.030
PHBA	89.5 ± 4.6	97.5 ± 1.7	99.3 ± 6.8	90.0 ± 7.6	61.9 ± 25.2	0.031
EtPB	98.9 ± 3.8	101.2 ± 2.7	105.2 ± 2.9	97.0 ± 2.3	95.5 ± 6.0	0.030
PrPB	104.6 ± 2.2	100.7 ± 2.0	104.6 ± 3.2	104.0 ± 11.3	n.q.	0.025
BuPB	101.3 ± 3.4	103.6 ± 1.2	99.2 ± 3.4	110.6 ± 3.8	n.q.	0.025
BnPB	98.5 ± 2.5	100.6 ± 4.7	105.8 ± 3.1	110.0 ± 9.4	n.q.	0.031

Average recovery values obtained for spiked samples at 0.1 ng mL<sup>-1</sup> of each compound, analyzed by SPE–LVSS–NACE–DAD (injection time 60 s, except for ultrapure water spiked samples with 120 s). Relative standard deviation (RSD %) for  $n=6$  replicates. Limit of quantification (LOQ):  $S/N=10$ . n.q. = data non-quantified (due to the presence of interferences).

**Table 4**  
Concentration values of PHBA and parabens found in environmental water samples.

Water sample	Concentration (ng mL <sup>-1</sup> ): mean ± SD					
	MePB	PHBA	EtPB	PrPB	BuPB	BnPB
Tap	0.040 ± 0.002	0.057 ± 0.002	n.d.	<LOQ	n.d.	n.d.
River A	0.037 ± 0.000	0.133 ± 0.003	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ
River B	<LOQ	0.039 ± 0.003	<LOQ	<LOQ	<LOQ	n.d.
Effluent 1	0.112 ± 0.007	0.074 ± 0.002	n.d.	0.044 ± 0.003	0.083 ± 0.001	0.090 ± 0.005
Effluent 2	<LOQ	0.035 ± 0.003	0.030 ± 0.003	n.d.	<LOQ	n.d.
Influent 1	3.259 ± 0.150	0.776 ± 0.072	0.187 ± 0.014	0.904 ± 0.072	n.d.	n.d.
Influent 2	0.524 ± 0.057	8.395 ± 0.355	0.202 ± 0.005	0.756 ± 0.044	n.d.	0.655 ± 0.033

Standard deviation (SD) for  $n=4$  replicates. <LOQ = detected under limit of quantification; n.d. = non-detected.

Codes A and B referred to water samples collected from different rivers. Codes 1 and 2 referred to wastewaters taken on different days.

cases) by spiking known amounts of studied compounds to the samples. Quantification was based on the external standard method using calibration curves fitted by linear regression analysis.

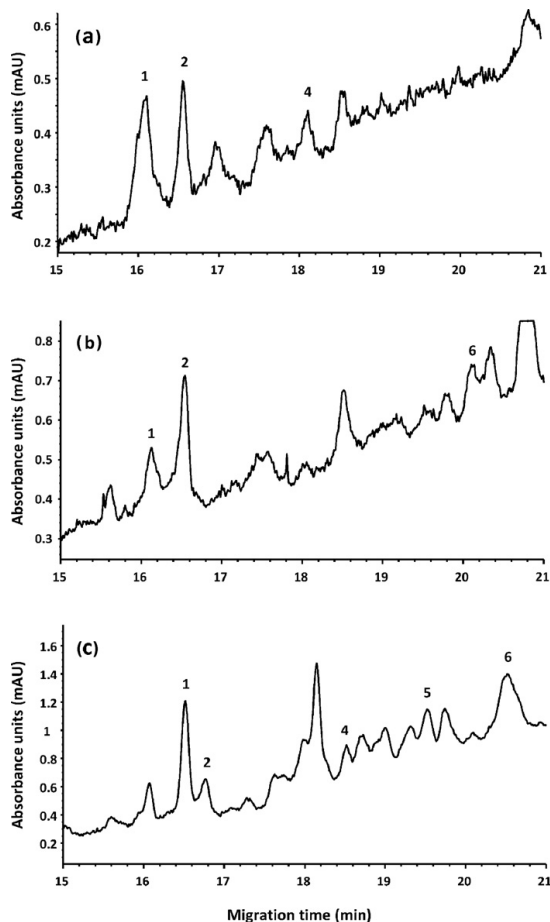
Parabens are mainly used as antimicrobial agents in some cosmetics and PPCPs formulations. These products usually contain two or more parabens as a part of a preservative system, being MePB

and PrPB the most widely used. Thus, as could be expected, MePB, PrPB and PHBA (the main metabolite and/or degradation product of parabens) were generally found in water samples at higher concentrations than EtPB, BuPB and BnPB (see Table 4). Although various authors have reported the rapid reaction of parabens with free chlorine in tap [22] and swimming pool [19] waters, in this study trace amounts of MePB, PrPB and PHBA were detected in a tap water sample, as it can be seen in Fig. 3(A).

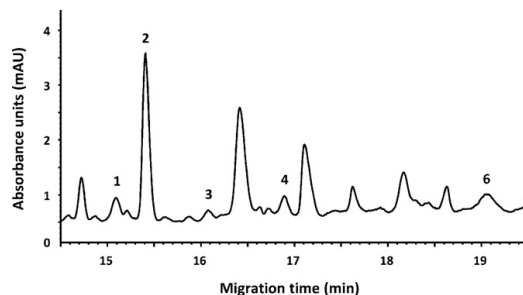
Concentration of MePB (0.037 ng mL<sup>-1</sup>) found in river water was lower than/similar to that reported for parabens in samples from Belgium [14] and Wales [15–17]. Anyway, this concentration was much lower than that found in urban riverine waters from China, up to 1.062 for MePB and 3.142 ng mL<sup>-1</sup> for PrPB [18], originated mainly from random discharge and/or leakage of municipal wastewater.

Parabens and PHBA were detected in all influent and effluent samples. As it has been mentioned before, the presence of coextracted interferences made difficult the quantitation of the analytes in raw wastewater using SPE–LVSS–NACE–DAD. Nevertheless, the data shown in Table 4 evidenced that the SPE–NACE–DAD method was sensitivity necessary for detecting the relatively high concentration levels of parabens and PHBA present in this matrix (see Table 4). A typical electropherogram is shown in Fig. 4.

The concentrations of parabens found in treated (between 0.030 ng mL<sup>-1</sup> for EtPB and 0.112 ng mL<sup>-1</sup> for MePB) and raw wastewaters (from 0.187 ng mL<sup>-1</sup> for EtPB to 3.259 ng mL<sup>-1</sup> for MePB) were similar to those reported in sewage water samples from Canada [4], Wales [17] and Spain [20,22]. Concentration values shown in Table 4 for PHBA in influent samples (between 0.776 ng mL<sup>-1</sup> and 8.395 ng mL<sup>-1</sup>) are in the same order of magnitude than the only published data for this compound, corresponding to a concentration of 1 ng mL<sup>-1</sup> found in non-treated domestic grey wastewaters [3]. Overall, lower levels of parabens and PHBA were found in effluent than those in influent samples, suggesting that the removal of parabens and PHBA during



**Fig. 3.** Electropherograms obtained for SPE extracts of (a) tap water, (b) river water A, and (c) treated wastewater 1 samples. Detection: 295 nm; hydrodynamic injection: 50 mbar during 60 s. Other NACE conditions as described in Section 2.4. Peak assignment: (1) MePB, (2) PHBA, (4) PrPB, (5) BuPB and (6) BnPB.



**Fig. 4.** Electropherogram obtained for the SPE extract of raw wastewater 2 sample. Detection: 295 nm; hydrodynamic injection: 50 mbar during 5 s. Other NACE conditions as described in Section 2.4. Peak assignment: (1) MePB, (2) PHBA, (3) EtPB, (4) PrPB and (6) BnPB.

wastewater treatment must be highly efficient. This behaviour is in agreement with the tendency described by other authors in several sewage treatment plants from Canada [4] and Spain [20].

#### 4. Conclusions

New sensitive methods for the simultaneous determination of a group of five parabens and PHBA from water samples have been presented. Developed procedures were based on both SPE and LVSS using the EOF pump as off-line and on-line preconcentration techniques, respectively, followed by NACE–DAD analysis. The influence of the sample organic matter content on SPE efficiency for PHBA, as well as the performance of the combination of both off-line SPE and on-line LVSS preconcentration techniques, was thoroughly investigated.

The developed SPE–NACE–DAD and SPE–LVSS–NACE–DAD methods allowed the simultaneous identification and quantification of parabens and PHBA with the sensitivity necessary for environmental monitoring in both surface and sewage water samples, as an effective alternative to reported procedures based on GC–MS and LC–MS. Although the selectivity of the SPE concentration step was not as good as desirable for raw wastewaters analyzed by LVSS–NACE–DAD, the suitability of SPE–NACE–DAD method for the determination of these compounds at relevant concentration range in this aqueous matrix has been demonstrated.

The feasibility of both SPE–NACE–DAD and SPE–LVSS–NACE–DAD methodologies was confirmed by validation as well as application to the analysis of several non-spiked water samples. The presence of parabens and PHBA was detected at sub-ng mL<sup>-1</sup> in surface and treated sewage water samples. Concentrations up to 8.4 ng mL<sup>-1</sup> were found in raw wastewater, with the highest levels corresponding to MePB, PrPB, and PHBA. Results obtained in this study were in accordance with concentrations found by other authors, and also evidenced the high removal efficiency of these compounds in sewage water treatment plants.

#### Acknowledgements

This research was financially supported by the Spanish Ministry of Education and Science MEC-DGI (project CTQ2006-03334/BQU), the Xunta de Galicia (project PGDIT06PXIB237039PR) and E. U. FEDER funding. E. Blanco acknowledges her doctoral grant from the Xunta de Galicia.

#### References

- [1] R.L. Elder, *J. Am. Coll. Toxicol.* 3 (1984) 147.
- [2] M.G. Soni, I.G. Carabin, G.A. Burdock, *Food Chem. Toxicol.* 43 (2005) 985.
- [3] E. Eriksson, K. Auffarth, A.-M. Eilersen, M. Henze, A. Ledin, *Water SA* 29 (2003) 135.
- [4] H.-B. Lee, T.E. Peart, M.L. Svodoba, *J. Chromatogr. A* 1094 (2005) 122.
- [5] E.J. Routledge, J. Parker, J. Odum, J. Ashby, J.P. Sumpter, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 153 (1998) 12.
- [6] P.W. Harvey, D.J. Everrett, *J. Appl. Toxicol.* 24 (2004) 1.
- [7] P.D. Darbre, A. Aljarrah, W.R. Miller, N.G. Coldham, M.J. Sauer, G.S. Pope, *J. Appl. Toxicol.* 24 (2004) 5.
- [8] P.D. Darbre, P.W. Harvey, *J. Appl. Toxicol.* 28 (2008) 561.
- [9] X. Ye, A.M. Bishop, J.A. Reidy, L.L. Needham, A.M. Calafat, *Environ. Health Perspect.* 114 (2006) 1843.
- [10] X. Ye, A.M. Bishop, L.L. Needham, A.M. Calafat, *Anal. Chim. Acta* 622 (2008) 150.
- [11] X. Ye, L.J. Tao, L.L. Needham, A.M. Calafat, *Talanta* 76 (2008) 865.
- [12] N.R. Janjua, G.K. Mortensen, A.M. Andersson, B. Kongshoj, N.E. Skakkebek, H.C. Wulf, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 5564.
- [13] N.R. Janjua, H. Frederiksen, N.E. Skakkebak, H.C. Wulf, A.M. Andersson, *Int. J. Androl.* 31 (2008) 118.
- [14] T. Benijts, W. Lambert, A. De Leenheer, *Anal. Chem.* 76 (2004) 704.
- [15] B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy, *Talanta* 74 (2008) 1299.
- [16] B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy, *Water Res.* 42 (2008) 3498.
- [17] B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 1293.
- [18] X. Peng, Y. Yu, C. Tang, J. Tan, Q. Huang, Z. Wang, *Sci. Total Environ.* 397 (2008) 158.
- [19] M. Terasaki, M. Makino, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 88 (2008) 911.
- [20] P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, M.H. Bollain, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1124 (2006) 3.
- [21] N. Paxéus, *Water Res.* 30 (1996) 1115.
- [22] P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, N. Negrreira, R. Cela, *Anal. Chim. Acta* 575 (2006) 106.
- [23] A. De Rossi, C. Desiderio, *Electrophoresis* 23 (2002) 3410.
- [24] A.M. Peck, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 907.
- [25] T. Benijts, R. Dams, W. Lambert, A. De Leenheer, *J. Chromatogr. A* 1029 (2004) 153.
- [26] T. Benijts, W. Günther, W. Lambert, A. De Leenheer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 1866.
- [27] M. Grung, R. Lichtenthaler, M. Ahel, K.-E. Tollefsen, K. Langford, K.V. Thomas, *Chemosphere* 67 (2007) 108.
- [28] L. Muñoz, J.L. Tadeo, A.I. García-Valcárcel, E. Turiel, *J. Chromatogr. A* 1214 (2008) 178.
- [29] R.A. Rudel, D.E. Camann, J.D. Spengler, L.R. Korn, J.G. Brody, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 4543.
- [30] R.A. Rudel, L.J. Perovich, *Atmos. Environ.* 43 (2009) 170.
- [31] P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, *Anal. Chem.* 79 (2007) 1675.
- [32] P. Canosa, D. Pérez-Palacios, A. Garrido-López, M.T. Tena, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1161 (2007) 105.
- [33] E. Blanco, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, *Electrophoresis* 29 (2008) 3229.
- [34] M.X. Kokoletsis, S. Kafkala, M. Tsiaganis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 763.
- [35] E. Blanco, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1071 (2005) 205.
- [36] A. Wade, P.J. Weller (Eds.), *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 2nd ed., Joint Publication of The American Pharmaceutical Association and The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, The Pharmaceutical Press, London, 1994, pp. 184, 244.
- [37] V.I. Boti, V.A. Sakkas, T.A. Albanis, *J. Chromatogr. A* 1146 (2007) 148.
- [38] J.J. Ridal, M.E. Fox, C.A. Sullivan, R.J. Maguire, A. Mazumber, D.R.S. Lean, *Anal. Chem.* 69 (1997) 711.
- [39] I. Jeanneau, P. Faure, E. Jardé, *J. Chromatogr. A* 1173 (2007) 1.
- [40] S. Pflugmacher, C. Pietsch, W. Rieger, C.E.W. Steinberg, *Sci. Total Environ.* 357 (2006) 169.
- [41] A.A. MacKay, B. Canterbury, *J. Environ. Qual.* 34 (2005) 1964.
- [42] T. Weber, T. Allard, E. Tipping, M.F. Benedetti, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 7488.
- [43] T. Kohn, M. Grandbois, K. McNeill, K.L. Nelson, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 4626.
- [44] D.S. Burgi, *Anal. Chem.* 65 (1993) 3726.
- [45] M. Albert, L. Debusschere, C. Demesmay, J.L. Rocca, *J. Chromatogr. A* 757 (1997) 291.
- [46] J.P. Quirino, S. Terabe, *Anal. Chem.* 70 (1998) 149.
- [47] J.P. Quirino, S. Terabe, *Electrophoresis* 21 (2000) 355.
- [48] B. Kim, S. Chung, *Electrophoresis* 23 (2002) 49.
- [49] A. Macià, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, *Electrophoresis* 24 (2003) 2779.
- [50] A. Macià, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, *Electrophoresis* 25 (2004) 428.

## 2.4. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES ADICIONALES

En este capítulo IV.2 se han expuesto los resultados obtenidos durante el desarrollo de la metodología analítica para la determinación del PHBA y un grupo de parabenos en muestras acuosas, mediante NACE acoplada a detector de absorción UV-vis (DAD), empleando la SPE como técnica de extracción y concentración de los analitos de la matriz acuosa.

A continuación se exponen, de un modo más concreto, algunas conclusiones y consideraciones adicionales relacionadas con cada uno de los trabajos de investigación desarrollados en este capítulo IV.2.

