



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

Desarrollo y evaluación de nuevas estrategias  
para la miniaturización de la preparación de la  
muestra

Lorena Vidal Martínez

Tesis

**Doctorales**

[www.eltallerdigital.com](http://www.eltallerdigital.com)

UNIVERSIDAD de ALICANTE



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

Universidad de Alicante

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología



**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE NUEVAS  
ESTRATEGIAS PARA LA MINIATURIZACIÓN DE  
LA PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

TESIS DOCTORAL

LORENA VIDAL MARTÍNEZ

Alicante, febrero de 2009





Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

Universidad de Alicante

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología



**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE NUEVAS  
ESTRATEGIAS PARA LA MINIATURIZACIÓN DE  
LA PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

Memoria presentada por LORENA VIDAL MARTÍNEZ  
para la obtención del título de Doctor en Química,  
(modalidad de Doctorado Europeo)

Alicante, febrero de 2009





Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

Departament de Química Analítica, Nutrició i Bromatologia

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

JOSÉ MARÍA SANTIAGO PÉREZ

Director del Departamento de Química Analítica,  
Nutrición y Bromatología de la Facultad de  
Ciencias de la Universidad de Alicante,

Certifica que,

Dña. LORENA VIDAL MARTÍNEZ ha realizado bajo la dirección de los profesores Dr. D. ANTONIO CANALS HERNÁNDEZ y Dra. Dña. NURIA GRANÉ TERUEL, el trabajo bibliográfico y experimental correspondiente a la obtención del Grado de Doctor en Química (modalidad de Doctorado Europeo) sobre el tema: **“Desarrollo y evaluación de nuevas estrategias para la miniaturización de la preparación de la muestra”**.

Alicante, enero de 2009

Fdo. Dr. José María Santiago Pérez



Los profesores Dr. D. ANTONIO CANALS HERNÁNDEZ y Dra. Dña. NURIA GRANÉ TERUEL del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Alicante, en calidad de Directores de la Tesis Doctoral (modalidad de Doctorado Europeo) presentada por Dña. LORENA VIDAL MARTÍNEZ, con el título **“Desarrollo y evaluación de nuevas estrategias para la miniaturización de la preparación de la muestra”**.

Certifican que,

la citada Tesis Doctoral se ha realizado en los laboratorios del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Alicante, en los laboratorios del Departamento de Ingeniería Medioambiental de la Universidad Técnica de Creta (Grecia) y en los laboratorios del Departamento de Química de la Universidad de Bath (Inglaterra), y que, a su juicio, reúne los requisitos necesarios exigidos en este tipo de trabajos.

Alicante, enero de 2009

Fdo. D. Antonio Canals Hernández

Fdo. Dña. Nuria Grané Teruel







*"Empieza por hacer lo necesario, luego lo que es posible y de pronto estarás haciendo lo imposible"*

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Con estas palabras me gustaría dar las gracias a las personas que me han dado la oportunidad de trabajar a su lado, ofreciéndome conocimientos y experiencias que me han enriquecido tanto a nivel científico como personal, y que me han ayudado a llegar hasta aquí.

A los que han aportado su granito de arena al trabajo realizado en este tiempo, sin cuya contribución todo hubiera resultado más complicado.

Y no puedo dejar de mencionar a toda la gente que me ha rodeado durante estos años, afortunadamente muchos de ellos todavía lo siguen haciendo, compartiendo los buenos momentos y soportándome en los malos ratos.





Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **ÍNDICES**

---



# ÍNDICE GENERAL

<b>I. OBJETO/OBJECT .....</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>7</b>
<b>II.1. Preparación de la muestra .....</b>	<b>9</b>
<b>II.2. Técnicas de extracción .....</b>	<b>16</b>
II.2.1. Extracción en fase gaseosa .....	17
II.2.1.1. Extracción en espacio de cabeza .....	17
II.2.1.1.1. Espacio de cabeza estático .....	17
II.2.1.1.2. Espacio de cabeza dinámico .....	19
II.2.2. Extracción con membrana .....	20
II.2.3. Extracción con un material sorbente .....	24
II.2.3.1. Atrapamiento en tubo abierto .....	25
II.2.3.2. Extracción en fase sólida .....	28
II.2.3.3. Microextracción en fase sólida .....	30
II.2.3.4. Extracción por sorción en barra agitadora .....	33
II.2.4. Extracción con un disolvente .....	34
II.2.4.1. Extracción líquido-líquido convencional .....	35
II.2.4.2. Extracción líquido-líquido en vial .....	37
II.2.4.3. Microextracción en fase líquida .....	38
II.2.4.3.1. Microextracción en fibra hueca .....	39
II.2.4.3.2. Microextracción en gota .....	43
<b>II.3. Microextracción en gota .....</b>	<b>44</b>
II.3.1. Evolución y modos de extracción .....	44
II.3.2. Aspectos teóricos .....	53
II.3.2.1. Modalidad de inmersión directa .....	53
II.3.2.2. Modalidad de espacio de cabeza .....	57
II.3.3. Parámetros que afectan a la microextracción en gota ...	62
II.3.3.1. Fuerza iónica .....	62
II.3.3.2. pH de la muestra .....	62
II.3.3.3. Agitación de la muestra .....	63
II.3.3.4. Disolvente de extracción .....	63
II.3.3.5. Tiempo de extracción .....	64



II.3.3.6. Volumen de gota .....	64
II.3.3.7. Temperatura .....	65
II.3.3.8. Volumen del espacio de cabeza y forma del vial.....	65
II.3.3.9. Adición de disolvente .....	66
<b>II.4. Líquidos iónicos como fase extractante .....</b>	<b>67</b>
<b>II.5. Radiación de microondas para favorecer la extracción ...</b>	<b>72</b>
II.5.1. Fundamentos del calentamiento con energía microondas.....	72
II.5.2. Uso de la radiación de microondas en técnicas de microextracción.....	76
<b>II.6. Nuevos materiales como fase extractante: Nanomateriales de carbón .....</b>	<b>80</b>
<b>II.7. Diseño estadístico de experimentos .....</b>	<b>83</b>
II.7.1. Diseño factorial .....	87
II.7.1.1. Diseño factorial con niveles mixtos .....	88
II.7.2. Diseño factorial fraccionado.....	88
II.7.2.1. Diseño de Plackett-Burman.....	90
II.7.3. Diseño central compuesto .....	91
<b>II.8. Analitos objeto de estudio .....</b>	<b>94</b>
II.8.1. Clorobencenos.....	94
II.8.2. Benzofenona-3 .....	96
II.8.3. Triclosán.....	98
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>101</b>
<b>III. HERRAMIENTAS ANALÍTICAS .....</b>	<b>121</b>
<b>III.1. Estándares y reactivos .....</b>	<b>124</b>
III.1.1. Analitos.....	124
III.1.2. Fases extractantes.....	124
III.1.3. Reactivos .....	125
III.1.4. Muestras reales .....	126
III.1.5. Otros reactivos.....	127
<b>III.2. Instrumentos .....</b>	<b>127</b>

III.2.1. Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas .....	128
III.2.2. Cromatógrafo de líquidos con un detector espectrofotométrico de fila de diodos .....	128
III.2.3. Sistema potencióstato .....	128
III.2.4. Otros instrumentos .....	129
<b>III.3. Aparatos .....</b>	<b>130</b>
III.3.1. Agitador magnético y placa calefactora .....	130
III.3.2. Baño de ultrasonidos.....	130
III.3.3. Microondas doméstico .....	130
III.3.4. Centrífuga .....	131
<b>III.4. Programas estadísticos .....</b>	<b>131</b>
<b>IV. PARTE EXPERIMENTAL, RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>133</b>
<b>Capítulo 1. Microextracción en gota.....</b>	<b>135</b>
IV.1. Headspace single-drop microextraction for the analysis of chlorobenzenes in water samples .....	138
<b>Capítulo 2. Líquidos iónicos como fase extractante .....</b>	<b>155</b>
IV.2.1. An ionic liquid as a solvent for headspace single drop microextraction of chlorobenzenes from water samples.....	159
IV.2.2. Sensitive determination of free benzophenone-3 in human urine samples based on an ionic liquid as extractant phase in single-drop microextraction prior to liquid chromatography analysis .....	180
<b>Capítulo 3. Radiación de microondas para favorecer la extracción.....</b>	<b>203</b>
IV.3. Microwave-assisted headspace single-drop microextraction of chlorobenzenes from water samples .....	206
<b>Capítulo 4. Nuevos materiales como fase extractante:</b>	
<b>Nanomateriales de carbón .....</b>	<b>225</b>
IV.4. Chemically surface-modified carbon nanoparticle carrier for phenolic pollutants: Extraction and electrochemical determination of benzophenone-3 and triclosan .....	228

<b>V. DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS/GENERAL DISCUSSION OF THE RESULTS.....</b>	<b>251</b>
<b>V.1. Elementos comunes de la memoria .....</b>	<b>254</b>
<b>V.2. Elementos no comunes de la memoria.....</b>	<b>263</b>
<b>V.1. Common elements of the overview.....</b>	<b>273</b>
<b>V.2. Non common elements of the overview.....</b>	<b>281</b>
<b>VI. CONCLUSIONES GENERALES/GENERAL CONCLUSIONS .....</b>	<b>291</b>
<b>VII. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN/FUTURE WORKS.....</b>	<b>299</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>305</b>
<b>A. Coeficientes de partición octanol-agua de los analitos (<math>K_{o/w}</math>) .....</b>	<b>307</b>
<b>B. Comunicaciones a congresos.....</b>	<b>311</b>
<b>C. Otras publicaciones.....</b>	<b>315</b>





## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de los distintos caminos desde la muestra hasta el instrumento utilizado en la medición de la señal analítica.....	10
<b>Figura 2.</b> Número de publicaciones aparecidas en la década 1997-2007 relacionadas con la preparación de la muestra .....	12
<b>Figura 3.</b> Número de publicaciones aparecidas en la década 1997-2007 relacionadas con la preparación de la muestra y agrupados por el tipo de la misma .....	12
<b>Figura 4.</b> Número de publicaciones relacionadas con los diferentes tipos de métodos utilizados en la preparación de la muestra aparecidas en la década 1997-2007 .....	14
<b>Figura 5.</b> Esquema de la modalidad de espacio de cabeza .....	18
<b>Figura 6.</b> Sistema de purga y trampa. (a) Proceso de transferencia de los analitos volátiles a la trampa; (b) transferencia de los analitos volátiles desde la trampa hasta el cromatógrafo de gases .....	19
<b>Figura 7.</b> Sistema comercial de purga y trampa .....	20
<b>Figura 8.</b> Principio de funcionamiento de la separación mediante membrana (las esferas representan el analito) .....	21
<b>Figura 9.</b> Configuraciones de los módulos de membrana. (a) Membrana en la muestra (MIS); (b) muestra en la membrana (SIM) .....	22
<b>Figura 10.</b> (a) Acoplamiento con el espectrómetro de masas (MIMS); (b) acoplamiento con el sistema cromatográfico (MESI), en la modalidad de espacio de cabeza.....	23
<b>Figura 11.</b> Esquema de una trampa tubular rellena con tres tipos diferentes de partículas sorbentes.....	25
<b>Figura 12.</b> Modos de extracción en tubo. (a) Modo pasivo; (b) modo activo .....	26
<b>Figura 13.</b> Modos de disposición del sorbente. (a) Sorbente dispuesto sobre una barra de sílice fundida; (b) sorbente recubriendo el interior de un capilar .....	27
<b>Figura 14.</b> Cartuchos y discos empleados en la extracción en fase sólida.....	28
<b>Figura 15.</b> Etapas principales de la extracción en fase sólida (las esferas representan el analito y los cuadrados y triángulos a las interferencias) .....	29
<b>Figura 16.</b> Dispositivo de SPME comercializado por Supelco.....	30
<b>Figura 17.</b> Etapas del proceso de extracción mediante SPME .....	31
<b>Figura 18.</b> Modos de extracción de SPME. (a) Modo de inmersión directa; (b) Modo de espacio de cabeza; (c) Modo de inmersión directa con membrana .....	32
<b>Figura 19.</b> Esquema de una barra agitadora utilizada en SBSE.....	33
<b>Figura 20.</b> Extracción líquido-líquido convencional mediante agitación en embudo de decantación.....	35

<b>Figura 21.</b> Etapas de la extracción líquido-líquido en vial con membrana .....	38
<b>Figura 22.</b> Sección transversal de la fibra hueca en el interior de la fase acuosa en un sistema de dos fases (a) y tres fases (b) .....	40
<b>Figura 23.</b> Representación esquemática de la configuración en la que la fibra está sostenida por dos agujas convencionales .....	41
<b>Figura 24.</b> Representación esquemática de la configuración en la que la aguja de una microjeringa sostiene la fibra y uno de los extremos está en contacto con la disolución dadora .....	42
<b>Figura 25.</b> Representación esquemática de la SBME .....	43
<b>Figura 26.</b> Esquema del sistema de microextracción en gota diseñado por Liu y Dasgupta .....	44
<b>Figura 27.</b> Ilustración del sistema de microextracción en gota empleado por Jeannot y Cantwell .....	45
<b>Figura 28.</b> Esquema del sistema de microextracción en gota modificado por Jeannot y Cantwell .....	46
<b>Figura 29.</b> Esquema de microextracción en gota, en la modalidad de espacio de cabeza.....	47
<b>Figura 30.</b> Etapas de la microextracción en gota dinámica. (a) Introducción de la fase orgánica en la jeringa; (b) introducción de una porción de la fase acuosa en el interior de la jeringa; (c) expulsión de la fase acuosa .....	48
<b>Figura 31.</b> Esquema del sistema de microextracción líquido-líquido-líquido en gota diseñado por Ma y Cantwell .....	49
<b>Figura 32.</b> Esquema de la LLLME modificada .....	49
<b>Figura 33.</b> Sistema de microextracción en flujo continuo. (1) Tubo de PEEK, insertado en la cámara de extracción; (2) punta de pipeta modificada; (3) cierre; (4) entrada a la cámara de extracción; (5) cámara de extracción de vidrio; (6) microjeringa; (7) gota de disolvente; (8) muestra.....	50
<b>Figura 34.</b> Esquema de la DSDME.....	51
<b>Figura 35.</b> Nuevos dispositivos utilizados en SDME.....	52
<b>Figura 36.</b> Diagrama simplificado del sistema de transporte del analito entre las tres fases y las áreas interfaciales ( $A_{og}$ =orgánica/gaseosa; $A_{ga}$ =gaseosa/acuosa)..	58
<b>Figura 37.</b> Cationes de algunos de los líquidos iónicos más estudiados. (a) 1-alkuil-3-metilimidazolio; (b) N-alkuilpiridinio; (c) tetraalkuilamonio; (d) tetraalkuilfosfonio. ( $R_{1,2,3,4}$ = Alquil) .....	67
<b>Figura 38.</b> Sistema de microextracción en gota utilizado con líquidos iónicos: (a) Modalidad de inmersión directa y; (b) de espacio de cabeza .....	70
<b>Figura 39.</b> Espectro electromagnético .....	73
<b>Figura 40.</b> Calentamiento convencional (a) y por microondas (b) .....	75

<b>Figura 41.</b> Sistema de microextracción en fibra asistida por microondas.....	78
<b>Figura 42.</b> Sistema de SPME asistida por microondas (comercial).....	78
<b>Figura 43.</b> Sistema de microextracción en gota asistida por microondas.....	79
<b>Figura 44.</b> Esquema general de un proceso o sistema.....	83
<b>Figura 45.</b> Superficie de respuesta tridimensional .....	92
<b>Figura 46.</b> Estructura química de los diez clorobencenos estudiados .....	95
<b>Figura 47.</b> Estructura química del filtro UV BZ3 .....	97
<b>Figura 48.</b> Estructura química del triclosán .....	98
<b>Figura 49.</b> Imagen TEM de las nanopartículas de carbón .....	125
<b>Figura 50.</b> Electrodo de trabajo. (a) Grafito pirolítico; (b) carbón vítreo .....	129
<b>Figura 51.</b> Esquema de los elementos diferenciadores entre los capítulos de la presente memoria .....	264



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante





## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Propiedades físicas de los ILS más utilizados en química analítica .....	68
<b>Tabla 2.</b> Diseño de Plackett-Burman para $N = 12$ y $k = 11$ .....	90
<b>Tabla 3.</b> Datos representativos de los métodos desarrollados en la presente memoria .....	256
<b>Tabla 4.</b> Figuras de mérito de los métodos desarrollados para los diferentes analitos.....	259
<b>Tabla 5.</b> Recuperaciones relativas (%).....	262
<b>Tabla 6.</b> Condiciones de separación utilizadas en cromatografía de líquidos.....	270



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



## GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ACRÓNIMOS

ANOVA	Ánàlisis de varianza / Analysis of variance
ASPD	Dispersi3n en fase s3lida vesicular / Ad-vesicle solid-phase dispersion
BTEX	Benceno, tolueno, etilbenceno y o-, m- y p-xileno / Benzene, toluene, ethylbenzene and o-, m- and p-xylene
BZ3	Benzofenona-3 / Benzophenone-3
C8	Fase estacionaria octil / Octil stationary phase
C18	Fase estacionaria octadecil / Octadecil stationary phase
Carboxen-PDMS	Carboxen-polidimetilsiloxano / Carboxen-polydimethylsiloxane
CCCD	Diseño central compuesto circunscrito / Circumscribed central composite design
CCD	Diseño central compuesto / Central composite design
CE	Electroforesis capilar / Capilar electrophoresis
[C <sub>4</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ]	1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato / 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate
[C <sub>6</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ]	1-hexil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato / 1-hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate
[C <sub>8</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ]	3-metil-1-octilimidazolio hexafluorofosfato / 3-methyl-1-octylimidazolium hexafluorophosphate
CNTs	Nanotubos de carb3n / Carbon nanotubes
CPE	Extracci3n en punto de niebla / Cloud point extraction
CW-DVB	Carbowax-divinilbenceno / Carbowax-divinylbenzene
CW-TPR	Carbowax-resina templada / Carbowax-template resin
DBB	Dibromobenceno / Dibromobenzene
DCB	Diclorobenceno / Dichlorobenzene

DSDME	Microextracción en gota directamente suspendida / Directly suspended droplet microextraction
DVB-carboxen-PDMS	Divinilbenceno-carboxen-polidimetilsiloxano / Divinylbenzene-carboxen-polydimethylsiloxane
ECD	Detector de captura electrónica / Electron capture detector
EPA	Agencia de protección medioambiental americana / Environmental protection agency
EtOH	Etanol / Ethanol
FEGSEM	Microscopio electrónico de barrido con cátodo de emisión en campo / Field emission gun scanning electron microscope
GC	Cromatografía de gases / Gas chromatography
HAc	Ácido acético / Acetic acid
HCB	Hexaclorobenceno / Hexachlorobenzene
HF-LPME	Microextracción líquida en fibra hueca / Hollow fiber liquid-phase microextraction
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución / High performance liquid chromatography
HS	Espacio de cabeza / Headspace
ILs	Líquidos iónicos / Ionic liquids
LC	Cromatografía de líquidos / Liquid chromatography
LLE	Extracción líquido-líquido / Liquid-liquid extraction
LLLME	Microextracción líquido-líquido-líquido / Liquid-liquid- liquid microextraction
LOD	Límite de detección / Limit of detection
LOQ	Límite de cuantificación / Limit of quantification
LPME	Microextracción en fase líquida / Liquid phase microextraction
MeCN	Acetonitrilo / Acetonitrile

MESI	Sistema de membrana acoplado a un cromatógrafo de gases / Membrane extraction with sorbent interface
MIMS	Sistema de membrana acoplado a un espectrómetro de masas / Membrane introduction mass spectrometry
MIPS	Polímeros de impresión molecular / Molecular imprinted polymers
MIS	Membrana en la muestra / Membrane in sample
MS	Espectrometría de masas / Mass spectrometry
MW	Microondas / Microwaves
OTT	Atrapamiento en tubo abierto / Open tubular trap
PA	Poliacrilato / Polyacrylate
PCB	Pentaclorobenceno / Pentachlorobenzene
PCDDs	Policlorodibenzo-p-dioxinas / Polychlorodibenzo-p-dioxins
PCDFs	Policlorodibenzofuranos / Polychlorodibenzofuranes
PCP	Productos de cuidado personal / Personal care products
PDA	Detector de espectrofotométrico de fila de diodos / Photodiode array detector
PDMS	Polidimetilsiloxano / Polydimethylsiloxane
PDMS-DVB	Polidimetilsiloxano-divinilbenceno / Polydimethylsiloxane-divinylbenzene
PEEK	Polieteretercetona / Polyetheretherketone
PTFE	Politetrafluoroetileno / Polytetrafluoroethylene
PVC	Policloruro de vinilo / Polychloride vinyl
r	Coefficiente de correlación / Correlation coefficient
r <sup>2</sup>	Coefficiente de determinación / Determination coefficient
RSD	Desviación estándar relativa / Relative standard deviation

RTILs	Líquidos iónicos a temperatura ambiente / Room-temperature ionic liquids
SAXS	Dispersión de rayos X de ángulo pequeño / Small-angle X-ray scattering
SBME	Microextracción en barra solvente / Solvent bar microextraction
SBSE	Extracción por sorción en barra agitadora / Stir-bar sorptive extraction
SCE	Electrodo de calomelanos saturado / Saturated calomel electrode
SD	Desviación estándar / Standard deviation
SDME	Microextracción en gota / Single-drop microextraction
SIM	Muestra en la membrana / Sample in membrane
SIM	Monitorización selectiva de iones / Selective ion monitoring
S/N	Relación señal-ruido / Signal-to-noise ratio
SPE	Extracción en fase sólida / Solid-phase extraction
SPMDs	Sistemas de membrana semipermeable / Semi-permeable membrane devices
SPME	Microextracción en fase sólida / Solid phase microextraction
TAS	Sistema analítico total / Total analytical system
TCB	Triclorobenceno / Trichlorobenzene
TeCB	Tetraclorobenceno / Tetrachlorobenzene
TEM	Microscopía electrónica de transmisión / Transmission electron microscopy
UV	Ultravioleta / Ultraviolet
VOC	Compuesto orgánico volátil / Volatile organic compound
WAXS	Difusión de rayos X de ángulo ancho / Wide-angle X-ray scattering









Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **I. OBJETO/OBJECT**

---



El continuo aumento en la demanda de métodos cada día más rápidos, baratos, sencillos y respetuosos con el medio ambiente ha favorecido el desarrollo de los sistemas miniaturizados de preparación de la muestra. De esta forma, la finalidad de la presente memoria consiste en desarrollar y evaluar nuevas estrategias, así como avanzar en otras ya existentes, para la miniaturización de la preparación de la muestra que presenten el mayor número posible de las características anteriormente indicadas.

Para tal fin se ha estudiado en profundidad la técnica de microextracción en gota y se han presentando algunas variantes. La primera de ellas consiste en el empleo de diferentes líquidos iónicos como fase extractante con el objetivo de eliminar los disolventes orgánicos y convertirla en una técnica más ecológica. La segunda variante presenta el uso de la radiación de microondas para favorecer la extracción, debido a que es un modo de calentamiento rápido y focalizado, calentando únicamente la muestra. Se presenta un sistema en el que el calentamiento y la extracción se realizan en una única etapa. Para realizar la evaluación de estas nuevas estrategias, la técnica ha sido aplicada en sus dos modalidades de extracción (espacio de cabeza e inmersión directa) a diferentes tipos de muestras de aguas y biológicas para la determinación de analitos de diferente naturaleza.

Por otro lado, se ha presentado un nuevo material extractante siguiendo la línea de miniaturización de la memoria. La eficacia del material se ha evaluado realizando el estudio de extracción de dos compuestos orgánicos en disolución acuosa.

En general, todos los objetivos (generales y parciales) marcados se han ido materializando a lo largo del desarrollo de esta memoria con un alto grado de satisfacción.

The increasing demand for faster, cheaper, easier and environmentally-friendly methods has favored the miniaturization of systems for sample preparation. For this reason, the main purpose of the present overview concerns the development and evaluation of new strategies, and improvement of other previously-developed ones, for the miniaturization of sample preparation with the previously-indicated characteristics.

In order to fulfill these aims, the single-drop microextraction technique has been studied in-depth and some variations have been presented. The first variation involves using different ionic liquids in order to eliminate organic solvents and thereby make the technique more ecological. The second variation proposes microwave radiation in order to improve extraction, as it is a fast and focused heating source, which only heats the sample. A single-step heating and extraction system is presented. To evaluate these new strategies, the technique has been applied in two extraction modes (direct immersion and headspace) to different samples, such as aqueous and biological, and to the determination of different analytes.

Furthermore, a new extractant material is discussed within the miniaturization context of this overview. The efficiency of the material has been evaluated through extraction studies of two organic compounds from water samples.

On the whole, all the established goals (general and partial) have been achieved during this work, and are highly satisfactory.







Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **II. INTRODUCCIÓN GENERAL**

---





## II.1. Preparación de la muestra

El objetivo de todo estudio analítico consiste en tratar de obtener información (bio)química de calidad, tanto de naturaleza parcial (presencia/concentración/estructura en muestras de analitos o especies bio(químicas)) como de naturaleza global en materiales o sistemas de naturaleza muy diversa (química, bioquímica y biológica) en el espacio y en el tiempo [1]. A pesar del arsenal tan sofisticado de técnicas analíticas de las que disponemos hoy día, solo es posible obtener información directamente para un número reducido de muestras. La mayor parte de la instrumentación actual no ha sido desarrollada para el análisis directo de la muestra, de modo que ha de ser tratada previamente.

El proceso analítico total incluye una serie de etapas de gran importancia como son: muestreo, preparación de la muestra, identificación, cuantificación y tratamiento de los datos. Es importante tener en mente que estas etapas son consecutivas y que para pasar a la siguiente es necesario que la anterior sea completada. Si una de las etapas no es realizada correctamente el rendimiento total del proceso puede ser bajo, pueden introducirse errores y, consecuentemente, puede esperarse inconsistencia en los resultados.

La etapa de la preparación de la muestra es una de las etapas clave y más crítica del proceso analítico total. De hecho la sofisticación y la capacidad de identificación y/o cuantificación de la instrumentación actual contrastan con la lentitud y laboriosidad de los procedimientos de tratamiento de muestra convencionales. Por ello, podemos concluir que la preparación de la muestra es hoy día el talón de Aquiles del proceso analítico total.

Una posible definición para la preparación de la muestra podría ser: "la preparación de la muestra consiste en convertir una matriz real en una forma adecuada para su análisis". Para lograr este objetivo, el estado físico de la muestra debe ser el adecuado atendiendo a los requerimientos de la técnica seleccionada. La [Figura 1](#) muestra un esquema con las diferentes posibilidades que se pueden encontrar.

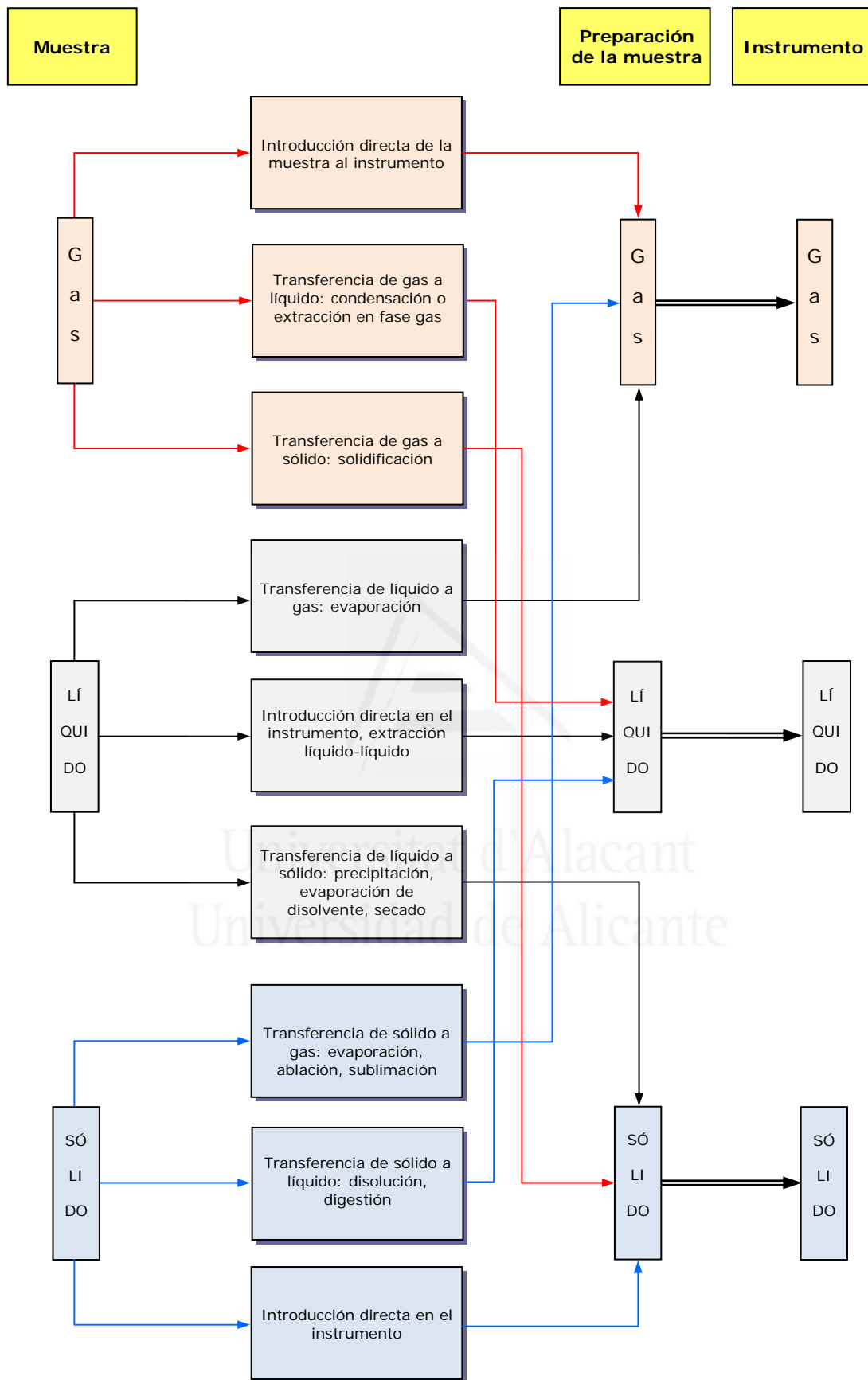


Figura 1. Esquema de los distintos caminos desde la muestra hasta el instrumento utilizado en la medición de la señal analítica. (Fuente: referencia 45).