### - SEPARACIÓN DE PARABENOS Y ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR EN MEDIO NO ACUOSO

Se ha optimizado la separación y detección de los parabenos y el PHBA mediante NACE-DAD. El empleo de metanol como disolvente del electrolito permite actuar de forma efectiva sobre la selectividad y la eficacia del proceso analítico, con lo que se consigue una buena resolución de la mezcla de los analitos estudiados. El control del pH y la fuerza iónica de la disolución tampón, es fundamental para obtener una buena repetibilidad y reproducibilidad en la separación electroforética. De nuevo se observa que pequeñas variaciones en el pH y/o la fuerza iónica del medio electrolítico provocan una falta de reproducibilidad en la medida, especialmente en los tiempos de migración, pudiendo dar lugar a identificaciones incorrectas de los analitos en los electroferogramas, y pérdida de resolución.

Asimismo, se ha aplicado LVSS como técnica de concentración en columna (*on-column*), mejorándose la sensibilidad significativamente, entre 10 y 25 veces, empleando tiempos de inyección de 240 s. El empleo de metanol como disolvente del medio electrolítico permite llevar a cabo el proceso LVSS sin intercambio de polaridad, lo que proporciona mayor sencillez al procedimiento.

Los parámetros analíticos de calidad para los métodos NACE-DAD y LVSS-NACE-DAD en el rango de concentraciones estudiado son buenos en cuanto a linealidad, repetibilidad y reproducibilidad. Los límites de cuantificación han sido excelentes, dentro del rango de 42 a 70 ng·mL<sup>-1</sup> para NACE-DAD, y entre 2.5 y 7.0 ng·mL<sup>-1</sup> para LVSS-NACE-DAD, y comparables a los obtenidos por otras técnicas basadas en cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida (LC) acopladas a espectrometría de masas (MS), tales como GC-MS, GC-MS/MS, LC-MS y LC-MS/MS (ver tabla II.3.4 en capítulo II.3).

### - DETERMINACIÓN DE PARABENOS Y ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO EN MUESTRAS DE AGUA

En cuanto a la extracción simultánea de los parabenos y el PHBA en muestras de agua, se han evaluado los parámetros que afectan a la eficacia de la SPE, principalmente el pH y volumen de las muestras acuosas, el disolvente de elución, etc.

## 2. PARABENOS Y ÁCIDO *p*-HIDROXIBENZOICO

---

La extracción y concentración de los compuestos en muestras de agua, tanto de río como residuales, se puede llevar a cabo empleando cartuchos Oasis HLB de 60 mg. El PHBA ha condicionado en todo momento la selección de las condiciones experimentales más adecuadas en la SPE a lo largo de la optimización de los parámetros. Así, mientras que para los parabenos se podría llevar a cabo la extracción a pH 7 (evitando así la coextracción de los ácidos húmicos y fúlvicos), en el caso del PHBA fue necesario ajustar el pH a 2.5.

La elución del cartucho se realiza con metanol, lo que de nuevo garantiza la compatibilidad entre el proceso de extracción SPE y la determinación por NACE. Lavando el material con una disolución 10% de metanol en agua a pH 2,5, y añadiendo este volumen por el cartucho tras el paso de la muestra, se consiguen solventar los problemas de adsorción del PHBA al material de vidrio y/o plástico empleado en el proceso de extracción.

En estas condiciones, se obtienen valores de recuperación satisfactorios para todos los compuestos, entre 92 y 102% en aguas de grifo, río y residual efluente, y de 84 a 108% en agua residual influente, con un volumen de corte de 500 mL. Los límites de cuantificación alcanzados con el método SPE-NACE-DAD están dentro del rango de 168 a 280 ng·L<sup>-1</sup>.

La fuerza iónica de los extractos de SPE hace necesaria de nuevo una reducción del tiempo de inyección en LVSS para conseguir una inyección cuantitativa de los analitos. Con un tiempo de inyección de 60 s se obtienen unos límites de cuantificación entre 25 y 31 ng·L<sup>-1</sup> para aguas de grifo, río y efluentes. Estos LOQ son excelentes para tratarse de detección UV-vis, siendo comparables (y en ocasiones incluso mejores) con los obtenidos para el análisis de parabenos en muestras acuosas, empleando técnicas de determinación basadas en GC-MS y LC-MS (ver tabla II.3.4 en capítulo II.3).

Por otro lado, sin embargo, no ha sido posible aplicar la combinación de SPE y LVSS para la preconcentración de muestras de agua residual influente, debido a la presencia en los electroferogramas de un número elevado de interferencias coextraídas, que dificultan en gran medida la identificación y cuantificación de los compuestos de interés. Hay que destacar aquí que, a pesar de esto, el método SPE-NACE-DAD desarrollado es lo suficientemente sensible como para detectar las concentraciones a las que encuentran habitualmente los parabenos y el PHBA en este tipo de muestras (ver tabla II.3.3 en capítulo II.3).

Se ha detectado la presencia de algunos de los analitos estudiados en varias de las muestras acuosas analizadas. En las muestras de agua de grifo, río y efluente, las concentraciones de los compuestos encontrados están por debajo de 0.14 µg·L<sup>-1</sup>. En influente, se han detectado estos analitos en concentraciones de hasta 8.4 µg·L<sup>-1</sup>.

## **CONCLUSIONES**

---

---



Si bien a lo largo del capítulo IV, para cada uno de los trabajos de investigación desarrollados se han ido extrayendo algunas conclusiones y consideraciones adicionales a partir de los resultados obtenidos, en este capítulo se pretende destacar los objetivos que han sido finalmente alcanzados, así como las conclusiones más relevantes a modo de resumen final.

De forma general se puede concluir que todas y cada una de las metodologías propuestas en esta memoria han resultado apropiadas para la resolución de los diferentes problemas analíticos planteados inicialmente. Los resultados obtenidos han confirmado la versatilidad de las técnicas empleadas para el análisis de dos grupos diferentes de contaminantes emergentes en diversas matrices medioambientales. Así, mediante electroforesis capilar en medio no acuoso (NACE) como técnica de separación, empleando tanto la extracción en fase sólida (SPE) como la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) para la preparación de la muestra, se han podido determinar fenoles y bisfenoles halogenados, parabenos y el ácido *p*-hidroxibenzoico (PHBA), en matrices acuosas y sólidas medioambientales de diferente complejidad.

Se han demostrado las capacidades de la electroforesis capilar (CE), en particular, de la NACE, como alternativa viable, sencilla y barata, en comparación con las técnicas cromatográficas habitualmente empleadas en la separación de estos compuestos. La concentración y el pH de la disolución tampón, junto con la fuerza iónica resultante en el medio electrolítico de separación, han sido los parámetros más importantes a tener en cuenta a la hora de desarrollar los métodos de determinación basados tanto en CE en medio acuoso como en NACE. La introducción del metanol como disolvente orgánico en la disolución tampón de desarrollo ha permitido mejorar la selectividad de la separación electroforética de compuestos fenólicos muy similares (en algunos casos, isómeros posicionales). Asimismo, se ha podido llevar a cabo eficazmente la separación simultánea del PHBA y sus ésteres derivados.

Se ha comprobado que la NACE es totalmente compatible con los extractos orgánicos en metanol y acetonitrilo obtenidos tras la preparación de las muestras, tanto acuosas como sólidas, mediante SPE y MSPD. Para ambas técnicas de extracción se han estudiado los parámetros más significativos para mejorar la eficacia del proceso, seleccionando las condiciones experimentales más adecuadas en cada caso. La SPE ha permitido llevar a cabo la extracción y concentración, tanto de los fenoles y bisfenoles halogenados, como de los parabenos y el PHBA, en muestras de aguas superficiales y residuales urbanas de forma eficaz. Por otra parte, la MSPD ha sido aplicada por primera vez a la extracción de contaminantes orgánicos de matrices medioambientales, como los sedimentos y los lodos de depuradora.

La NACE permite, asimismo, aplicar técnicas de preconcentración en línea (*on-line*) como la concentración de muestra con campo amplificado y eliminación de matriz (LVSS), combinado con la etapa anterior de extracción fuera de línea (*off-line*), solventando la principal desventaja de la CE, su baja sensibilidad por detección por absorción ultravioleta-visible (UV-vis) en el propio capilar de sílice. Aunque si bien es

## V. CONCLUSIONES

---

cierto que, en LVSS, la matriz coextraída de la muestra ejerce una gran influencia en el proceso de *stacking*, obligando a reducir el volumen de inyección respecto al efectivo con disoluciones estándar, en todos los casos se ha conseguido un incremento significativo de sensibilidad. Así, incluso empleando la detección por absorción UV-vis, los límites de detección alcanzados llegan a ser comparables, especialmente en el caso de los parabenos y el PHBA, con los de otras técnicas basadas en la cromatografía de gases y cromatografía líquida acopladas a espectrometría de masas (GC-MS y LC-MS). De esta forma, los métodos desarrollados, combinando las técnicas de extracción *off-line* y concentración *on-line* con la determinación mediante NACE, presentan una sensibilidad adecuada para el análisis de los compuestos estudiados en muestras medioambientales.

Como se ha podido comprobar a lo largo de esta memoria de tesis, la mayoría de las metodologías propuestas han sido novedosas en el campo analítico y medioambiental en el momento de su publicación, e incluso pioneras en el caso de la MSPD de matrices sólidas medioambientales. Por otra parte, desde la fecha de publicación de estos trabajos de investigación hasta el momento de finalizar esta memoria, apenas han surgido otras alternativas que compitan en cuanto a simplicidad y bajo coste, especialmente en lo que se refiere a la técnica de determinación mediante NACE, así como al tratamiento y extracción de muestras sólidas medioambientales mediante MSPD. En algunos artículos de investigación publicados posteriormente por otros autores, y relacionados fundamentalmente con las técnicas NACE y LVSS, la MSPD de matrices medioambientales, y el análisis de fenoles halogenados en muestras acuosas, se ha hecho referencia a los métodos aquí desarrollados, poniendo de manifiesto el reconocimiento de estos trabajos.

## CONCLUSIONS

Throughout Chapter IV some conclusions and additional considerations arisen from results obtained were drawn. Here, the main objectives eventually achieved, together with the most outstanding conclusions, are emphasized as a final summary.

In general, it can be concluded that all proposed methodologies were suitable and helpful to solve different analytical problems challenging at the beginning of this research. Results obtained have confirmed the versatility of all analytical techniques used for the analysis of two different groups of emerging pollutants in several environmental matrices. Using both solid-phase extraction (SPE) and matrix-solid phase dispersion (MSPD) for sample preparation, non-aqueous capillary electrophoresis (NACE) has been applied as separation technique for the determination of halogenated phenols and bisphenols, parabens and *p*-hydroxybenzoic acid (PHBA), in both aqueous and solid environmental matrices of widely different complexity.

Capillary electrophoresis (CE) capabilities have been demonstrated, particularly for NACE, as a feasible, simple and low-cost alternative in comparison with common chromatographic techniques usually employed for the separation of these compounds. Buffer solution concentration and pH, and also final ionic strength on separation background electrolyte (BGE), appeared as the most important parameters to bear in mind when developing determination methods based on CE in aqueous media and NACE. The use of methanol as BGE organic solvent has allowed a significant improvement on the separation selectivity of very similar phenolic compounds (in some cases, positional isomers). Moreover, the simultaneous separation of PHBA and its esters derivatives could be carried out efficiently.

The compatibility between NACE and organic extracts in methanol and acetonitrile obtained after sample preparation by SPE and MSPD, from both aqueous and solid matrices, has been emphasized and optimized. In order to improve the efficiency of both extraction techniques, most significant factors affecting the extraction performance have been evaluated, and then most suitable experimental conditions were chosen in each case. SPE allowed the efficient extraction and concentration, not only for halogenated phenols and bisphenols, but also for parabens and PHBA, in surface and urban sewage waters. On the other hand, MSPD has been applied for the first time to the extraction of organic pollutants in environmental matrices, such as sediments and sewage sludges.

Using on-line preconcentration techniques such as large-volume sample stacking (LVSS) in combination with previous off-line sample extraction stage, it has been shown that NACE could overcome the main drawback of CE, which is the low concentration sensitivity of on-column ultraviolet-visible (UV-vis) absorption detection (on silica capillary). Although in LVSS the coextracted sample matrix exerts great influence on the stacking process, forcing to reduce injection volume with respect to effective volume chosen for standard solutions, in all cases a significant sensitivity improvement has been achieved. Thus, even using UV-vis absorption detection, limits of detection achieved for NACE were comparable, especially in the case of parabens

## V. CONCLUSIONES

---

*and PHBA, to the corresponding values of analytical methodologies based on gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS and LC-MS). Therefore, developed procedures combining off-line extraction and on-line concentration with NACE determination provide suitable sensitivity for the analysis of studied compounds in environmental matrices.*

*As it has been proved throughout this PhD dissertation, most of proposed procedures have remarkable novelty in the analytical and environmental fields at the moment of their publication, pioneering MSPD of solid environmental matrices. On the other hand, since the publication date of research articles to actually, other alternatives that can compete in terms of simplicity and low-cost, specially regarding NACE determination and also pretreatment and extraction of environmental solid samples by MSPD, have scarcely arisen. In some recently published research articles, mainly related to NACE and LVSS techniques, MSPD of environmental matrices, and halogenated phenols analysis in aqueous samples, other authors have referred to methods here developed, highlighting the recognition of these investigations.*

# **ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS**

---

---



**ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS**

<b>ABS</b>	<i>acrylonitrile-butadiene-styrene</i>	acrilonitrilo-butadieno-estireno
<b>AcN</b>	<i>acetonitrile</i>	acetonitrilo
<b>AcOEt</b>	<i>ethyl acetate</i>	acetato de etilo
<b>ADI</b>	<i>acceptable daily intake</i>	ingesta diaria aceptable
<b>ADN</b>	<i>deoxyribonucleic acid</i>	ácido desoxirribonucleico
<b>APCI</b>	<i>atmospheric pressure chemical ionization</i>	ionización química a presión atmosférica
<b>BFRs</b>	<i>brominated flame retardants</i>	retardantes de llama bromados
<b>BGE</b>	<i>background electrolyte</i>	medio electrolítico de fondo
<b>Bn</b>	<i>bencil</i>	bencil
<b>BnPB</b>	<i>benzylparaben or benzyl p-hydroxybenzoate</i>	bencilparaben o <i>p</i> -hidroxibenzoato de bencilo
<b>BPA</b>	<i>bisphenol A</i>	bisfenol A
<b>Bu</b>	<i>butyl</i>	butil
<b>BuPB</b>	<i>butylparaben or butyl p-hydroxybenzoate</i>	butilparaben o <i>p</i> -hidroxibenzoato de butilo
<b>BSEF</b>	<i>Bromine Science Environmental Forum</i>	
<b>BSTFA</b>	<i>N,O-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide</i>	N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
<b>BTP</b>	<i>1,3-bis[tris(hydroxymethylamino)]propane</i>	1,3-bis[tris(hidroximetilamino)]propano
<b>C2</b>	<i>ethylsilane</i>	etilsilano
<b>C8</b>	<i>octylsilane</i>	octilsilano
<b>C18</b>	<i>octadecylsilane</i>	octadecilsilano
<b>C30</b>	<i>triacontylsilane</i>	triacontilsilano
<b>CAR/PDMS</b>	<i>carboxen/polydimethylsiloxane</i>	carboxen/polidimetilsiloxano
<b>CE</b>	<i>capillary electrophoresis</i>	electroforesis capilar
<b>CEC</b>	<i>capillary electrochromatography</i>	electrocromatografía capilar
<b>CGE</b>	<i>capillary gel electrophoresis</i>	electroforesis capilar en gel

## ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS

---

<b>CIEF</b>	<i>capillary isoelectrofocusing</i>	enfoque isoelectrónico capilar
<b>CITP</b>	<i>capillary isotacophoresis</i>	isotacoforesis capilar
<b>CL</b>	<i>chemiluminiscence</i>	quimioluminiscencia
<b>CW/DVB</b>	<i>carbowax/divynilbenzene</i>	carbowax/divinilbenceno
<b>CZE</b>	<i>capillary zone electrophoresis</i>	electroforesis capilar de zona
<b>d</b>	<i>diameter</i>	diámetro
<b>D</b>	<i>molecular diffusion coefficient</i>	coeficiente de difusión molecular
<b>DAD</b>	<i>diode array detector</i>	detector de red de diodos
<b>DCM</b>	<i>dichloromethane</i>	diclorometano
<b>DMA</b>	<i>N,N-dimethylacetamide</i>	N,N-dimetilacetamida
<b>DMF</b>	<i>N,N-dimethylformamide</i>	N,N-dimetilformamida
<b>DMSO</b>	<i>dimethyl sulfoxide</i>	dimetilsulfóxido
<b>DVB/CAR/ PDMS</b>	<i>divynilbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane</i>	divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano
<b>E</b>	<i>electric field</i>	campo eléctrico
<b>EC</b>	<i>electrochemical</i>	electroquímico
<b>ECNI</b>	<i>electrochemical negative ionization</i>	ionización electroquímica negativa
<b>EDAR</b>	<i>wastewater treatment plant (WWTP)</i>	estación depuradora de aguas residuales
<b>EDCs</b>	<i>endocrine disrupting chemicals</i>	disruptores endocrinos químicos
<b>EEC</b>	<i>Economic European Community</i>	Comunidad Económica Europea
<b>EE2</b>	<i>ethynilestradiol</i>	etinilestradiol
<b>EI</b>	<i>electronic impact</i>	impacto electrónico
<b>EOF</b>	<i>electroosmotic flow</i>	flujo electroosmótico
<b>ESI</b>	<i>electrospray ionization</i>	ionización por electronebulización
<b>Et</b>	<i>ethyl</i>	etil
<b>EtPB</b>	<i>ethylparaben</i>	etilparaben
<b>EU</b>	<i>European Union</i>	Unión Europea
<b>E2</b>	<i>17<math>\beta</math>-estradiol</i>	17 $\beta$ -estradiol
<b>FASS</b>	<i>field-amplified sample stacking</i>	hacinamiento o concentración de muestra con campo amplificado

<b>F<sub>e</sub></b>	<i>electric or electromotive strength</i>	fuerza eléctrica o electromotriz
<b>F<sub>f</sub></b>	<i>friction strength</i>	fuerza de rozamiento o fricción
<b>FRs</b>	<i>flame retardants</i>	retardantes de llama
<b>GC</b>	<i>gas chromatography</i>	cromatografía de gases
<b>GCB</b>	<i>graphitized carbon black</i>	carbón negro grafitizado
<b>GC-MS</b>	<i>gas chromatography coupled to mass spectrometry</i>	cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
<b>GC-MS/MS</b>	<i>gas chromatography coupled to mass spectrometry in tandem</i>	cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem
<b>GPC</b>	<i>gel permeation chromatography</i>	cromatografía de permeación en gel
<b>HBCD</b>	<i>hexabromocyclododecane</i>	hexabromociclododecano
<b>HPLC</b>	<i>high-performance liquid chromatography</i>	cromatografía líquida de alta resolución
<b>HpPB</b>	<i>heptylparaben or heptyl p-hydroxybenzoate</i>	heptilparaben o heptil <i>p</i> -hidroxibenzoato
<b>HS</b>	<i>headspace</i>	espacio de cabeza
<b>iBu</b>	<i>iso-butyl</i>	iso-butil
<b>iBuPB</b>	<i>iso-butylparaben</i>	iso-butilparaben
<b>i.d.</b>	<i>inner diameter</i>	diámetro interno
<b>iPr</b>	<i>iso-propyl</i>	iso-propil
<b>iPrPB</b>	<i>iso-propylparaben</i>	iso-propilparaben
<b>IS</b>	<i>internal standard</i>	estándar o patrón interno
<b>ITP</b>	<i>isotachopheresis</i>	isotacoforesis
<b>JCID</b>	<i>Japan Cosmetic Ingredients Dictionary</i>	Diccionario Japonés de Ingredientes de Cosméticos
<b>k</b>	<i>Boltzmann constant</i>	constante de Boltzmann
<b>K<sub>a</sub></b>	<i>disociation or acidity constant</i>	constante de disociación o constante de acidez
<b>K<sub>auto</sub></b>	<i>autoprotolysis constant</i>	constante de autoprotólisis
<b>K<sub>ow</sub></b>	<i>octanol-water partition coefficient</i>	coeficiente de partición octanol-agua
<b>L<sub>eff</sub></b>	<i>effective length</i>	longitud efectiva

## ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS

---

<b>L<sub>t</sub></b>	<i>total length</i>	longitud total
<b>LC</b>	<i>liquid chromatography</i>	cromatografía líquida
<b>LC-GC</b>	<i>liquid chromatography-gas chromatography hybrid</i>	híbrido cromatografía líquida-cromatografía de gases
<b>LIF</b>	<i>laser-induced fluorescence</i>	fluorescencia inducida por láser
<b>LLE</b>	<i>liquid-liquid extraction</i>	extracción líquido-líquido
<b>LC-MS</b>	<i>liquid chromatography coupled to mass spectrometry</i>	cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
<b>LC-MS/MS</b>	<i>liquid chromatography coupled to mass spectrometry in tandem</i>	cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
<b>LOD</b>	<i>limit of detection</i>	límite de detección
<b>LOQ</b>	<i>limit of quantification</i>	límite de cuantificación
<b>LVPC</b>	<i>low volume production chemicals</i>	sustancias químicas de bajo volumen de producción
<b>LVSEP</b>	<i>large-volume sample stacking using the electroosmotic flow pump</i>	hacinamiento o concentración de muestra con campo amplificado y eliminación de matriz utilizando el EOF como bomba impulsora
<b>LVSS</b>	<i>large-volume sample stacking</i>	hacinamiento o concentración de muestra con campo amplificado y eliminación de matriz
<b>MAE</b>	<i>microwave-assisted extraction</i>	extracción asistida por microondas
<b>Me</b>	<i>methyl</i>	metil
<b>MEEKC</b>	<i>microemulsion electrokinetic chromatography</i>	cromatografía electrocinética de microemulsión
<b>MEKC</b>	<i>micellar electrokinetic chromatography</i>	cromatografía electrocinética micelar
<b>MeOH</b>	<i>methanol</i>	metanol
<b>MePB</b>	<i>methylparaben</i>	metilparaben
<b>MHEC</b>	<i>methylhydroxyethylcellulose</i>	metilhidroxietilcelulosa
<b>MIPs</b>	<i>molecular imprinted polymers</i>	polímeros de impresión molecular
<b>MLC</b>	<i>micellar liquid chromatography</i>	cromatografía líquida micelar
<b>MRM</b>	<i>multiple reaction monitoring</i>	
<b>MS</b>	<i>mass spectrometry</i>	espectrometría de masas

<b>MS/MS</b>	<i>tandem mass spectrometry</i>	espectrometría de masas en tándem
<b>MSPD</b>	<i>matrix solid-phase dispersion</i>	dispersión de la matriz en fase sólida
<b>MSTFA</b>	<i>N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide</i>	N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
<b>MTBE</b>	<i>methyl-t-butyl ether</i>	metil-tert-butil éter
<b>MTBSTFA</b>	<i>N-t-butyl dimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide</i>	N-tert-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida
<b>MTL</b>	<i>Master Testing List</i>	
<b>m/z</b>	<i>mass/charge ion</i>	ion masa/carga
<b>N</b>	<i>number of theoretical plates</i>	número de platos teóricos
<b>NACE</b>	<i>non-aqueous capillary electrophoresis</i>	electroforesis capilar en medio no acuoso
<b>n.d.</b>	<i>non-detected</i>	no detectado
<b>NMF</b>	<i>N-methylformamide</i>	N-metilformamida
<b>o.d.</b>	<i>outer diameter</i>	diámetro exterior
<b>OSPAR</b>	<i>Convention for the protection of the marine environment of the North-East Atlantic (Oslo-Paris Convention)</i>	Convenio sobre la protección del medio ambiente marino del nordeste Atlántico (Convenio de Oslo y Paris)
<b>P</b>	<i>presion</i>	presión
<b>PA</b>	<i>polyacrylate</i>	poliacrilato
<b>PAHs</b>	<i>polycyclic aromatic hydrocarbons</i>	hidrocarburos aromáticos policíclicos
<b>PBBs</b>	<i>polybrominated biphenyls</i>	bifenilos polibromados
<b>PBDDs</b>	<i>polybrominated dibenzodioxines</i>	dibenzodioxinas polibromadas
<b>PBDEs</b>	<i>polybrominated diphenylethers</i>	difeniléteres polibromados
<b>PBDFs</b>	<i>polybrominated dibenzofuranes</i>	dibenzofuranos polibromados
<b>PCBs</b>	<i>polychlorinated biphenyls</i>	bifenilos policlorados
<b>PCDDs</b>	<i>polychlorinated dibenzodioxines</i>	dibenzodioxinas policloradas
<b>PCDFs</b>	<i>polybrominated dibenzofuranes</i>	dibenzofuranos policlorados
<b>PDMS</b>	<i>polydimethylsiloxane</i>	olidimetilsiloxano
<b>PDMS-<math>\beta</math>-CD</b>	<i>polydimethylsiloxane-<math>\beta</math>-cyclodextrine</i>	olidimetilsiloxano- $\beta$ -ciclodextrina

## ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS

---

<b>PeBP</b>	<i>pentabromophenol</i>	pentabromofenol
<b>PeCP</b>	<i>pentachlorophenol</i>	pentaclorofenol
<b>PFPA</b>	<i>pentafluoropropionic acid anhydride</i>	anhídrido del ácido pentafluoropropiónico
<b>pH<sub>app</sub></b>	<i>apparent pH</i>	pH aparente
<b>PHBA</b>	<i>p-hydroxybenzoic acid</i>	ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico
<b>PHWE</b>	<i>pressurized hot water extraction</i>	extracción con agua caliente presurizada
<b>PLE</b>	<i>pressurized liquid extraction</i>	extracción con líquidos presurizados
<b>P<sub>m</sub></b>	<i>molecular weight</i>	peso molecular
<b>POPs</b>	<i>priority organic pollutants</i>	contaminantes orgánicos prioritarios
<b>p/p</b>	<i>weight/weight</i>	peso/peso
<b>PPCPs</b>	<i>pharmaceutical and personal care products</i>	fármacos y productos de higiene y cuidado personal
<b>Pr</b>	<i>propyl</i>	propil
<b>PrPB</b>	<i>propylparaben</i>	propilparaben
<b>PSA</b>	<i>primary and secondary amines</i>	aminas primarias y secundarias
<b>PS-DVB</b>	<i>polystyrene-divinylbenzene</i>	poliestireno-divinilbenceno
<b>PSE</b>	<i>pressurized solvent extraction</i>	extracción con disolventes presurizados
<b>PTFE</b>	<i>polytetrafluoroethylene or teflon</i>	politetrafluoroetileno o teflón
<b>PTV</b>	<i>programmed temperature vaporisation</i>	vaporización a temperatura programada
<b>p/v</b>	<i>weight/volume</i>	peso/volumen
<b>q</b>	<i>ion charge</i>	carga de ion
<b>q/r</b>	<i>charge/radius ratio</i>	relación carga/radio
<b>r</b>	<i>radius</i>	radio
<b>REACH</b>	<i>registration, evaluation, authorisation and restriction of chemical substances</i>	registro, evaluación, autorización y restricción de sustancias químicas
<b>R<sub>s</sub></b>	<i>resolution</i>	resolución
<b>S</b>	<i>solubility</i>	solubilidad

<b>SAESC</b>	<i>sonication assisted extraction in small columns</i>	extracción en columnas pequeñas asistida por ultrasonidos
<b>SAX</b>	<i>strong anion exchanger</i>	intercambiador aniónico fuerte
<b>SBSE</b>	<i>stir-bar sorptive extraction</i>	extracción por adsorción con barras magnéticas agitadoras
<b>SCX</b>	<i>strong cation exchanger</i>	intercambiador catiónico fuerte
<b>SDS</b>	<i>sodium dodecylsulphate</i>	dodecilsulfato sódico
<b>SFE</b>	<i>supercritical fluid extraction</i>	extracción con fluidos supercríticos
<b>SIM</b>	<i>single ion monitoring</i>	
<b>S/N</b>	<i>signal-to-noise</i>	señal/ruido
<b>SPE</b>	<i>solid-phase extraction</i>	extracción en fase sólida
<b>SPM</b>	<i>suspended particulate matter</i>	materia particulada en suspensión
<b>SPME</b>	<i>solid-phase microextraction</i>	microextracción en fase sólida
<b>SSI</b>	<i>sonic spray ionization</i>	ionización por nebulización sónica
<b>t</b>	<i>migration time</i>	tiempo de migración
<b>T</b>	<i>temperature</i>	temperatura
<b>TBBPA</b>	<i>tetrabromobisphenol A</i>	tetrabromobisfenol A
<b>TCBPA</b>	<i>tetrachlorobisphenol A</i>	tetraclorobisfenol A
<b>T<sub>eb</sub></b>	<i>boiling pint</i>	temperatura de ebullición
<b>Tris</b>	<i>tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>	tris(hidroximetil)aminometano
<b>UAE</b>	<i>ultrasound-assisted extraction</i>	extracción asistida por ultrasonidos
<b>UPLC</b>	<i>ultra-performance liquid chromatography</i>	cromatografía líquida ultrarrápida
<b>USAEME</b>	<i>ultrasound-assisted emulsification-microextraction</i>	microextracción por emulsificación asistida por ultrasonidos
<b>USEPA</b>	<i>United States Environmental Portection Agency</i>	Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos
<b>UV</b>	<i>ultraviolet</i>	ultravioleta
<b>UV-vis</b>	<i>ultraviolet-visible</i>	ultravioleta-visible

## ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS

---

<b>v</b>	<i>migration velocity</i>	velocidad de migración
<b>V</b>	<i>voltage</i>	voltaje
<b>V<sub>c</sub></b>	<i>capillary volume</i>	volumen del capilar
<b>v<sub>eo</sub></b>	<i>electroosmotic flow velocity</i>	velocidad del flujo electroosmótico
<b>V<sub>i</sub></b>	<i>injection volume</i>	volumen de inyección
<b>v/v</b>	<i>volume/volume</i>	volumen/volumen
<b>w</b>	<i>peak width</i>	anchura de pico
<b>w<sub>1/2</sub></b>	<i>peak width at medium height</i>	anchura de pico a media altura
<b>WEEE</b>	<i>waste electrical and electronic equipment</i>	desechos de equipamiento eléctrico y electrónico
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>	Organización Mundial de la Salud
<b>ε</b>	<i>dielectric constant</i>	constante dieléctrica
<b>ε<sub>0</sub></b>	<i>vacuum dielectric constant</i>	constante dieléctrica del vacío
<b>ε<sub>r</sub></b>	<i>relative dielectric constant</i>	constante dieléctrica relativa
<b>η</b>	<i>viscosity</i>	viscosidad
<b>λ</b>	<i>wavelength</i>	longitud de onda
<b>μ</b>	<i>dipolar moment</i>	momento dipolar
<b>μ<sub>app</sub></b>	<i>apparent electrophoretic mobility</i>	movilidad electroforética aparente
<b>μ<sub>e</sub></b>	<i>electrophoretic mobility</i>	movilidad electroforética
<b>μ<sub>eff</sub></b>	<i>effective electrophoretic mobility</i>	movilidad electroforética efectiva
<b>μ<sub>eo</sub></b>	<i>electroosmotic mobility</i>	movilidad electroosmótica
<b>σ</b>	<i>standard deviation</i>	desviación estándar
<b>ζ</b>	<i>zeta potential</i>	potencial zeta
<b>2-BrP</b>	<i>2-bromophenol</i>	2-bromofenol
<b>2-Br-4-MeP</b>	<i>2-bromo-4-methylphenol</i>	2-bromo-4-metilfenol
<b>2-Me-4,6-DiNP</b>	<i>2-methyl-4,6-dinitrophenol</i>	2-metil-4,6-dinitrofenol
<b>2-NP</b>	<i>2-nitrophenol</i>	2-nitrofenol
<b>3-CP</b>	<i>3-chlorophenol</i>	3-clorofenol