El conjunto de técnicas para la preparación de la muestra es muy amplio y comprende desde aquellas basadas en operaciones clásicas (por ejemplo, filtración, calcinación o centrifugación), muchas de las cuales no han cambiado durante los últimos cincuenta años, a técnicas más recientes desarrolladas en los últimos años. Debido al gran número de problemas estudiados y al gran número de matrices disponibles es imposible realizar un esquema detallado de todos los procedimientos utilizados para la preparación de la muestra; sin embargo, sí es posible resumir los objetivos de todos los métodos de preparación de la muestra en tres generales y fundamentales:

- i. *Acondicionar la muestra*: Adaptar las características físicas y/o químicas de la muestra a los requerimientos del instrumento de medida (Figura 1).
- ii. *Eliminación de especies interferentes*: Enmascaramiento o técnicas de separación (e.g., adsorción, absorción, lixiviación, extracción por fluidos supercríticos, diálisis, extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida, precipitación, etc.)
- iii. *Operaciones adicionales*: Dilución, preconcentración, transformaciones químicas, derivatización, etc.

La preparación de la muestra está en continua evolución debido al elevado consumo de tiempo, muestra y reactivos, en algunos casos caros y/o tóxicos, requiere de un analista experto y es la causa más frecuente de pérdida y contaminaciones. Por ello, la tendencia actual es eliminar todos o parte de estos problemas o, al menos, reducirlos. El interés por el desarrollo de nuevas técnicas de preparación de la muestra o la modificación de las ya existentes con la finalidad de hacerlas más rápidas, potentes y versátiles se ha visto incrementado en los últimos años. El aumento del interés de los investigadores puede observarse en el incremento del número de publicaciones relacionadas con la preparación de la muestra que han aparecido en los últimos diez años (Figura 2).

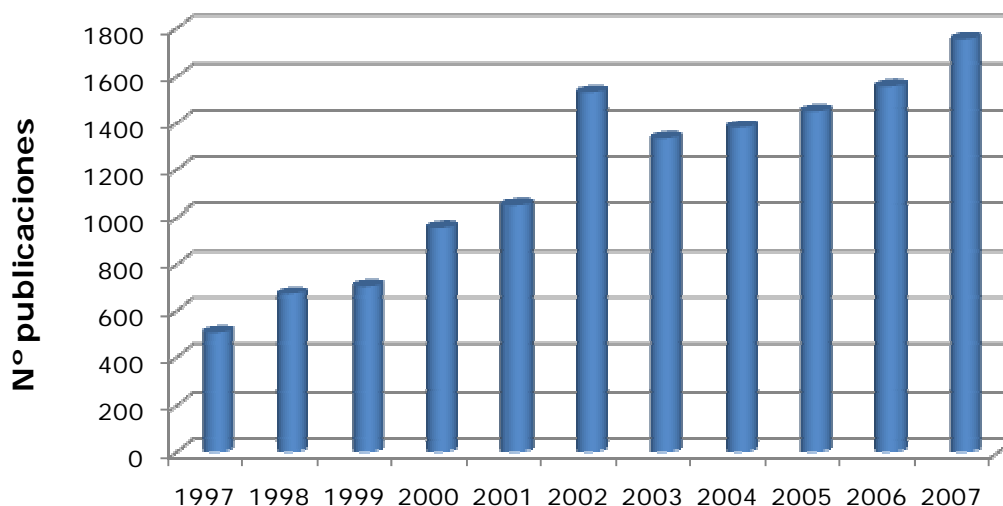


Figura 2. Número de publicaciones aparecidas en la década 1997-2007 relacionadas con la preparación de la muestra (Fuente: SciFinder Scholar® 2007; palabra clave: "Sample preparation").

La Figura 3 muestra los trabajos publicados sobre el mismo tema y durante la misma década pero agrupados por el tipo de muestra (i.e., biológicas, aguas, aire, suelos, y residuos). En la figura se puede observar que el mayor número de publicaciones está dedicado a la preparación de muestras de tipo biológico, seguido de muestras de aguas, aire, suelos y, finalmente, residuos.

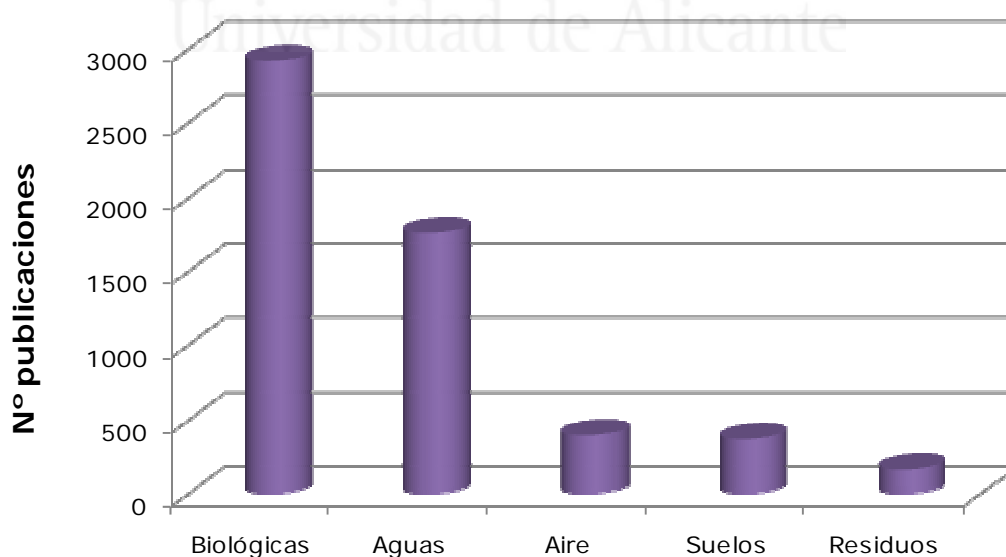


Figura 3. Número de publicaciones aparecidas en la década 1997-2007 relacionadas con la preparación de la muestra y agrupados por el tipo de la misma (Fuente: SciFinder Scholar® 2007).

Dos de las tendencias actuales que más se han desarrollado durante los últimos años son la automatización [2,3] y la miniaturización [4,5] de la preparación de la muestra.

La automatización es una tendencia común en todas las áreas de la química analítica. El objetivo de la misma consiste en desarrollar procesos "on-line" o "in-line" en los cuales el analista tiene un mínimo contacto con la muestra, eliminando así algunas de las desventajas que presentan los métodos tradicionales de preparación de la muestra. Existen tres formas de conseguir la automatización parcial o total del tratamiento de la muestra. Una de las más efectivas es el uso de estaciones robotizadas que permiten el acoplamiento de varias o todas las etapas del proceso analítico total [6]. Otra alternativa es el uso de equipos automáticos no robotizados que suelen estar diseñados para realizar operaciones específicas o muy concretas [7]. La tercera alternativa para conseguir la automatización de la preparación de la muestra lo constituyen los sistemas continuos, también llamados dinámicos o en flujo [8].

La miniaturización se ha convertido en una tendencia dominante en la química analítica durante los últimos años [9,10], ya que presenta numerosas ventajas frente a la preparación de la muestra tradicional. Algunas de ellas son: simplicidad, rapidez, economía, minimización de las etapas y de la manipulación de la muestra, mayor precisión y sensibilidad. Además, se minimiza la cantidad de muestra, el consumo de reactivos y de disolventes caros y tóxicos, obteniéndose un sistema más ecológico. Se ha realizado el desarrollo a microescala de técnicas de separación como la microextracción en fase sólida (SPME) [11], la microextracción en fase líquida (LPME) [12], la electroforesis capilar (EC) [13] así como las técnicas cromatográficas [14], etc. En los últimos años también se ha comenzado a miniaturizar los sistemas de detección, por ejemplo, espectrómetros de masas [14,15] y plasmas [16,17], entre otros. Esto ha permitido la asociación de instrumentos, lo que ha facilitado la integración del laboratorio en un chip ("lab-on-a-chip"), como parte del concepto más general de la miniaturización de los sistemas de análisis total ("miniaturized total analytical systems",  $\mu$ TAS) [9,10].

En la [Figura 4](#) se muestra el número de publicaciones aparecidas en la década 1997-2007 en las cuales se hace uso de los métodos de

preparación de la muestra más utilizados. Podemos observar las tendencias en la preparación de la muestra y podemos confirmar que la extracción en fase sólida, la microextracción/miniaturización y la extracción líquido-líquido son las tres más desarrolladas y utilizadas. La automatización también ocupa un lugar importante, teniendo en cuenta que la primera publicación sobre este tema data de 1975.

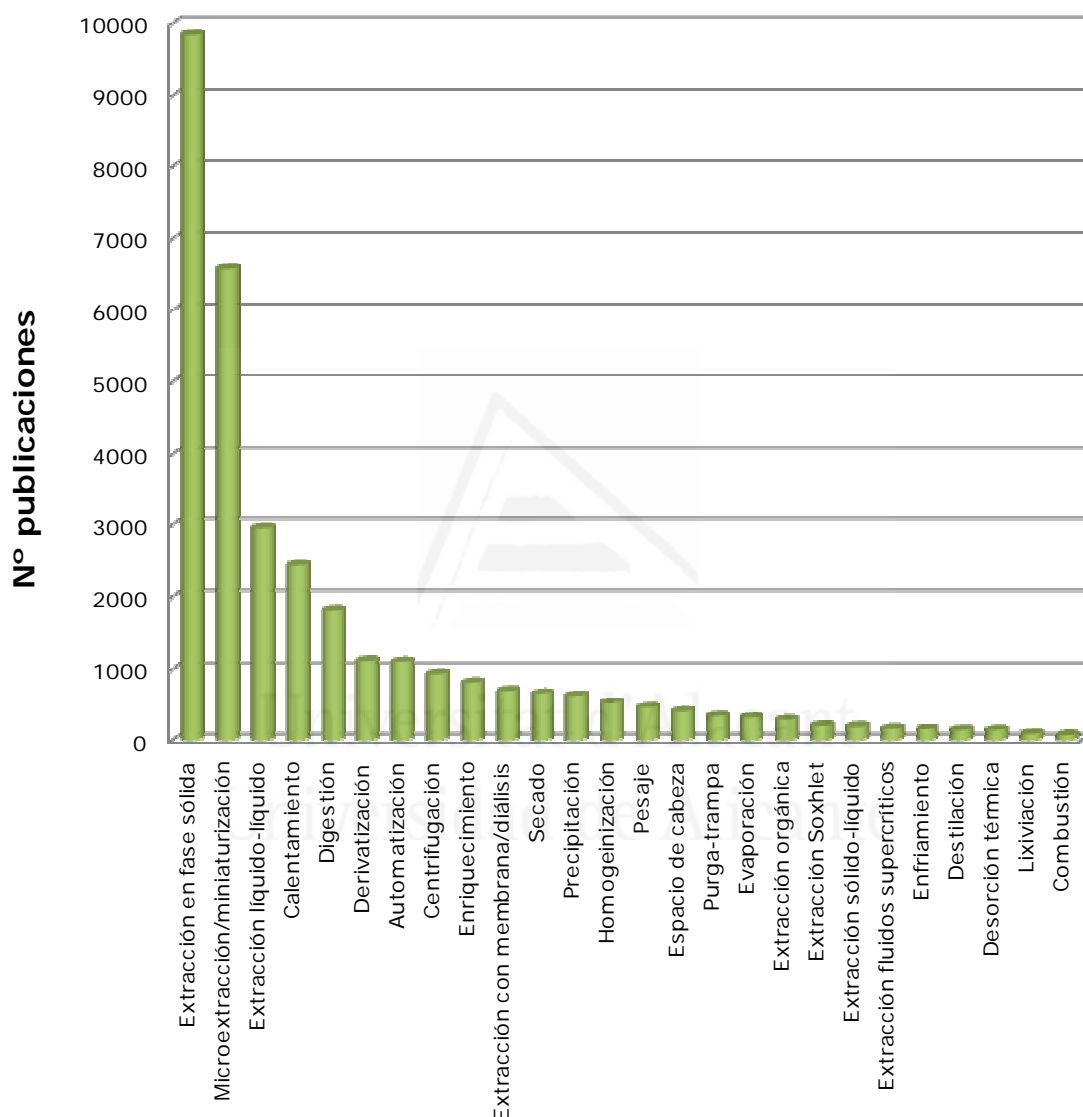


Figura 4. Número de publicaciones relacionadas con los diferentes tipos de métodos utilizados en la preparación de la muestra aparecidas en la década 1997-2007 (Fuente: SciFinder Scholar® 2007).

Conviene llamar la atención sobre el hecho de que frecuentemente se necesita de más de una etapa de preparación de la muestra. Una estrategia de preparación de la muestra clara y optimizada es fundamental para

minimizar el número de etapas ya que cada etapa representa un tiempo adicional y es una fuente potencial de errores (contaminación, pérdida de analitos y cambios en la composición). Por ello, se puede concluir que lo mejor es utilizar el menor número posible de etapas en la preparación de la muestra, y en el límite, se puede afirmar que *“la mejor preparación de la muestra es aquella que no existe”*.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



## II.2. Técnicas de extracción

Las técnicas de extracción son las técnicas más utilizadas para la preparación de la muestra (Figura 4). De entre todas las técnicas de extracción, las de extracción sin disolvente y las miniaturizadas han experimentado en los últimos años un enorme auge, debido, principalmente, a que con ellas se elimina o minimiza el empleo de disolventes orgánicos en muchos casos caros y/o tóxicos, por lo que su empleo está más restringido por las nuevas normativas. Entre las técnicas de (micro)extracción podemos destacar la extracción en fase sólida (SPE), la extracción líquido-líquido (LLE), y la miniaturización de éstas técnicas que son la microextracción en estado sólido (SPME), la microextracción en estado líquido (LPME), la extracción por sorción en barra agitadora (SBSE) y la microextracción en barra solvente (SBME).

Las técnicas de extracción pueden ser aplicadas a muestras de diferente naturaleza (líquida, gaseosa o sólida); sin embargo, la presente memoria está basada en el estudio de muestras de naturaleza exclusivamente líquida, como son las muestras naturales de aguas y muestras de orina. Por lo tanto, las técnicas de extracción que se presentan son aquellas que se aplican principalmente a analitos orgánicos contenidos en muestras de naturaleza líquida.

El fundamento de estas técnicas se basa en el reparto diferencial de los analitos entre la matriz de la muestra y la fase extractante. Las técnicas de extracción pueden ser clasificadas, de acuerdo a la fase extractante [18, 19], en:

### *II.2.1. Extracción en fase gaseosa*

#### II.2.1.1. Extracción en espacio de cabeza

##### II.2.1.1.1. Espacio de cabeza estático

##### II.2.1.1.2. Espacio de cabeza dinámico

### *II.2.2. Extracción con membrana*

### *II.2.3. Extracción con un material sorbente*

#### II.2.3.1. Atrapamiento en tubo abierto

- II.2.3.2. Extracción en fase sólida
- II.2.3.3. Microextracción en fase sólida
- II.2.3.4. Extracción por sorción en barra agitadora

#### *II.2.4. Extracción con un disolvente*

- II.2.4.1. Extracción líquido-líquido
- II.2.4.2. Extracción líquido-líquido en vial
- II.2.4.3. Microextracción en fase líquida
  - II.2.4.3.1. Microextracción en fibra hueca
  - II.2.4.3.2. Microextracción en gota

### II.2.1. Extracción en fase gaseosa

Las técnicas de extracción en fase gaseosa, tales como espacio de cabeza estático o la técnica de purga y trampa, tienen como rasgo común el reparto de los analitos entre la matriz de la muestra y el seno de una fase gaseosa, permaneciendo en la matriz de la muestra los compuestos no volátiles de alto peso molecular [20].

#### II.2.1.1. Extracción en espacio de cabeza

Las técnicas de espacio de cabeza pueden ser aplicadas al análisis de compuestos orgánicos volátiles y compuestos de moderada volatilidad. Es una de las técnicas más utilizadas ya que la fase extractante (aire, helio o nitrógeno) es compatible con la cromatografía de gases.

##### II.2.1.1.1. Espacio de cabeza estático

La técnica de espacio de cabeza estático ("headspace") [20,21] probablemente sea la técnica de preparación de la muestra sin disolventes más sencilla. En ella simplemente se realiza la transferencia de los analitos desde la matriz de la muestra, líquida o sólida, a la fase gaseosa o espacio de cabeza hasta que se alcanza el equilibrio. Posteriormente, un volumen pequeño y bien definido del gas que se encuentra en el espacio de cabeza

es inyectado, de modo manual o automático, en un cromatógrafo de gases para su análisis (Figura 5). Asumiendo que el espacio de cabeza ha alcanzado el equilibrio con la muestra, la cantidad de analito transferida al equipo de análisis es proporcional al volumen de fase gaseosa (espacio de cabeza), a la temperatura, a la constante de Henry y a la concentración de analito en la muestra.

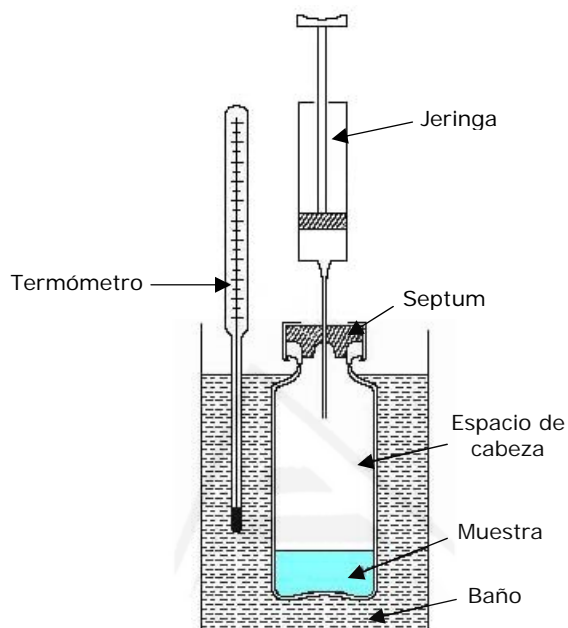


Figura 5. Esquema de la modalidad de espacio de cabeza. (Fuente: H. Hachenberg, A.P. Schmidt, "Gas chromatography headspace analysis", (Heyden Press, 1977), p. 21).

Esta es una modalidad de extracción que proporciona baja sensibilidad debido a que carece de un efecto de concentración. No se puede llevar a cabo una extracción exhaustiva, excepto en el caso de compuestos muy volátiles.

Esta técnica de extracción ha sido utilizada para determinar compuestos orgánicos volátiles en alimentos [22], bebidas [23] y muestras clínicas [24], entre otros.

### II.2.1.1.2. Espacio de cabeza dinámico

La extracción en espacio de cabeza dinámico, también llamada purga y trampa (“purge-and-trap”), emplea varias etapas y permite una extracción exhaustiva y cuantitativa de los compuestos orgánicos volátiles [20,21]. Al contrario que en la extracción estática, los analitos volátiles no alcanzan el equilibrio entre la fase gas y la matriz debido a que están siendo eliminados de la muestra continuamente.

La extracción de purga y trampa consta de dos etapas principales (Figura 6). En una primera etapa el gas portador pasa a través de la muestra para purgar los compuestos orgánicos volátiles de la misma. Estos compuestos son recogidos cuantitativamente usando una trampa de material sorbente o una trampa fría (Figura 6a). La segunda etapa consiste en la desorción térmica de los analitos retenidos en la trampa y su posterior introducción en el sistema en el que serán separados y cuantificados (Figura 6b).

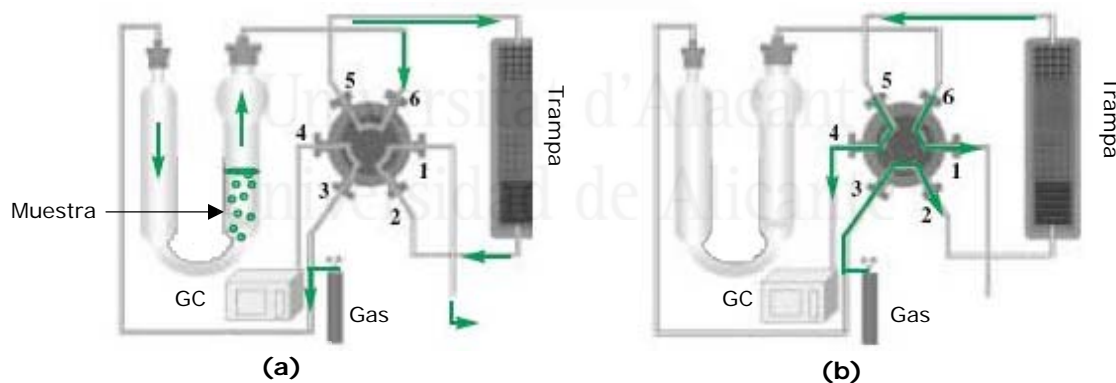


Figura 6. Sistema de purga y trampa. (a) Proceso de transferencia de los analitos volátiles a la trampa; (b) transferencia de los analitos volátiles desde la trampa hasta el cromatógrafo de gases. (Fuente: [www.restekcorp.com](http://www.restekcorp.com)).

En la Figura 7 se muestra un sistema de purga y trampa comercial en el que se puede observar claramente el paso del gas portador a través de la muestra.



Figura 7. Sistema comercial de purga y trampa. (Fuente: [www.restekcorp.com](http://www.restekcorp.com)).

Los analitos volátiles pueden ser fácilmente desorbidos térmicamente a partir de las muestras sólidas mediante el calentamiento de la misma a elevada temperatura [25]. El calentamiento de la muestra también mejora la transferencia a la fase gaseosa de las especies menos volátiles. Sin embargo, los analitos térmicamente lábiles presentan dificultades en su desorción.

### II.2.2. Extracción con membrana

La extracción con membrana [21] es una técnica que se presenta como alternativa a las técnicas de extracción de preparación de la muestra convencionales. Esta técnica ha sido utilizada para realizar la extracción de una amplia variedad de analitos contenidos en diferentes matrices pero su principal aplicación es la extracción de analitos volátiles [26].

El principio de funcionamiento de esta técnica de extracción puede observarse en la Figura 8. La muestra se encuentra en contacto con un lado de la membrana y la membrana actúa como una barrera selectiva. Los analitos pasan desde el lado dador a través de la membrana hasta el lado receptor. Las especies que atraviesan la membrana son arrastradas por un gas portador o mediante vacío.

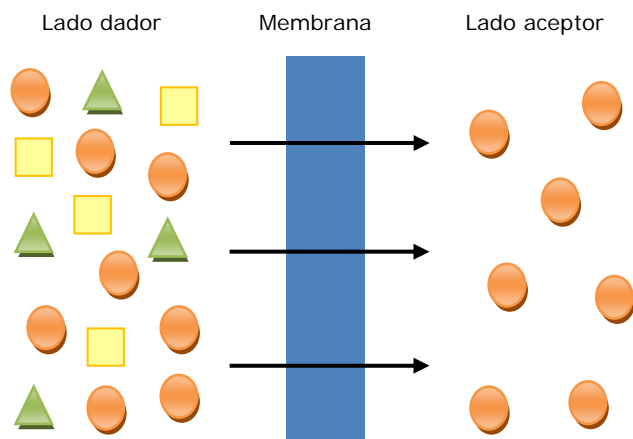
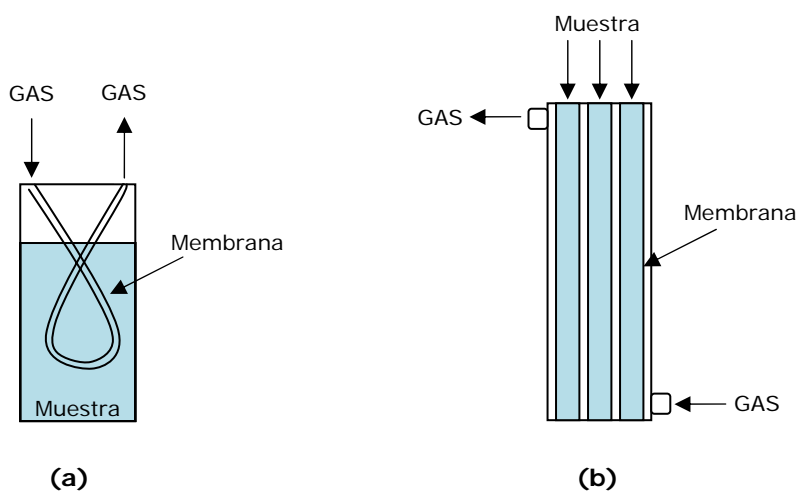


Figura 8. Principio de funcionamiento de la separación mediante membrana (las esferas representan el analito). (Fuente: referencia 21).

Las membranas pueden ser clasificadas como porosas y no porosas, en base a su estructura, o como una hoja plana o una fibra hueca, en base a su geometría. Las membranas no porosas, cuyo componente básico es la silicona (polidimetilsiloxano (PDMS)), son normalmente hidrofóbicas. Los compuestos orgánicos disueltos en agua pasan a través de la membrana y son extraídos mientras que la matriz acuosa queda sin extraer. Las membranas microporosas (polipropileno, celulosa o Teflón) no son tan hidrofóbicas por lo que grandes cantidades de agua pueden atravesar la membrana. Como su nombre indica, las membranas de tipo de hoja plana son planas como una hoja de papel y pueden tener un espesor de menos de una micra. Sin embargo, este tipo de membranas necesita unos soportes especiales. Las membranas de fibra hueca forman tubos finos de entre 200 y 500 micras de diámetro interno y permiten el paso de fluidos por su interior. Este tipo de membranas se pueden sostener sin soporte y presentan la ventaja de poseer una elevada área superficial por unidad de volumen y una elevada densidad de empaquetamiento. Un elevado número de fibras dispuestas en paralelo pueden ser empaquetadas en un volumen reducido.

Existen dos modos de diseñar un módulo de membrana [27]. Si la membrana es introducida en la muestra se obtiene la conocida como membrana en la muestra (MIS) mientras que si la muestra es introducida en la membrana se obtiene la conocida como muestra en la membrana

(SIM). La [Figura 9](#) muestra un diagrama esquemático de ambas configuraciones utilizando una membrana de fibra hueca.



[Figura 9](#). Configuraciones de los módulos de membrana. (a) Membrana en la muestra (MIS); (b) muestra en la membrana (SIM). (Fuente: referencia 21).

En el modo MIS, la membrana es sumergida en la muestra y los analitos que permean son transportados por un gas por el otro lado de la membrana ([Figura 9a](#)). La membrana también puede ser colocada en el espacio de cabeza y de este modo puede llevarse a cabo la extracción de analitos volátiles contenidos en muestras líquidas o sólidas. En el modo SIM, la muestra acuosa puede pasar por el interior o exterior de la membrana mientras que el gas portador se encuentra en el otro lado de la misma. En este caso el contacto con la muestra es dinámico y la relación entre la superficie de contacto y el volumen es mucho mayor que en el modo de extracción MIS.

La principal ventaja que presenta esta técnica de extracción es que puede acoplarse a un instrumento para el análisis en continuo "*on-line*" o "*in-line*". Esta técnica de extracción ha sido acoplada a un espectrómetro de masas [28,29] o a un cromatógrafo de gases [26,30]. En la [Figura 10](#) se muestran dos dispositivos, uno de cada tipo. En el sistema de membrana acoplado al espectrómetro de masas (MIMS) ([Figura 10a](#)) la membrana se dispone en el compartimento de ionización del espectrómetro. De esta forma las especies que atraviesan la membrana son ionizadas directamente. El sistema MESI ([Figura 10b](#)) está constituido por una membrana, un

módulo que contiene un sistema de interfase sorbente, una trampa fría, un sistema de desorción térmica y un medio de separación y detección, como puede ser un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas. En este caso la extracción con membrana implica dos procesos simultáneos: (i) extracción de los analitos desde la matriz de la muestra por la membrana y transporte de los mismos hacia la trampa sorbente y; (ii) desorción térmica de los analitos retenidos en la trampa y posterior introducción de los mismos en el sistema cromatográfico.

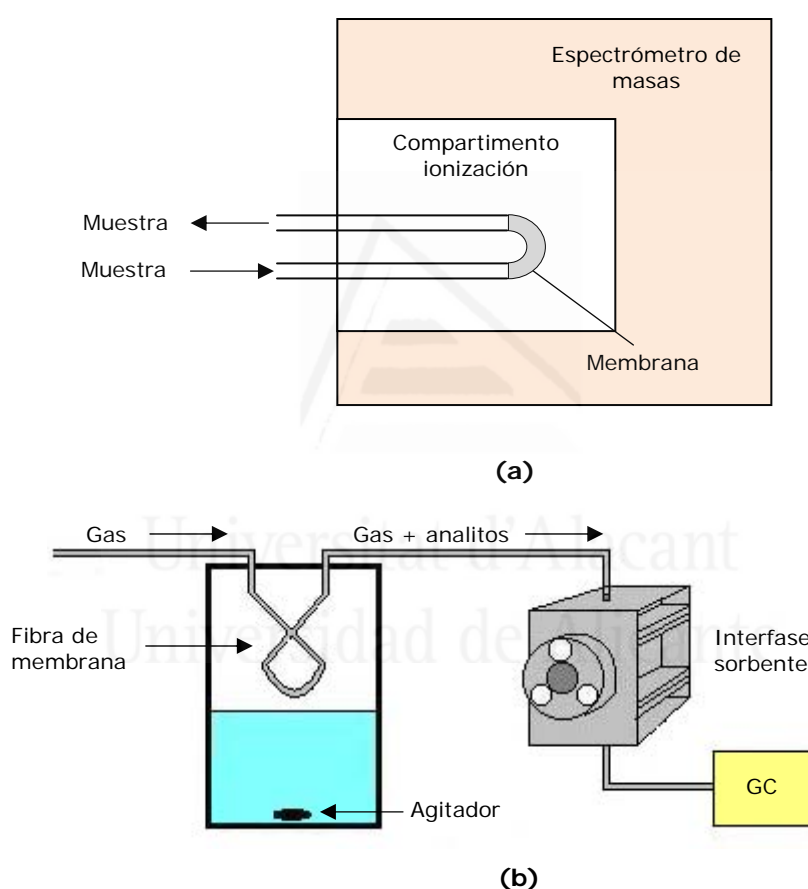


Figura 10. (a) Acoplamiento con el espectrómetro de masas (MIMS); (b) acoplamiento con el sistema cromatográfico (MESI), en la modalidad de espacio de cabeza. (Fuente: referencia 21).

La extracción con membrana no está limitada al análisis de compuestos volátiles, también se pueden analizar compuestos de elevado peso molecular usando temperaturas más altas o membranas microporosas con diferentes diámetros de poro.



Este tipo de extracción previene las posibles pérdidas de analito. Una desventaja de este sistema es la respuesta lenta de la membrana a cambios en la concentración y los posibles efectos de memoria.

### II.2.3. Extracción con un material sorbente

El interés de las técnicas de extracción basadas en un material sorbente reside en la disponibilidad de una amplia gama de fases lo que confiere una gran selectividad. La idea de emplear un material sorbente para extraer compuestos de una muestra acuosa se desarrolló en los años 70 y sus aplicaciones han sido numerosas [31,32]. Los sorbentes se emplean actualmente para extraer compuestos orgánicos de varias matrices incluyendo agua, aire y algunos suelos. Un sorbente con una gran afinidad hacia compuestos orgánicos retendrá estos compuestos y los concentrará desde muestras muy diluidas.

Muchos sorbentes son modificados específicamente para la extracción de distintos grupos de compuestos orgánicos con varios grados de selectividad. Los sorbentes empleados con mayor frecuencia contienen sílices enlazadas (octil (C8) y octadecil (C18)), polímeros hidrofóbicos de PDMS, Tenax, carbón activo (negro y grafitizado) para el atrapamiento (más o menos) selectivo de compuestos de elevada polaridad y no polares, cambiadores iónicos, materiales de tipo mixto como cambiadores catiónicos y aniónicos mezclados con C18 para el enriquecimiento simultáneo de compuestos polares y apolares, entre otros. Actualmente se están desarrollando nuevas fases sorbentes mucho más selectivas como los polímeros de impresión molecular (MIPs) [33-36], los inmunosorbentes [34,37] y los nanotubos y fullerenos de carbón [38].

Dependiendo de las características del sorbente la retención del analito se produce: (i) por adsorción (i.e., por una interacción química o física real de tipo superficial entre el adsorbente y los analitos); (ii) mediante absorción (o reparto de los analitos entre el absorbente y la muestra); (iii) por una interacción antígeno-anticuerpo y; (iv) por un mecanismo de retención mixto. La desorción de los analitos puede tener lugar mediante elución con un pequeño volumen de un disolvente apropiado, el cual es transferido de manera parcial o total al instrumento

seleccionado para realizar la determinación final, o mediante desorción térmica, normalmente en el inyector del instrumento analítico.

### II.2.3.1. Atrapamiento en tubo abierto

La técnica de atrapamiento en tubo abierto (OTT) es la más antigua de las técnicas de extracción sin disolvente. Consiste en el empleo de trampas tubulares abiertas rellenas con partículas sorbentes [39] (Figura 11), aunque recientemente la atención se ha dirigido principalmente hacia la utilización de capilares recubiertos de sorbente [40,41] debido a sus características favorables similares a las de las columnas capilares de cromatografía. Esta técnica se puede emplear tanto para muestras gaseosas y líquidas, así como sólidas en el caso de analitos volátiles.

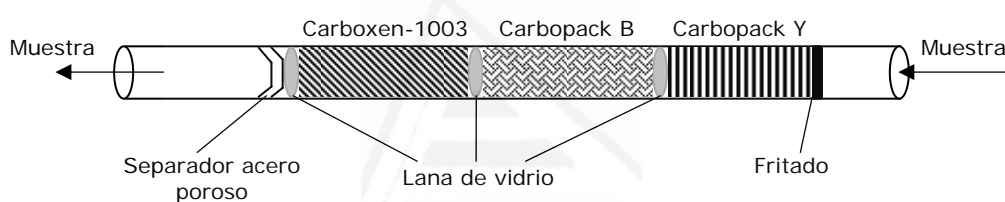


Figura 11. Esquema de una trampa tubular rellena con tres tipos diferentes de partículas sorbentes. (Fuente: referencia 39).

El principio de su funcionamiento consiste en el atrapamiento de los analitos en el sorbente contenido en el tubo y la posterior desorción térmica de los mismos, los cuales son retenidos en una nueva trampa, o con disolventes. Finalmente, estos analitos son desorbidos térmicamente de ésta segunda trampa e introducidos en el sistema en el que serán separados y cuantificados. La principal ventaja que ofrece la técnica OTT sobre otras técnicas alternativas de separación es la eliminación completa del agua de la trampa, lo cual se puede conseguir purgando la misma con un pequeño flujo de gas. Esto hace que no se requieran tiempos largos de secado. Sin embargo, la principal desventaja es su bajo poder de retención de los analitos volátiles contenidos en muestras sólidas, particularmente compuestos muy polares los cuales no se retienen fuertemente en la fase estacionaria. Además, debido a que el coeficiente de difusión de los

compuestos en la fase líquida es bajo, la velocidad de flujo durante la separación es crítica y únicamente se toleran velocidades de flujo bajas.

En los últimos años el interés en esta técnica se ha centrado en la utilización de capilares, en detrimento de las trampas tubulares, para el enriquecimiento de muestras acuosas. La técnica que utiliza tubos capilares para esta modalidad de extracción se conoce como microextracción en fase sólida en tubo (*"in-tube SPME"*) [40]. Conviene aclarar que esta técnica de extracción difiere de la conocida como microextracción en fase sólida (SPME) que será comentada más adelante.

Existen dos tipos fundamentales de SPME en tubo (Figura 12): (i) pasivo o estático cuando el tubo no entra en contacto directo con la muestra y; (ii) activo o dinámico cuando la muestra pasa a través del tubo mediante un flujo continuo.

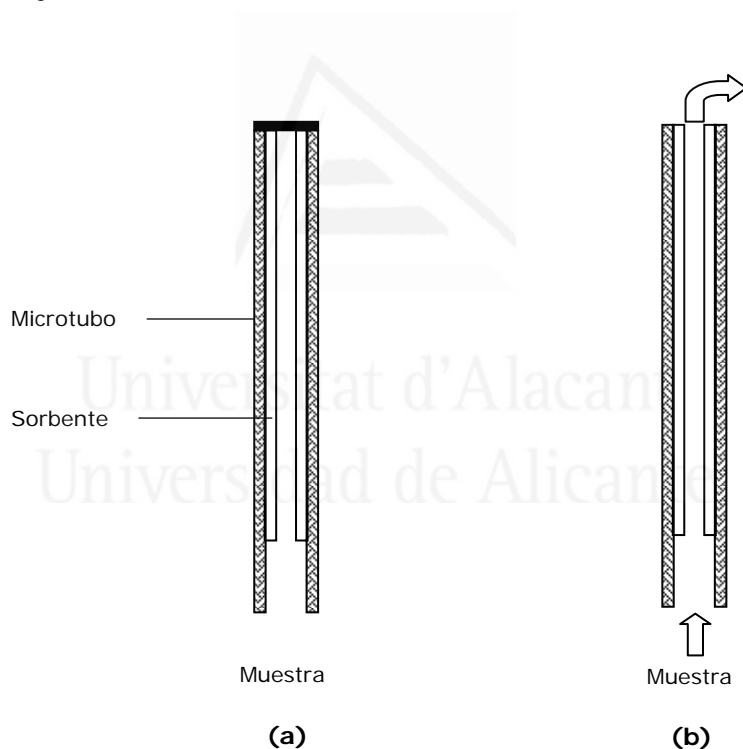


Figura 12. Modos de extracción en tubo. (a) Modo pasivo; (b) modo activo. (Fuente: referencia 40).

En ambas modalidades el sorbente puede estar depositado sobre una barra de sílice fundida (Figura 13a) o recubriendo el interior de un tubo capilar (Figura 13b).

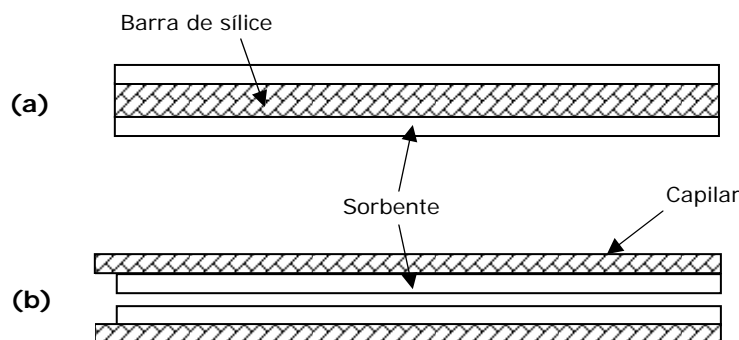


Figura 13. Modos de disposición del sorbente. (a) Sorbente dispuesto sobre una barra de sílice fundida; (b) sorbente recubriendo el interior de un capilar. (Fuente: referencia 40).

El sistema de SPME en tubo estático no se expone directamente a la muestra (Figura 12a). El sorbente está contenido en el tubo capilar por el cual no pasa ningún flujo de muestra a través del mismo; la extracción tiene lugar a través de la fase gas estática presente. En el sistema de SPME en tubo dinámico el frente de analitos avanza a través del capilar con una velocidad proporcional a la velocidad de la muestra, e inversamente proporcional a la relación de reparto (Figura 12b). El tiempo de extracción es directamente proporcional a la longitud del capilar e inversamente proporcional a la velocidad de flujo lineal del fluido. Para capilares cortos con una pequeña dispersión, el tiempo de extracción se supone similar al tiempo requerido para que el centro de la banda alcance el final del capilar. El tiempo de extracción también aumenta al aumentar la constante de distribución entre el recubrimiento y la muestra y con el espesor de la fase extractante. Un aumento en la constante de distribución produce un aumento en la cantidad absoluta extraída.

Las ventajas que presenta esta modalidad de extracción frente a la OTT es la eliminación de la segunda trampa debido a que la desorción puede ser realizada directamente en el inyector de un cromatógrafo de gases o mediante elución con un disolvente para su posterior introducción en un cromatógrafo de líquidos, y la posibilidad de automatización [40].

### II.2.3.2. Extracción en fase sólida

La técnica de extracción en fase sólida (SPE) es la más utilizada en esta última década para la preparación de la muestra (Figura 4) [20,42]. Esta técnica se basa en el empleo de sorbentes dispuestos en cartuchos (tubos) o discos (membranas) (Figura 14). En los cartuchos el sorbente está recubriendo un soporte; sin embargo, en los discos el sorbente está inmovilizado en una membrana de microfibras. Los discos son de 0.5 mm de espesor y permiten flujos más altos que los utilizados con los cartuchos.



Figura 14. Cartuchos y discos empleados en la extracción en fase sólida. (Fuente: [www.genopore.com](http://www.genopore.com))

Esta técnica de extracción consiste en la realización de cuatro etapas principales [20] (Figura 15). La primera etapa consiste en acondicionar el cartucho o disco. En la segunda etapa se hace pasar la muestra líquida a través de un cartucho (tubo) o disco (membrana) donde se retienen tanto los analitos como algunas especies potencialmente interferentes. Generalmente en una tercera etapa se emplea un disolvente selectivo para eluir las sustancias interferentes retenidas mientras que los analitos permanecen en el lecho sorbente. Finalmente, en la cuarta etapa se emplea otro disolvente para eluir los analitos (concentrados y purificados). La elución puede realizarse por gravedad, con ayuda de una fuente de vacío, mediante presión o por centrifugación.

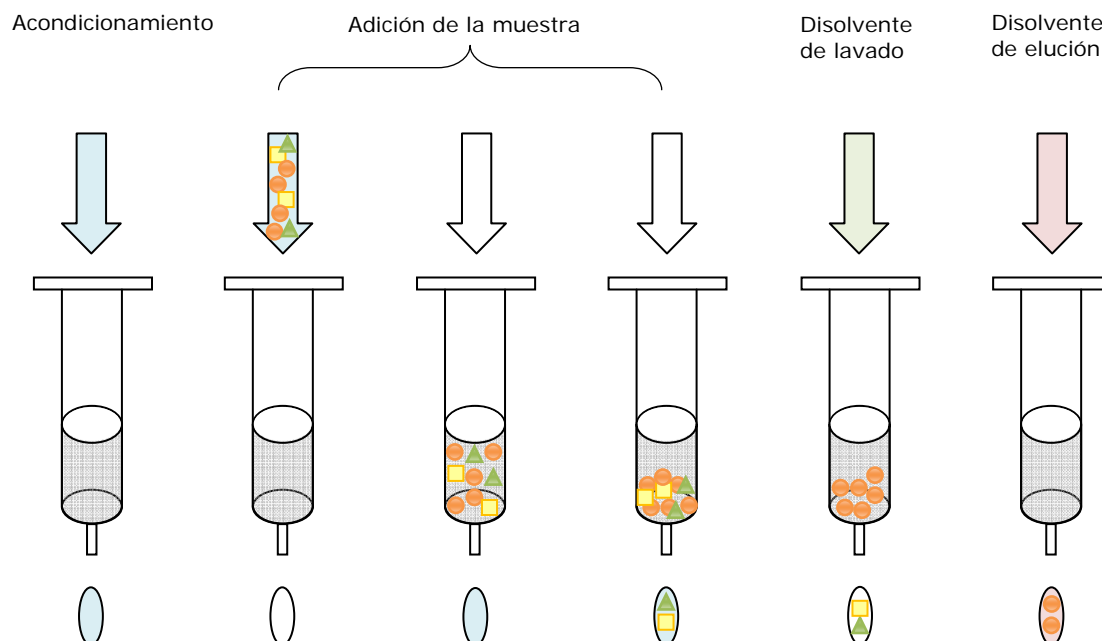


Figura 15. Etapas principales de la extracción en fase sólida (las esferas representan el analito y los cuadrados y triángulos las sustancias interferentes). (Fuente: referencia 20).

La SPE posee un gran número de ventajas comparada con otras técnicas de extracción, como las técnicas de extracción con disolvente que se comentarán en la sección II.2.4. La SPE es una técnica que requiere instrumentación económica, sencilla y con un consumo de disolvente relativamente bajo.

El principal inconveniente reside en que un componente de la matriz impida o dificulte la interacción entre el analito y el sorbente, lo que con frecuencia proporciona una baja recuperación de los analitos de interés. También puede ocurrir que algunos componentes oleosos y/o sólidos de la muestra obstruyan los canales del cartucho o del disco impidiendo la retención de los analitos. Además, los sorbentes presentan efectos de memoria y se han observado variaciones entre lotes del mismo sorbente que conducen a una baja reproducibilidad. Esta técnica está limitada a compuestos semivolátiles y no volátiles con temperaturas de ebullición sustancialmente por encima de la temperatura de los disolventes [43,44].

### II.2.3.3. Microextracción en fase sólida

La técnica de microextracción en fase sólida (SPME) surge para eliminar, o al menos reducir, las limitaciones de la extracción en fase sólida [11,20]. Así, la SPME ofrece una rápida transferencia de masa durante la extracción y la desorción, previene las obstrucciones que se pueden producir en la SPE, reduce el consumo de disolventes y facilita el manejo e introducción directa en los instrumentos analíticos de medida.

El dispositivo empleado en SPME (Figura 16) consiste en una fibra de sílice fundida (generalmente de 1 cm de longitud y 0.11 mm de diámetro interno), químicamente inerte, estable a altas temperaturas y recubierta con un polímero sorbente. La fibra se sitúa en el interior de una aguja de acero inoxidable. Esta aguja forma parte de una jeringa especialmente diseñada para transportar y manejar la fibra. Este dispositivo fue comercializado por Supelco en el año 1993.

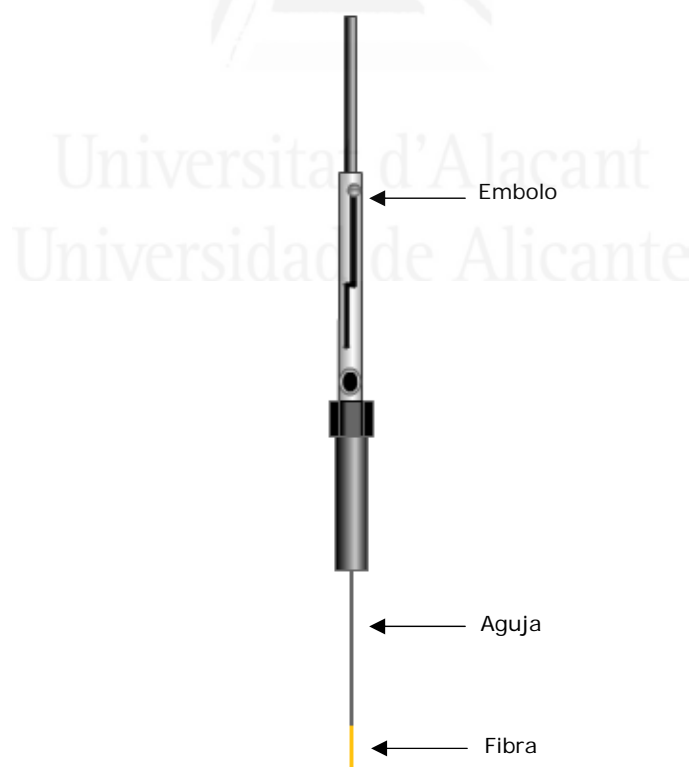


Figura 16. Dispositivo de SPME comercializado por Supelco. (Fuente: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)).

El proceso de extracción se realiza mediante una serie de etapas (Figura 17). Inicialmente la fibra está introducida en la aguja de la jeringa. Se introduce la aguja en el vial mediante la perforación del septum. Posteriormente se expone la fibra a la muestra descendiendo el émbolo de la jeringa (Figura 17b). Una vez que se ha completado la etapa de extracción, la fibra se introduce nuevamente en la aguja metálica, se extrae del vial (Figura 17c) y se transfiere al instrumento en el que tendrá lugar la desorción (Figura 17d y 17e) que puede ser el inyector de un cromatógrafo de gases o de líquidos. En el primer caso la desorción se realiza térmicamente mientras que en el segundo se eluye utilizando un disolvente adecuado. Finalmente, se realiza la separación de los analitos de interés y su posterior cuantificación.

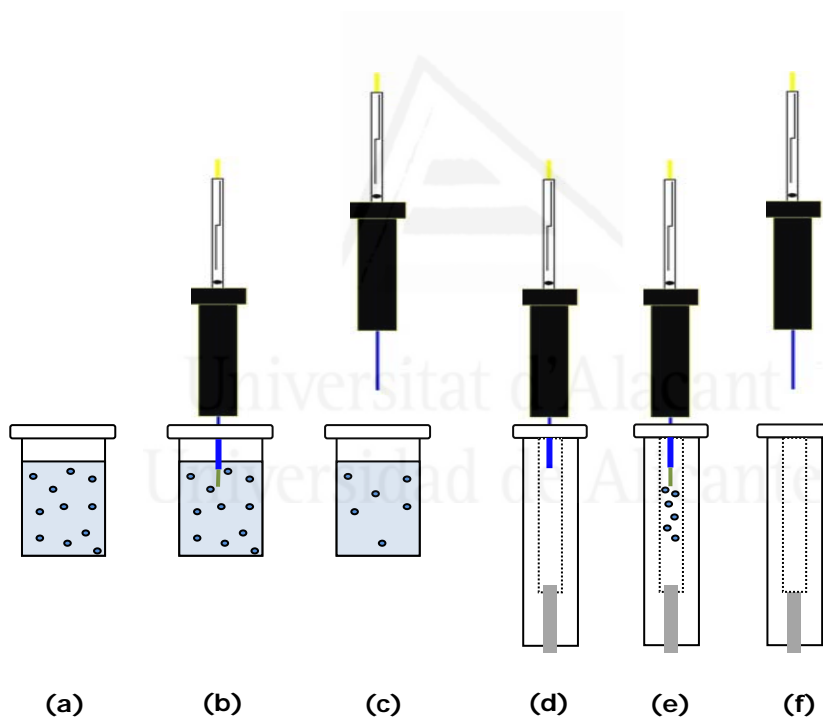


Figura 17. Etapas del proceso de extracción mediante SPME.

La fibra recubierta se expone durante un tiempo predeterminado para extraer los analitos. La geometría de la SPME permite la colocación de la fibra recubierta directamente en la muestra (matrices gaseosas o acuosas) (Figura 18a), en el espacio de cabeza situado sobre la muestra para extraer los analitos volátiles (Figura 18b) o se recubre con una membrana de



protección cuando se coloca directamente en muestras acuosas con matrices sucias (Figura 18c).

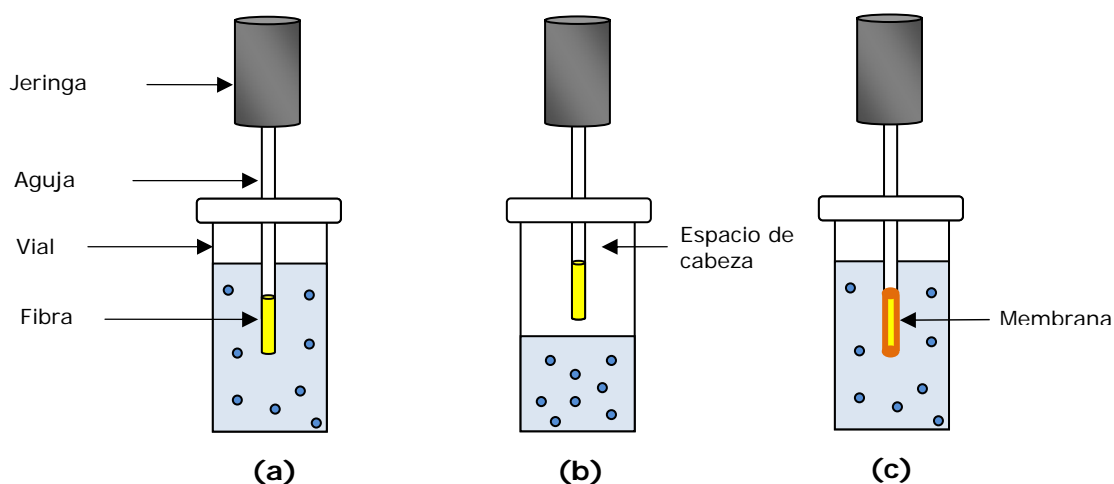


Figura 18. Modos de extracción de SPME. (a) Modo de inmersión directa; (b) Modo de espacio de cabeza; (c) Modo de inmersión directa con membrana.

El gran número de recubrimientos de las fibras disponibles hoy día ha contribuido a ampliar el tipo de analitos que pueden ser separados con esta técnica. Algunas de las fibras disponibles incluyen la apolar polidimetilsiloxano (PDMS), las semipolares polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB), carboxen-polidimetilsiloxano (carboxen-PDMS) y divinilbenceno-carboxen-polidimetilsiloxano (DVB-carboxen-PDMS) y las polares poliacrilato (PA), carbowax-divinilbenceno (CW-DVB) y carbowax-resina templada (CW-TPR) [20,45]. Recientemente han sido desarrolladas nuevas fases sorbentes para recubrir las fibras de SPME, por ejemplo, los MIPs [36,46,47], nanotubos de carbón [48,49] y líquidos iónicos [50,51].

La SPME se puede llevar a cabo manualmente o por medio de un automuestreador. La única diferencia entre un automuestreador normal y una automuestreador para SPME es que el movimiento del émbolo y el tiempo (de extracción y desorción) deben ser cuidadosamente controlados para realizar la sorción y la desorción correctamente y obtener resultados precisos.

Si se emplea la técnica de SPME para hacer muestreo en el campo (*“field sampling”*) es importante prevenir las posibles pérdidas de analitos durante el transporte hasta el laboratorio. Para ello, una vez que la fibra ha

sido introducida en la aguja metálica ésta se sella con un septum o se refrigera hasta realizar el análisis.

La SPME mantiene las ventajas de la SPE, tales como la sencillez de manejo, facilidad de automatización y posibilidad de muestreo *"on-line"* e *"in-line"*, eliminando, además, las principales desventajas de la SPE, tales como la obstrucción del soporte, el empleo de disolventes y los tiempos de preconcentración largos.

Las principales desventajas que presenta esta técnica son la fragilidad de la fibra, la cual puede ser dañada fácilmente disminuyendo su tiempo de vida, la cantidad reducida de fase sorbente, su elevado coste y los posibles efectos de memoria.

#### II.2.3.4. Extracción por sorción en barra agitadora

La técnica de extracción por sorción en barra agitadora (SBSE) [42,45,52] aparece debido a las limitaciones que presentaba la SPME, principalmente el empleo de una cantidad reducida de fase sorbente, y para eliminar los inconvenientes de otras muchas técnicas de extracción. Las principales diferencias que presenta esta técnica de extracción frente a la SPME son el modo de realizar la extracción y que el área superficial de la barra agitadora es superior al de las fibra; esto permite emplear una mayor cantidad de material sorbente (0,5  $\mu\text{L}$  en una fibra frente a los 50 ó 300  $\mu\text{L}$  de una barra).

En este caso el material sorbente se encuentra recubriendo una barra agitadora en lugar de estar dispuesto sobre una fibra (Figura 19).

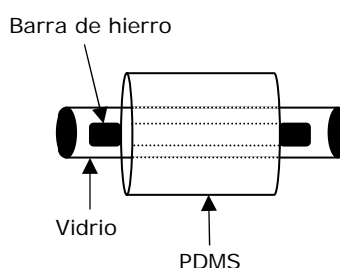


Figura 19. Esquema de una barra agitadora utilizada en SBSE. (Fuente: referencia 53).

En SBSE los analitos de una muestra acuosa [53,54] son extraídos mediante agitación durante un tiempo predeterminado. Transcurrido el tiempo de extracción la barra agitadora se retira de la muestra acuosa y se introduce en un tubo de vidrio hueco utilizado para desorción térmica, el cual se coloca en una unidad de desorción térmica. Los compuestos son desorbidos térmicamente e introducidos en el sistema de separación, normalmente un cromatógrafo de gases. Los analitos también pueden ser desorbidos mediante la inmersión de la barra en un disolvente. La SBSE también ha sido utilizada con muestras gaseosas y sólidas, en este último caso mediante el muestreo en el espacio de cabeza [55,56].

La SBSE es considerada, al igual que la SPME, una técnica no exhaustiva; sin embargo, presenta una mayor capacidad de extracción que la SPME. Las principales limitaciones que presenta la SBSE son la dificultad para automatizar la extracción de la barra agitadora de la muestra y las posibles contaminaciones que se pueden producir al introducir un material externo para realizar la extracción de la barra.

#### II.2.4. Extracción con un disolvente

La extracción con un disolvente es una de las técnicas clásicas más utilizadas para la extracción de analitos en muestras acuosas. Esta técnica se lleva empleando desde principios del siglo diecinueve [57]; sin embargo, está todavía en uso debido a la simplicidad de su instrumentación y a su amplia utilización en métodos oficiales (métodos EPA). Permite llevar a cabo extracciones rápidas y generalmente aplicables tanto a la separación de trazas como de macrocomponentes. Sus objetivos fundamentales son:

- ❖ La separación de un analito o un grupo de compuestos de interés de las posibles interferencias presentes en la matriz.
- ❖ La preconcentración de un analito antes de su medida, aumentando así la sensibilidad.