<b>4-Br-3-MeP</b>	<i>4-bromo-3-methylphenol</i>	4-bromo-3-metilfenol
<b>4-CP</b>	<i>4-chlorophenol</i>	4-clorofenol
<b>4-NonylP</b>	<i>4-nonylphenol</i>	4-nonilfenol
<b>4-NP</b>	<i>4-nitrophenol</i>	4-nitrofenol
<b>2,3-DiCP</b>	<i>2,3-dichlorophenol</i>	2,3-diclorofenol
<b>2,4-DiBP</b>	<i>2,4-dibromophenol</i>	2,4-dibromofenol
<b>2,4-DiCP</b>	<i>2,4-dichlorophenol</i>	2,4-diclorofenol
<b>2,4-DiMeP</b>	<i>2,4-dimethylphenol</i>	2,4-dimetilfenol
<b>2,4-DiNP</b>	<i>2,4-dinitrophenol</i>	2,4-dinitrofenol
<b>2,5-DiCP</b>	<i>2,5-dichlorophenol</i>	2,5-diclorofenol
<b>2,6-DiBP</b>	<i>2,4-dibromophenol</i>	2,4-dibromofenol
<b>2,6-DiCP</b>	<i>2,6-dichlorophenol</i>	2,6-diclorofenol
<b>3,4-DiCP</b>	<i>3,4-dichlorophenol</i>	3,4-diclorofenol
<b>3,5-DiCP</b>	<i>3,5-dichlorophenol</i>	3,5-diclorofenol
<b>2,3,4-TriCP</b>	<i>2,3,4-trichlorophenol</i>	2,3,4-triclorofenol
<b>2,3,5-TriCP</b>	<i>2,3,5-trichlorophenol</i>	2,3,5-triclorofenol
<b>2,3,6-TriCP</b>	<i>2,3,6-trichlorophenol</i>	2,3,6-triclorofenol
<b>2,4,5-TriCP</b>	<i>2,4,5-trichlorophenol</i>	2,4,5-triclorofenol
<b>2,4,6-TriBP</b>	<i>2,4,6-tribromophenol</i>	2,4,6-tribromofenol
<b>2,4,6-TriCP</b>	<i>2,4,6-trichlorophenol</i>	2,4,6-triclorofenol
<b>2,3,4,5-TetraCP</b>	<i>2,3,4,5-tetrachlorophenol</i>	2,3,4,5-tetraclorofenol
<b>2,3,4,6-TetraCP</b>	<i>2,3,4,6-tetrachlorophenol</i>	2,3,4,6-tetraclorofenol
<b>2,3,5,6-TetraCP</b>	<i>2,3,5,6-tetrachlorophenol</i>	2,3,5,6-tetraclorofenol



## **ANEXOS**





## **ANEXO I. OTRAS PUBLICACIONES**

A continuación se presentan otras publicaciones científicas originales que, junto con los artículos que acompañan a cada uno de los capítulos de esta memoria, están relacionadas con el trabajo de investigación de esta tesis doctoral, y por tanto pueden resultar de interés dentro de este mismo contexto.

Si bien dichos resultados no aparecen reflejados directamente en la presente memoria, han sido fruto, tanto de estudios bibliográficos, como de experimentos llevados a cabo durante el transcurso del mismo período y por la misma autora de esta tesis, en colaboración con otros investigadores.

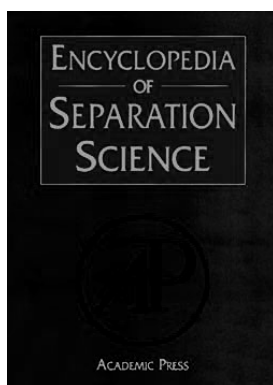
- ✓ E. Blanco, M. C. Casais, M. C. Mejuto, R. Cela (2007), *Capillary Electrophoresis /Phenols*. In: Colin F. Poole and Ian D. Wilson, (Editors-in-Chief) *Encyclopedia of Separation Science, online update*, pp. 1-9 Oxford: Elsevier Science Ltd.
  
- ✓ P.-L. Laamanen, E. Blanco, R. Cela, R. Matilainen, Improving sensitivity in simultaneous determination of copper carboxylates by nonaqueous capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1110 (2006) 261-267.



## AUTHOR'S PERSONAL COPY

**Provided for non-commercial research and educational use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.**

This article was originally published in the *Encyclopedia of Separation Science online update 2007*, published by Elsevier, and the attached copy is provided by Elsevier for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for non-commercial research and educational use including without limitation use in instruction at your institution,



sending it to specific colleagues who you know, and providing a copy to your institution's administrator.

All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are prohibited. For exceptions, permission may be sought for such use through Elsevier's permissions site at:

<http://www.elsevier.com/locate/permissionusematerial>

Professor R Cela (2007), Capillary Electrophoresis /Phenols. In: Colin F. Poole and Ian D. Wilson, (Editors-in-Chief) *Encyclopedia of Separation Science, online update*, pp. 1-9 Oxford: Elsevier Science Ltd.

# CAPILLARY ELECTROPHORESIS

## Phenols

**E. Blanco, M. C. Casais, M. C. Mejuto and R. Cela,** University of Santiago, de Compostela, Spain

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### Introduction

Phenols are a large family of chemical compounds of great importance. Having both natural and anthropogenic origin, they exhibit widely different environmental, toxicological, and commercial properties thus challenging analytical chemistry in many fields of application. Natural phenols, often called polyphenols, form a large group of plant compounds. Natural antioxidants with proven or claimed therapeutic (anticarcinogenic, antiinflammatory, analgesic, antimutagenic, etc.) properties show chemical structures from the very simple to the highly complex (phenolic acids and aldehydes, cinnamic acids, flavonols, anthocyanins, flavones, isoflavones, catechins, coumarins, lignins, ..., humic substances).

In industry, phenolic compounds (chloro-, bromo-, methyl-, and/or nitro-substituted) are used as precursors in synthesis, agrochemicals, biocides, dyes, flame retardants, and wood and pharmaceutical preservatives, among others. However, these phenols are considered as proven or potential environmental pollutants. Their toxicity depends on the type and position of substituents in the aromatic ring, some of them are carcinogenic and several of them are either known or suspected as endocrine disruptors.

Considering their vast applicability, it is easy to understand that phenolic compounds enter the environment from a wide variety of industrial sources (e.g., plastics, drugs, dyes, wood, and paper). In addition, some are created by the biodegradation of chlorinated phenoxyacids, phenoxyalkanoic acid herbicides, and organophosphorous pesticides. These contamination sources far outweigh natural and biogeochemical formation pathways (e.g., farm waste, degradation of humic substances, tannins, and lignins). Widespread contamination of the aquatic environment has forced the adoption of restrictive regulations. Many phenolic compounds are now listed in the United States Environmental

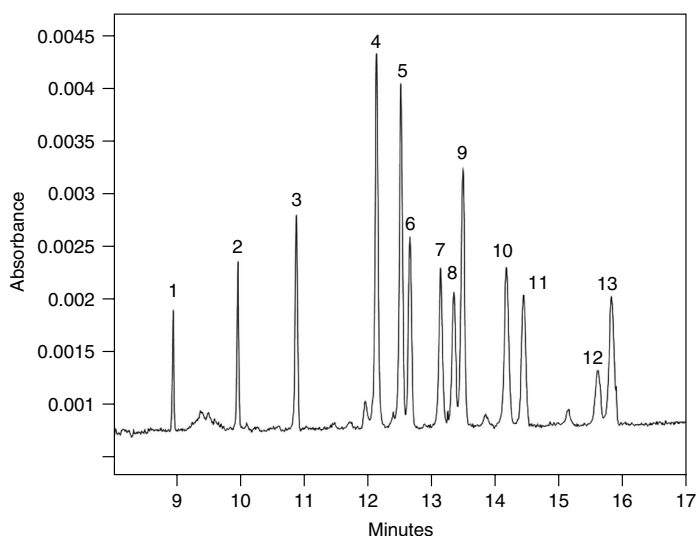
Protection Agency (US EPA) as priority pollutants. Also the European Union has recently adopted measures to control the environmental level of several phenols (Decision No. 2455/2001/EC in the area of water policy).

For the analysis of phenolic compounds (natural as well as pollutants), both gas (GC) and liquid chromatography (LC) are extensively used. Since the development of capillary electrophoresis (CE), however with its outstanding resolution, this technique has provided highly efficient separations of phenols, characterized by short separation times and low solvent consumption.

### Capillary Electrophoresis in Aqueous Media

Owing to their weak acidity ( $pK_a$  values ranging from 4 to 10.5) and relatively nonpolar character, phenols (both natural and pollutants) can be separated by capillary zone electrophoresis (CZE) in untreated capillary columns using aqueous buffered alkaline electrolytes (adjusting properly the pH of the separation media), hydrodynamic injection and normal (positive) polarity. In CZE, phenols are separated into discrete zones based on differences in their migration velocities caused by differences in size and charge. In an alkaline medium, phenols are more or less fully deprotonated as phenolate ions with negative electrophoretic mobilities usually lower than the electroosmotic flow (EOF). Consequently, they are swept by the EOF to the detector situated at the cathodic end. Borate and phosphate buffers with a working pH range of 8–11 and concentrations ranging from 10 to 200 mM are commonly applied (in the case of flavonoids and other polyphenols, borate can form complexes with orthodihydroxyl groups and with vicinal *cis*-dihydroxyl groups of sugars contributing to separations). Other electrophoretic parameters (e.g., capillary dimensions – usually 50–70 cm long by 25–75  $\mu\text{m}$  inner diameter, temperature – ambient or voltage – 10–30 kV) have less influence on these separations. **Figure 1** shows an electropherogram of a typical aqueous CZE separation of several phenolic pollutants.

Owing to the fact that in CZE the migration velocities of phenolate ions toward the detector are directly proportional to their charge/size ratio, the analysis of real samples and complex phenolic



**Figure 1** Electropherogram of a standard solution of phenol derivatives in methanol/water 6:4 (v/v). Running buffer: 40 mM sodium borate, pH 9.8; capillary: 70 cm  $\times$  50  $\mu$ m i.d.; applied voltage: 30 kV; capillary temperature: 25  $^{\circ}$ C; sample tray temperature: 20  $^{\circ}$ C. Peaks: (1), phenol; (2), 4-chloro-3-methylphenol; (3), 4-chlorophenol; (4), pentachlorophenol; (5), 2,3,5,6-tetrachlorophenol; (6), 2,4,6-trichlorophenol; (7), 2,4-dichlorophenol; (8), 2-methyl-4,6-dinitrophenol; (9), 2,3,6-trichlorophenol; (10), 2-chlorophenol; (11), 2,4-dinitrophenol; (12), 4-nitrophenol; and (13), 2-nitrophenol. (Reproduced with permission from Rodríguez I, Turnes MI, Bollain MH, Mejuto MC and Cela R (1997) Determination of phenolic pollutants in drinking water by capillary electrophoresis in the sample stacking mode. *Journal of Chromatography A* 778: 279–288.)

mixtures such as the phenols included in US EPA and European Union lists, is complicated owing to structural and dissociation constant similarities between them. Thus, other CE modes and EOF modification have been studied to overcome these difficulties, although full separation of the positional isomers of phenols of environmental concern continues to be an unresolved problem.

EOF can be altered by modifying internal capillary walls with permanent coatings (covalent bonds between silanol groups at the wall and neutral or hydrophilic substituents that decrease wall charge nearly to zero). In such capillaries, phenolates migrate only due to their own mobilities (negative or reverse polarity and thus anodic detection). Capillary deactivation is usually carried out with polyacrylamide or sulfonic acids. The allowable pH working range to maintain coatings stability (4–7) is not the best for phenol separation. Alternatively, EOF direction can be reversed using dynamic coatings by addition of cationic surfactants (e.g., cetyltrimethylammonium bromide, CTAB) to the electrolyte in concentrations below their critical micellar concentration (CMC). In this way, a codirectional movement of the anionic phenolates and the EOF is established allowing short separation times in anodic detection. Additionally, phenols can associate with charged species in the medium thus providing addi-

tional chances for separation. In the case of polyphenols, using tetraethylammonium tetrafluoroborate as the single component of the background electrolyte (BGE) with a pH around 4, polyphenols should be neutral ( $pK_a = 7.5\text{--}10.5$ ) and separation can be attributed to two factors: analytes may associate with positively charged tetraalkylammonium groups coating the capillary wall and/or with the tetraalkylammonium ions in the bulk solution. This association could be partially driven by hydrophobic interactions between the polyphenols and the hydrocarbon moieties of the tetraalkylammonium ions.

Another possibility to improve the resolution and selectivity of CZE for complex mixtures of phenols with very similar  $pK_a$  values and chemical structures is by adding an organic solvent as a modifier to the aqueous buffer. Solvents such as acetonitrile, alcohols, and N-substituted amines (see **Table 1**) added to aqueous buffers in proportions less than 40%, modify both buffer viscosity and acid–base properties, increasing at the same time the phenols solubility. Consequently, the EOF velocity as well as the phenolates electrophoretic mobilities are changed, improving peak shapes. Higher proportions of organic solvents and the use of the organic solvent as the electrophoretic medium are discussed below.

Analogous to organic solvents, the addition of chiral selectors (e.g., natural or modified  $\beta$ -cyclodextrins, or

**Table 1** Properties of more common solvents used in CE for phenolic compounds at 25°C

Solvent	$T_m$ (°C)	$T_b$ (°C)	$\rho$ (kPa)	$\gamma$ (mNm <sup>-1</sup> )	$\epsilon$	$\mu$ (D)	$\eta$ (mPas)	$pK_{auto}$
H <sub>2</sub> O	0	100.0	3.17	71.8	78.36	1.85	0.8903	17.51
MeOH	-97.7	64.5	16.90	22.3	32.66	2.87	0.551	16.91
EtOH	-114.5	78.2	7.89	21.9	24.55	1.66	1.083	19.10
2-PrOH	-88.0	82.2	6.03	21.2	19.92	1.66	2.044	21.08
ACN	-43.9	81.6	12.20	28.3	35.94	3.92	0.341	32.20
NMF	-3.8	199.0	0.0333	39.5	182.40	3.86	1.650	10.74
DMF	-60.5	153.0	0.53	36.4	36.71	3.82	0.802	23.10

$T_m$ , melting point;  $T_b$ , boiling point;  $\rho$ , vapor pressure;  $\gamma$ , surface tension;  $\epsilon$ , relative permittivity;  $\mu$ , dipole moment;  $\eta$ , dynamic viscosity;  $pK_{auto}$ , autoprotolysis constant; H<sub>2</sub>O, water; MeOH, methanol; EtOH, ethanol; PrOH, propanol; ACN, acetonitrile; NMF, *N*-methylformamide; DMF, *N,N*-dimethylformamide. Reproduced with permission from Marina ML, Rios A and Valcárcel M (2005) *Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis*, p. 110. Elsevier).

poly(ethylene glycol)) to the running buffer can significantly improve the separation of isomeric phenols (e.g., catechins separation). Less frequently, micellar electrokinetic chromatography (MEKC) has been applied for phenol separations. Adding surfactants that form micelles in the electrophoretic medium, the separation of phenolic compounds occurs as a result of differences in the degree of partitioning of the analytes between the aqueous buffer and the hydrophobic micelle core. Sodium dodecyl sulfate (SDS) 10–70 mM as surfactant and phosphate–borate carrier electrolyte (including sometimes small amounts of an organic solvent) build the most usual electrolyte in these separations. Recently, excellent results have been obtained using sodium deoxycholate (SDC).

### Nonaqueous Capillary Electrophoresis (NACE)

As mentioned before, selectivity for phenols is based on differences in effective charge and hydrodynamic ratio of the phenolate ions. Then, both ionization and ion solvation determine the electrophoretic mobility. Because physicochemical properties of solvents vary in a wide range, incorporation of organic solvents into the background electrolyte introduces additional flexibility in CE separations, allowing advantage to be taken of the slight difference in  $pK_a$  values of the phenols. **Table 1** summarizes several characteristics of solvents most commonly used to prepare the BGEs or as additives in aqueous electrolytes. Owing to their lower relative permittivity, organic electrolytes generate three to four times less current compared with aqueous electrolytes. Consequently, organic electrolytes permit the application of higher electric fields thus enhancing efficiency and reducing analysis times without noticeable Joule heating effects.

In NACE, ion solvation may be different from one solvent to another, changing the size of the solvated particles and their acid–base properties. In fact, positive shifts of 3–5 units in  $pK_a$  values has been reported for phenols in protic solvent-based media (e.g., methanol) and up to 17 units in aprotic solvent-based media (e.g., acetonitrile) when compared to aqueous solutions. Destabilization of phenolates and enhanced stability of undissociated phenols in organic solvent may explain these enormous shifts. This means that, depending on the characteristics of the organic solvent used as BGE and on the apparent pH of the medium, electrophoretic separations of phenols can be driven by a combination of two mechanisms: deprotonation and heteroconjugation. Additionally, ion association and contact ion-pair formation are frequent phenomena in organic solvents having low or moderate dielectric constants. These effects would decrease the number of free ions in solution, thus reducing their effective mobility. In fact, although being negligible in water, ion pairing has a relevant role in methanol-based BGEs.

When protic organic solvents are used, phenolate ions are stabilized by solvation through hydrogen bonds with solvent molecules. Obviously, aprotic solvents cannot act as a donor to form hydrogen bonds and therefore, anion stabilization with other molecules present in the BGE should be considered. It was shown that phenols may form homoconjugates  $HA_2^-$  between an undissociated acid HA and its anion  $A^-$ . Also the formation of heteroconjugate anions  $(RH)_nA^-$  between the undissociated analytes RH and buffer ions  $A^-$  in acetonitrile was demonstrated. Since all heteroconjugates share the same charge (that corresponding to electrolyte anions), differences in migration times for phenols are basically caused by shape and size effects.

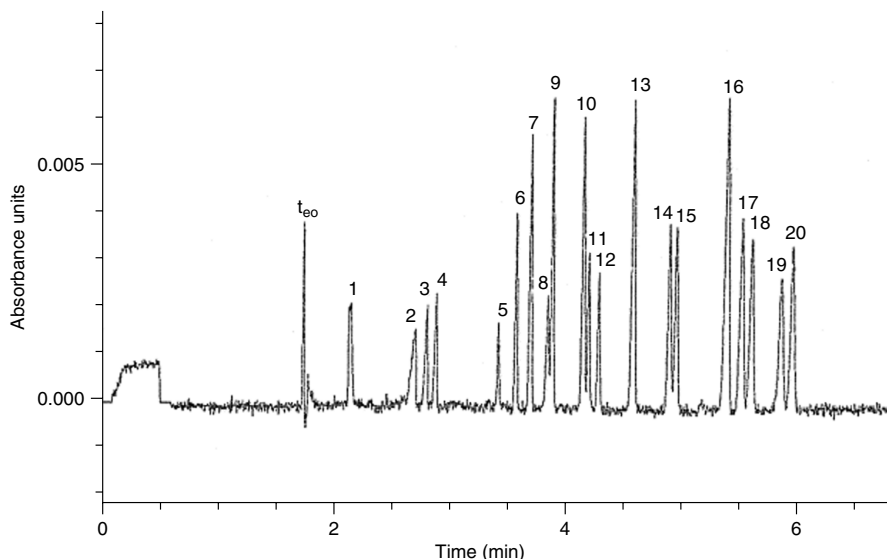
An example of this type of separations is given in **Figure 2**, corresponding to the highly efficient separation of phenol and 19 chlorophenol congeners in

less than 6 min. Less-substituted chlorophenol congeners eluted first followed by the more chlorinated congeners, which is the same pattern observed in aqueous CZE separations. The electron-withdrawing chlorine groups, which lower the phenol's  $pK_a$  values, cause this elution order. Since the degree of dissociation is greater for the highly chlorinated phenols at moderate pH values, these compounds exhibit greater mobility in the opposite direction of EOF, thus eluting after less-chlorinated phenols. If pH increases, the elution order reverses because all phenols become fully deprotonated. In practice, phenol separations are very sensitive to minor changes in the BGE component ratios and several pairs of isomers coeluted when the BGE becomes slightly more basic. Thus good control of buffer reproducibility is a key to success in these separations.

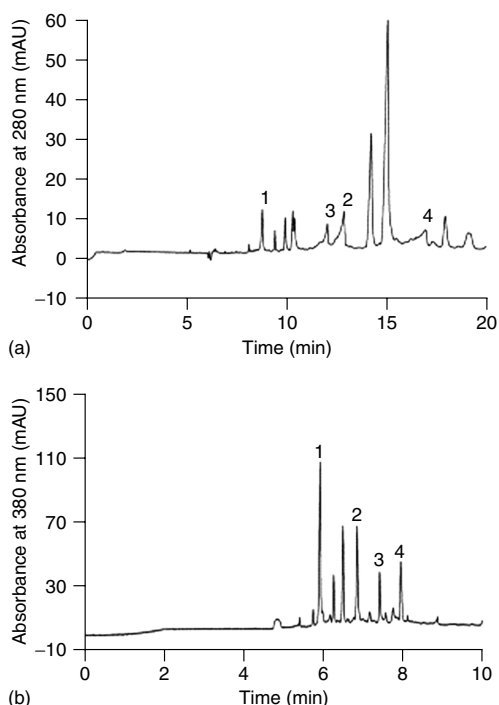
Another example corresponding to natural phenols is the separation of theaflavins (TFs), flavonol compounds formed during the manufacturing process of black tea. In that process, fresh leaves are macerated to disrupt the cells and subcellular compartments. One consequence is that cytoplasmatic polyphenol oxidase and probably the leaf peroxidase too, oxidize and polymerize the majority of monomeric flavan-3-ol to form thearubigins (TRs) and

TFs. Depending on substituents in the plant original flavanols, TF-mono and digallates or the free TF are formed. Control of TFs is important because of their significant correlation with tea quality and taste characteristics. Not only the total TF content, but also individual TFs are important for quality control schemes. Aqueous CE separation procedures as well as MEKC show poor selectivity while NACE separations using 90 mM ammonium acetate in acetonitrile/methanol/acetic acid (71:25:4 by vol.) as BGE allows baseline resolution of the four TFs. **Figure 3** compares the CZE aqueous and NACE separations of these analytes. It is clear that broad-tailed peaks are produced in aqueous buffers (**Figure 3a**) making the accurate quantification of analytes difficult. On the contrary, sharp-symmetric peaks are produced under NACE conditions (**Figure 3b**).

Similar behavior (ion-pair formation and heteroconjugation) is observed in amphiprotic solvents (e.g., *N*-methylformamide, *N,N*-dimethylformamide). **Figure 4** shows a highly efficient and selective separation of 26 phenols included in method 8041 US EPA and 76/464/EEC European Union directive using 150 mM ammonium acetate dissolved in *N*-methylformamide/acetonitrile 75:25 (v/v). Twenty-three analytes in the mixture are



**Figure 2** Separation of phenol and 19 chlorophenol congeners. Running buffer: 10 mM acetic acid + 5 mM tetrabutylammonium hydroxide in acetonitrile; capillary: 57 cm  $\times$  53  $\mu$ m i.d.; applied voltage: 25 kV; detection: 214 nm; capillary and sample tray temperature: 25°C; hydrodynamic injection: 1 s. Peaks: (1), phenol; (2), 4-chlorophenol; (3), 2-chlorophenol; (4), 3-chlorophenol; (5), 3,4-dichlorophenol; (6), 2,4-dichlorophenol; (7), 2,3-dichlorophenol; (8), 2,6-dichlorophenol; (9), 3,5-dichlorophenol; (10), 2,5-dichlorophenol; (11), 3,4,5-trichlorophenol; (12), 2,3,4-trichlorophenol; (13), 2,4,5-trichlorophenol; (14), 2,3,5-trichlorophenol; (15), 2,3,4,5-tetrachlorophenol; (16), 2,4,6-trichlorophenol; (17), pentachlorophenol; (18), 2,3,4,6-tetrachlorophenol; (19), 2,3,5,6-tetrachlorophenol; and (20), 2,3,6-trichlorophenol. (Reproduced with permission from Miller JL, Shea D and Khaledi MG (2000). Separation of acidic solutes by non-aqueous capillary electrophoresis in acetonitrile-based media. Combined effects of deprotonation and heteroconjugation. *Journal of Chromatography A* 888: 251–266.)



**Figure 3** Electropherograms of thearubigin extract prepared from commercial black tea. (a) Aqueous CZE; running buffer: 600 mM boric acid and 50 mM potassium sulfate titrated to pH 7.0 with 1.0 M sodium hydroxide; capillary: 59 cm  $\times$  50  $\mu$ m i.d.; applied voltage: 22.5 kV; detection: 280 nm; capillary temperature: 25°C; hydrodynamic injection: 50 mbar by 5 s. (b) Non-aqueous CZE; running buffer: 90 mM ammonium acetate in acetonitrile/methanol/acetic acid 71:25:4 (by vol.); capillary: 40 cm  $\times$  50  $\mu$ m i.d.; applied voltage: 27.5 kV; detection: 380 nm; capillary temperature: 18.5°C; hydrodynamic injection: 50 mbar by 5 s. Peaks: (1), free theaflavin; (2), theaflavin-3-gallate; (3), theaflavin-3'-gallate; and (4), theaflavin-3,3'-digallate. (Reproduced with permission from Wright LP, Aucamp JP and Apostolides Z (2001). Analysis of black tea theaflavins by non-aqueous capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 919: 205–213.)

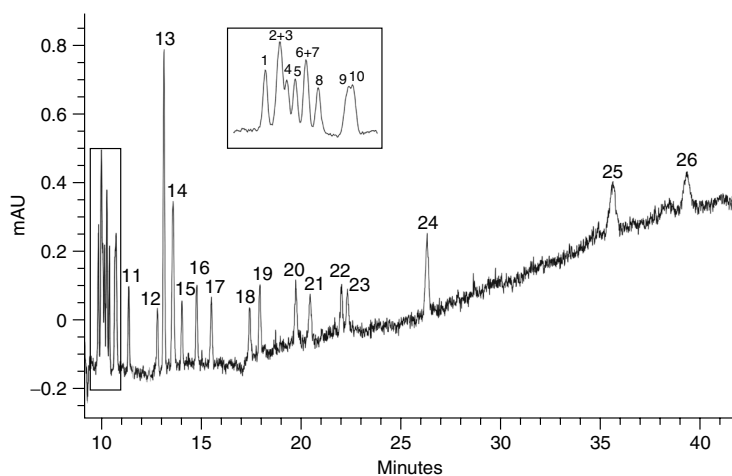
successfully resolved in spite of the similarities between many of the analytes in this mixture. Only three couples comigrate: *o*-cresol and *p*-cresol, 4-chloro-3-methylphenol and 2-amino-4-chlorophenol, and 2-chloro with 3-chlorophenol. This level of resolution is comparable to that attained by the official 8041 US-EPA gas chromatography method for the analysis of phenol derivatives.

## Detection

Ultraviolet/visible (UV/vis) spectrophotometric detection, either at fixed wavelength or with a diode array (DAD), is undoubtedly the most usual and widespread detection system for CE analysis of

phenol derivatives. Depending on the particular analytes to be determined wavelength ranges of 206–214, 254, and 260–280 nm for halogenated phenols, cresols, and nonflavonoid natural phenols, and 350–390 for nitrophenols and flavonoids, are selected. DAD detectors help in the identification of analytes by simultaneously monitoring several wavelengths and ensure the attainment of the best quantification limits for the different analytes. Of course, when NACE is used, the cutoff and absorbance backgrounds of some solvents in the UV region it has to be taken into account. For example, formamide and *n*-methylformamide exhibit significant absorption under 270 nm thus limiting the choices of wavelengths for monitoring phenols. On the other hand, high-purity acetonitrile and methanol can be utilized even at 200 nm.

Limited sensitivity of UV detection, further penalized by the short optical path length in the detection cell (capillary inner diameter) and small injection volumes allows detection limits (LODs) only in the low  $\mu\text{g mL}^{-1}$  range to be achieved, thus limiting the application of the separation technique in many environmental applications. Better detection limits may be obtained with detection cells of special design or by resorting to alternative detection systems. Although there are several reports dealing with applications of fluorescence, amperometric, conductimetric, and mass spectrometric detectors for CE analysis of phenols, UV detection continues to be the preferred technique. It is clear that mass spectrometry (MS) detection has several intrinsic advantages because reliable identification of analytes is especially critical in complex environmental and biological or food related samples where phenols, natural or pollutants, must be determined. The on-line combination of CE and the detection and identification potential of MS provides a valuable tool for the analysis of phenols, particularly, the analysis of natural antioxidants, soft ionization interfaces such as electrospray ionization (ESI) allows the production of ions even for labile compounds thus providing a very powerful analytical tool. However, some difficulties (very low-flow rate characteristics of CE and especially the volatility of buffers) still need further development to render CE–MS a routine tool. As an example, **Figure 5** shows the separation of 18 positional isomers of chlorophenols by CE–ion-trap MS with ESI using diethylmalonic (DEM) acid (5 mM, pH 7.25) as running buffer and isopropanol-250 mM diethylamine (80:20) as sheath liquid to compensate for the difference in eluent flow required by the ESI interface. Better resolution between 3-chlorophenol and 4-chlorophenol can be obtained using a higher concentration of DEM in the buffer, although



**Figure 4** Electropherogram of a mixture of 26 phenol derivatives in concentration  $5 \text{ mg L}^{-1}$  in electrolyte. Running buffer: 150 mM ammonium acetate in *N*-methylformamide/acetonitrile 75:25 (v/v); capillary:  $70 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$  i.d.; applied voltage: 30 kV; detection: 280 nm; capillary and sample tray temperature:  $20^\circ\text{C}$ ; hydrodynamic injection: 50 mbar by 5 s. Peaks: (1), 2,4-dimethylphenol; (2), *o*-cresol; (3), *p*-cresol; (4), *m*-cresol; (5), phenol; (6), 2-amino-4-chlorophenol; (7), 4-chloro-3-methylphenol; (8), 4-chlorophenol; (9), 2-chlorophenol; (10), 3-chlorophenol; (11), 2,4-dichlorophenol; (12), 2,3,4-trichlorophenol; (13), 4-nitrophenol; (14), 2-nitrophenol; (15), 2,4,5-trichlorophenol; (16), 2,6-dichlorophenol; (17), 2,3,5-trichlorophenol; (18), 2,3,4,5-tetrachlorophenol; (19), 2,4,6-trichlorophenol; (20), 2,3,6-trichlorophenol; (21), 2,3,4,6-tetrachlorophenol; (22), 2,3,5,6-tetrachlorophenol; (23), pentachlorophenol; (24), Dinoseb; (25), 2-methyl-4,6-dinitrophenol; (26), 2,4-dinitrophenol. (Reproduced with permission from Morales S and Cela R (2000) Highly selective and efficient determination of US Environmental Protection Agency priority phenols employing solid-phase extraction and nonaqueous capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 896: 95–104.)