El fundamento de esta técnica se basa en la diferente distribución o reparto de los constituyentes de la muestra entre dos fases inmiscibles. En la mayoría de los casos una de las fases es un medio acuoso y la otra un

disolvente orgánico, por lo que frecuentemente se denomina esta técnica como *extracción con disolventes orgánicos* o, simplemente, *extracción con disolvente*.

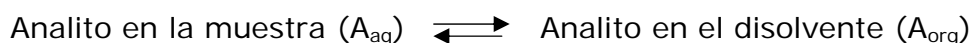
#### II.2.4.1. Extracción líquido-líquido convencional

La extracción líquido-líquido (LLE) convencional es la técnica de extracción con disolvente más antigua [20]. La forma de operar consiste en hacer que la muestra líquida entre en contacto íntimo con un disolvente adecuado y, después de un período de agitación adecuado, se dejan reposar produciéndose la separación de ambas fases (Figura 20).



Figura 20. Extracción líquido-líquido convencional mediante agitación en embudo de decantación.

Durante la agitación y contacto de ambas fases el analito se distribuye entre ambos líquidos hasta alcanzar el equilibrio:



el cual posee una determinada constante de equilibrio conocida como coeficiente de partición:

$$K = \frac{C_{\text{org}}}{C_{\text{aq}}} \quad (1)$$

donde  $C_{org}$  y  $C_{aq}$  es la concentración del analito en la fase orgánica y acuosa, respectivamente.

Cuanto mayor sea el valor de  $K$  más desplazado estará el equilibrio hacia la derecha y, por tanto, aumentará la eficacia de la extracción. Lógicamente, el coeficiente de partición va a ser diferente para cada analito y para cada par de disolventes. Si un analito presenta una baja solubilidad en agua indica que su extracción desde una muestra acuosa a un disolvente orgánico no polar está favorecida. Por tanto, a la hora de desarrollar un método de LLE, y en general cualquier método de extracción de compuestos orgánicos, organometálicos, etc., hay que tener una idea inicial de la polaridad de los analitos objeto del análisis. Actualmente existen valores tabulados de los coeficientes de partición octanol-agua de gran cantidad de compuestos orgánicos. Si el valor de  $K$  es grande nos indica que el analito presenta tendencia a concentrarse en la fase orgánica y, por tanto, nos dará una idea preliminar sobre la metodología a seguir. Generalmente se seleccionan como fase extractante aquellos disolventes orgánicos que tengan una elevada afinidad por los analitos a separar, que sean totalmente inmiscibles con la fase acuosa y que sean relativamente volátiles para facilitar la posterior eliminación por evaporación del disolvente y así preconcentrar el analito.

La selectividad y eficacia del proceso de extracción depende principalmente de la elección de los dos disolventes inmiscibles, pero también de otros factores que pueden afectar al equilibrio, como son el pH, la adición de un agente complejante, la utilización de un reactivo formador de pares iónicos o la modificación de la fuerza iónica mediante la adición de sales (efecto salino desplazante o "*salting out*"), entre otros. Cuando se utiliza una fase acuosa y un disolvente orgánico los analitos más hidrofílicos quedarán preferentemente en la fase acuosa y los más hidrofóbicos pasarán al disolvente orgánico. De esta manera, si se utiliza como método analítico de separación la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase invertida es preferible acumular el/los analito/s de interés en la fase acuosa. Sin embargo, si los analitos de interés van a ser separados posteriormente por cromatografía de gases es preferible concentrarlos en el disolvente orgánico.

Un aspecto de interés a considerar en la extracción líquido-líquido convencional es la cinética del proceso. Algunos procesos de extracción presentan una cinética lenta, lo que provoca que los tiempos necesarios para alcanzar el equilibrio sean extremadamente largos. En estos casos resulta conveniente emplear la extracción líquido-líquido en continuo o en contracorriente [20].

La gran cantidad de variables que es posible modificar, como la gran variedad de disolventes disponibles, la posibilidad de emplear mezclas, modificaciones de pH, etc., hace de la extracción líquido-líquido convencional una técnica muy útil y versátil. Sin embargo, la formación de emulsiones, el manejo de volúmenes grandes de muestra y disolventes, el empleo de disolventes tóxicos e inflamables, así como los riesgos de pérdidas o contaminaciones durante las distintas etapas hacen de ella una técnica cara, lenta y tediosa, además de poco respetuosa con el medioambiente.

Por ello, en los últimos años esta técnica ha sido desplazada por técnicas de extracción miniaturizadas, evitando de este modo todos o al menos la mayor parte de estos inconvenientes. La miniaturización ha sido llevada a cabo fundamentalmente de dos modos: (i) basado en la reducción de las dimensiones de la técnica tradicional (extracción en vial) y; (ii) en el desarrollo de nuevas modalidades de extracción (microextracción en fase líquida (LPME)).

Estas técnicas miniaturizadas han adquirido una enorme popularidad debido a que los volúmenes de disolvente orgánico empleados son muy pequeños y la manipulación de la muestra es mínima.

#### II.2.4.2. Extracción líquido-líquido en vial

Cuando los volúmenes tanto de la fase acuosa como del extractante son suficientemente pequeños, la LLE puede llevarse a cabo en un vial [58]. El proceso de extracción en vial conlleva tres etapas (Figura 21). En la primera etapa la muestra es introducida en el vial, y el disolvente (< 1mL) puede ser introducido directamente en el vial [58] o en una membrana [59], en el caso que se trabaje con muestras sucias (Figura 21a). En una segunda etapa se agita el vial para favorecer la transferencia de los analitos

desde la muestra hasta el disolvente (Figura 21b). Finalmente, en la tercera etapa, una porción del disolvente es extraída mediante una jeringa (Figura 21c) que posteriormente es introducido en el instrumento analítico para su análisis, generalmente en un cromatógrafo o un equipo de electroforesis capilar.

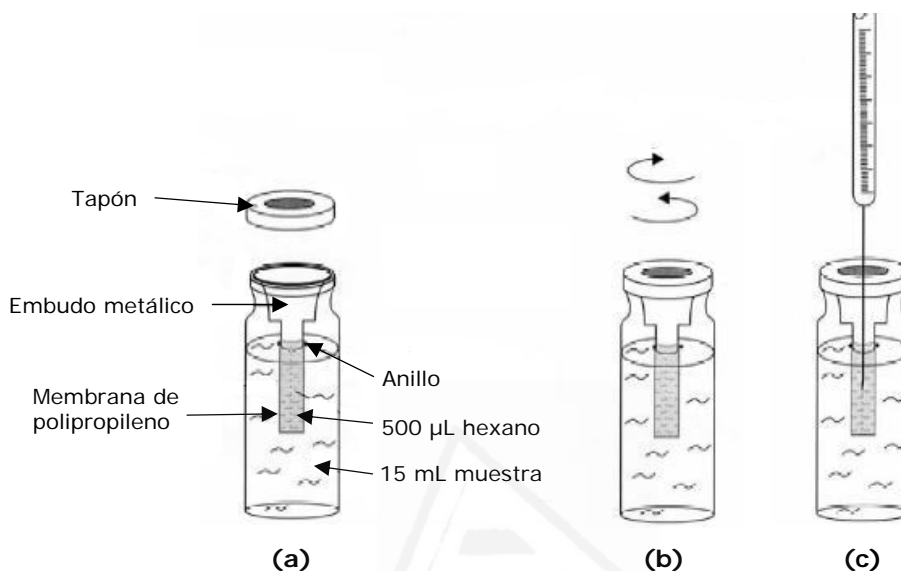


Figura 21. Etapas de la extracción líquido-líquido en vial con membrana. (Fuente: referencia 59).

Este tipo de extracción ha sido empleado, con distinto grado de éxito, para el enriquecimiento de clorofenoles en muestras acuosas [60], en la determinación de anilinas en aguas de grifo, superficiales y de desecho [61] así como en la determinación de drogas en orina y plasma [62]. Sin embargo, cuando esta metodología es aplicada a muestras más complejas, como por ejemplo alimentos, la eficacia del proceso en términos de precisión y exactitud disminuye considerablemente. Además, debido a la baja selectividad del mismo, es necesario incorporar una etapa adicional de purificación antes de la determinación instrumental para eliminar las interferencias coextraídas.

### II.2.4.3. Microextracción en fase líquida

La técnica de microextracción en fase líquida (LPME) aparece en el año 1996 en su modalidad de gota [63] y en el año 1999 en su modalidad de fibra hueca [64]. Ambas modalidades, desde su aparición, han sido utilizadas en el análisis de muestras de diferente naturaleza (gaseosa, líquida y sólida) y con todo tipo de analitos (orgánicos e inorgánicos). Por ello, es posible encontrar un elevado número de publicaciones, tanto de aplicaciones como de revisiones. Junto con la SPME son las técnicas de extracción más utilizadas en los últimos años debido a las ventajas que presentan.

#### II.2.4.3.1. Microextracción en fibra hueca

La técnica de microextracción en fibra hueca (HF-LPME) [12,65] fue introducida por Pedersen-Bjergaard y Rasmussen en 1999 [64]. En HF-LPME los poros de una fibra hueca son impregnados con un disolvente, normalmente orgánico. Existen dos modalidades para este tipo de microextracción; en la primera de ellas existen dos fases (líquido-líquido) (Figura 22a) y en la segunda existen tres fases (líquido-líquido-líquido) (Figura 22b). La diferencia entre las dos modalidades reside en la existencia de una (Figura 22a) o dos interfases (Figura 22b) entre líquidos diferentes. En el sistema de dos fases (Figura 22a) el extracto final que se obtiene es una fase orgánica compatible con técnicas analíticas tales como CG o LC. En el sistema de tres fases (Figura 22b) el analito es extraído desde una fase acuosa (fase dadora) a través del disolvente orgánico inmovilizado en los poros de la fibra hueca (fase orgánica) hasta otra fase acuosa (fase aceptora) que se encuentra en el interior de la fibra. La fase orgánica en este último caso actúa como una barrera entre las disoluciones acuosas dadora y aceptora, impidiendo la mezcla de ambas fases. Esta modalidad suele asociarse con las técnicas de LC o CE y está limitado a analitos con un notable comportamiento ácido-base.



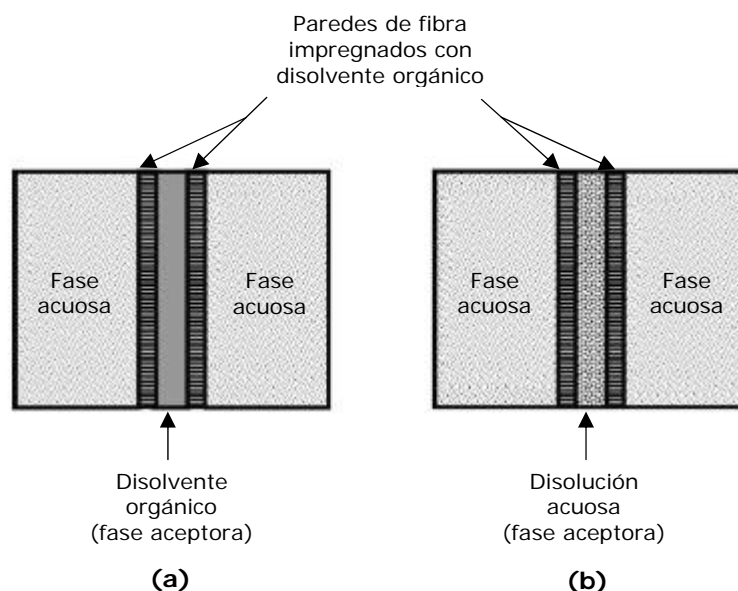


Figura 22. Sección transversal de la fibra hueca en el interior de la fase acuosa en un sistema de dos fases (a) y tres fases (b). (Fuente: referencia 12).

Dependiendo de la disposición de la fibra existen tres configuraciones:

- En la primera de ellas se utilizan dos agujas de jeringa convencionales insertadas a través de un septum y que son conectadas mediante una fibra hueca en forma de U (Figura 23). La longitud de la fibra varía entre 4 y 8 cm. La fibra es inicialmente sumergida durante varios segundos en el disolvente orgánico para que éste sea inmovilizado en los poros de la fibra. El volumen de disolvente orgánico inmovilizado varía entre 15 y 20  $\mu\text{L}$ . Después de la impregnación la fibra es sumergida en la fase acuosa dadora. La fase aceptora es inyectada en el interior de la fibra con la ayuda de una jeringa. Una vez la extracción se ha completado, la fase aceptora es recogida con la ayuda de una jeringa y posteriormente llevada al instrumento de análisis.

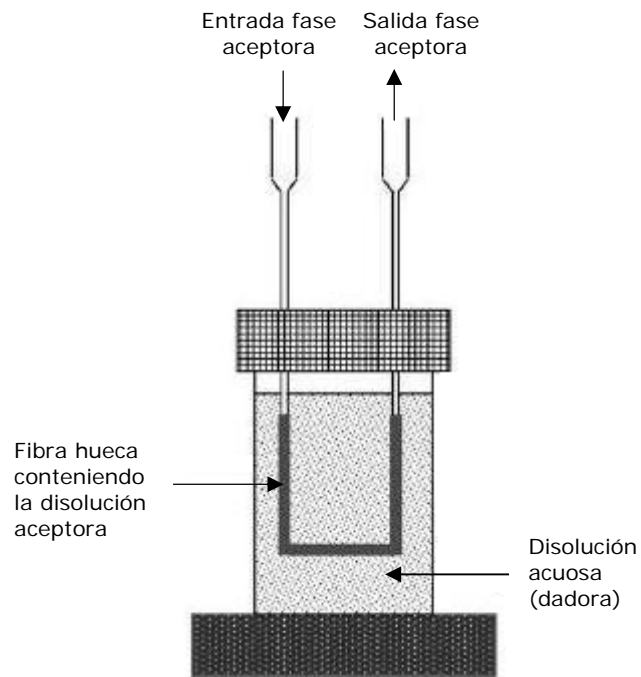


Figura 23. Representación esquemática de la configuración en la que la fibra está sostenida por dos agujas convencionales. (Fuente: referencia 64).

- En la segunda configuración únicamente un extremo de la fibra es utilizado para la inyección y recolección de la fase aceptora mientras que el otro extremo queda expuesto a la disolución dadora (Figura 24). Esto es posible al utilizar la punta de una aguja de una jeringa como soporte de la fibra (1-2 cm de longitud). La jeringa en este caso soporta la fibra, introduce y recoge la fase aceptora y, además, sirve para introducir a ésta última en el dispositivo en el que se lleva a cabo el análisis.

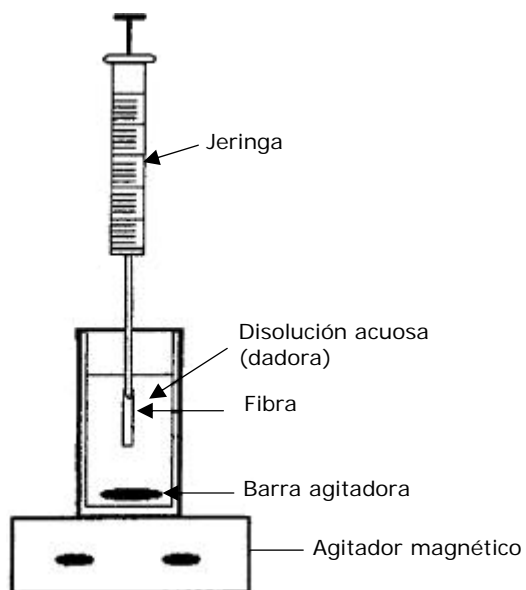


Figura 24. Representación esquemática de la configuración en la que la aguja de una jeringa sostiene la fibra y uno de los extremos está en contacto con la disolución dadora. (Fuente: referencia 12).

- Otra modalidad de HF-LPME es la que se conoce como microextracción en barra solvente (SBME) [66]. En la misma el disolvente es introducido en la fibra (2 cm) la cual tiene inicialmente un extremo sellado; a continuación se sumerge en el disolvente seleccionado para que los poros queden impregnados. Finalmente, el otro extremo de la fibra también es sellado. La barra se introduce en la muestra, la cual se mueve libremente con la ayuda de un agitador para realizar la extracción (Figura 25). Una vez finalizada, uno de los extremos es abierto y se toma una porción del disolvente de su interior para su análisis.

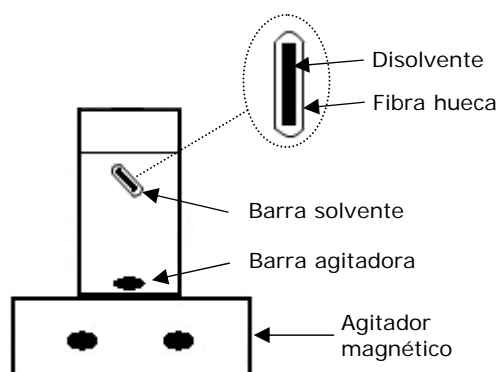


Figura 25. Representación esquemática de la SBME. (Fuente: referencia 66).

#### II.2.4.3.2. Microextracción en gota

La búsqueda continua de nuevos procedimientos para la preparación de la muestra ha conducido a desarrollar nuevos métodos de microextracción cuyas principales ventajas son su rapidez y el empleo de volúmenes pequeños de disolventes. La técnica de microextracción en gota (SDME) utiliza una gota de disolvente como fase extractante [63,67-73]. Desde su introducción en 1996 esta técnica ha experimentado un rápido desarrollo debido a la mejora que proporciona en el enriquecimiento de los analitos, la fácil manipulación, la rapidez, su bajo coste, su carácter ecológico y su amplio campo de aplicación. Además de las ventajas indicadas anteriormente, los altos factores de enriquecimiento, entre 10-1600, y el hecho de proporcionar un extracto listo para su análisis instrumental han sido sin duda claves para su rápido desarrollo.

Por todo lo anterior, la SDME ha sido la técnica de extracción objeto de estudio en la presente memoria. Por ello, se le ha dedicado un apartado individual en donde es tratada con más detalle.

## II.3. Microextracción en gota

### II.3.1. Evolución y modos de extracción

Liu y Dasgupta [63] fueron los primeros en desarrollar un sistema novedoso automatizado de extracción en gota donde una microgota de cloroformo, inmisible en agua ( $\sim 1.3 \mu\text{L}$ ), era suspendida en una gota acuosa más grande (Figura 26). El sistema se utilizó para extraer pares iónicos formados por dodecilsulfato sódico y azul de metileno. La fase acuosa, la cual contiene el analito de interés, era renovada continuamente, siendo suministrada por la parte superior y aspirada con el tubo que se sitúa en el fondo (Figura 26).

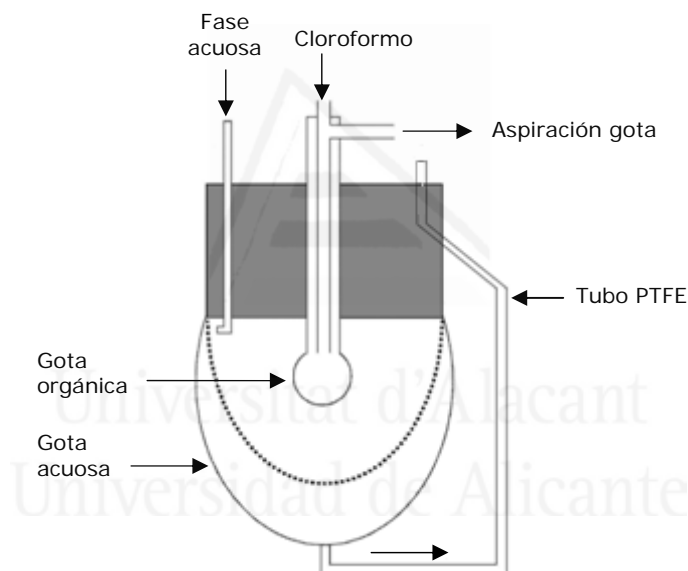


Figura 26. Esquema del sistema de microextracción en gota diseñado por Liu y Dasgupta. (Fuente: referencia 63).

Una vez finalizada la extracción, la fase acuosa era sustituida por una disolución de lavado, quedando la microgota de cloroformo coloreada por el analito. A continuación se realizaba la detección mediante un detector de absorbancia. Para ello, se irradiaba a la disolución de lavado y a la microgota con un haz de luz ( $\lambda = 645 \text{ nm}$ ), y éste era recogido por una fibra óptica dispuesta en el lado contrario. Cuando la fase orgánica era retirada

se podía repetir el ciclo analítico. Las ventajas de este sistema eran el bajo consumo de disolvente orgánico y la facilidad de automatización.

Jeannot y Cantwell [67] introdujeron una nueva modalidad de microextracción en gota en la cual una microgota (8  $\mu\text{L}$ ) de n-octano, conteniendo una cantidad fija de patrón interno, era suspendida al final de una varilla de Teflón hueca. La varilla era sumergida en una disolución acuosa que contenía 4-metil-acetofenona (Figura 27).

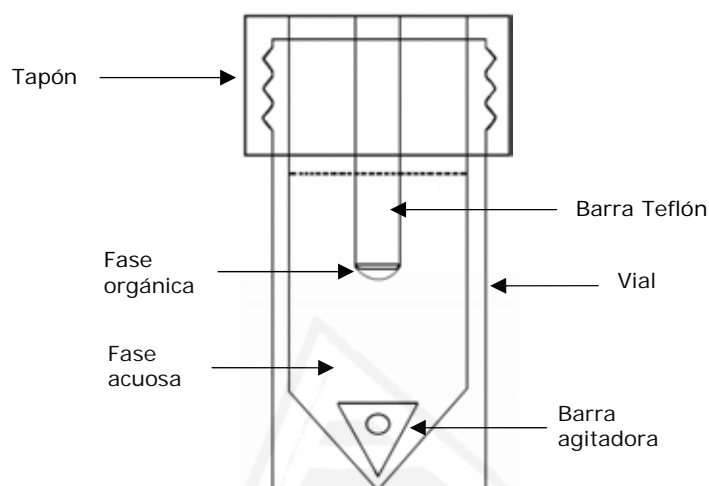


Figura 27. Ilustración del sistema de microextracción en gota empleado por Jeannot y Cantwell. (Fuente: referencia 67).

Después de realizar la extracción durante un período predeterminado de tiempo, la varilla era retirada de la disolución de la muestra y con la ayuda de una jeringa, un microlitro de la fase orgánica era extraído, y seguidamente inyectado en el cromatógrafo de gases.

Como el uso de la varilla de Teflón suponía un inconveniente, el mismo grupo de investigadores sugirió posteriormente una modalidad alternativa de extracción basada en la formación de una gota en la punta de una aguja [68]. En esta nueva modalidad la microextracción era realizada simplemente suspendiendo una gota de 1  $\mu\text{L}$  directamente en la punta de una aguja de una jeringa, la cual estaba sumergida en una disolución acuosa que contenía una mezcla de malatión, 4-metilacetona, 4-nitrotolueno y progesterona (Figura 28).

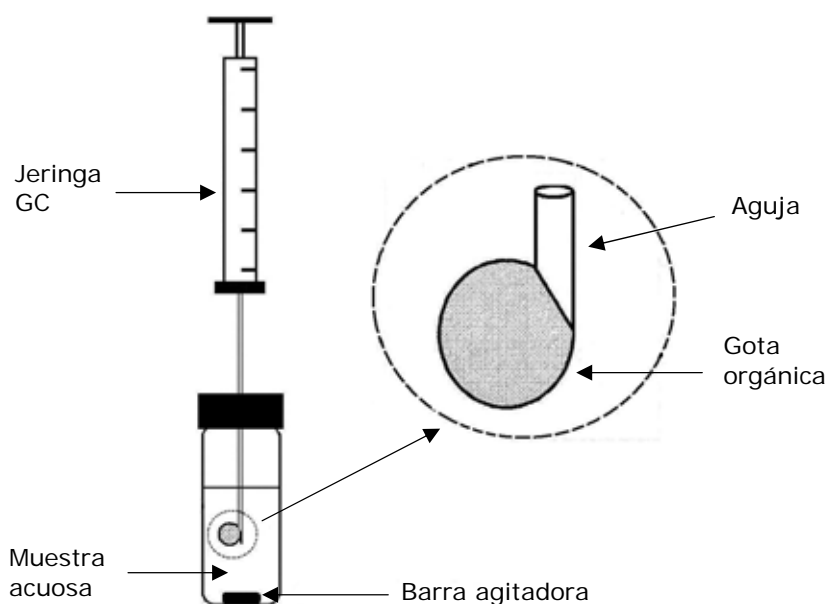


Figura 28. Esquema del sistema de microextracción en gota modificado por Jeannot y Cantwell. (Fuente: referencia 72).

Después de la extracción, realizada durante un período de tiempo preestablecido, la microgota era recogida en la jeringa y transferida al cromatógrafo para su posterior análisis. Este mismo sistema es posible utilizarlo en modo de espacio de cabeza [74] (Figura 29). En el mismo, la microgota es expuesta al espacio de cabeza existente sobre la muestra líquida o sólida. Los analitos han de ser transportados, en una primera etapa, desde la matriz de la muestra al espacio de cabeza, antes de pasar a la fase extractante. Este modo es utilizado en el caso de analitos volátiles y semivolátiles, así como analitos que puedan transformarse en especies volátiles. El procedimiento es idéntico al comentado anteriormente, con la única excepción de que la gota no entra en contacto directo con la muestra, lo que permite trabajar con matrices más complejas que contienen un elevado número de interferentes.

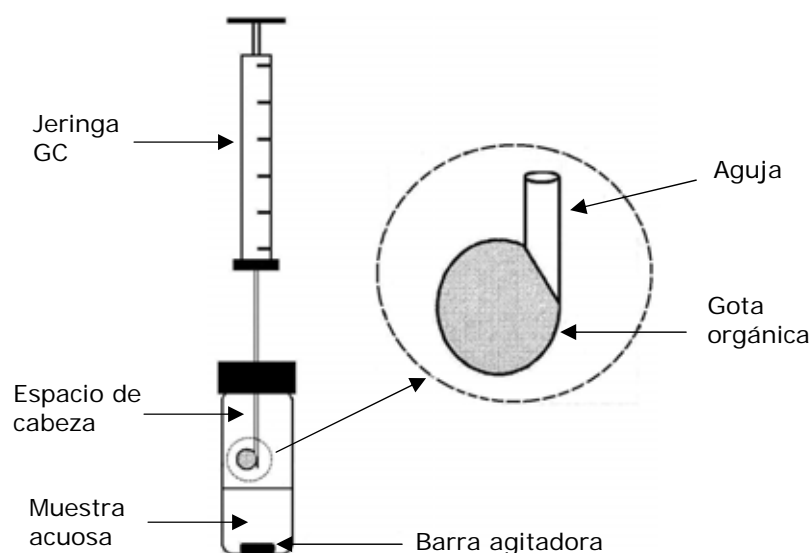


Figura 29. Esquema de microextracción en gota, en la modalidad de espacio de cabeza. (Fuente: referencia 72).

También en 1997 He y Lee [69] introducen por primera vez el término estático y dinámico aplicado a la LPME. El término estático es aplicado a la modalidad descrita anteriormente en la que la microgota es suspendida de una aguja de una jeringa. Por otro lado, el término dinámico es aplicado al caso en el que la muestra acuosa es introducida en la jeringa, la cual contiene 1  $\mu\text{L}$  de tolueno (Figura 30). Posteriormente la fase acuosa es expulsada de la jeringa y, nuevamente, el proceso se repite varias veces ( $\sim 20$ ). Los autores indican que la extracción tiene lugar en la película delgada que se forma en la pared interior de la aguja y consideran despreciable la transferencia de analito desde la fase acuosa al seno del disolvente orgánico (Figura 30b). Cuando la fase acuosa es expulsada de la jeringa los analitos son transferidos desde la película hasta el seno del disolvente orgánico (Figura 30c). Al finalizar la extracción, el microlitro de tolueno es inyectado en el sistema cromatográfico.



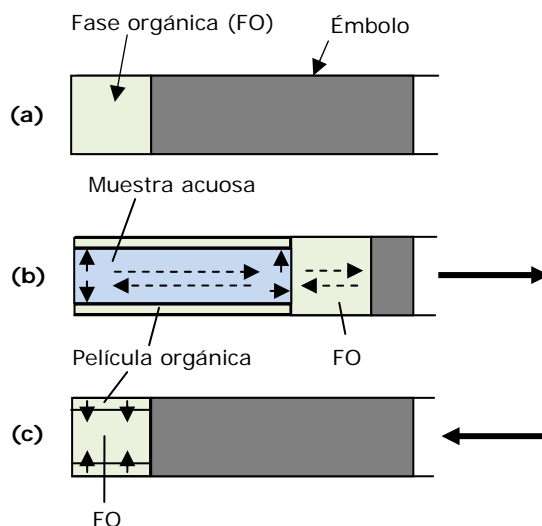


Figura 30. Etapas de la microextracción en gota dinámica. (a) Introducción de la fase orgánica en la jeringa; (b) introducción de una porción de la fase acuosa en el interior de la jeringa; (c) expulsión de la fase acuosa. (Fuente: referencia 69).

( —————> Movimiento émbolo    - - -> Movimiento de fases    -> Transferencia de masa )

También es posible realizar la extracción dinámica en el espacio de cabeza, introduciendo en la jeringa, en este caso, la fase gas del espacio de cabeza [75]. Ambas modalidades de extracción dinámica han sido recientemente automatizadas [76-79].