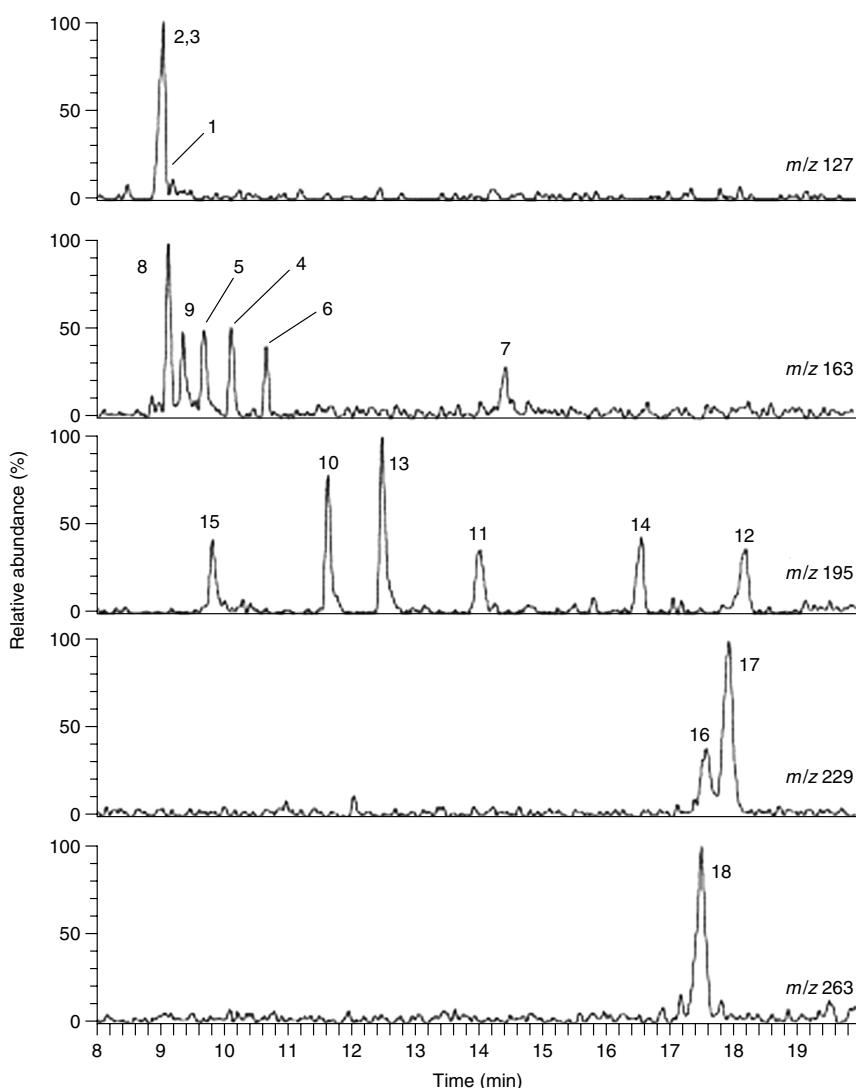
currents are too high to allow coupling to MS. In general, instrumental factors and volatility limitations are conflicting with the resolution of peaks so compromise solutions have to be adopted.

### Sample Extraction and Concentration Techniques

The major limitation of CE for the analysis of phenols is the low sensitivity of UV detection. Even coupled to alternative detection systems, injection of small sample volumes limits the use of CE in some important analytical applications. In general, to achieve the detection limits demanded by environmental regulations involves some sample concentration steps prior to the separation and determination. Sample concentration can be carried out off-line (e.g., by liquid–liquid extraction, solid-phase extraction, solid-phase microextraction, microwave-assisted extraction, etc.) or online directly in the capillary. Of course, combinations of both working modes may provide the necessary levels of concentration to deal with most practical cases.

Although off-line procedures are still recommended in most environmental regulations (e.g., liquid–liquid extraction or solid-phase extraction for

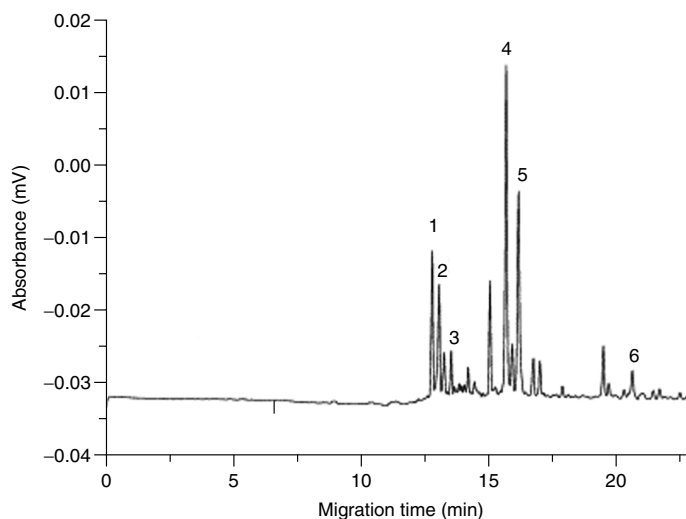
EPA methods 604, 625, and 8041), online procedures have shown excellent performance. These procedures are based on conductivity differences between the sample and the BGE, and are frequently called *sample stacking*, *on-column stacking*, or *field-amplified injection* procedures. Isotacophoresis (ITP), an electrophoretic technique in its own, can be used as well for online sample preconcentration in CZE (known as on-column transient ITP concentration). Sweeping is an online sample concentration technique in MEKC based on the sorption and accumulation of analyte molecules by the pseudostationary phase (micelles) that penetrate and fill the sample zone upon application of a voltage. It occurs when the sample matrix is void of charged carrier phase, and the sample matrix may have a higher, similar, or lower conductivity compared with the BGE. Up to 5000-fold concentration factors have been reported using this technique. Also MEKC field-enhanced sample injection with reverse migrating micelles (FESI-RMM) was shown to concentrate samples online prior to MEKC separations. This technique has been applied to plant flavonoids separation providing 40–360-fold sensitivity improvements as compared with conventional hydrodynamic injection. Certain flavonoids are the major active constituents of traditional Chinese medicines.



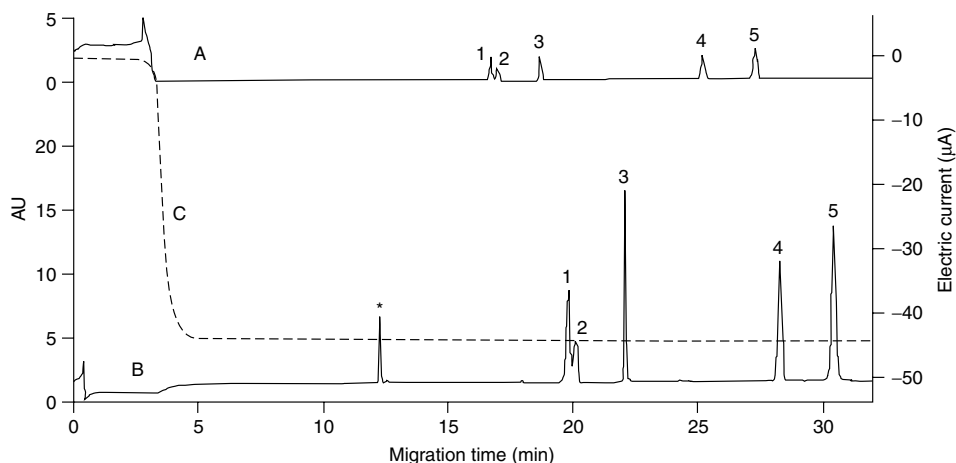
**Figure 5** CE-MS separation of a standard solution of 18 chlorophenols in concentration of  $2\text{--}20\ \mu\text{g mL}^{-1}$ , depending on each compound. Running buffer: 5 mM diethylmalonic acid, pH 7.25; capillary:  $100\ \text{cm} \times 75\ \mu\text{m}$  i.d.; applied voltage: 20 kV; capillary temperature:  $25^\circ\text{C}$ ; hydrodynamic injection: 20 psi by 4 s. Sheath liquid: isopropanol 250 mM, dimethylamine (80:20) at  $5\ \mu\text{L min}^{-1}$ . Peaks: (1), 2-chlorophenol; (2), 3-chlorophenol; (3), 4-chlorophenol; (4), 2,3-dichlorophenol; (5), 2,4-dichlorophenol; (6), 2,5-dichlorophenol; (7), 2,6-dichlorophenol; (8), 3,4-dichlorophenol; (9), 3,5-dichlorophenol; (10), 2,3,4-trichlorophenol; (11), 2,3,5-trichlorophenol; (12), 2,3,6-trichlorophenol; (13), 2,4,5-trichlorophenol; (14), 2,4,6-trichlorophenol; (15), 3,4,5-trichlorophenol; (16), 2,3,4,6-tetrachlorophenol; (17), 2,3,5,6-tetrachlorophenol; (18), pentachlorophenol. (Reproduced with permission from Jáuregui O, Moyano E and Galceran MT (2000) Capillary electrophoresis–electrospray ion-trap mass spectrometry for the separation of chlorophenols. *Journal of Chromatography A* 896: 125–133.)

**Figure 6** shows the electropherogram of an extract of *Epimedium brevicornum* maxim produced in FESI-RMM-MEKC conditions. In this technique, a low-pH buffer is used to reduce the EOF and renders flavonoids protonated. The sample is dissolved with the aid of micelles in solution and injected into the capillary using voltage. Sample stacking with a

dynamic pH junction depends on the change in electrophoretic mobilities of analytes when reaching the pH junction between the sample plug and the BGE. Analytes must possess an appropriate chemical functional group (e.g., amino, phenolic hydroxyl, or vicinal diol groups) so that they may exist in at least two distinct states, with different velocities in the



**Figure 6** Electropherogram of the extract of *E. brevicornum* maxim. Running buffer: 20 mM phosphoric acid containing 100 mM SDS, 20% (v/v) acetonitrile and 2% (v/v) 2-propanol, pH 2.0; capillary: 70 cm  $\times$  75  $\mu$ m i.d.; applied voltage:  $-15$  kV; detection: 254 nm; capillary temperature:  $27.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ; electrokinetic injection:  $-10$  kV for 20 s after introduction of 3 s water plug. Peaks: (1), icariin II; (2), 2''-O-rhamnosylcariside I; (3), ikarisoside A; (4), icariin; (5), epimedien B; (6), kaempferol-3-O-Rha. (Reproduced with permission from Wang S, Wu Y, Ju Y, Chen X, Zheng W and Hu Z (2003) On-line concentration by field-enhanced sample injection with reverse migrating micelles in micellar electrokinetic capillary chromatography for the analysis of flavonoids in *Epimedium brevicornum* maxim. *Journal of Chromatography A* 1017: 27–34.)



**Figure 7** Electropherograms of standard solutions in methanol of tetrabromobisphenol A and other phenolic compounds using LVSEP, in concentration of (A),  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  and (B),  $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . (C), Electric current during the LVSEP process. Running buffer: 20 mM sodium tetraborate,  $\text{pH}_{\text{app}}$  9.4; capillary: 70 cm  $\times$  75  $\mu$ m i.d.; applied voltage:  $-30$  kV; detection: 210 nm; capillary and sample tray temperature:  $25^\circ\text{C}$ ; hydrodynamic injection: (A), 50 mbar by 2 s; (B), 50 mbar by 300 s. Peaks: (1), 2,4,6-tribromophenol; (2), pentabromophenol; (3), 2,6-dibromophenol; (4), tetrabromobisphenol A; (5), tetrachlorobisphenol A. (Reproduced with permission from Blanco E, Casais MC, Mejuto MC and Cela R (2005) Analysis of tetrabromobisphenol A and other phenolic compounds in water samples by non-aqueous capillary electrophoresis coupled to photodiode array ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A* 1071: 205–211.)

capillary. Large-volume sample-stacking injection using the EOF pump (LVSEP) allows highly sensitive NACE of phenolic compounds using methanol

as the running buffer solvent. Methanol provides adequate suppression of EOF and, depending on each particular case, an increase in the

electrophoretic mobilities of phenolates as compared with water. These two effects allow LVSEP to be achieved under an electric field of reverse polarity. Because under these conditions, the electrophoretic mobility of phenolates is higher than and opposite to the EOF during both sample stacking and the subsequent separation processes, once the matrix plug is eliminated and the ions stacked in a narrow band, the separation can proceed immediately under the same voltage (no polarity switching needed). **Figure 7** shows an example of this type of technique in the separation of some bromophenols of environmental concern. Running buffer is 20 mM sodium tetraborate in methanol and pH 9.4 (apparent). The process of removing the methanol plug corresponding to the injected sample out of the capillary justifies the differences in migration times observable between electropherograms (A) and (B). It has been observed that coupling LVSEP to CE improved the quantification limits (LOQs) about two or three orders of magnitude. This allows the application of CE procedures to samples in the  $\mu\text{g L}^{-1}$  level using conventional UV detection and thus the efficient application of CE separation and analysis to environmental samples.

Of course, for those phenolates with electrophoretic mobilities lower than EOF, the LVSEP technique cannot be applied unless polarity switching is performed after the anions stacking and removal of the large matrix plug. In general, this point is marked when the current reaches 95% of the value corresponding to the BGE used for the conventional

injection of samples. After polarity switching, the separation is completed in normal polarity, achieving around 100-fold improvements in sensitivity.

An additional advantage of NACE procedures in the analysis of phenol derivatives is the compatibility with the solvents commonly applied in off-line pre-concentration techniques. Avoiding solvent change-over means avoiding error chances and improving sample throughput.

*See also:* **II/Capillary Electrophoresis:** Coated Columns; **II/Capillary Electrophoresis:** Microemulsion electrokinetic chromatography; **II/Capillary Electrophoresis:** Preconcentration Techniques. **Phenols:** Gas Chromatography; **Phenols:** Liquid Chromatography; **Phenols:** Thin-Layer (Planar) Chromatography.

### Further Reading

- Gelpi E (2002) An update on recent developments. *Journal of Mass Spectrometry* 37: 241–253.
- Herrero M, Ibáñez E and Cifuentes A (2005) Analysis of natural antioxidants by capillary electromigration methods. *Journal of Separation Science* 29: 883–897.
- Khaledi MG (1998) *High-Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques and Applications*. New York: Wiley.
- Marina ML, Ríos A and Valcárcel M (eds) (2005) Analysis and detection by capillary electrophoresis. In: D. Barceló (ed.) *Wilson & Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. XLV. Amsterdam: Elsevier.

## Improving sensitivity in simultaneous determination of copper carboxylates by nonaqueous capillary electrophoresis

Pirkko-Leena Laamanen<sup>a,\*</sup>, Eva Blanco<sup>b</sup>, Rafael Cela<sup>b</sup>, Rose Matilainen<sup>a</sup>

<sup>a</sup> University of Jyväskylä, Department of Chemistry, P.O. Box 35, FI-40014 University of Jyväskylä, Finland

<sup>b</sup> Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química, Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela, Avda. de las Ciencias s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Received 21 November 2005; received in revised form 17 January 2006; accepted 20 January 2006

Available online 7 February 2006

### Abstract

A new method of nonaqueous capillary electrophoresis (NACE) with UV spectrophotometric detection was developed and optimized for the simultaneous determination of seven carboxylates (trans-1,2-diaminocyclohexane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (CDTA), diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), *N*-(2-hydroxyethyl)ethylenediamine-*N,N',N'*-triacetic acid (HEDTA), nitrilotriacetic acid (NTA), 1,3-diaminopropane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (PDTA) and triethylenetetraaminehexaacetic acid (TTHA)) as copper complexes. The method development was carried out by using a fused silica capillary. Background electrolyte (BGE) was optimized and the best separation achieved by using 30 mmol L<sup>-1</sup> potassium bromide in *N*-methylformamide (NMF) at apparent pH (pH<sub>app</sub>) 10.2. A voltage of +30 kV and direct UV detection at 280 nm were used in all measurements. Large-volume sample stacking using the electroosmotic flow pump (LVSEP) was tested in addition to basic capillary electrophoresis (CE) and observed to improve the separation of the analyte zones in the capillary. All the peaks in the electropherograms were properly separated, the calibration plots gave excellent correlation coefficients ( $R^2 \geq 0.994$ ) and all seven copper carboxylate complexes were detected in less than 20 min using both the basic measurements and the large-volume sample stacking method. The new NACE method was tested with lake water and proved to be reliable.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Chelating agents; Copper carboxylate complexes; Large-volume sample stacking; *N*-Methylformamide; Nonaqueous capillary electrophoresis

### 1. Introduction

There has been rapid development of aqueous (CE) and nonaqueous capillary electrophoresis (NACE) in recent years. Although aqueous methods have been more common, recently attention has been turned towards nonaqueous media. Several review papers [1–3] highlighted the unique properties of some solvent systems thus contributing to the fast development of NACE.