Ma y Cantwell [70] combinaron la extracción con disolvente con una retroextracción desde el disolvente orgánico a una microgota acuosa. Estos autores desarrollaron una aproximación basada en un sistema de tres fases, la denominada microextracción líquido-líquido-líquido (LLLME). Esta modalidad utiliza una fina película de octano (30  $\mu\text{L}$ ) confinada en un anillo de Teflón el cual se coloca sobre la muestra acuosa que está tamponada a pH 13 y contenida en un vial. La microgota (0,5-1  $\mu\text{L}$ ) de una disolución acuosa tamponada a pH 2.1 es suspendida en el interior de la fina película de octano con la ayuda de una jeringa (Figura 31). Los analitos polares (metanfetamina, mefentermina, 2-feniletilamina y metoxifenamina), una vez neutralizados, son extraídos desde la muestra acuosa hasta la membrana de octano y a continuación son nuevamente extraídos por la microgota acuosa. Una vez concluida la extracción la microgota acuosa se introduce en la jeringa y posteriormente es analizada mediante LC o CE.

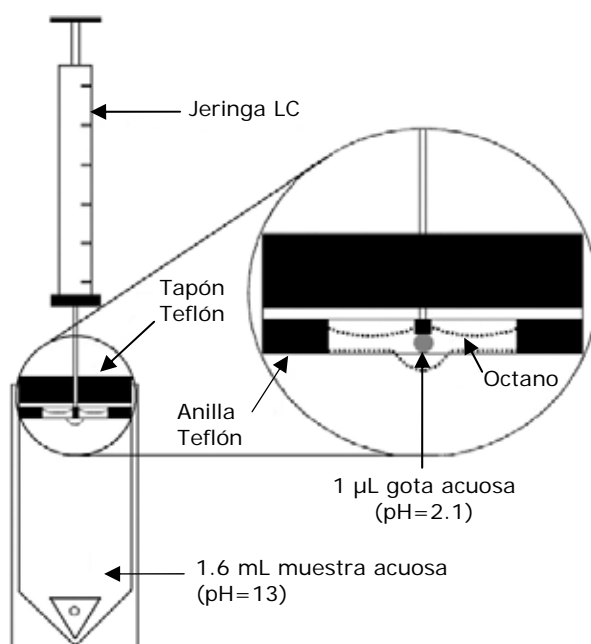


Figura 31. Esquema del sistema de microextracción líquido-líquido-líquido en gota diseñado por Ma y Cantwell. (Fuente: referencia 70).

Esta modalidad de extracción aparece ligeramente modificada años más tarde [80]. La diferencia reside principalmente en que el anillo de Teflón es eliminado y la fase orgánica se dispone directamente sobre la muestra (Figura 32).

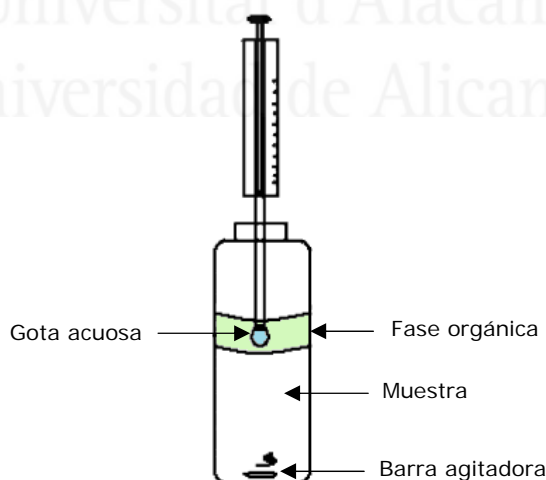


Figura 32. Esquema de la LLLME modificada. (Fuente: referencia 80).

La configuración de la película orgánica/gota acuosa tiene la ventaja de ser muy estable lo que permite emplear velocidades de agitación relativamente altas. Este método proporciona una elevada preconcentración

empleando tiempos relativamente cortos, alcanzando valores de los factores de enriquecimiento entre 160 y 500 para los compuestos estudiados.

Liu y Lee [71] introdujeron una nueva aproximación a la microextracción en gota, a la cual llamaron microextracción en flujo continuo (Figura 33).

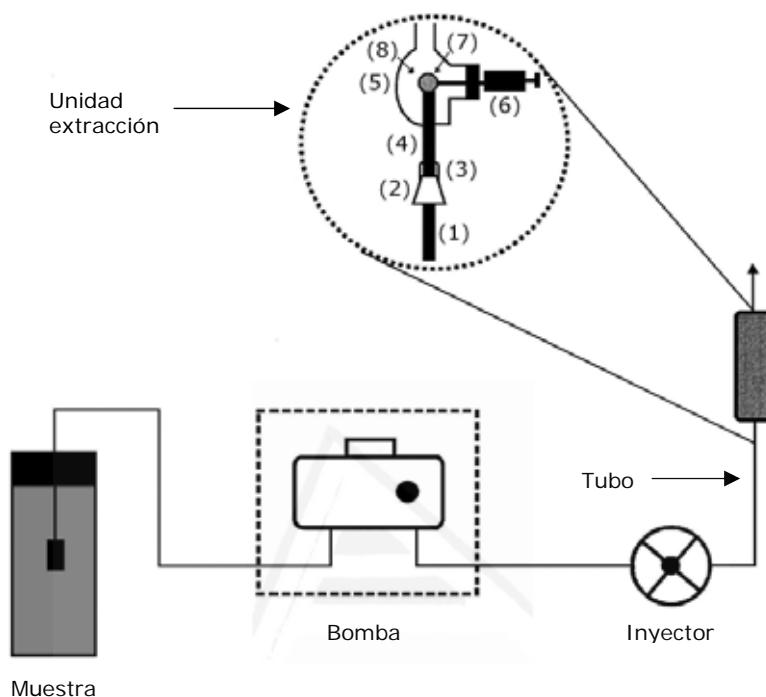


Figura 33. Sistema de microextracción en flujo continuo. (1) Tubo de PEEK, insertado en la cámara de extracción; (2) punta de pipeta modificada; (3) cierre; (4) entrada a la cámara de extracción; (5) cámara de extracción de vidrio; (6) jeringa; (7) gota de disolvente; (8) muestra. (Fuente: referencia 71).

En este caso la extracción se lleva a cabo en una cámara de vidrio de 0,5 mL. El tubo de polieterecetona (PEEK) conecta la unidad de extracción con el inyector y sirve para la introducción de la fase acuosa y del disolvente orgánico y para sostener la microgota durante la extracción. Una vez la cámara de vidrio está llena con la muestra acuosa, el volumen requerido de disolvente orgánico (1-5  $\mu\text{L}$ ) se introduce a través del inyector y junto con la muestra acuosa son conducidos a la cámara de vidrio. Cuando el disolvente orgánico alcanza el final del tubo de PEEK se forma una microgota la cual está virtualmente inmovilizada en la salida del tubo. La posición de la gota permite la interacción directa con el flujo continuo de la disolución de muestra, lo cual favorece la extracción. Al finalizar la

extracción la microgota es extraída con la ayuda de una jeringa y transferida al inyector del cromatógrafo para su posterior análisis. El método propuesto se utilizó para la extracción de cinco compuestos nitroaromáticos y seis clorobenzenos los cuales se encontraban en muestras acuosas en muy baja concentración. Los factores de preconcentración alcanzados tras diez minutos de extracción variaron entre 260 y 1600. Recientemente, Xia y colaboradores [81] han presentado una variación de este sistema. Estos autores han desarrollado un sistema de flujo recirculante conectando la salida de la cámara de extracción al recipiente que contiene la muestra; de este modo la muestra es recirculada lo cual permite reducir el volumen de muestra.

La SDME ha sufrido recientemente varias modificaciones. Yangcheng y colaboradores [82] han introducido el término microextracción en gota directamente suspendida (DSDME) para indicar que la jeringa que sustentaba la microgota ha sido eliminada y que la microgota (10-30  $\mu\text{L}$ ) ha sido depositada directamente en la muestra (Figura 34). Una vez finalizada la extracción, una porción de la microgota es tomada con la ayuda de una jeringa y posteriormente inyectada en el sistema de detección.



Figura 34. Esquema de la DSDME. (Fuente: referencia 82).

Esta modalidad de extracción puede realizarse adicionando un agente dispersante a la muestra, la cual es conocida como microextracción líquida dispersiva [83,84]. El agente dispersante, como su nombre indica, dispersa a la microgota orgánica produciendo un contacto más íntimo con la muestra. Se realiza la extracción y cuando ésta ha finalizado se centrifuga para separar ambas fases. Posteriormente, se toma una alícuota de la gota

orgánica con una jeringa y se realiza el análisis. Otro modo de tomar la fase orgánica, una vez finalizada la extracción, es introduciendo el vial en un baño de hielo y congelando la microgota (~5 minutos) [85]. Una vez congelada, la gota es separada de la muestra e introducida en un vial. Posteriormente la gota es fundida y se toma una porción con una jeringa y se inyecta en el sistema analítico. Esta modalidad de extracción, en la que la gota es introducida directamente en la muestra, presenta una serie de ventajas frente a la gota suspendida de la punta de la aguja de la jeringa. Entre ellas se encuentran: (i) Se consigue un contacto más íntimo entre la microgota y la muestra; (ii) la microgota se mueve libremente al ser agitada, con lo que no hay problemas de estabilidad de la microgota y permite velocidades de agitación elevadas; (iii) el equilibrio se alcanza con mayor rapidez, siendo necesarios tiempos de extracción más cortos y alcanzando factores de enriquecimiento superiores y; (iv) se permite el uso de mayores volúmenes de gota necesarios para algunos sistemas analíticos como el HPLC.

Otras pequeñas modificaciones han surgido en los últimos años. Se han introducido nuevos dispositivos que ayudan a la formación de la gota [86-88] (Figura 35), algunos sistemas han sido automatizados [76-79] y se ha empezado a utilizar nuevas fases extractantes como microgotas acuosas [89], como ya introdujo Ma y Cantwell pero sin el uso de membranas orgánicas, líquidos iónicos [88,90] y surfactantes [91].

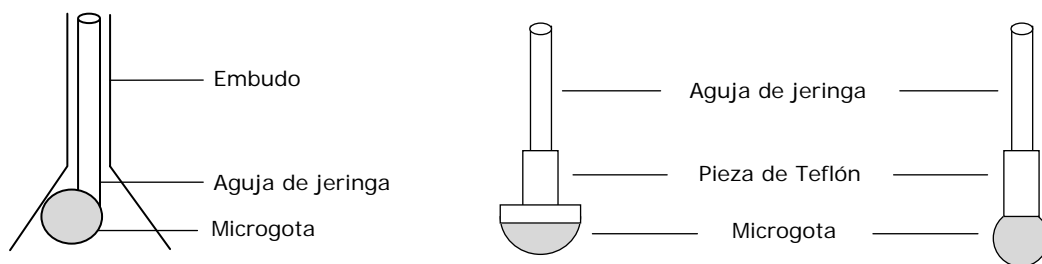


Figura 35. Nuevos dispositivos utilizados en SDME. (Fuentes: referencias 86, 87 y 88)

### II.3.2. Aspectos teóricos

Con la finalidad de aumentar el conocimiento sobre la técnica de microextracción en gota profundizando en las características cinéticas del proceso y descubriendo los diferentes caminos que nos permitirán optimizar de una forma racional el método, varios modelos matemáticos han sido propuestos.

#### II.3.2.1. Modalidad de inmersión directa

En la modalidad de inmersión directa, el modelo matemático que se presenta está basado en la teoría de la película de difusión de Nernst [67,68,72].

El proceso de microextracción se basa en las diferencias de concentración de los analitos entre las dos fases líquidas inmiscibles (acuosa y orgánica). La transferencia de masa del analito desde la fase acuosa (muestra) a la fase orgánica (microgota) continúa hasta que se alcanza el equilibrio termodinámico o se interrumpe la extracción.

El modelo consta de un balance de masas dinámico para el analito entre las diferentes fases. En todo momento el analito presente en la fase acuosa y orgánica ha de ser igual a la cantidad inicial de analito en la muestra:

$$C_{\text{aq}} V_{\text{aq}} + C_{\text{org}} V_{\text{org}} = C_{\text{aq}}^0 V_{\text{aq}} \quad (2)$$

donde

- $C_{\text{aq}}$  y  $C_{\text{org}}$  son las concentraciones del analito en la fase acuosa y en la fase orgánica (microgota) en un instante dado, respectivamente,
- $V_{\text{aq}}$  y  $V_{\text{org}}$  son el volumen de fase acuosa y el de la fase orgánica, respectivamente,
- $C_{\text{aq}}^0$  es la concentración inicial del analito en la fase acuosa.

El balance de masas dinámico del analito en la microgota viene dado por:

$$\frac{d(C_{\text{org}} V_{\text{org}})}{dt} = k_{\text{tot}}^{\text{org}} A_i [K C_{\text{aq}} - C_{\text{org}}] \quad (3)$$

donde

- $A_i$  es el área interfacial (que en el caso de la microgota es proporcional a  $(V_{\text{org}})^{2/3}$ ),
- $K$  es el coeficiente de partición en el equilibrio,
- $k_{\text{tot}}^{\text{org}}$  es el coeficiente de transferencia de masa total del analito con respecto a la fase orgánica.

Si se considera la transferencia a través de la interfase líquido-líquido, el coeficiente de transferencia de masa total viene dado por:

$$\frac{1}{k_{\text{tot}}^{\text{org}}} = \frac{1}{k^{\text{org}}} + \frac{K}{k^{\text{aq}}} \quad (4)$$

donde

- $k^{\text{org}}$  y  $k^{\text{aq}}$  son los coeficientes de transferencia de masa para el analito en la fase orgánica y fase acuosa, respectivamente.

Si se asume que el volumen de la microgota,  $V_{\text{org}}$ , permanece constante,  $A_i$  también será constante. Combinando las ecuaciones anteriores (2) y (3) se puede expresar  $C_{\text{org}}$  en función del tiempo:

$$C_{\text{org}}(t) = C_{\text{org}}^{\infty} (1 - e^{-\lambda t}) \quad (5)$$

donde

- $C_{\text{org}}^{\infty}$  es la concentración del analito en la microgota en el equilibrio y  $\lambda$  es la constante de velocidad observada ( $\text{s}^{-1}$ ).

Ambas variables vienen dadas por las siguientes expresiones:

$$C_{\text{org}}^{\infty} = \frac{KC_{\text{aq}}^0 V_{\text{aq}}}{V_{\text{aq}} + KV_{\text{org}}} \quad (6)$$

$$\lambda = \frac{k_{\text{tot}}^{\text{org}} A_i}{V_{\text{org}}} \left( 1 + \frac{KV_{\text{org}}}{V_{\text{aq}}} \right) \quad (7)$$

Jeannot y Cantwell verificaron experimentalmente la validez de la ecuación (5) que representa el porcentaje de analito extraído en un instante dado de lo que se extrae en el equilibrio [67,68].

Las ecuaciones (4) y (7) muestran los parámetros experimentales que influyen en el tiempo requerido para la extracción. El modelo descrito sugiere que maximizando  $k_{\text{tot}}^{\text{org}}$  y  $A_i$  combinado con la minimización de  $V_{\text{aq}}$  y  $V_{\text{org}}$  se obtienen mayores velocidades de extracción y, por lo tanto, menor es el tiempo de extracción. El máximo de área superficial se puede conseguir con la reciente modalidad de extracción dispersiva debido a que aumenta el área superficial al dispersar el disolvente orgánico en muchas microgotas. El máximo de  $k_{\text{tot}}^{\text{org}}$  se puede alcanzar aumentando el valor de  $k^{\text{aq}}$ , ya que  $k^{\text{org}}$  es, a menudo, más grande que  $k^{\text{aq}}$  y, por lo tanto, la resistencia a la transferencia de masa en la fase acuosa controla la velocidad total de transferencia de masa. El coeficiente de transferencia de masa para el analito en la fase acuosa,  $k^{\text{aq}}$ , está relacionado con la difusividad del analito en la fase acuosa,  $D^{\text{aq}}$ , y el espesor de la película inmovilizada alrededor de la microgota,  $\delta$ , también conocida como la película de difusión de Nernst. La relación entre ellas presenta la forma:

$$k^{\text{aq}} = \frac{D^{\text{aq}}}{\delta} \quad (8)$$

Esta ecuación sugiere que se puede conseguir un aumento en  $k^{\text{aq}}$  reduciendo  $\delta$ . Esto último se puede alcanzar aumentando la velocidad de agitación en el vial que contiene la muestra.



Modelo refinado

En el desarrollo del modelo anterior se asumió que el volumen de la microgota,  $V_{org}$ , permanecía constante durante el proceso de extracción; pero a menudo el volumen de la microgota se puede reducir a la mitad de su valor inicial por un fenómeno de disolución.

El disolvente orgánico, inicialmente presente en la gota, tras experimentar el proceso de disolución se encuentra distribuido entre la gota remanente y la fase acuosa. Por lo tanto, en un instante dado se tiene:

$$(C_s)_{aq} V_{aq} + \rho_s V_{org} = \rho_s V_{org}^o \quad (9)$$

donde

- $\rho_s$  es la densidad del disolvente orgánico,
- $(C_s)_{aq}$  es la concentración del disolvente en la fase acuosa,
- $V_{org}^o$  es el volumen inicial de la microgota.

El balance de masas dinámico del disolvente presente en la microgota viene dado por:

$$\rho_s \frac{dV_{org}}{dt} = -V_{aq} \frac{d(C_s)_{aq}}{dt} = -k_s A_i [(C_s)_{aq,\infty} - (C_s)_{aq}] \quad (10)$$

donde

- $k_s$  es el coeficiente de transferencia de masa del disolvente en la fase acuosa,
- $(C_s)_{aq,\infty}$  es la concentración en el equilibrio del disolvente orgánico en la fase acuosa, es decir, la solubilidad del disolvente en agua.

Utilizando la ecuación (10), la ecuación (3), y después de varias transformaciones, se convierte en:

$$\frac{dC_{org}}{dt} = \frac{k_{tot}^{org} A_i}{V_{org}} [k C_{aq} - C_{org}] + \frac{k_s A_i C_{org}}{V_{org} \rho_s} [(C_s)_{aq,\infty} - (C_s)_{aq}] \quad (11)$$

Esta última ecuación se ajusta mejor a la dinámica de la extracción en gota en su modalidad de inmersión directa. El segundo término de la derecha representa el aumento adicional de la concentración del analito en la microgota debido a la pérdida de volumen de la misma como consecuencia de su disolución en la fase acuosa. Aquí se asume que todo el analito permanece en la gota debido a su mayor afinidad por el disolvente orgánico.

El valor de la constante  $k_s$  aumenta al hacerlo la velocidad de agitación, lo que puede reducir considerablemente el tiempo de extracción. Por lo tanto, la velocidad de agitación es una variable experimental muy importante en la microextracción en gota por inmersión directa.

#### II.3.2.2. Modalidad de espacio de cabeza

Recientemente Schnobrich y Jeannot [92] han propuesto un modelo matemático que permite describir la microextracción en gota en su modalidad de espacio de cabeza. Dicho modelo se fundamenta en considerar la concentración del analito baja y relativamente en estado estacionario en el espacio de cabeza durante el proceso de extracción. Esta aproximación se utiliza con la finalidad de simplificar el tratamiento matemático y proporcionar una expresión cinética manejable.

Esta modalidad de microextracción introduce un grado más de complejidad para entender los aspectos cinéticos del proceso debido a la presencia de un intermediario adicional como es la fase gaseosa. En la [Figura 36](#) se muestra un esquema del sistema de extracción con las diferentes fases presentes en el mismo.

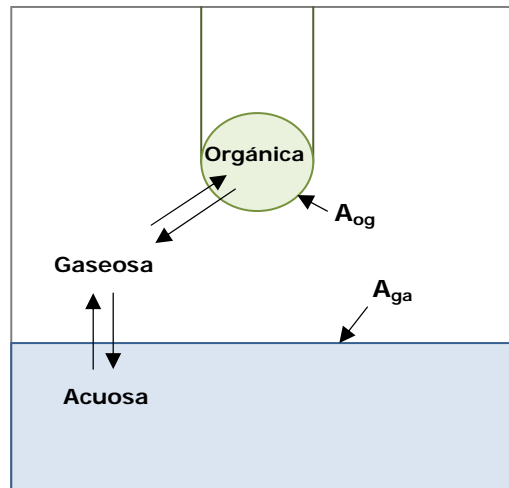


Figura 36. Diagrama simplificado del sistema de transporte del analito entre las tres fases y las áreas interfaciales ( $A_{og}$ =orgánica/gaseosa;  $A_{ga}$ =gaseosa/acuosa) (Fuente: referencia 92).

El modelo propuesto se fundamenta en los siguientes supuestos: (1) el flujo de masa de analito (moles por unidad de área interfacial y por unidad de tiempo) es proporcional a la diferencia de concentraciones entre el seno y la interfase; (2) no hay acumulación de los analitos en la interfase; (3) el equilibrio de distribución siempre se alcanza entre las fases adyacentes a cada lado de la interfase; (4) la cantidad de analito en el espacio de cabeza es despreciable comparada con las otras fases (líquidas) y permanece inalterada (estado estacionario durante la extracción). Estos supuestos pueden ser expresados matemáticamente mediante las siguientes ecuaciones:

$$\frac{1}{A_{ga}} \frac{dn}{dt} = k^{aq}(C_{aq} - C_{aq,i}) = k^{g1}(C_{g1,i} - C_g) \quad (12)$$

$$\frac{1}{A_{og}} \frac{dn}{dt} = k^{g2}(C_g - C_{g2,i}) = k^{org}(C_{org,i} - C_{org}) \quad (13)$$

$$K_{ga} = \frac{C_{g1,i}}{C_{aq,i}} \quad (14)$$

$$K_{og} = \frac{C_{org,i}}{C_{g2,i}} \quad (15)$$

$$C_{aq}V_{aq} + C_{org}V_{org} = C_{aq}^0V_{aq} \quad (2)$$

donde,  $A_{ga}$  y  $A_{og}$  son las áreas interfaciales entre las fases gaseosa/acuosa y entre las fases orgánica/gaseosa, respectivamente;  $n$  es el número de moles;  $t$  es el tiempo;  $k^{aq}$ ,  $k^{g1}$ ,  $k^{g2}$  y  $k^{org}$  son los coeficientes de transferencia de masa en la fase acuosa, entre las fases gaseosa y acuosa, entre las fases gaseosa y orgánica, y en la fase orgánica, respectivamente;  $C_{aq}$ ,  $C_g$  y  $C_{org}$  son las concentraciones de analito en el seno de las fases acuosa, gaseosa y orgánica, respectivamente;  $C_{aq,i}$ ,  $C_{g1,i}$ ,  $C_{g2,i}$  y  $C_{org,i}$  son las concentraciones de analito en cada fase en las proximidades de las interfases;  $K_{ga}$  y  $K_{og}$  son los coeficientes de partición entre las fases gaseosa/acuosa, y entre las fases orgánica/gaseosa, respectivamente;  $V_{aq}$  y  $V_{org}$  son los volúmenes de la fase acuosa y fase orgánica, respectivamente; y  $C_{aq}^0$  es la concentración inicial del analito en la fase acuosa.

Combinando las ecuaciones (2), (12), (13), (14) y (15) y reordenándolas, se obtiene una ecuación diferencial lineal de primer orden para  $C_{org}$  con respecto al tiempo, la cual puede ser integrada para obtener la siguiente expresión:

$$C_{org}(t) = C_{org}^{\infty} (1 - e^{-\lambda t}) \quad (5)$$

donde  $C_{org}^{\infty}$  es la concentración en el equilibrio del analito en la fase orgánica (microgota) y  $\lambda$  es la constante de velocidad, que en este modo de extracción viene dada por:

$$\lambda = \frac{A_{og} A_{ga} k_{tot}^{org} k_{tot}^{aq}}{V_{org} (A_{og} k_{tot}^{org} K_{og} + A_{ga} k_{tot}^{aq})} \left[ K \frac{V_{org}}{V_{aq}} + 1 \right] \quad (16)$$

donde,  $K$  es el coeficiente de partición entre la fase orgánica y la fase acuosa en el equilibrio.

Los coeficientes de transferencia de masa total en cada interfase se definen como:

$$k_{tot}^{org} = \frac{k^{g2} k^{org}}{k^{g2} + K_{og} k^{org}} \quad (17)$$

$$k_{\text{tot}}^{\text{aq}} = \frac{k^{\text{aq}}k^{\text{g1}}}{k^{\text{aq}} + K_{\text{ga}}k^{\text{g1}}} \quad (18)$$

Representando la concentración de analito en la fase orgánica frente al tiempo (ecuación 5), se espera un comportamiento idéntico al obtenido en el caso de la modalidad de inmersión directa. Por otro lado, la constante de velocidad,  $\lambda$ , es más compleja en el modo de espacio de cabeza que en modo de inmersión directa (ecuación 7), pero una revisión cuidadosa de ésta a través de las ecuaciones (16)-(18) proporciona importantes detalles sobre el proceso de extracción. En primer lugar, el coeficiente de transferencia de masa total de la ecuación (17), el cual describe la velocidad de transferencia desde el espacio de cabeza hasta la fase orgánica, puede ser simplificado a  $k^{\text{org}}$  ya que el primer término del denominador es mucho más grande que el segundo. Esto será siempre así a menos que  $K_{\text{og}}$  sea excepcionalmente grande ya que la transferencia de materia en la fase gaseosa (difusión) es aproximadamente cuatro órdenes de magnitud mayores que en la fase líquida, y además, la agitación de la fase acuosa favorece los movimientos de convección en la fase gaseosa, pero no en la fase orgánica. En segundo lugar, el coeficiente de transferencia de masa total de la ecuación (18), el cual describe la velocidad de transferencia desde la fase acuosa hasta el espacio de cabeza, puede ser simplificado a  $k^{\text{aq}}/K_{\text{ga}}$  por razones similares a las anteriores. En otras palabras, generalmente, el control de la velocidad del proceso de extracción reside principalmente en las fases acuosa y/o orgánica, pero no en la fase gaseosa (espacio de cabeza). Con todas estas aproximaciones, la expresión de la constante de velocidad puede ser simplificada a la siguiente expresión:

$$\lambda = \frac{A_{\text{og}}A_{\text{ga}}k^{\text{org}}k^{\text{aq}}}{V_{\text{org}}K_{\text{ga}}(A_{\text{og}}k^{\text{org}}K_{\text{og}} + A_{\text{ga}}(k^{\text{aq}}/K_{\text{ga}}))} \left[ K \frac{V_{\text{org}}}{V_{\text{aq}}} + 1 \right] \quad (19)$$

Se puede conocer si el control de la velocidad del proceso de extracción reside en la fase acuosa, orgánica o en ambas, examinado con mayor detalle la ecuación (19). Para analitos volátiles con valores de  $K_{\text{og}}$  del

orden de  $10^3$  y de  $K_{ga}$  del orden de  $10^{-1}$ , ambos términos en el denominador de la ecuación (19) serán de similar magnitud, asumiendo que  $A_{og}$  y  $k^{org}$  son aproximadamente un orden de magnitud más pequeños que los términos correspondientes de la interfase gas/agua, las cuales aparecen en el lado de la derecha (esto suele ser razonable dada la geometría y agitación normalmente utilizadas en el proceso de microextracción en espacio de cabeza). Por lo tanto, este modelo predice que ambos procesos (transferencia desde la fase acuosa, y transferencia en la fase orgánica) son las etapas limitantes de la velocidad para compuestos volátiles, coincidiendo con estudios anteriores [74].

Por otro lado, para compuestos menos volátiles con valores muy pequeños de  $K_{ga}$ , el segundo término del denominador es el dominante, simplificando en gran medida la expresión de la constante de velocidad similar a la ecuación (7):

$$\lambda \approx \frac{A_{og}k^{org}}{V_{org}} \left[ K \frac{V_{org}}{V_{aq}} + 1 \right] \quad (20)$$

En este caso, el control de la velocidad reside exclusivamente en la difusión de los analitos en la microgota.

Este modelo cinético ha sido constatado experimentalmente utilizando el grupo de analitos BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y los isómeros del xileno) como analitos modelo [92]. En este estudio se observó que la consideración del estado estacionario empieza a no cumplirse para analitos muy volátiles, para los cuales la concentración en el espacio de cabeza es importante. En términos de velocidad de extracción, el modelo sugiere que la extracción de compuestos de baja volatilidad se ve beneficiada mejorando la transferencia de masa en la fase orgánica mediante la agitación del disolvente orgánico (e.g. técnicas dinámicas), mientras que en el caso de los analitos más volátiles la extracción se mejora mediante la agitación tanto de la fase acuosa como de la fase orgánica. El modelo también predice una mejora en la constante de velocidad aumentando las áreas interfaciales y disminuyendo el volumen de la fase orgánica.

### II.3.3. Parámetros que afectan a la microextracción en gota

#### II.3.3.1. Fuerza iónica

La adición de sales (p.e., NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a muestras acuosas presenta varios efectos en la extracción al provocar un aumento de la fuerza iónica de la disolución [72,93]. Dependiendo de la solubilidad de los analitos, la extracción se ve mejorada debido a que las moléculas de agua tienden a solvatar a los iones presentes en la misma y no a las moléculas neutras de los analitos. La reducción de la solubilidad en la fase acuosa por incremento de la fuerza iónica se conoce como efecto "*salting-out*" (efecto salino desplazante) el cual modifica el coeficiente de partición de muchas sustancias y, por tanto, facilita la extracción de los analitos por la fase orgánica. Se produce, por tanto, una disminución de la solubilidad de los analitos en agua favoreciendo su paso a otras fases del sistema, gota o espacio de cabeza, originando un incremento de la sensibilidad. Para que este proceso tenga lugar es necesario que los analitos se encuentren en forma no disociada. Sin embargo, la presencia de sal causa un segundo efecto en la modalidad de inmersión directa. Se produce un cambio en las propiedades físicas de la película de extracción (película de difusión de Nernst), reduciendo la velocidad de difusión de los analitos que se desplazan hacia la gota y por tanto, dificultando la extracción.

#### II.3.3.2. pH de la muestra

El pH de la muestra afecta al equilibrio de disociación de los analitos en medio acuoso. Anteriormente se ha visto que la extracción es más eficaz si los analitos están sin disociar.

Si se asume que solamente serán extraídas por la gota las formas no disociadas de los analitos (ácidos o básicos), el ajuste del pH de una disolución acuosa a valores que promocionen la forma neutra de los analitos cambiará la relación de distribución de las especies disociables, incrementando la transferencia de masa hacia la gota y, por lo tanto, mejorando la extracción de dichos analitos. Por ejemplo, cuando el pH disminuye se produce un aumento de la concentración del ácido en su

forma no disociada resultando un aumento de la cantidad extraída por la gota y, por tanto, un incremento de la sensibilidad. Por ello, se recomienda trabajar a un pH al menos dos unidades por debajo (especies ácidas) o por encima (especies básicas) del correspondiente  $pK_a$ . En la práctica, en las extracciones afectadas por el pH las muestras deben tamponarse para conseguir buena reproducibilidad.

#### II.3.3.3. Agitación de la muestra

Cuando se extraen compuestos volátiles mediante espacio de cabeza, el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio es corto y generalmente está limitado por la difusión de los analitos en la gota. En este caso los analitos se encuentran en el espacio de cabeza dando lugar a extracciones relativamente rápidas incluso cuando el sistema no se agita. La agitación facilita la transferencia de masa entre la fase acuosa y el espacio de cabeza, originando extracciones más rápidas de las especies menos volátiles. Sin embargo, en inmersión directa, en la mayor parte de las muestras líquidas es conveniente agitar el sistema para facilitar el transporte de masa desde la muestra acuosa hasta la gota y, de esta forma, acelerar la cinética del proceso reduciendo el tiempo de extracción.

La agitación magnética produce un incremento en la respuesta analítica del instrumento en todos los casos. Sin embargo, cuando la microgota está directamente expuesta a la fase acuosa hay un límite superior el cual no se puede superar ya que elevadas velocidades de agitación puede provocar el desprendimiento y la disolución de la gota, especialmente con tiempos prolongados de agitación. El uso de pequeñas barras de agitación puede superar este tipo de inconvenientes.

#### II.3.3.4. Disolvente de extracción

La elección de disolvente más adecuado para la extracción es muy importante para alcanzar una buena selectividad para los compuestos de interés. Deben probarse varios disolventes inmiscibles en agua de diferente polaridad y solubilidad en agua. La elección final del disolvente debe basarse en la comparación de la selectividad, eficiencia de la extracción,



posibilidad de desprendimiento de gota, velocidad de disolución de gota (especialmente para velocidades elevadas de agitación y tiempos de extracción largos), nivel de toxicidad y presión de vapor, en el caso en el que se trabaje en modalidad de espacio de cabeza.

### II.3.3.5. Tiempo de extracción

El objetivo de todo proceso de extracción es alcanzar el equilibrio de distribución en el sistema, ya que cuando esto ocurra se extraerá la máxima cantidad de analito. El tiempo de equilibrio se define como el tiempo tras el cual la cantidad de analito en cada fase permanece constante y corresponderá a la cantidad extraída a tiempo infinito. La agitación de la muestra reduce el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio ya que favorece la difusión de los analitos hacia la gota o el espacio de cabeza.

Los compuestos con constantes de distribución bajas poseen tiempos de equilibrio mayores. Desde un punto de vista práctico, generalmente se trabaja a un tiempo de extracción menor, sin llegar a alcanzar el equilibrio, siempre y cuando se tenga un control estricto del mismo para obtener suficiente reproducibilidad en la extracción. Además, un tiempo de extracción prolongado puede provocar la disolución de la gota.

### II.3.3.6. Volumen de gota

El uso de gotas grandes produce un incremento en la respuesta analítica del instrumento debido a un aumento en la cantidad de analito extraída. Sin embargo, gotas grandes son difíciles de manipular. Además, la inyección de volúmenes grandes produce un ensanchamiento de las bandas en cromatografía. En la microextracción en gota el volumen de la gota con el que se suele trabajar oscila entre 1 y 10  $\mu\text{L}$ , pero el volumen más común es 1-2  $\mu\text{L}$  ya que asegura la formación de una gota estable y reproducible, y permite emplear una elevada velocidad de agitación.

### II.3.3.7. Temperatura

La temperatura es un parámetro muy importante en la microextracción en gota, ya que afecta tanto a la cinética como a la termodinámica del proceso de absorción y, por tanto, a la sensibilidad y selectividad del proceso. La temperatura presenta dos efectos opuestos en el proceso de microextracción en gota. Por un lado, el incremento de la temperatura durante la extracción aumenta la difusión de los analitos hacia la gota. Además, en el modo de muestreo de espacio de cabeza, la temperatura favorece la transferencia de los analitos hacia el espacio de cabeza. Por otra parte, como la etapa de absorción es un proceso exotérmico, el incremento de temperatura reduce el coeficiente de partición de los analitos (entre la fase orgánica y la fase gaseosa o acuosa) y, por lo tanto, produce una disminución en la absorción del analito en la gota.

Si la muestra y la gota cambian su temperatura de  $T_0$  a  $T$  el coeficiente de partición cambia según la expresión:

$$K = K_0 e^{-\frac{\Delta H}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right)} \quad (21)$$

$K_0$  es el coeficiente de partición entre la gota y la muestra a temperatura  $T_0$  (K),  $\Delta H$  es la variación de entalpía del analito cuando se mueve desde la muestra a la gota y  $R$  es la constante de los gases. El cambio de entalpía,  $\Delta H$ , se considera constante en el intervalo de temperatura que se utiliza en SDME. Así, según la ecuación (21) un incremento de temperatura produce la disminución de  $K$  y, por tanto, una disminución de la sensibilidad.

### II.3.3.8. Volumen del espacio de cabeza y forma del vial

En modo de espacio de cabeza, (HS-SDME), los analitos son distribuidos entre la matriz de la muestra, la gota y el espacio de cabeza. Los compuestos muy volátiles se acumulan en el espacio de cabeza. por lo que su volumen debe ser pequeño para que los analitos se concentren antes

de su difusión hacia la gota. Si el volumen del espacio de cabeza es grande se produce una sustancial pérdida de sensibilidad.

El volumen del espacio de cabeza afecta también a la cinética del proceso. Cuanto más pequeño sea éste, con relación al volumen de muestra, más rápido será el transporte de los analitos desde la muestra hasta la gota.

La forma del vial también afecta a la cinética del proceso de extracción. Cuando se utiliza la modalidad de espacio de cabeza la transferencia de masa entre la muestra y el espacio de cabeza está influenciada por el tamaño de la superficie de contacto entre las dos fases. Además, dependiendo de la forma del vial, se producirá más o menos convección cuando la muestra es agitada.

### II.3.3.9. Adición de disolvente

Hasta el momento, los estudios que se han realizado sobre el efecto de la adición de un disolvente orgánico auxiliar en muestras acuosas han indicado que se reduce la cantidad de analito extraído. Por ejemplo, en una disolución acuosa con un 3% de metanol la  $K$  del benceno se reduce en un 20%.

Por otra parte, la adición de agua o de disolventes orgánicos a muestras de suelos y lodos ha demostrado ser muy eficaz para facilitar la liberación de analitos desde la matriz y mejorar su difusión hasta la gota.

## 11.4. Líquidos iónicos como fase extractante

Los líquidos iónicos (ILs), también llamados líquidos iónicos a temperatura ambiente (*“room-temperature ionic liquids”, RTILs*), son sales líquidas a temperatura ambiente debido a que presentan puntos de fusión inferiores a ésta temperatura. Estos compuestos resultan de la combinación de un catión orgánico y un anión orgánico o inorgánico. La mayoría de los ILs estudiados están formados por los cationes 1-alkuil-3-metilimidazolio ( $[C_nMIM]^+$ ), N-alkuilpiridinio, tetraalkuilamonio o tetraalkuilfosfonio (Figura 37). Los aniones más utilizados son el hexafluorofosfato  $[PF_6]^-$ , tetrafluoroborato  $[BF_4]^-$ , trifluorometilsulfonato  $[CF_3SO_3]^-$ , bis[(trifluorometil)sulfonyl]amida  $[(CF_3SO_2)_2N]^-$ , trifluoroetanoato  $[CF_3CO_2]^-$ , acetato  $[CH_3CO_2]^-$ , nitrato y haluros [94].

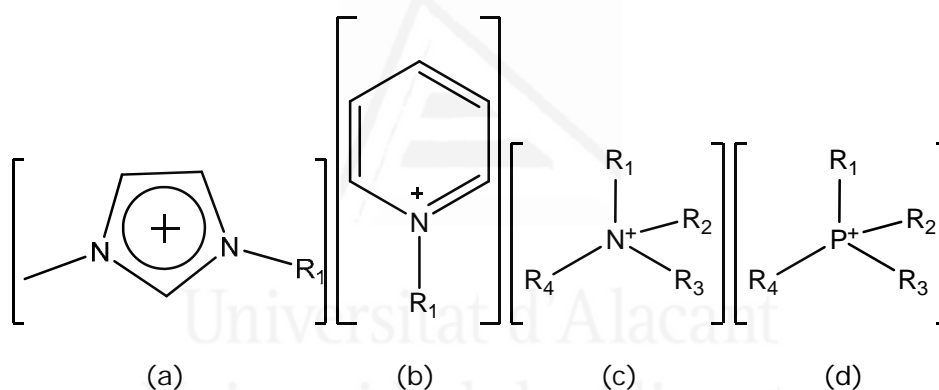


Figura 37. Cationes de algunos de los líquidos iónicos más estudiados. (a) 1-alkuil-3-metilimidazolio; (b) N-alkuilpiridinio; (c) tetraalkuilamonio; (d) tetraalkuilfosfonio. ( $R_{1,2,3,4}$  = alkul).

Las propiedades fisicoquímicas de los ILs dependen de la naturaleza y tamaño del catión y del anión. Por ello, debido a que una única combinación de cationes y aniones influye en las propiedades de los ILs, a estos disolventes se les ha denominado disolventes diseñados. Las diferentes combinaciones de anión y catión posibles puede proporcionar hasta  $10^{18}$  ILs diferentes. La Tabla 1 muestra algunas propiedades físicas de los ILs más utilizados en química analítica.

Tabla 1. Propiedades físicas de los ILs más utilizados en química analítica. (Fuente: referencia 95).

ILs	Punto fusión (°C)	Densidad (g mL <sup>-1</sup> )	Viscosidad (mPa s)	Solubilidad agua (g 100 mL <sup>-1</sup> )	Conductividad (S cm <sup>-1</sup> )
[C <sub>4</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ]	10, -8	1.36-1.37 (25°C)	148-450 (25°C)	1.88	0.14 (25°C)
[C <sub>6</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ]	-61	1.29-1.31 (25°C)	560-586 (25°C)	0.75	
[C <sub>8</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ]		1.20-1.23 (25°C)	682-710 (25°C)	0.20	
[CMIM][(CF <sub>3</sub> SO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N]	22	1.56	44 (20°C)		0.84 (20°C)
[C <sub>2</sub> MIM][(CF <sub>3</sub> SO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N]	-3	1.50	34 (20°C)	1.77	0.88 (20°C)
[C <sub>4</sub> MIM][(CF <sub>3</sub> SO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N]	-4	1.42	52 (20°C)	0.80	0.39 (20°C)
[C <sub>6</sub> MIM][(CF <sub>3</sub> SO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N]		1.33		0.34	
[C <sub>8</sub> MIM][(CF <sub>3</sub> SO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N]		1.31		0.21	
[C <sub>2</sub> MIM][BF <sub>4</sub> ]	15	1.15 (30°C) 1.28 (25°C)	37 (25°C)	Miscible	
[C <sub>4</sub> MIM][BF <sub>4</sub> ]	-81	1.17 (30°C) 1.21 (25°C)	233 (30°C) 180 (25°C)	Miscible	0.17 (25°C)
[C <sub>6</sub> MIM][BF <sub>4</sub> ]			314 (20°C) 177 (30°C)	Miscible	
[C <sub>4</sub> MIM][CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ]	16	1.29 (20°C)	90 (20°C)	Miscible	0.37 (20°C)

Sus aplicaciones en la química analítica [95-99], especialmente en la separación de analitos, son importantes debido a que poseen propiedades únicas tales como buena estabilidad térmica y oxidativa, conductividad iónica intrínseca, una amplia ventana de potenciales electroquímicos, excelentes propiedades de transferencia de calor, eficiente absorción y transmisión de microondas, viscosidad y densidad variables, miscibilidad selectiva con agua o disolventes orgánicos, síntesis económica, así como una buena extractabilidad para compuestos orgánicos e iones metálicos [100-102]. Sin embargo, las propiedades que los ha hecho más conocidos son su baja presión de vapor e inflamabilidad, incluso a elevadas temperaturas. Debido a estas últimas propiedades los ILs producen una cantidad mínima de compuestos orgánicos volátiles, el potencial inflamable se ve minimizado y pueden ser recuperados y reciclados, hecho que les ha proporcionado un papel importante dentro de la química verde debido a su carácter beneficioso para el medio ambiente y para las personas. Sin embargo, durante los últimos años han aparecido diversos estudios que ponen en entredicho la toxicidad de algunos de los ILs fundamentalmente en el medio acuático [103]. Estudios de toxicidad, incluyendo el de ecotoxicidad, han demostrado que los ILs no son totalmente benignos y que

algunos de ellos poseen un nivel de toxicidad. Por ello se ha estudiado la posibilidad de desarrollar ILs biodegradables [104-106].

Los ILs aparecen a principios de la década de los noventa, principalmente para ser utilizados como medio de reacción y así reemplazar a los disolventes orgánicos convencionales. Una década después han sido incorporados en muchas otras áreas y, recientemente, han captado el interés y la imaginación de la comunidad analítica [95-99]. Así, en los últimos años han sido una pieza importante de las innovaciones en separaciones analíticas, espectrometría de masas, electroquímica, espectroscopia y química de sensores.

Como se ha comentado anteriormente, uno de los campos donde mayor ha sido su aplicación, debido a su buena extractabilidad, es en el de extracción de analitos tanto orgánicos como inorgánicos [100]. El primer trabajo publicado en el que se utilizó un IL como fase extractante data del año 1998 [107] y el primero dedicado a la microextracción en fase líquida del año 2003 [88]. Desde el año 2003 han aparecido numerosas publicaciones tanto dedicadas a SDME [88,90,108-112] (modo de inmersión directa y espacio de cabeza) como a HF-LPME [113] así como a modo dispersivo [114]. El aumento en el número de trabajos publicados se debe a las excelentes propiedades físicas y químicas que los ILs ofrecen a la microextracción líquida, en especial a la SDME, y que pueden ser seleccionadas variando el tipo de anión y catión. De esta forma se pueden seleccionar disolventes de muy diversa densidad, viscosidad, punto de fusión, polaridad, miscibilidad en agua y volatilidad, lo que permite emplear tiempos de extracción y volúmenes de gota mayores (3-10  $\mu\text{L}$ ) mejorando así los factores de enriquecimiento y con ello la sensibilidad del método.

Al utilizar un IL como fase extractante se debe emplear un dispositivo similar al último mostrado en la [Figura 35](#). Este dispositivo consiste en un capilar de Teflón de 3 mm de longitud y 0,8 mm de diámetro interno. Este dispositivo es utilizado debido a que las jeringas utilizadas en este caso son para LC y la punta de la aguja no es biselada lo que no permite suspender la gota. En este caso el sistema utilizado para la SDME es el mismo descrito por Jeannot y Cantwell [67,74] (punto II.3.1.) con la variación del nuevo dispositivo ([Figura 38](#)).

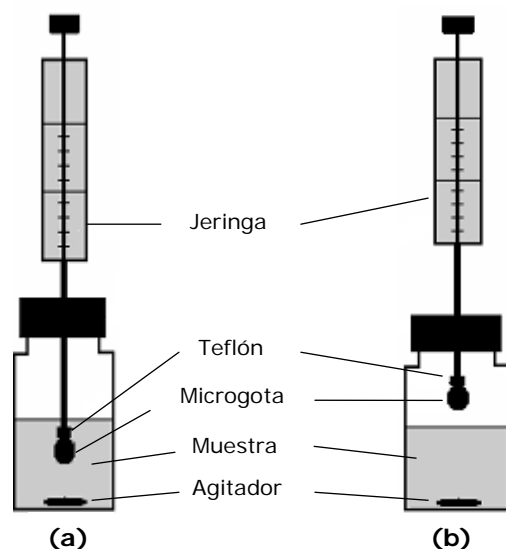


Figura 38. Sistema de microextracción en gota utilizado con líquidos iónicos: (a) Modalidad de inmersión directa y; (b) de espacio de cabeza. (Fuente: referencia 88).

Sin embargo, existe una limitación al utilizar los ILs como fase extractante debida a su baja presión de vapor. Los ILs no pueden ser introducidos directamente en un cromatógrafo de gases ya que sin la interfase adecuada contaminarían la columna deteriorando su eficacia. Esta limitación hace que la sensibilidad sea menor debido a los detectores utilizados en LC. Para realizar el análisis de la microgota se suele utilizar la cromatografía de líquidos provista de un detector adecuado, en la mayoría de los casos ultravioleta-visible. Algunos problemas adicionales que aparecen frecuentemente en esta modalidad cromatográfica son que en algunos casos la disolución de los analitos desde la gota es lenta por lo que se deteriora la resolución. Los IL proporcionan también picos anchos y, además, ensucian la columna, producen interferencias debidas a la falta de pureza y su movimiento se ve dificultado por su gran viscosidad. Recientemente Valcárcel y colaboradores han presentado un dispositivo [115] que se coloca en el inyector del cromatógrafo de gases para realizar la desorción térmica de los analitos del IL y recogerlo posteriormente libre de analito, evitando así el contacto con la columna cromatográfica.

Por tanto, una de las nuevas tendencias relacionadas con la utilización de los ILs en la microextracción líquida consiste en desarrollar dispositivos/interfases que sirvan para introducir directamente las

microgotas de ILs en un instrumento de GC, y así obtener unos menores límites de detección que los que se obtienen actualmente con IL-LC o utilizando disolventes orgánicos clásicos y GC.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



## II.5. Radiación de microondas para favorecer la extracción

El nombre magnetrón (generador de microondas) fue utilizado por primera vez por A.W. Hall en 1921. Percy Spencer descubrió en 1946 la habilidad de las microondas de calentar agua con mucha rapidez, siendo en el año 1967 cuando aparece el primer horno de microondas doméstico. Sin embargo, hasta el año 1975 no se publica la primera aplicación de las microondas en el campo de la preparación de la muestra [116].

El interés por la utilización de la energía de microondas en el tratamiento de muestras ha ido creciendo los últimos años [117-119] debido a las ventajas que presenta frente al calentamiento convencional. Una de las principales ventajas es la importante reducción del tiempo de extracción, hecho atribuible al mecanismo de calentamiento. Mientras que en las técnicas convencionales el mecanismo de calentamiento se debe básicamente a fenómenos de conducción-convección, el calentamiento mediante energía de microondas se basa en la acción directa de las microondas sobre las moléculas y los iones presentes en la disolución.

### II.5.1. Fundamentos del calentamiento con energía de microondas

Las microondas son ondas electromagnéticas cuya frecuencia cubre el intervalo desde 300 a 300.000 MHz, que corresponde a longitudes de onda entre 1 cm y 1 m (Figura 39). Las microondas se encuentran entre las regiones de las ondas de radio e infrarrojos. De las cuatro frecuencias más utilizadas con fines industriales y científicos (915; 2.450; 5.800; 22.125 MHz) la que se usa en los hornos domésticos con potencias de 600-700 W es la de 2.450 MHz, la cual proporciona a la cavidad de microondas unas 43.500 calorías en 5 minutos.

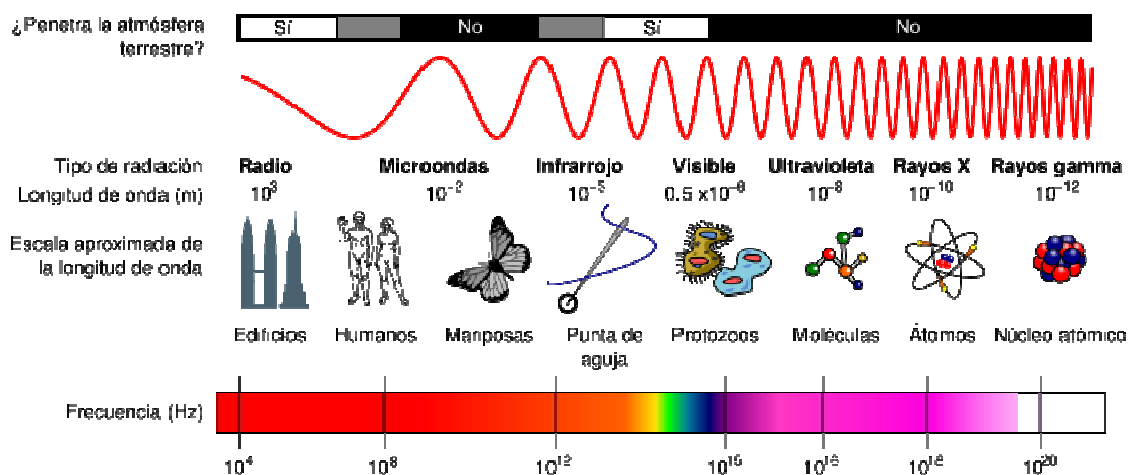


Figura 39. Espectro electromagnético.

La radiación de microondas no posee características ionizantes y no produce cambios en la estructura molecular. Por lo general y de modo simplista, la energía de esta radiación se disipa a través de los mecanismos: (i) conducción iónica y (ii) rotación de dipolos (procesos que, por lo general, se dan de forma simultánea) [120]. La conducción iónica se produce por la migración de los iones en disolución al aplicar el campo electromagnético, y dependerá de su concentración, movilidad y temperatura. Dicha migración produce un flujo de corriente que origina pérdidas de energía debido a la fricción, como consecuencia de la resistencia del medio al flujo de iones, con la correspondiente producción de calor. La pérdida de energía es función del tamaño, la carga y la conductividad de los iones en disolución que están sujetos a interacciones con las moléculas del disolvente.

Por otra parte, disolventes tales como el  $H_2O$ , ácidos minerales y algunos disolventes orgánicos tienen momentos dipolares que pueden interactuar con el campo eléctrico aplicado, dando lugar a la rotación de los dipolos o alineación de las moléculas. Al dejar de aplicarse el campo eléctrico, las moléculas vuelven a su estado de desorden en un tiempo, denominado de relajación, durante el cual la energía absorbida se transforma en calor. El tiempo de relajación dieléctrico se define como el intervalo necesario para que el 63% de las moléculas vuelvan al desorden. A 2.450 MHz el proceso orden-desorden tiene lugar aproximadamente  $4,9 \times 10^9$  veces por segundo, lo cual origina que el calentamiento sea muy rápido.

La capacidad de un disolvente para absorber energía de microondas y convertirla en calor viene dada por el factor de disipación ( $\tan \delta$ ) [121], el cual se define como la relación entre la pérdida de dieléctrico ( $\epsilon''$ , define la eficiencia de la molécula de convertir la energía de microondas en calor) y su constante dieléctrica ( $\epsilon'$ , medida de la capacidad de polarización de las moléculas en un campo eléctrico).

$$\tan \delta = \epsilon'' / \epsilon' \quad (22)$$

La constante dieléctrica,  $\epsilon'$ , proporciona una medida de la capacidad de una muestra para oponerse al paso de la radiación de microondas, de forma que la capacidad de absorción de esta radiación aumentará con el aumento de la constante dieléctrica. Cuando la radiación de microondas penetra en una muestra, la energía absorbida por la muestra aumenta con el factor de disipación. La penetración es considerada infinita en materiales transparentes a las microondas, nula en los materiales reflectantes, como son los metales y toma un valor finito cuando la muestra es absorbente. No obstante, debe tenerse en cuenta que la eficiencia de calentamiento depende además de la temperatura, de la viscosidad, del tamaño de la muestra, de la potencia y el tiempo de irradiación.

**Viscosidad-temperatura:** la viscosidad de la muestra afecta a la rotación dipolar y, por tanto, a su capacidad de absorber energía de microondas. Así, si ésta es elevada la movilidad molecular es pequeña y, por tanto, baja la capacidad de alineación de las moléculas en el campo magnético, con lo que disminuye su factor de disipación.

La temperatura afecta a la rotación dipolar y a la conducción iónica. Para moléculas pequeñas, como la del agua y otros disolventes, la pérdida de dieléctrico debida a la rotación de dipolos disminuye cuando la temperatura aumenta, mientras que la debida a la conducción iónica aumenta. Si la movilidad iónica y la concentración de iones son bajas, el calentamiento de la muestra estará dominado por la rotación dipolar, lo que justifica que la presencia de agua en una muestra reduzca el factor de disipación con el aumento de la temperatura. Así, un mismo incremento de temperatura en una muestra se consigue de forma más rápida a baja que a alta temperatura. La mayoría de los disolventes orgánicos y los sólidos se

comportan de manera diferente aumentando el factor de disipación con la temperatura. La estabilización de la temperatura en un sistema expuesto a radiación de microondas sólo es posible si el calor se puede eliminar en una proporción elevada o si se limita la potencia de microondas aplicada.

**Tamaño de muestra:** el tamaño de la muestra sometida a microondas afecta a la distribución de la temperatura en su interior de forma distinta que en los métodos clásicos de calentamiento. En los clásicos (Figura 40a) el calor se transmite por conducción a través de la pared del recipiente y por corrientes de convección en el seno de la disolución. Por el contrario, en el calentamiento por microondas (Figura 40b) el material del recipiente que contiene la muestra debe ser transparente a la radiación y es la muestra-disolvente la que absorbe directamente dicha radiación, produciéndose sobrecalentamientos en puntos concretos que llegan a originar gradientes importantes de temperatura.

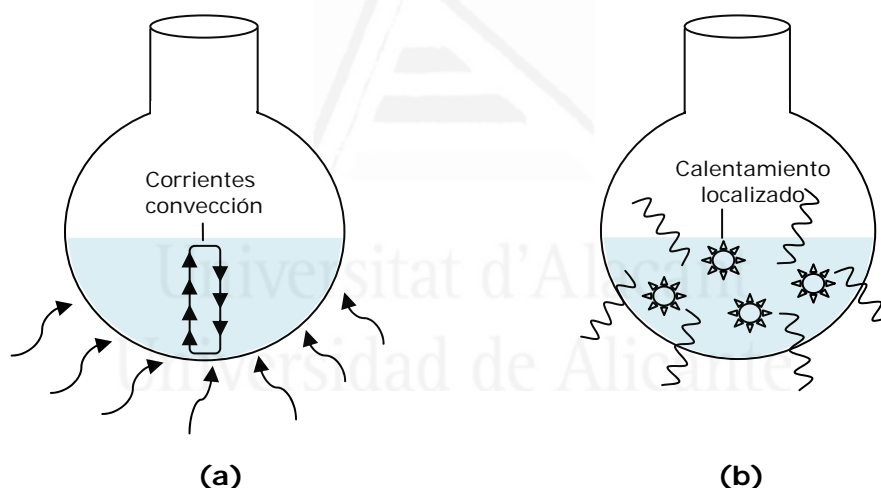


Figura 40. Calentamiento convencional (a) y por microondas (b).

La muestra absorbe directamente energía de microondas, de forma que las temperaturas en el interior del material son mayores que en la superficie del recipiente, especialmente en sólidos con baja conductividad térmica. En muestras de tamaño elevado, el calentamiento que tiene lugar más allá de la profundidad de penetración de las microondas se debe a la conductividad térmica por colisiones moleculares, por lo que la temperatura cerca de la superficie será más alta que en el interior. Si se dispone de un sistema con características estructurales heterogéneas, conteniendo

especies químicas con propiedades eléctricas diferentes dispersas en un medio homogéneo, se puede realizar un calentamiento selectivo de algunas áreas o componentes del sistema. Las muestras pequeñas resultan ser más adecuadas para disolverse por microondas, a pesar de que una gran cantidad de energía no es absorbible y se puede reflejar, lo que puede ocasionalmente causar daños en el magnetrón si no está debidamente protegido.