Nonaqueous capillary electrophoresis is based on the use of background electrolyte solutions (BGE) prepared from pure organic solvents or their mixtures [4]. Selecting and optimizing a suitable BGE for the analytes of interest is the most challenging part of method development in NACE. Composition of BGE determines the electrophoretic mobility of ionic analytes

due to solvent and ion-ion interactions [5]. Unique properties of solvents as compared to water play the fundamental role in developing the separation procedure. A suitable liquid range, sufficient relative permittivity, relatively low viscosity, not too high volatility, chemical stability, availability, low cost and high purity are some of the important factors to consider on selecting the solvent for a particular separation [6]. Many properties of analytes may change in nonaqueous media; e.g., in methanolic medium  $pK_a$  values of basic analytes are higher than in water [1], and more generally  $pK_a$  values are larger in almost all the organic solvents used in NACE when compared to aqueous media [7].

NACE makes use of both amphiprotic and inert/aprotic solvents [2]. Alcohols (methanol (MeOH), etc.) belong to the class of water alike amphiprotic solvents. Formamide (FA), *N*-methylformamide (NMF) and dimethylformamide (DMF) are amphiprotic solvents exhibiting basic character (i.e., they enhance solute acidity [8]). Acetonitrile (ACN) represents the class of inert solvents [2]. As a consequence, NACE offers additional possibilities to the analyst. In aqueous media, the solvent

\* Corresponding author. Tel.: +358 14 260 2612; fax: +358 14 260 2501.  
E-mail address: [pirlaam@cc.jyu.fi](mailto:pirlaam@cc.jyu.fi) (P.-L. Laamanen).

remains the same while the additives are variable. In NACE both solvents and additives are variable thus increasing the practical possibilities for a good separation.

Methanol, either alone or in mixtures appear the most commonly used solvent in NACE [4,5,8–21,27] (e.g., halogenated phenolic and bisphenolic compounds [9],  $\beta$ -blockers [8,11], neutral surfactants [10], substituted benzoates and nitrophenolates [5] and small cations [12]). ACN [4,12,15–20,22–24], ethanol [12,20,21,25], propanol [12,20,21], butanol [21], FA and NMF [8,26] and DMF [12,26] have also been applied with satisfactory results.

On the other hand, as in aqueous capillary electrophoresis, the selection of appropriate electrolytes and additives is a key factor in optimizing the separations. Selection of additives is not generally straightforward. Acetic acid (HOAc) is common component of NACE media [1]. Also sodium tetraborate [9], ammonium acetate [1,15,17–20,24] and tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) [27] appear frequently as salt additives in reported separations. Salts that have smaller molecular weight like sodium bromide are less commonly used in NACE.

The development of methods for the analysis of carboxylate ligands is important because the environmental impact of these compounds. Widely used in industry and agriculture, they enter the environment not only as diffuse pollutants but via industrial and domestic waste waters. In previous papers [28,29] dealing with the capillary electrophoretic separation of carboxylates only aqueous media have been considered and optimized. Aqueous CE procedures are cheap, simple and practically feasible, although lower detection limits (LOD) are needed to accommodate real environmental concerns. The background signal has a marked influence in LOD calculation when  $3 \times$  noise based calculations are used, and in our experience the background noise of aqueous CE is often higher than in nonaqueous media because the high salt concentrations applied and the interactions between salts and water. Our preliminary tests proved that NACE allows higher ionic strengths of the BGEs and higher voltages for the capillary electrophoresis (CE) methods resulting lower currents, which enable the use of wider i.d. capillary. Thus, NACE appears as a potential alternative in the development of sensitive separation and determination procedures of copper carboxylate complexes, although to the best of our knowledge only aqueous CE has been previously explored with this aim. The practical aqueous methods used for separation of chelating ligands are discussed in more detail in [28].

This paper presents the development of a NACE procedure to separate several carboxylates. Additionally, large-volume sample stacking using the electroosmotic flow pump (LVSEP) [27,30] has been explored to overcome the sensitivity limitations imposed by the widespread UV detection in CE. Finally, natural water sample was used to check the suitability of this NACE method for simultaneous separation of copper complexes of trans-1,2-diaminocyclohexane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (CDTA), diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), *N*-(2-hydroxyethyl)ethylenediamine-*N,N',N'*-triacetic acid (HEDTA), nitrilotriacetic acid (NTA), 1,3-diaminopropane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (PDTA) and triethylenete-

traaminehexaacetic acid (TTHA). Through this study all chelating ligands used are considered as copper complexes, hence this is not mentioned every time they appear in the text.

## 2. Experimental

### 2.1. Instrumentation

Electropherograms were obtained on a Hewlett-Packard CE<sup>3D</sup> G1600 AX apparatus (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany) equipped with a diode array detector (DAD) and an air cooling unit for the capillary. Instrument control and data acquisition were performed with HP<sup>3D</sup> Chemstation software (Hewlett-Packard, Rev 04.02.). Absorbances at 191, 210, 254, 280 and 290 nm were monitored for analyte detection. The uncoated fused silica capillary (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany) was of 75  $\mu\text{m}$  i.d., 375  $\mu\text{m}$  o.d. and had a total length 70 cm (61.5 cm to the detector). The temperature of the capillary cassette was adjusted to 25 °C by air cooling. Depending on the experiment runs were performed with reverse polarity (–30, –20 kV) or normal polarity (+20 and +30 kV) generated by the negative and positive power supply, resulting in electric currents from –229 to +60  $\mu\text{A}$ . Standards and samples were injected hydrodynamically by overpressure (50 mbar = 5000 Pa). Depending on the experiment, the injection time was from 2 to 3 s. The instrument was placed in a special room with automated temperature control (+20 °C).

Apparent pH ( $\text{pH}_{\text{app}}$ ) measurements were done with Orion 720A pH-meter by using Orion Ross combination pH electrode (8103BN), the filling solution of the electrode was 3 M KCl (Orion Cat. No 810007). The pH equipments were obtained from Orion (Cambridge, England).

### 2.2. Reagents and solutions

Ultra pure water with a resistivity greater than 18.2 M $\Omega$ /cm was obtained by passing distilled water through an ELGA Elgastat Maxima (Elga Ltd., UK). All the chemicals used were of analytical reagent grade. Diethylenetriaminepentaacetic acid, methanol, sodium tetraborate and strontium bromide hexahydrate were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate was obtained from FF-Chemicals (Yli-II, Finland). Nitrilotriacetic acid trisodium salt monohydrate, 1,3-diaminopropane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid and *N*-methylformamide were obtained from Fluka Chemika (Buchs, Switzerland). Tetracyclotrimethylammonium bromide, acetonitrile, sodium bromide and acetic acid were obtained from J.T. Baker (Deventer, Holland). Copper sulphate pentahydrate and potassium bromide were obtained from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Trans-1,2-diaminocyclohexane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid hydrate, iminodiacetic acid (IDA) and triethylenetetraaminehexaacetic acid were obtained from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany) and *N*-(2-hydroxyethyl)ethylenediamine-*N,N',N'*-triacetic acid from Fluka BioChemika (Buchs, Switzerland). Tris(hydroxymethyl)aminomethane and formamide were obtained from Aldrich Chemical Company (Milwaukee, USA).

Table 1  
The tested solvent systems

Solvent	Salt additive	pH <sub>app</sub> range
MeOH	20 mmol L <sup>-1</sup> sodium tetraborate	8.9–11.4
ACN:MeOH:HOAc (74:25:1)	60 mmol L <sup>-1</sup> ammonium acetate	7.1
FA	–	8.9
FA	40 mmol L <sup>-1</sup> sodium tetraborate	10.8
FA	40 mmol L <sup>-1</sup> sodium tetraborate + 0.5 mmol L <sup>-1</sup> TTAB	10.8
NMF	–	8.9–10.7
NMF	2–10 mmol L <sup>-1</sup> sodium tetraborate	10.3–11.7
NMF	20–150 mmol L <sup>-1</sup> Tris	10.8–11.5

BGE solutions were prepared using pure solvents dissolving the appropriate amount of salts as indicated in Table 1. Apparent pH [31] adjustment was carried out by careful addition of aqueous 1 M NaOH. Electrode of the pH-meter in these measurements of pH<sub>app</sub> was calibrated against two aqueous standard buffer solutions, phosphate buffer pH 7.00 and citrate buffer pH 4.00 obtained from FF-Chemicals (Haukipudas, Finland).

A stock solution contained 10 mmol L<sup>-1</sup> of each chelating ligand and a small amount of NaOH to make the analytes fully soluble. The stock solution of copper was 120 mmol L<sup>-1</sup>. Standards and samples were prepared by mixing appropriate amount of stock solution of ligand mixture with copper and final dilution of the sample was done with ultrapure water. All the aqueous metal complex solutions were allowed to stand overnight to ensure thermodynamic equilibrium prior to the CE analysis. Both standards and samples consisted of excess of copper compared the amounts of chelating ligands in the sample [28,29].

Preliminary experiments were carried out without adjustment of the apparent pH but soon the results indicated pH adjustment as necessary to avoid metalcomplexes instability. Consequently, all presented experiments here were carried out by matching the apparent pH of samples and background electrolyte. Buffers and samples were filtered through 0.45 µm membrane filters (GHP Acrodisc, Pall Co., USA).

### 2.3. Conditioning of the capillary

When new fused silica capillaries were used for the first time, they were rinsed with 1 mol L<sup>-1</sup> sodium hydroxide for 30 min and ultra pure water for 30 min after which ordinary conditioning was done as follows: before every injection the capillary was conditioned by sequential purging with 0.1 mol L<sup>-1</sup> NaOH (5 min), ultra pure water (5 min) and BGE solution for 15 min. After every run the capillary was cleaned with ultra pure water (5 min). If the capillary had been used before, only the ordinary conditioning procedure before and after the sample injection was performed. The inlet and outlet of the capillary were stored in ultra pure water.

### 2.4. Large-volume sample stacking using the electroosmotic flow pump (LVSEP)

All the samples that were used in the stacking experiments were diluted with ultra pure water or NMF. Samples were introduced hydrodynamically into the capillary with a pressure of 50 mbar for 10–30 s, depending on the experiment. The analyses were carried out using normal polarity (+30 kV). After stacking with a negative voltage, when the conductivity was raised to about 95% of conductivity of the corresponding buffer, positive polarity was resumed.

The buffer and samples used were always changed after each measurement, so solutions were fresh for every injection.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Choice of the solvent system

In the absence of literature precedents concerning the analysis of carboxylates by NACE, the selection of candidate solvents in the NACE separation of the selected chelating ligands (CDTA, DTPA, EDTA, HEDTA, NTA, PDTA and TTHA) was based on the consideration of the general properties of both solvents and analytes. In this way, methanol (MeOH), ACN, FA and NMF, either pure or with several different salt additives and considering different pH<sub>app</sub> ranges were selected for preliminary experiments. Table 1 summarizes the solvent media considered in these experiments. Analyte solutions in these experiments were diluted with the solvent media or with ultrapure water, depending on the experiment. Both positive and negative polarity CE runs were tested to see if the BGE system is capable to reverse the electroosmotic flow in the capillary. These tests were made with every BGE solution and detection was carried out at 191, 210, 254, 280 and 290 nm. The basic character of NMF is such that it acts as a proton acceptor from the silanol groups of the capillary wall [3]. Inside the capillary, following proton donation by silanol groups to NMF, the capillary wall has negative charge, which is also confirmed by the elution of negatively charged analytes after EOF when normal polarity is used.

Only NMF provided promising results in the separation of the chelating agents as copper complexes. The better separation in these preliminary experiments was achieved without salt addition at an apparent pH of 10.2. Also several mixtures of solvent and water were tested, but no baseline separation of the analytes was obtained. The following steps were optimizing the length of the capillary, detection wavelength, temperature of the capillary and injection time. Seventy-five micrometers of i.d. capillaries of total length ranging from 60 to 80 cm were tested. Seventy centimeters was adopted as a compromise solution for capillary length enabling the separation of all the considered analytes in a reasonable time span. Although NMF has been recommended by several authors in NACE an obvious drawback of this solvent is the high UV cut-off (250 nm) [8]. However, copper carboxylates are satisfactorily detected at 280 nm in BGEs involving NMF. 25 °C was adopted as optimal for tray and capillary temperatures. A injection time of 3 s was adopted to enhance peak's height without distorting peak shapes. Current observed

in these conditions (+30 kV) was +12  $\mu\text{A}$ . Tests were carried out with samples diluted with water and NMF. Unexpectedly, water proved to perform better than NMF; hence water was used as sample diluent for further experiments.

Fig. 1A shows a typical separation of seven copper complexes obtained in the above described conditions.

### 3.2. Fine tune of the BGE system

As the Fig. 1A shows the peaks of PDTA and EDTA are not separated using only NMF at  $\text{pH}_{\text{app}}$  10.2, further experiments were conducted with the aim of an improved separation allowing the analysis of seven copper complexes of CDTA, DTPA, EDTA, HEDTA, NTA, PDTA and TTHA. Other background electrolytes, including sodium tetraborate and Tris were tested without practical results, only background signal was obtained. Then, injection of salt prior to sample injection, a technique used in a previous paper [29], was tested. In that case, the salt solution used was 10  $\text{mmol L}^{-1}$  sodium bromide in NMF. However, initial results were discouraging because baseline rose clearly

with no improvement of peak's separation. However, it was observed that dissolving even small amounts of sodium bromide into the NMF BGE improved clearly the separation of copper complexes. Concentration of sodium bromide in the BGE was studied in the range 10–50  $\text{mmol L}^{-1}$ , observing that salt concentration improves the separation up to 30  $\text{mmol L}^{-1}$ . Above this concentration, peak height of analytes decrease significantly and some of them (DTPA) even disappear. Fig. 1B show the separation attained for seven copper complexes using 30  $\text{mmol L}^{-1}$  sodium bromide NMF as BGE. Comparing this electropherogram with that shown in Fig. 1A allow easily appreciate the effect of sodium bromide addition, because peaks are clearly sharper and resolution between peaks is better. Also IDA was incorporated to the mixture of analytes although no peak for this chelating agent appeared in electropherograms. Detection problems of CuIDA in basic conditions have also been reported when aqueous capillary electrophoresis was used [32].

Further experiments show a significant interaction between the amount of sodium bromide in the BGE and the concentration of analytes. For example, DTPA peak disappears at concen-

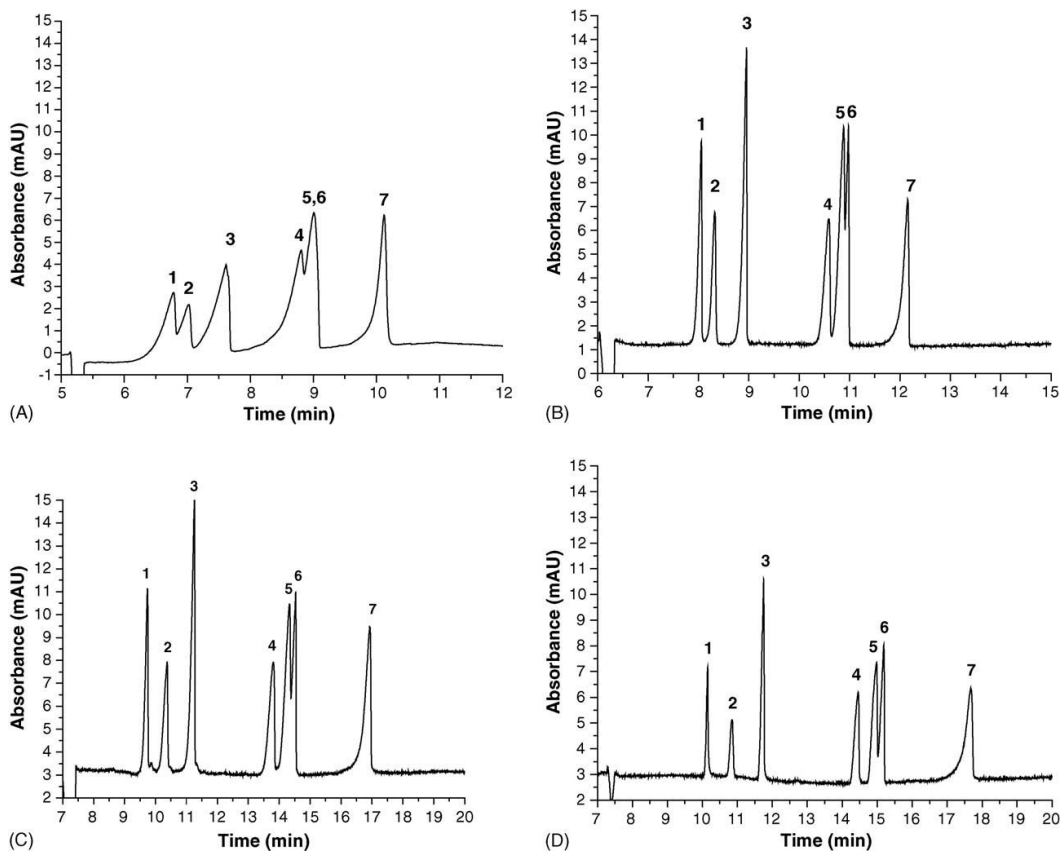


Fig. 1. Electropherograms of sample containing 1.0  $\text{mmol L}^{-1}$  of each complexing agent and 33  $\text{mmol L}^{-1}$  of copper: (A) NMF as electrolyte; (B) 30  $\text{mmol L}^{-1}$  sodium bromide in NMF as electrolyte; (C) 30  $\text{mmol L}^{-1}$  potassium bromide in NMF as electrolyte and (D) 30  $\text{mmol L}^{-1}$  potassium bromide in NMF as electrolyte. Peaks: (1) CuHEDTA; (2) CuNTA; (3) CuTTHA; (4) CuCDTA; (5) CuPDTA; (6) CuEDTA and (7) CuDTPA. Other conditions:  $\text{pH}_{\text{app}}$  10.2, temperature 25 °C, applied voltage +30 kV, in A–C hydrodynamic sample injection for 3 s 50 mbar and in D LVSEP for 10 s 50 mbar, detection at 280 nm.

Table 2

Values of correlation coefficients obtained with optimized method of 30 mM potassium bromide in NMF at pH<sub>app</sub> 10.2

Chelating agent	R <sup>2</sup>	Efficiency plates <sup>a</sup>	Efficiency plates <sup>b</sup>	Efficiency plates <sup>c</sup>
HEDTA	0.997	12560	218103	140502
NTA	0.996	24910	179180	109679
TTHA	0.996	11664	269255	116988
CDTA	0.996	19080	148211	78976
PDTA	0.996	Co-eluted with EDTA	201406	91390
EDTA	0.996	Co-eluted with PDTA	741489	270731
DTPA	0.994 <sup>d</sup>	52324	166930	104337

Calibration included six solutions in the range 0.5–1.75 mmol L<sup>-1</sup>. Efficiencies in the table are obtained with NMF, 30 mM sodium bromide and 30 mM potassium bromide BGEs at pH<sub>app</sub> 10.2; Calibration solutions contained seven chelating agents (CDTA, DTPA, EDTA, HEDTA, NTA, PDTA, TTHA); Efficiency is calculated by using the equation:  $N = 16(t_m/w)^2$ .

<sup>a</sup> BGE used NMF pH<sub>app</sub> 10.2.

<sup>b</sup> BGE used 30 mM sodium bromide in NMF pH<sub>app</sub> 10.2.

<sup>c</sup> BGE used 30 mM potassium bromide in NMF pH<sub>app</sub> 10.2.

<sup>d</sup> Calibration plot drawn with three points (0.5, 1.0 and 1.75 mmol L<sup>-1</sup>).

trations  $\leq 0.5$  mmol L<sup>-1</sup> if sodium bromide was present in the BGE at the 30 mmol L<sup>-1</sup> level. Our results did not allow a clear conclusion about this effect. Ion-pair formation and elution inhibition have been suggested in the literature [5] to justify similar observations.

Two other bromides, potassium bromide and strontium bromide were also tested as additives in NMF, because sodium bromide method was not satisfying. Strontium bromide did not work at all, but potassium bromide at 30 mmol L<sup>-1</sup> produced good separation of the analytes (Fig. 1C) although the total measurement time increases by about 5 min. These tests showed that, the size of the cation in the electrolyte has clear effect to the separation of copper carboxylates. This will be proved more clearly in our further NACE studies, which are unpublished results at the moment, but will be published soon. In the optimized conditions all seven considered analytes may be calibrated in the range 0.5–1.75 mmol L<sup>-1</sup>. Table 2 summarizes the calibration results of final optimized potassium bromide method and comparison of efficiencies calculated between the results obtained with pure NMF, with sodium bromide in NMF and with potassium bromide in NMF.

In the Table 3 the resolutions of the adjacent peaks are represented for seven copper complexes. It is noteworthy that efficiencies and resolutions calculated with sodium bromide in NMF give the highest values, but the method is not as usable as potas-

sium bromide method because the peak of DTPA disappears as discussed above. High values of resolution and efficiencies obtained for sodium bromide method are strongly affected by shorter analysis time and slightly sharper peaks in the electropherogram.

### 3.3. Sample stacking

Large-volume sample stacking using the electroosmotic flow pump has shown in many cases to be a powerful technique to improve detectability of analytes. In our case, LVSEP was tested diluting samples with ultrapure water and with NMF and injecting for 10–30 s. Best results were obtained by diluting samples with water and injecting during 10 s. Higher injection times produced significant losses of resolution. Using 10 s as injection time in stacking mode the peak's heights are lower compared to basic measurement although the resolution between peaks is improved with stacking mode (Fig. 1D). This effect was also confirmed using BGEs not including potassium bromide but, in any case the resolution improvement produced do not justify resorting to this injection technique in routine analysis so further measurements in this study were made without LVSEP.

### 3.4. Comparison of the optimized NACE method and aqueous capillary electrophoresis methods

In our previous study we introduced two aqueous capillary electrophoretic methods for the simultaneous determination of several chelating ligands as copper complexes [29]. In the present NACE method it was possible to use 75  $\mu$ m i.d. capillary, but in the aqueous methods [29] it was not possible, because the current would have risen above the apparatus maximum with the optimized conditions. When these two aqueous methods and the new nonaqueous method introduced in this paper are compared interesting differences are observed. With the nonaqueous method it was not possible to detect IDA, but with the aqueous phosphate method IDA was easily determined. The other peaks appeared in the reverse order in the nonaqueous compared to aqueous phosphate method, but the peaks of NTA and TTHA, appeared in the same order in both methods. This behavior is due

Table 3

Resolution of the adjacent peaks of seven chelating ligands as copper complexes

Adjacent peaks	Resolution (n = 1) <sup>a</sup>	Resolution (n = 1) <sup>b</sup>	Resolution (n = 5) <sup>c</sup>
HEDTA–NTA	1.2	3.6	13.2
NTA–TTHA	2.6	8.4	7.5
TTHA–CDTA	4.4	18.3	6.9
CDTA–PDTA	0.9	2.9	3.6
PDTA–EDTA	Co-eluted	1.3	0.5
EDTA–DTPA	6.3	13.8	11.6

Resolutions were calculated by using equation:  $R_s = 2 \left( \frac{t_2 - t_1}{w_1 + w_2} \right)$ .

<sup>a</sup> BGE used NMF pH<sub>app</sub> 10.2.

<sup>b</sup> BGE used 30 mM sodium bromide in NMF pH<sub>app</sub> 10.2.

<sup>c</sup> BGE used 30 mM potassium bromide in NMF pH<sub>app</sub> 10.2.

Table 4

Comparison of the limits of detection and migration times of the peaks in aqueous and in nonaqueous capillary electrophoretic methods for determination of several copper carboxylate complexes

Chelating agent	LOD <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) [29]	LOD <sup>b</sup> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) [29]	LOD <sup>c</sup> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Time <sup>a</sup> (min) [29]	Time <sup>b</sup> (min) [29]	Time <sup>c</sup> (min)
HEDTA	30	60	13	6.5 (3.3)	7.1 (3.0)	10.0 (2.7)
NTA	80	140	23	5.3 (2.6)	5.6 (2.2)	11.6 (2.8)
TTHA	20	30	9	5.7 (2.9)	6.1 (2.3)	12.7 (3.1)
CDTA	30	50	21	5.0 (2.7)	5.4 (1.8)	13.9 (3.4)
PDTA	60	60	15	4.7 (2.2)	5.0 (1.9)	14.6 (2.8)
EDTA	50	50	15	4.7 (2.2)	4.9 (1.9)	14.7 (2.8)
DTPA	40	60	26	4.3 (2.0)	4.5 (1.6)	16.5 (2.0)

LOD is calculated by using the equation:  $\text{LOD} = 3 \times \text{noise} \times \left( \frac{c}{\text{peak\_height}} \right)$ .

<sup>a</sup> 95 mmol L<sup>-1</sup> aqueous phosphate buffer, pH 7.1, 0.5 mmol L<sup>-1</sup> TTAB as a flow modifier (negative polarity).

<sup>b</sup> 95 mmol L<sup>-1</sup> aqueous phosphate buffer, pH 7.1, 0.5 mmol L<sup>-1</sup> DMDNAB as a flow modifier (negative polarity).

<sup>c</sup> 30 mmol L<sup>-1</sup> potassium bromide in NMF pH<sub>app</sub> 10.2 (positive polarity).

Values in parenthesis are relative standard deviations.

to the change in the properties of these analytes in nonaqueous media. The areas of the peaks were bigger and the peaks were higher with this new NACE method compared to our aqueous methods. Comparisons of migration times and LODs between aqueous and nonaqueous methods are shown in Table 4. The migration times are smaller when using aqueous methods, but the limits of detections are clearly smaller with the new NACE method.

### 3.5. Analysis of natural water samples

Finally the optimized NACE method was tested with natural water sample. The water sample was from Lake Jyväsjärvi (collected 10.11.2005) in Jyväskylä. The lake water did not contain measurable concentrations of CDTA, DTPA, EDTA, HEDTA, NTA, PDTA and TTHA so standard addition tests were made ( $n=3$ ). The concentration of chelating agents added to natural water samples was 0.8 mmol L<sup>-1</sup> and recoveries for copper complexes of CDTA, DTPA, EDTA, HEDTA, NTA, PDTA and TTHA were  $95 \pm 6$ ,  $92 \pm 8$ ,  $99 \pm 5$ ,  $98 \pm 6$ ,  $97 \pm 6$ ,  $98 \pm 7$ ,  $99 \pm 4\%$ , respectively. The new NACE method found to be accurate and precise. On the grounds of the measurements done with the lake water the optimized method is suitable for the analysis of real water samples.

## 4. Conclusions

In this study nonaqueous capillary electrophoresis was applied for the first time to separate the most environmentally relevant chelating ligands. Thirty millimole per liter of potassium bromide in NMF at pH<sub>app</sub> of 10.2, was successfully applied as BGE for the separation and detection of CDTA, DTPA, EDTA, HEDTA, NTA, PDTA and TTHA as copper complexes. Excellent resolution between peaks was obtained except for PDTA and EDTA. Even in that case, resolution is sufficient to allow quantitative measurements. LODs for all the analytes were consistently lower than those reported using aqueous CE thus making the NACE alternative a practical approach for environmental studies, also shown with the tests of lake water samples. Moreover, the whole separation can be carried out in less than 20 min.

## Acknowledgements

P.-L.L. acknowledges European Science Foundation Cost Action D32/005/04 for supporting her short term visit to the University of Santiago de Compostela. Studies carried out during this visit were supported by Spanish Ministry of Education and Science (project BQU2003-02090) and the Xunta de Galicia (project PGIDT04PXIC23701PN).

## References

- [1] M.-L. Riekkola, *Electrophoresis* 23 (2002) 3865.
- [2] M. Fillet, A.-C. Servais, J. Crommen, *Electrophoresis* 24 (2003) 1499.
- [3] M.-L. Riekkola, M. Jussila, S.P. Porras, I.E. Valkó, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 155.
- [4] M. Vaheer, M. Koel, M. Kaljurand, *J. Chromatogr. A* 979 (2002) 27.
- [5] S.P. Porras, M.-L. Riekkola, E. Kenndler, *Electrophoresis* 23 (2002) 367.
- [6] S.P. Porras, M.-L. Riekkola, E. Kenndler, *Electrophoresis* 24 (2003) 1485.
- [7] M.D. Cantu, S. Hillebrand, E. Carrillo, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 99.
- [8] L. Geiser, S. Cherkaoui, J.-L. Veuthey, *J. Chromatogr. A* 979 (2002) 389.
- [9] E. Blanco, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 189.
- [10] A.M. Desbène, L. Geulin, C.J. Morin, P.L. Desbène, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 159.
- [11] H. Sirén, R. Kuldvee, T. Karla, T. Ekström, M.-L. Riekkola, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 89.
- [12] M. Vaheer, M. Koel, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 83.
- [13] F. Qu, J.-M. Lin, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 169.
- [14] F. Cañada-Cañada, A. Kasselouri, P. Prognon, P. Maillard, D.S. Grierson, S. Descroix, M. Taverna, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 123.
- [15] J. Rodríguez-Flores, J.J. Berzas Nevado, A.M. Contento Salcedo, M.P. Cabello Díaz, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 175.
- [16] M. Vaheer, M. Koel, M. Kaljurand, *Electrophoresis* 23 (2002) 426.
- [17] S. Cherkaoui, J.-L. Veuthey, *J. Chromatogr. A* 874 (2000) 121.
- [18] F. Menzinger, P. Schmitt-Kopplin, M. Frommberger, D. Freitag, A. Ketrup, *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001) 25.
- [19] S.J. Carter, X.-F. Li, J.R. Mackey, S. Modi, J. Hanson, N.J. Dovichi, *Electrophoresis* 22 (2001) 2730.
- [20] E.F. Hilder, C.W. Klampff, W. Buchberger, P.R. Haddad, *Electrophoresis* 23 (2002) 414.
- [21] S. Palonen, M. Jussila, S.P. Porras, T. Hyötyläinen, M.-L. Riekkola, *Electrophoresis* 23 (2002) 393.
- [22] J.L. Miller, D. Shea, M.G. Khaleedi, *J. Chromatogr. A* 888 (2000) 251.

- [23] D. Barrón, A. Irlas, J. Barbosa, *J. Chromatogr. A* 871 (2000) 367.
- [24] S. Cherkaoui, J.-L. Veuthey, *Electrophoresis* 23 (2002) 442.
- [25] S. Palonen, M. Jussila, S.P. Porras, M.-L. Riekkola, *Electrophoresis* 25 (2004) 344.
- [26] J.-M. Lin, M. Nakagawa, K. Uchiyama, T. Hobo, *Electrophoresis* 23 (2002) 421.
- [27] B. Kim, D.S. Chung, *Electrophoresis* 23 (2002) 49.
- [28] P.-L. Laamanen, A. Mali, R. Matilainen, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 1264.
- [29] P.-L. Laamanen, S. Busi, M. Lahtinen, R. Matilainen, *J. Chromatogr. A* 1095 (2005) 164.
- [30] Z. Zhu, L. Zhang, A. Marimuthu, Z. Yang, *Electrophoresis* 23 (2002) 2880.
- [31] S.P. Porras, E. Kenndler, *J. Chromatogr. A* 1037 (2004) 455.
- [32] N.E. Ballou, G.R. Ducatte, C. Quang, V.T. Remcho, *J. High Resol. Chromatogr.* 19 (1996) 183.