**Potencia y tiempo de irradiación:** Por regla general estas dos variables suelen tener un efecto opuesto; es decir, para un proceso dado, el empleo de potencia de irradiación alta está asociado a un tiempo de aplicación corto, mientras que si se utiliza una potencia baja se requerirá un tiempo más largo para proporcionar a la muestra la misma cantidad de energía. En principio, puede pensarse que es más conveniente el uso de potencias de irradiación altas con el fin de acortar el tiempo de irradiación; sin embargo, esto no es siempre cierto ya que hay casos en los que el uso de potencias altas no es recomendable debido a las condiciones drásticas que se generan.

#### II.5.2. Uso de la radiación de microondas en técnicas de microextracción

La temperatura es un parámetro muy importante en la microextracción debido a que aumenta la difusión de los analitos hacia la gota (SDME) o fibra (SPME) o ayuda a la transferencia de los analitos al espacio de cabeza. Sin embargo, como la etapa de sorción es un proceso exotérmico, un incremento en la temperatura reduce el coeficiente de partición de los analitos y, por lo tanto, produce una disminución en la sorción del analito en la gota o fibra.

Como ha sido comentado anteriormente, el calentamiento convencional es lento y provoca el calentamiento del recipiente en el que se encuentra la muestra. Además, debido a los tiempos prolongados que se necesitan, también se produce el calentamiento del sistema completo, es decir, del espacio de cabeza y de la gota o fibra. Al calentar por irradiación con microondas, el calentamiento es más rápido y únicamente se calienta la muestra, evitando el calentamiento del recipiente y de todas las partes del sistema. Esto favorece la extracción y no afecta sensiblemente al proceso

de sorción. Por este motivo, las microondas han sido utilizadas como sistema de calentamiento para favorecer la extracción, principalmente en modo de espacio de cabeza, favoreciendo la volatilización de los analitos desde la muestra al espacio de cabeza y eliminando el efecto negativo que produce un aumento de la temperatura sobre la sorción por la gota.

El primer trabajo en el que se utilizó un sistema de calentamiento por microondas en microextracción fue publicado en el año 2002 por Wei y Jen [122]. Estos autores utilizaron la SPME asistida por microondas para la determinación de clorofenoles en muestras acuosas. El sistema que utilizaron está compuesto por un microondas doméstico modificado, un agitador para microondas, un matraz esférico que contiene la muestra y la barra agitadora y que está conectado a un tubo de vidrio en forma de Y, y un condensador. En uno de los brazos se introduce la jeringa de SPME que contiene la fibra (Figura 41). La extracción se llevó a cabo durante 5 minutos a una potencia media (132 W) y los resultados fueron comparados con los obtenidos mediante un método de SPME con calentamiento convencional. La eficiencia de extracción para dos de los cuatro analitos estudiados fue mejorada y los otros dos analitos fueron extraídos y detectados con éxito, lo que no fue posible mediante calentamiento convencional.

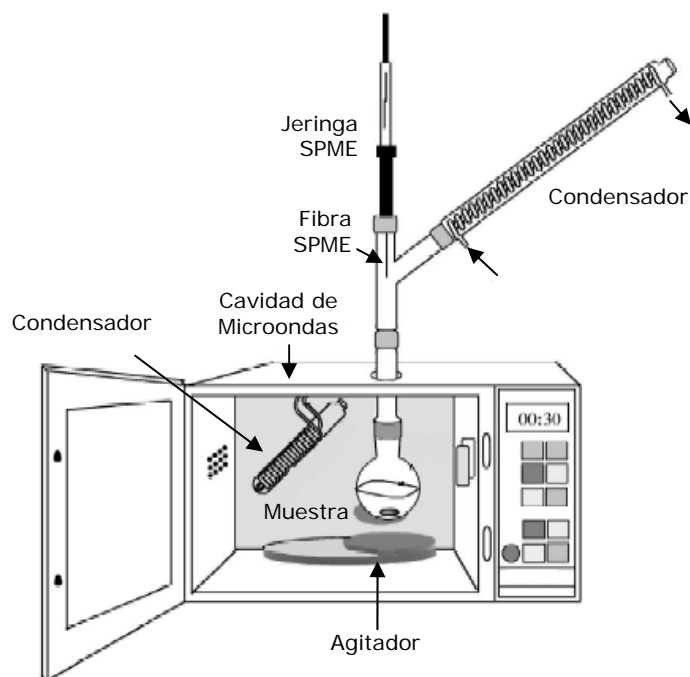


Figura 41. Sistema de microextracción en fibra asistida por microondas. (Fuente: referencia 126).

Varias han sido las publicaciones sobre SPME asistida por microondas, utilizando sistemas similares al descrito anteriormente [123-128] u otro comercial [129,130] como el que se muestra en la Figura 42. Los microondas comerciales utilizados son del tipo monomodo o focalizados y disponen de una cavidad en la que se introduce el vial que contiene la muestra, una barra agitadora y la fibra.

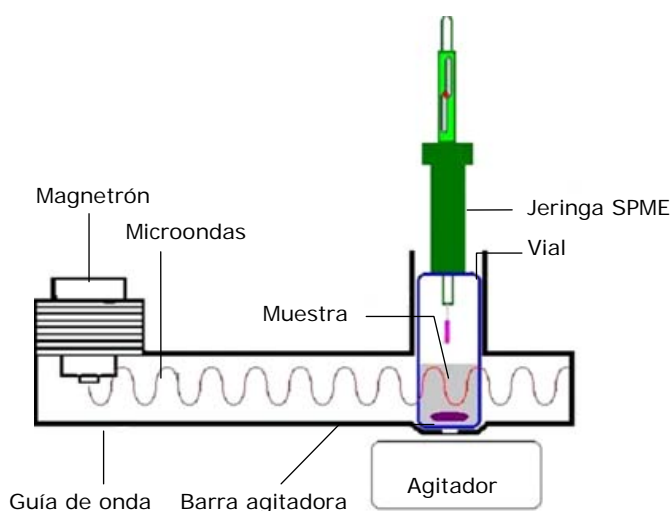


Figura 42. Sistema de SPME asistida por microondas (comercial). (Fuente: referencia 130).

La utilización de radiación de microondas en la microextracción en gota se publica por primera vez en el año 2007 por Deng y colaboradores [131]. En este trabajo se realiza una destilación por microondas de la fracción volátil contenida en unas hierbas chinas (*Artemisia capillaris*) asociada a la SDME. El sistema utilizado (Figura 43) es el mismo que utilizaron Wei y Jen [122] con la única diferencia de la gota, en lugar de la fibra, que se utiliza para realizar la extracción. La extracción se lleva a cabo durante 5 minutos y se determinan 35 compuestos volátiles.

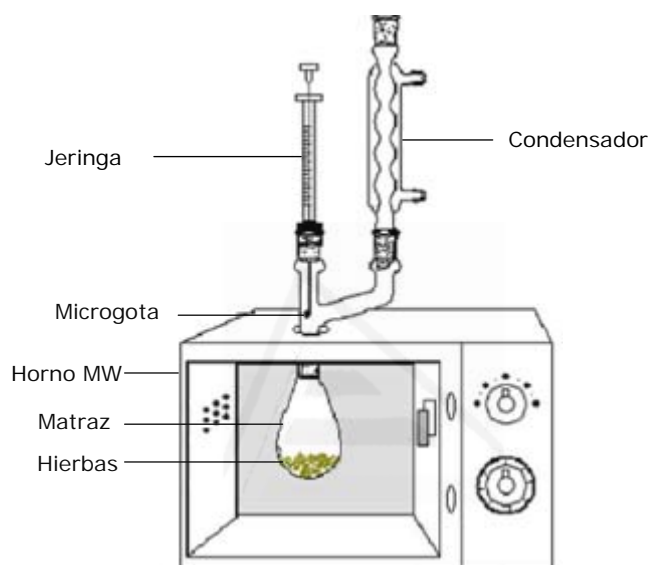


Figura 43. Sistema de microextracción en gota asistida por microondas. (Fuente: referencia 131).

La utilización de radiación de microondas en las técnicas de microextracción favorece sensiblemente la eficiencia de la extracción, mejorando así la sensibilidad y los límites de detección. Además, este tipo de sistema de calentamiento y microextracción es económico, sencillo, rápido, se puede trabajar con muestras sólidas y líquidas, y permite realizar el calentamiento por microondas y la extracción en un solo paso.



## **II.6. Nuevos materiales como fase extractante: nanomateriales de carbón**

Durante los últimos años se han incorporado nuevos materiales en una amplia variedad de procesos analíticos. La tecnología ha producido nuevos nanomateriales con propiedades únicas cuyo uso ha aumentado en las ciencias analíticas. Las nanoestructuras de carbón se encuentran entre esos nuevos materiales [132,133]. La combinación de su comportamiento único a escala nanométrica (nm) y su utilidad en la miniaturización presenta un efecto sinérgico que favorece su uso.

Recientemente, un elevado número de nanomateriales de carbón ha sido descrito en la literatura específica, incluyendo nanodiamantes [134], fullerenos C60 [135], nanocebollas [136], nanotubos de carbón (CNTs) [137], nanocuernos de carbón [138], vainas (fullerenos recubiertos de CNT) [139], nanofibras de carbón [140], anillos de nanotubo [141] y nanotúbulos [142]. Sin embargo, hasta la fecha, desde el punto de vista analítico, las aplicaciones han sido principalmente realizadas con fullerenos y CNTs.

Una amplia variedad de materiales han sido utilizados como sorbentes en un elevado número de aplicaciones. Su composición química engloba desde materiales inorgánicos, como la alúmina o la sílice, hasta materiales orgánicos como los polímeros [143,144]. Además, nuevos materiales basados en nanoestructuras de carbón son actualmente utilizados como nuevos sorbentes [38].

En general, los nanomateriales pueden ser utilizados como material sorbente en dos configuraciones: (i) Enlazados químicamente, generalmente a través de enlaces covalentes, a micropartículas; (ii) utilizados directamente como material sin procesar. En el segundo caso, dependiendo de la naturaleza del nanomaterial, es posible distinguir entre materiales sin procesar y materiales en los que las nanopartículas han sido ensambladas. Ensamblar las nanopartículas no covalentemente para generar agregados ordenados ofrece una alternativa eficiente a la clásica aproximación covalente. Este tipo de material requiere un número mínimo de etapas para su síntesis y se aplica en numerosos campos científicos y tecnológicos.

Cuando estos materiales son utilizados como sorbentes, las interacciones del analito pueden ser generadas directamente en la superficie de la nanopartícula o en los intersticios de los agregados. Las interacciones no covalentes entre el analito y las nanopartículas o el material nanoestructurado incluyen interacciones iónicas (e.g., dipolo-dipolo), enlaces por puente de hidrógeno, solapamientos  $\pi$ - $\pi$ , fuerzas de dispersión y enlaces dativos. La presencia de nanopartículas funcionalizadas o agregados supramoleculares permite incorporar una o más de esas interacciones. La combinación de dos o más interacciones, similares o diferentes, incrementa la selectividad y estabilidad del sistema.

De todas las configuraciones, los nanotubos y fullerenos son los más utilizados como fases extractantes, principalmente en SPE y SPME. Los materiales basados en carbón presentan unas propiedades excelentes de adsorción y cribado para un amplio intervalo de especies orgánicas e inorgánicas. El carbón activo fue el primer material empleado en extracciones mediante SPE y ha sido ampliamente utilizado para atrapar y extraer analitos orgánicos. Sin embargo, desde el punto de vista analítico, el carbón activo carece de selectividad en el proceso de adsorción y su heterogeneidad afecta directamente a la reproducibilidad del proceso de extracción. Aunque el carbón grafitizado ha sido propuesto como alternativa al carbón activo debido a su mayor homogeneidad y pureza, este material todavía proporciona baja selectividad en la interacción con los analitos. El descubrimiento de otras formas alotrópicas del carbón (e.g., fullerenos, CNTs) ha sido clave en el desarrollo de los adsorbentes basados en el carbón. Desde el principio han atraído la atención de los investigadores debido a su excepcional capacidad de adsorción. La versatilidad y selectividad de estos nuevos materiales ha sido aumentada mediante derivatización, introduciendo en estas estructuras grupos químicos específicos para favorecer la interacción con determinadas especies químicas. Además, presentan propiedades mecánicas, eléctricas, magnéticas y térmicas únicas.

Los fullerenos se han utilizado tanto en SPE [145] como en SPME [146-148], pero su uso se ve limitado por su baja solubilidad tanto en agua como en disolventes orgánicos. Sin embargo, la sensibilidad, selectividad y precisión son mejores que con los sorbentes convencionales, tales como

C18 y tenax. Además, su elevada estabilidad térmica los hace especialmente interesantes para su uso en SPME, permitiendo el uso de un intervalo amplio de temperaturas y no viéndose afectado el tiempo de vida útil de las fibras, superando de este modo el inconveniente que presentan en este sentido las fibras comerciales. La introducción de fullerenos en las fibras mejora no solo la capacidad de extracción sino también la resistencia a los disolventes y la durabilidad de las fibras.

Desde su descubrimiento, los CNTs han sido ampliamente estudiados para hacer uso de su estructura única y sus destacadas propiedades. Su gran capacidad para adsorber una extensa variedad de compuestos orgánicos junto con su elevada superficie de adsorción los convierte en unos materiales excelentes para la SPE [149-151] y la SPME [48,152,153].

Otra forma alotrópica del carbón son las nanopartículas de carbón, que hasta la actualidad se desconoce su uso como fase extractante de compuestos orgánicos. Sin embargo estos materiales han sido utilizados con éxito en otras áreas de la química, por ejemplo en electroquímica [154,155]. Las nanopartículas de carbón son un material de carbón especialmente interesante para la extracción de analitos ya que posee todas las ventajas de los nanomateriales de carbón, como una elevada área superficial, sitios de adsorción, sitios superficiales reactivos, conductividad eléctrica y estabilidad térmica, entre otras.

## II.7. Diseño estadístico de experimentos

El diseño estadístico de experimentos, también denominado como diseño experimental, es el proceso de planificar un experimento para obtener datos apropiados que pueden ser analizados mediante métodos estadísticos con objeto de obtener conclusiones válidas y objetivas [156]. La metodología estadística es el único enfoque objetivo para analizar un problema que involucre datos sujetos a errores experimentales. Por tanto, siempre hay dos aspectos fundamentales en cualquier problema experimental: (i) el diseño del experimento y; (ii) el análisis estadístico de los datos. Ambos aspectos están estrechamente relacionados ya que el método de análisis depende directamente del diseño empleado.

El diseño experimental ayuda al experimentador a seleccionar la estrategia experimental óptima que permita obtener la información buscada con el mínimo coste y evaluar los resultados experimentales obtenidos, garantizando la máxima fiabilidad en las conclusiones que se obtengan.

Las situaciones en las que se puede aplicar el diseño experimental son muy numerosas. De forma general se aplica a sistemas como el mostrado esquemáticamente en la [Figura 44](#). En todos ellos se observa una o más variables experimentales dependientes o respuestas ( $y$ ) cuyo valor depende de los valores de una o más variables independientes controlables llamadas también factores ( $x$ ). Las respuestas también pueden estar influidas por otras variables que no son controladas por el experimentador ( $z$ ).

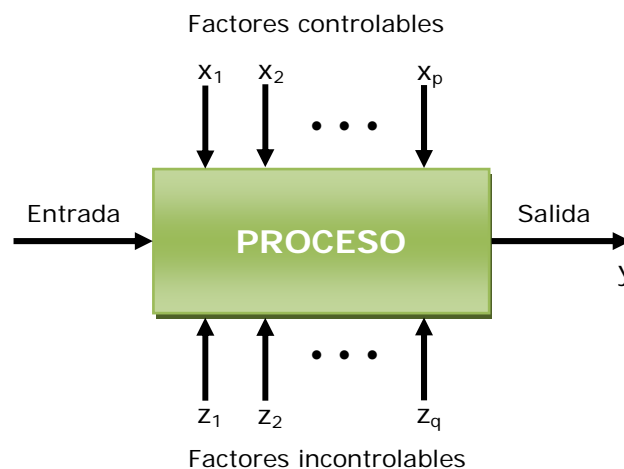


Figura 44. Esquema general de un proceso o sistema. (Fuente: referencia 156).

La optimización mediante diseño experimental se presenta como una alternativa muy interesante a la optimización clásica (paso a paso). El método clásico de optimización es clasificado como un método secuencial, y es también conocido como método clásico de investigación, método del factor único o de estrategia de un-factor-cada-vez. En el método clásico se fijan, a un determinado nivel o valor, todos los factores que están siendo investigados menos uno de ellos. Entonces, éste último es variado hasta que se encuentre la mejor respuesta. Después de eso, este factor es fijado en su valor óptimo y un nuevo factor es variado dentro de un intervalo prefijado. Al finalizar el proceso completo se obtiene un conjunto de valores formado por el óptimo de cada factor estudiado; pero el proceso es largo, tedioso y presenta una serie de inconvenientes. El elevado coste económico de la experimentación junto con las limitaciones de tiempo recomiendan ejecutar sólo los experimentos imprescindibles, y el método tradicional de variar un factor cada vez no suele ser la mejor opción. Esta estrategia de experimentación puede implicar más experimentos de los necesarios y, a pesar de ello, proporcionar sólo información parcial, por ejemplo no mostrará si existe interacción entre factores. Las interacciones suelen ser muy frecuentes y a veces son los efectos más importantes sobre la respuesta de un sistema, por lo que conocerlas es imprescindible para comprender el comportamiento de muchos sistemas.

La solución, por lo tanto, puede consistir en variar más de un factor simultáneamente al realizar un nuevo experimento. Ello permite mejorar la eficiencia en el esfuerzo del experimentador y obtener información sobre las interacciones entre factores. La dificultad principal de esta metodología consiste en diseñar una experimentación reducida en la cual estos cambios simultáneos se complementen entre sí y permitan obtener la información buscada al combinar los resultados de todos los experimentos. El diseño experimental proporciona el marco matemático para cambiar todos los factores simultáneamente y obtener la información buscada con un número reducido de experimentos, es decir, con la máxima eficiencia. El diseño experimental conduce a una planificación con menos experimentos que el método de optimización paso a paso proporcionando un conocimiento mayor del sistema o proceso en estudio.

La aplicación del diseño experimental requiere tener una idea clara de qué es exactamente lo que se va a estudiar, cómo se van a recopilar los datos y, al menos, una idea cualitativa de cómo se van a analizar. Por ello, se requiere considerar las etapas que se enumeran y describen brevemente a continuación.

### ***1. Comprender el problema y definir claramente el objetivo***

El diseño experimental es una herramienta para encontrar respuestas a problemas perfectamente identificados y definidos. Cuanto más claramente se plantea el problema y se identifica el propósito o información que se desea conseguir con los experimentos, mayor será la ayuda del diseño. Para obtener una comprensión profunda del sistema y del problema es necesario recopilar toda la información disponible sobre el sistema en estudio que pueda ser relevante para la experimentación que se realizará.

### ***2. Identificar los factores y niveles***

Es muy importante identificar todos los factores (las variables independientes) que se cree que pueden influir sobre el proceso y la respuesta, aunque se crea que pueden tener poca importancia. Los factores no controlados pueden introducir variaciones en la respuesta que dificulten el análisis de los resultados experimentales. El experimentador debe elegir los factores que variará en el experimento, los intervalos de dicha variación y los valores (niveles) específicos a los cuales se hará el experimento. Esta decisión requiere un conocimiento previo del sistema, obtenido de referencias bibliográficas, de la experiencia previa en el laboratorio, etc. Cuando el objetivo es el escrutinio de factores o la caracterización del proceso suele ser mejor mantener bajo el número de niveles de los factores (lo más común es usar dos niveles).

### ***3. Selección de la variable respuesta***

Al seleccionar la respuesta o variable dependiente, el experimentador debe estar seguro de que la respuesta que se va a medir realmente proporciona información útil acerca del proceso en estudio. Con mayor frecuencia, el promedio o la desviación estándar (o ambos) de la característica medida serán la variable respuesta.

#### **4. Elección del diseño experimental**

Es fundamental tener presente el objetivo del diseño experimental al seleccionar el diseño. Además, si los tres pasos anteriores se han realizado de manera correcta, este cuarto paso es relativamente fácil.

#### **5. Realización de la experimentación**

El diseño seleccionado suele estar descrito mediante variables codificadas. Éstas se particularizan para los factores en estudio, se comprueba si los experimentos son posibles y, si es así, se realiza la experimentación en orden aleatorio respecto al orden en el cual están listados. La ejecución en orden aleatorio es necesaria para asegurar que los factores no contemplados introduzcan confusión y/o sesgo en los resultados. Además, es vital vigilar el proceso cuidadosamente para asegurar que todo se haga conforme a lo planeado. Los errores cometidos durante el procedimiento serán detectados en el análisis de datos posterior.

#### **6. Análisis de datos**

Deben emplearse métodos estadísticos para analizar los datos con la finalidad de que los resultados y conclusiones sean objetivos más que apreciativos. Si el experimento se diseñó correctamente y se ha realizado conforme al diseño previsto, los métodos estadísticos que se requieren no son complicados. Existen muchos paquetes de software excelentes para el análisis de datos y los métodos gráficos sencillos son importantes en la interpretación de tales datos.

Conviene enfatizar que los métodos estadísticos no pueden probar que un factor (o varios factores) tiene un efecto particular; sólo proporcionan directrices para la veracidad y validez de los resultados. Los métodos estadísticos, aplicados adecuadamente, no permiten probar algo experimental, sólo hacen posible obtener el error probable de una conclusión o asignar un nivel de fiabilidad a los resultados. La principal ventaja de los métodos estadísticos es que agregan objetividad al proceso de toma de decisiones. Las técnicas estadísticas, junto a un buen conocimiento técnico del proceso y al sentido común, suelen llevar a conclusiones razonables.

## **7. Conclusiones y recomendaciones**

Una vez que se han analizado los datos, el experimentador debe extraer conclusiones prácticas de los resultados y recomendar un tipo de acción. También debe realizarse un seguimiento y pruebas de confirmación para validar las conclusiones del diseño.

Existen numerosos tipos de diseños dependiendo de las aplicaciones. Los que seguidamente se presentan son únicamente los diseños utilizados en la presente memoria.

### **II.7.1. Diseño factorial**

Por diseño factorial se entiende el diseño experimental en el que se investigan todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores estudiados en cada ensayo [156]. Los diseños factoriales son los más eficientes para estudiar los efectos producidos por dos o más factores los cuales tienen dos o más niveles (la notación más habitual para los factores, por lo general, es el valor -1 para el nivel inferior y el valor +1 para el nivel superior del experimento). El efecto de un factor se define como el cambio en la variable respuesta producido por un cambio en el nivel del factor.

Existen varios casos especiales del diseño factorial general que resultan importantes porque son utilizados ampliamente en el trabajo de investigación y, además, éstos constituyen la base para otros diseños de gran valor práctico. El caso más importante es el diseño factorial completo  $2^k$ , en el cual se tienen  $k$  factores con dos niveles cada uno (superior e inferior), aunque también es posible realizar diseños a 3 y 5 niveles,  $3^k$  y  $5^k$  respectivamente. Debido a que en el diseño  $2^k$  sólo hay dos niveles para cada factor, se debe suponer que la respuesta es aproximadamente lineal en el intervalo de los niveles elegidos de los factores. El modelo estadístico del diseño  $2^k$  describe los experimentos más adecuados para conocer simultáneamente qué efecto tienen los  $k$  factores sobre una respuesta y descubrir si interaccionan entre ellos. Sin embargo, incluso para un número pequeño de factores, el número de combinaciones o tratamientos en un diseño  $2^k$  es grande.



Muchas veces no se cuenta con los recursos necesarios para llevar a cabo el experimento más de una vez, o no se dispone de tiempo para llevarlo a cabo una segunda vez, por lo que el investigador se ve en la necesidad de realizar el experimento una sola vez. A este tipo de diseño factorial  $2^k$  se le llama *factorial no replicado*.

Los diseños factoriales presentan varias ventajas. Son más eficaces que los métodos de optimización en los cuales se varía solo un factor ya que permiten obtener más información con el menor número de experimentos posible. Además, un diseño factorial es necesario cuando hay presentes interacciones para evitar conclusiones erróneas. Finalmente, estos diseños permiten estimar los efectos de un factor a varios niveles de los otros factores, así como interacciones entre dichos factores, aportando conclusiones que son válidas en el intervalo de condiciones experimentales estudiadas.

#### II.7.1.1. Diseño factorial con niveles mixtos

En los diseños empleados generalmente, los factores son elegidos a dos o tres niveles, dependiendo del objetivo buscado y del tipo de diseño que se aplica. Sin embargo, en ocasiones, cuando se tienen simultáneamente factores cuantitativos y cualitativos no es necesario que todos los factores tengan los mismos niveles. Es decir, que algunos factores tengan dos niveles y otros tres o cuatro niveles, dependiendo de las limitaciones experimentales. Por tal motivo, este tipo de diseño toma el nombre de *diseño factorial con niveles mixtos*.

El tipo de diseño factorial con niveles mixtos utilizado en una sección de la presente memoria utiliza factores a dos y tres niveles. Este tipo de diseño mixto se denota como  $\{2^k \times 3^{k'}\}$ , donde los exponentes representan el número de factores para cada nivel y la base indica el nivel de cada factor [157].

#### II.7.2. Diseño factorial fraccionado

A medida que el número de factores en un diseño factorial  $2^k$  aumenta, el número de ensayos necesarios para obtener un diseño

completo sobrepasa rápidamente los recursos de la mayoría de los experimentadores. Un diseño  $2^6$  requiere 64 ensayos. En este caso sólo 6 de los 63 grados de libertad ( $n^\circ$  de ensayos menos 1) corresponden a los efectos principales y únicamente 15 corresponden a las interacciones de dos factores. Los 42 restantes corresponden a las interacciones de tres o más factores.

Si el experimentador puede razonablemente suponer que algunas interacciones de orden superior son despreciables, la información sobre los efectos principales y las interacciones de menor orden puede obtenerse realizando sólo una fracción del diseño factorial completo. Estos diseños factoriales fraccionados [156] se encuentran entre los tipos más ampliamente utilizados en el diseño de productos y procesos así como en la detección y solución de problemas.

Un uso importante de este tipo de diseño se da en los experimentos de escrutinio, también llamados de tamizado, cribado o "*screening*". Éstos son diseños en los cuales se consideran muchos factores con el fin de identificar aquellos que presentan efectos importantes. Los experimentos de escrutinio suelen realizarse en las primeras fases de un proyecto o proceso de optimización, cuando es probable que muchos de los factores inicialmente considerados tengan poco o ningún efecto sobre la respuesta. Los factores que se identifican como importantes en esta primera etapa son investigados entonces con mayor detalle en diseños posteriores.

El empleo exitoso de los diseños factoriales fraccionados se basa en tres ideas fundamentales:

- 1- *Principio de dispersidad de efectos.* Cuando existen varias variables es probable que el sistema o proceso se vea influido principalmente por algunos de los efectos principales e interacciones de orden superior.
- 2- *La propiedad de proyección.* Los diseños factoriales fraccionados pueden ser extendidos a diseños factoriales más grandes.
- 3- *Experimentación secuencial.* Es posible combinar los ensayos de dos o más diseños factoriales fraccionados para conformar de

manera secuencial un diseño más grande y estimar los efectos de los factores y las interacciones de interés.

El diseño factorial fraccionado más utilizado es el conocido como Plackett-Burman, que es un diseño saturado que se utiliza principalmente para identificar las variables significativas del proceso.

### II.7.2.1. Diseño de Plackett-Burman

Este diseño factorial fraccionado fue propuesto en 1946 por Plackett y Burman [156,158]. Es un diseño de dos niveles ( $\pm 1$ ) y es utilizado para estudiar k factores con N ensayos, siendo N múltiplo de 4. Este tipo de diseño es útil cuando N = 12, 20, 24, 28 y 36. La [Tabla 2](#) presenta la matriz del diseño para 11 factores (k) con 12 ensayos (N), uno de los más utilizados.

Tabla 2. Diseño de Plackett-Burman para N = 12 y k = 11.

Ensayo	Factores										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
2	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
3	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
4	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
5	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
6	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
7	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
8	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
9	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
10	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
11	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Este diseño asume que las interacciones pueden ser ignoradas y que únicamente los efectos principales son calculados con un número reducido

de experimentos. Se emplea cuando se quiere conocer los factores que son significativos en el proceso y cuáles afectan en menor grado y, por lo tanto, pueden ser fijados. Posteriormente los factores que afectan significativamente al proceso son optimizados mediante un diseño factorial completo u otro tipo de diseño, como el diseño central compuesto.

En la última década se ha introducido el uso de factores ficticios o factores fantasma (*"dummy"*) en este tipo de diseño [159,160]. El objetivo de la utilización de estos factores fantasma es la estimación del error experimental utilizado en la interpretación estadística. De este modo, al aplicar un diseño Plackett-Burman, tenemos un número de factores reales y el resto hasta N-1 de factores fantasmas. Por ejemplo, si utilizamos la matriz de 12 ensayos, tenemos 6 factores reales y 5 factores fantasma.

### II.7.3. Diseño central compuesto

El *diseño central compuesto* (CCD) es un diseño cuya superficie de respuesta se ajusta a un polinomio de segundo orden. Este tipo de diseño se utiliza para optimizar y evaluar los factores principales, las interacciones y los efectos cuadráticos. Si se realiza la optimización de tres factores, como es el caso utilizado en la presente memoria, el diseño viene definido por el siguiente modelo polinomial de segundo orden:

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 \quad (23)$$

donde  $y$  es la variable respuesta,  $x_1$ ,  $x_2$  y  $x_3$  son las variables independientes,  $\beta_0$  es la ordenada en el origen y  $\beta_1$ - $\beta_{33}$  son los coeficientes de regresión. Dado que no es posible representar en este caso la respuesta del sistema en función simultáneamente de todas las variables en estudio, la respuesta viene representada por una superficie en un espacio tridimensional que muestra el efecto que ejerce un par de variables por separado sobre la función objetivo. En la [Figura 45](#) se muestra una superficie de respuesta obtenida para dos de los tres factores estudiados.

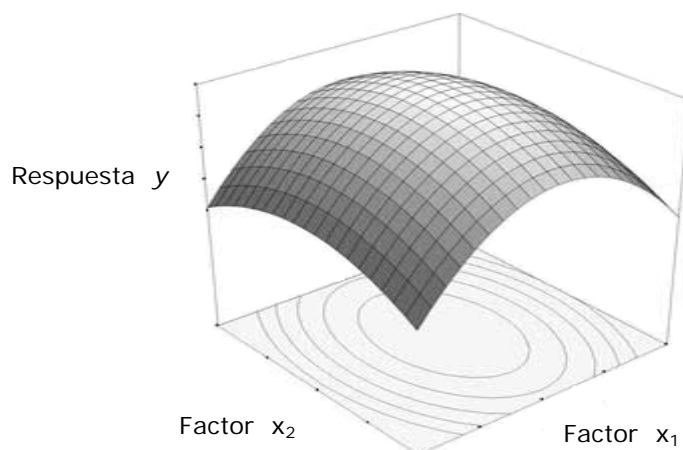


Figura 45. Superficie de respuesta tridimensional.

Este tipo de diseño fue introducido por Box y Wilson en el año 1951 y es el más utilizado de los diseños de segundo orden. Por ello, este diseño también toma el nombre de diseño Box-Wilson. El diseño CCD está construido por la superposición de varios diseños. Consiste en un diseño factorial ( $2^k$ ) aumentado con puntos estrella ( $2k$ ) y con un punto central, el cual puede ser replicado  $n$  veces [158]. Los puntos correspondientes al diseño factorial representan el modelo de primer orden junto con las interacciones entre dos factores. Los puntos centrales proporcionan información sobre la existencia de una posible curvatura en el sistema, y si existe curvatura, los puntos estrella permiten estimar los términos cuadráticos.

En la presente memoria el tipo de diseño CCD utilizado es el conocido como diseño central compuesto circunscrito (CCCD), en el que los puntos estrella se encuentran localizados a una distancia  $\pm \alpha$  ( $|\alpha| > 1$ ) del centro del diseño, el cual es situado en el punto 0. El valor de  $\alpha$  depende de las propiedades deseadas del diseño y del número de factores. Para establecer la ortogonalidad y rotabilidad del diseño, las réplicas del punto central ( $n$ ) se fijan en 9 y  $\alpha = \sqrt[4]{2^k} = 1,682$  [158].

En el diseño CCCD utilizado en este trabajo se estudian tres factores o variables a 5 niveles, siendo éstos el punto estrella inferior ( $-\alpha$ ), el nivel bajo ( $-1$ ), el nivel central ( $0$ ), el nivel superior ( $+1$ ) y el punto estrella superior ( $+\alpha$ ). El número total de ensayos que conlleva la realización del

CCCD con las condiciones fijadas se establece en 23 (8 puntos del diseño factorial + 6 puntos estrella + 9 réplicas centrales).



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## II.8. Analitos objeto de estudio

A lo largo de la presente memoria se determinan diversos analitos en diferentes matrices de naturaleza líquida. Los analitos estudiados han sido: (i) diez analitos de la familia de los clorobencenos (1,2-; 1,3-; y 1,4-diclorobenceno (DCB); 1,2,3-; 1,2,4-; y 1,3,5-triclorobenceno (TCB); 1,2,3,4- y 1,2,4,5-tetraclorobenceno (TeCB); pentaclorobenceno (PCB) y hexaclorobenceno (HCB)); (ii) un filtro ultravioleta liposoluble (2-hidroxi-4-metoxibenzofenona, también llamado oxibenzona o benzofenona-3 (BZ3)) y; (iii) un bactericida/fungicida (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol también denominado triclosán). A continuación se describen brevemente los principales usos y los diferentes problemas a nivel de toxicidad de estos analitos tanto en humanos como en el medioambiente.

### II.8.1. Clorobencenos

Los clorobencenos (Figura 46) pertenecen a una clase de contaminantes medioambientales que son utilizados como disolventes industriales, pesticidas, fluidos dieléctricos, desodorantes y como aditivos en reacciones químicas [161,162]. Los bencenos menos clorados son ampliamente utilizados en la limpieza y desengrase del metal, pieles, lanas y papel, en la limpieza en seco y tintado textil, como compuesto conservador de la madera, en síntesis orgánica de pesticidas y herbicidas, como agentes desodorizantes para basura y residuos, como ambientadores y como medio de transmisión de calor en el mantenimiento de equipos. También son utilizados como disolventes para materiales orgánicos en la aplicación y extracción de capas superficiales de ceras, resinas, gomas, aceites y asfaltos. El pentaclorobenceno es utilizado para producir pentacloronitrobenceno, un fungicida que es actualmente utilizado como retardante del fuego. El hexaclorobenceno fue utilizado, entre otras aplicaciones, como fungicida, en la producción de composiciones pirotécnicas militares, como agente plastificante para el poli(cloruro de vinilo) (PVC), aunque en muchos países su producción y uso han sido prohibidos [162,163].

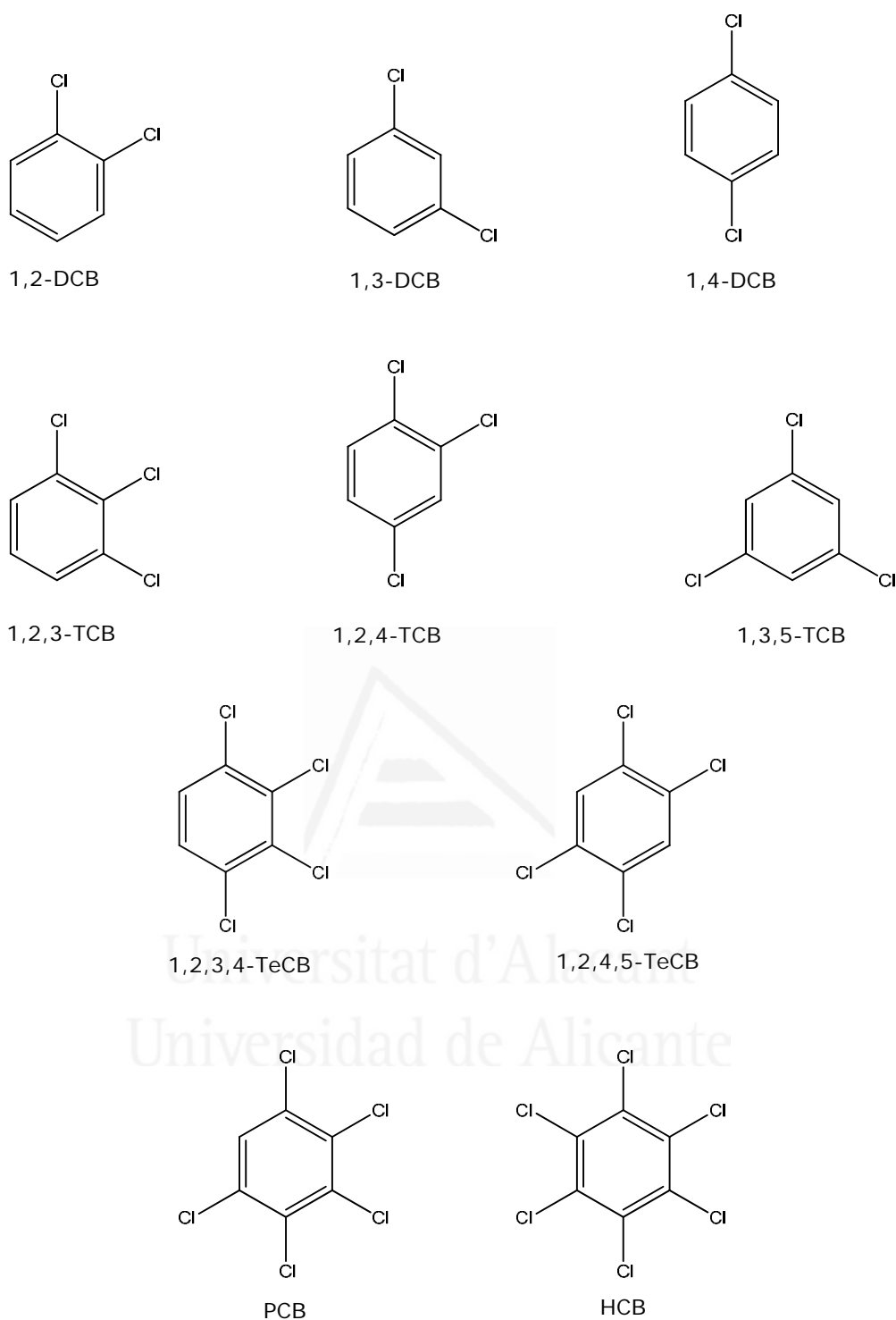


Figura 46. Estructura química de los diez clorobencenos estudiados.

Su aporte al medioambiente tiene lugar principalmente durante su producción, y a través de sus usos que favorecen su dispersión en el medioambiente. El vertido descontrolado de sólidos y líquidos, junto con la incineración, contribuyen en menor medida. Además, la incineración de los



clorobencenos conduce a la emisión de policlorodibenzo-p-dioxinas (PCDDs) y policlorodibenzofuranos (PCDFs) [161,162]. Por otro lado, una vez que los clorobencenos entran el medio acuático tienden a acumularse en los organismos vivos [161,162].

La presencia de estos analitos en el medioambiente es de gran importancia debido a que los clorobencenos son incluidos en varias listas de sustancias dañinas debido a su alta toxicidad. El hexaclorobenceno y el 1,4-diclorobenceno fueron los primeros incluidos, como precursores de cáncer en humanos, en el tercer y quinto informe anual sobre carcinógenos publicados por el departamento de salud y servicios humanos de los Estados Unidos, debido a la evidencia de carcinogenicidad en animales [163]. Además, un número elevado de estos compuestos también son incluidos en la directiva 76/464/EEC [164] sobre contaminación causada por ciertas sustancias que son descargadas en el medio acuático. Por ello, se considera imprescindible el estudio de nuevos métodos de análisis de estos analitos más rápidos y sensibles que los ya existentes, para su control en muestras medioambientales, principalmente en aguas.

### II.8.2. Benzofenona-3

El uso de filtros ultravioleta (UV) en productos cosméticos para la protección solar reduce el daño que produce en la piel la radiación ultravioleta del sol. Los filtros UV no son utilizados únicamente en protectores solares para la playa o montaña, sino que están siendo utilizados también en otros productos cosméticos de uso diario como cremas faciales, productos para después del afeitado, champús, barras de labios, maquillajes, etc [165].

En un principio, los filtros UV están diseñados para aplicaciones externas en las capas más superficiales de la piel. Sin embargo, se han observado algunos efectos dermatológicos, como dermatitis o alergias, y además se ha observado que pueden penetrar en el cuerpo humano a través de la piel. Por ello, actualmente se están realizando estudios sobre los posibles efectos toxicológicos de los mismos [166,167]. Investigaciones recientes, llevadas a cabo *in vitro* o *in vivo*, parecen indicar que algunos filtros ultravioleta tienen una actividad estrogénica y/o antiandrogénica

importante [168-170]. Sin embargo, un estudio basado en cambios de los niveles hormonales en humanos, después de aplicar ciertos productos que contenían filtros, parece indicar, que no hay efectos significativos [171].

Por otro lado, los filtros UV pueden ser acumulados en el medioambiente a través de fuentes directas e indirectas [166]. Una entrada directa en sistemas acuáticos naturales es el baño en piscinas, ríos y mares, así como descargas de aguas residuales industriales. La entrada indirecta está relacionada con la descarga de aguas residuales desde plantas de tratamiento.

Se pueden diferenciar dos tipos de filtros ultravioleta; (i) los filtros orgánicos o químicos, los cuales absorben la radiación ultravioleta y; (ii) los filtros inorgánicos o físicos, que reflejan la radiación. Los filtros químicos son más aceptados comercialmente debido a que suelen ser más fluidos y tienen una aplicación más confortable para el usuario, su coste es menor y permiten la transpiración de la piel. Además, para las empresas de productos cosméticos resulta más sencillo formular productos con filtros químicos que con filtros físicos ya que éstos últimos presentan mayor dificultad en lo que se refiere a la formulación de emulsiones estables. Por estas razones, el empleo de los filtros químicos en productos cosméticos es mayor y, como consecuencia, su uso por los humanos y la presencia en el medio ambiente es de gran importancia.

De entre todos los filtros UV autorizados por la legislación, la BZ3 es sin duda alguna el filtro UV más utilizado. Por ello, en la presente memoria se estudia la determinación de este filtro UV (Figura 47) en muestras de orina.

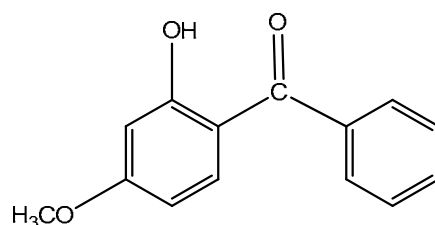


Figura 47. Estructura química de la benzofenona-3.

### II.8.3. Triclosán

El triclosán (Figura 48) es un agente antimicrobiano utilizado en numerosas aplicaciones. Es un ingrediente activo en la mayoría de los desinfectantes y ha sido ampliamente utilizado para mejorar la higiene medioambiental. Puede encontrarse como compuesto antiséptico en productos médicos, jabón de manos, cremas para la piel, productos dentales, así como en productos cosméticos, desodorantes, etc. También es utilizado como aditivo de polímeros, textiles e instrumentación médica.

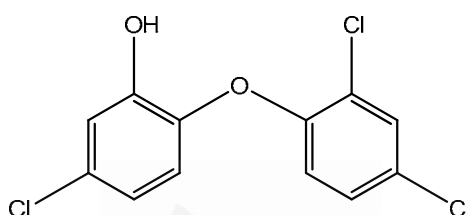


Figura 48. Estructura química del triclosán.

Como ingrediente que se puede encontrar en productos de consumo habitual, el triclosán puede entrar en la red de aguas urbanas y es transportado a las plantas de tratamiento de aguas residuales. Aunque es prácticamente eliminado mediante los tratamientos utilizados en estas plantas, su continua introducción en el medioambiente a través del sistema acuático es todavía importante. Así, el triclosán ha sido detectado en lodos y aguas residuales, aguas superficiales, sedimentos y en el mar a niveles de  $\text{ng L}^{-1}$  [172-176].

La toxicidad del triclosán ha sido estudiada durante años, pero los efectos adversos encontrados en humanos se limitan a picores leves y rojeces en pieles sensibles. Sin embargo, en el agua puede ser fácilmente metilado o clorado en posición orto y para con respecto al grupo hidroxilo y dar como resultado derivados metilados, dibenzo-p-dioxinas policloradas, cloroformos y clorofenoles, los cuales son altamente tóxicos [167,177,178].

Por tanto, debido a su elevada presencia en productos de uso diario, el estudio y monitorización de este analito en aguas es considerado de elevada importancia.







Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## Referencias

---



## • Preparación de la muestra

1. M. Valcárcel, "A modern definition of analytical chemistry", *Trends Anal. Chem.*, 16 (1997) 124.
2. J. Palandra, D. Weller, G. Hudson, J.-L. Sarah, E. Hudson, M. Zhong, L. Buchholz, L.-H. Cohen, "Flexible automated approach for quantitative liquid handling of complex biological samples", *Anal. Chem.*, 79 (2007) 8010.
3. N. Hedin, G. DeMartin, S. Reyes, "Automated sample preparation station for studying self-diffusion in porous solids with NMR spectroscopy", *Rev. Sci. Instrum.*, 77 (2006) 035114.
4. A. Ríos, A. Escarpa, M.C. González, G. Crevillén, "Challenges of analytical microsystems", *Trends Anal. Chem.*, 25 (2006) 467.
5. P.S. Dittrich, K. Tachikawa, A. Manz, "Micro total analysis systems. Latest advancements and trends", *Anal. Chem.*, 78 (2006) 3887.
6. J.M. Dixon, H. Du, D.G. Cork, J.S. Lindsey, "An experiment planner for performing successive focused grid searches with an automated chemistry workstation", *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, 62 (2002) 115.
7. J.W. Choi, J.H. Lee, B.S. Moon, K.H. Baek, "Semi-automated disk-type solid-phase extraction method for polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in aqueous samples and its application to natural water", *J. Chromatogr. A*, 1157 (2007) 17.
8. M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, "Flow-injection analysis: principles and applications", Eds. R.A. Chalmers y M. Masson (John Wiley & Sons, Inc, 1987), cap. 1, p. 9.
9. D.R. Reyes, D. Iossofidis, P.A. Auroux, A. Manz, "Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology", *Anal. Chem.*, 74 (2002) 2623.
10. P.A. Auroux, D. Iossofidis, D.R. Reyes, A. Manz, "Micro total analysis systems. 2. Analytical standard operations and applications", *Anal. Chem.*, 74 (2002) 2637.
11. J. Pawliszyn, "Solid phase microextraction. Theory and practice", (John Wiley & Sons, Inc., 1997).
12. E. Psillakis, N. Kalogerakis, "Developments in liquid-phase microextraction", *Trends Anal. Chem.*, 22 (2003) 565.



13. "Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques", Ed. J.P. Landers (CRC Press, Taylor and Francis group, 2008).
14. D.C. Hinz, "Chips for chromatography", *The Column*, Mayo (2006) 20.
15. N. Sillon, R. Baptist, "Micromachined mass spectrometer", *Sens. Act. B*, 83 (2002) 129.
16. O.B. Minayeva, J.A. Hopwood, "Emission spectroscopy using a microfabricated inductively coupled plasma-on-a-chip", *J. Anal. At. Spectrom.*, 17 (2002) 1103.
17. J. Franzke, K. Kunze, M. Miclea, K. Niemax, "Microplasmas for analytical spectrometry", *J. Anal. At. Spectrom.*, 18 (2003) 802.

• **Técnicas de extracción**

18. J. Pawliszyn, "New directions in sample preparation for analysis of organic compounds", *Trends Anal. Chem.*, 14 (1995) 113.
19. I.P. Román, M. Nogueroles, "Analysis of volatile organic compounds in water" en *Handbook of water analysis*, Ed. L.M. Nollet (CRC Press, Taylor & Francis Group, 2007), cap. 23, p. 599.
20. R. Cela, R. Lorenzo, C. Casais, "Técnicas de separación en química analítica", (Editorial Síntesis S.A., 2002).
21. G. Slack, N. Snow, D. Kou, "Extraction of volatile organic compounds from solids and liquids" en *Sample preparation techniques in analytical chemistry*, Ed. S. Mitra (John Wiley and Sons, Inc, 2003), cap. 4, p. 183.
22. P. Nyman, K. Morehouse, T. Mcneal, G. Perfetti, G. Diachenko, "Single-laboratory validation of a method for the determination of furan in foods by using static headspace sampling and gas chromatography/mass spectrometry", *J. AOAC Int.*, 89 (2006) 1417.
23. M. Parat-Wilhelms, M. Denker, K. Borchering, W. Hoffmann, A. Luger, H. Steinhart, "Influence of defined milk products on the flavour of white coffee beverages using static headspace gas chromatography–mass spectrometry/olfactometry and sensory analysis", *Eur. Food Res. Technol.*, 221 (2005) 265.

24. H.-J. Schroers, E. Jermann, J. Begerow, H. Hajimiragha, A.-M. Chiarotti-Omar, L. Dunemann, "Determination of physiological levels of volatile organic compounds in blood using static headspace capillary gas chromatography with serial triple detection", *Analyst*, 123 (1998) 715.
25. M. Rosell, S. Lacorte, D. Barceló, "Simultaneous determination of methyl *tert*-butyl ether, its degradation products and other gasoline additives in soil samples by closed-system purge-and-trap gas chromatography–mass spectrometry", *J. Chromatogr. A*, 1132 (2006) 28.
26. B. Hauser, P. Popp, "Combining membrane extraction with mobile gas chromatography for the field analysis of volatile organic compounds in contaminated waters", *J. Chromatogr. A*, 909 (2001) 3.
27. D. Kou, A. San Juan, S. Mitra, "Gas injection membrane extraction for fast on-line analysis using GC detection", *Anal. Chem.*, 73 (2001) 5462.
28. S. Bauer, D. Solyom, "Determination of volatile organic compound as the parts per trillion level in complex aqueous matrices using membrane introduction mass spectrometry", *Anal. Chem.*, 66 (1994) 4422.
29. V. Virkki, R. Ketola, M. Ojala, T. Kotiaho, V. Komppa, A. Grove, S. Facchetti, "On-site environmental analysis by membrane inlet mass spectrometry", *Anal. Chem.*, 67 (1995) 1421.
30. M. Yang, S. Harms, Y. Luo, J. Pawliszyn, "Membrane extraction with a sorbent interface for capillary gas chromatography", *Anal. Chem.*, 66 (1994) 1339.
31. C. Leuenberger, J. Pankow, "Tenax GC cartridges in adsorption/solvent extraction of aqueous organic compounds", *Anal. Chem.*, 56 (1984) 2518.
32. C. Borra, "Evaluation of graphitized carbon black cartridges for rapid organic trace enrichment from water: Application to priority pollutant phenols", *Anal. Chem.*, 58 (1986) 2048.
33. V. Kandimalla, H. Ju, "Molecular imprinting: a dynamic technique for diverse applications in analytical chemistry", *Anal. Bioanal. Chem.*, 380 (2004) 587.
34. J. Haginaka, "Selectivity of affinity media in solid-phase extraction of analytes", *Trends Anal. Chem.*, 24 (2005) 407.

35. W. Mullett, P. Martin, J. Pawliszyn, "In-tube molecularly imprinted polymer solid-phase microextraction for the selective determination of propranolol", *Anal. Chem.*, 73 (2001) 2383.
36. F. Tamayo, E. Turiel, A. Martín-Esteban, "Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends", *J. Chromatogr. A*, 1152 (2007) 32.
37. N. Delaunay-Bertoncini, M.-C. Hennion, "Immunoaffinity solid-phase extraction for pharmaceutical and biomedical trace-analysis—coupling with HPLC and CE—perspectives", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 34 (2004) 717.
38. M. Valcárcel, S. Cárdenas, B.M. Simonet, Y. Moliner-Martínez, R. Lucena, "Carbon nanostructures as sorbent materials in analytical processes", *Trends Anal. Chem.*, 27 (2008) 34.
39. E. Woolfenden, "Monitoring VOCs in air using sorbent tubes followed by thermal desorption-capillary GC analysis: summary of data and practical guidelines", *J. Air Waste Manage. Assoc.*, 47 (1997) 20.
40. H. Lord, J. Pawliszyn, "Evolution of solid-phase microextraction technology", *J. Chromatogr. A*, 885 (2000) 153.
41. Y. Saito, K. Jinno, "Miniaturized sample preparation combined with liquid phase separations", *J. Chromatogr. A*, 1000 (2003) 53.
42. M.J. Wells, "Principles of extraction and the extraction of semivolatile organics from liquids" en *Sample preparation techniques in analytical chemistry*, Ed. S. Mitra (John Wiley and Sons, Inc, 2003), cap. 2, p. 68.
43. H. Sabik, R. Jeannot, B. Rondeau, "Multiresidue methods using SPE techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products, in ground and surface waters", *J. Chromatogr. A*, 885 (2000) 217.
44. J. Martínez, M. Pablos, A. Garrido, F. Arrebola, "Pesticide trace analysis using SPE and GC with electron-capture and tandem mass spectrometric detection in water samples", *J. Chromatogr. A*, 867 (2000) 235.
45. C. Domini, D. Hristozov, B. Almagro, I. Román, S. Prats, A. Canals, "Sample preparation for chromatographic analysis of environmental samples" en *Chromatographic analysis of the environment*, Ed. L.M.L. Nollet (CRC Press, Taylor & Francis group, 2005), cap. 2, p. 31.

46. E. Koster, C. Crescenzi, W. den Hoedt, K. Ensing, G. de Jong, "Fibers coated with molecularly imprinted polymers for solid-phase microextraction", *Anal. Chem.*, 73 (2001) 3140.
47. E. Turiel, J. Tadeo, A. Martín-Esteban, "Molecularly imprinted polymeric fibers for solid-phase microextraction", *Anal. Chem.*, 79 (2007) 3099.
48. J.-X. Wang, D.-Q. Jiang, Z.-Y. Gu, X.-P. Yan, "Multiwalled carbon nanotubes coated fibers for solid-phase microextraction of polybrominated diphenyl ethers in water and milk samples before gas chromatography with electron-capture detection", *J. Chromatogr. A*, 1137 (2006) 8.
49. J. Lü, J. Liu, Y. Wei, K. Jiang, S. Fan, J. Liu, G. Jiang, "Preparation of single-walled carbon nanotube fiber coating for solid-phase microextraction of organochlorine pesticides in lake water and wastewater", *J. Sep. Sci.*, 30 (2007) 2138.
50. J.-F. Liu, N. Li, G.-B. Jiang, J.-M. Liu, J. Jönsson, M.-J. Wen, "Disposable ionic liquid coating for headspace solid-phase microextraction of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes in paints followed by gas chromatography–flame ionization detection", *J. Chromatogr. A*, 1066 (2005) 27.
51. Y.-N. Hsieh, P.-C. Huang, I.-W. Sun, T.-J. Whang, C.-Y. Hsu, H.-H. Huang, C.-H. Kuei, "Nafion membrane-supported ionic liquid–solid phase microextraction for analyzing ultra trace PAHs in water samples", *Anal. Chim. Acta*, 557 (2006) 321.
52. E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, "Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles", *J. Microcolumn Sep.*, 11 (1999) 737.
53. J. Vercauteren, C. Peres, C. Devos, P. Sandra, F. Vanhaecke, L. Moens, "Stir bar sorptive extraction for the determination of ppq-level traces of organotin compounds in environmental samples with thermal desorption-capillary gas chromatography-ICP mass spectrometry", *Anal. Chem.*, 73 (2001) 1509.
54. N. Ochiai, K. Sasamoto, M. Takino, S. Yamashita, S. Daishima, A. Heiden, A. Hoffman, "Determination of trace amounts of off-flavor compounds in drinking water by stir bar sorptive extraction and thermal desorption GC-MS", *Analyst*, 126 (2001) 1652.

55. B. Tienpont, F. David, C. Bicchi, P. Sandra, "High capacity headspace sorptive extraction", *J. Microcolumn Sep.*, 12 (2000) 577.
56. C. Bicchi, C. Iori, P. Rubiolo, P. Sandra, "Headspace sorptive extraction (HSSE), stir bar sorptive extraction (SBSE), and solid phase microextraction (SPME) applied to the analysis of roasted arabica coffee and coffee Brew", *J. Agric. Food. Chem.*, 50 (2002) 449.
57. I. Kolthoff, E. Sandell, E. Meehan, S. Bruckenstein, "Quantitative chemical analysis", (Macmillan, 1969), cap. 14., p. 335.
58. M. Catalina, J. Dallüge, J. Vreuls, U. Brinkman, "Determination of chlorophenoxy acid herbicides in water by in situ esterification followed by in-vial liquid-liquid extraction combined with large-volume on-column injection and gas chromatography-mass spectrometry", *J. Chromatogr. A*, 877 (2000) 153.
59. B. Hauser, P. Popp, E. Kleine-Benne, "Membrane-assisted solvent extraction of triazines and other semivolatile contaminants directly coupled to large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometric detection", *J. Chromatogr. A*, 963 (2002) 27.
60. S. Almeda, L. Nozal, L. Arce, M. Valcárcel, "Direct determination of chlorophenols present in liquid samples by using a supported liquid membrane coupled in-line with capillary electrophoresis equipment", *Anal. Chim. Acta*, 587 (2007) 97.
61. R. Vreuls, E. Romijn, U. Brinkman, "In-vial liquid-liquid extraction with subsequent large-volume on-column injection into GC-MS for the determination of anilines in tap, surface, and wastewater", *J. Microcolumn Sep.*, 10 (1998) 581.
62. K. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, M. Krogh, H. Ugland, T. Grønhaug, "Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. A*, 873 (2000) 3.
63. H. Liu, P. Dasgupta, "Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop", *Anal. Chem.*, 68 (1996) 1817.
64. S. Pedersen-Bjergaard, K. Rasmussen, "Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis", *Anal. Chem.*, 71 (1999) 2650.

65. K. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, "Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction", *Trends Anal. Chem.*, 23 (2004) 1.
66. X. Jiang, H.K. Lee, "Solvent bar microextraction", *Anal. Chem.*, 76 (2004) 5591.
67. M. Jeannot, F. Cantwell, "Solvent microextraction into a single drop", *Anal. Chem.*, 68 (1996) 2236.
68. M. Jeannot, F. Cantwell, "Mass transfer characteristics of solvent extraction into a single drop at the tip of a syringe needle", *Anal. Chem.*, 69 (1997) 235.
69. Y. He, H. Lee, "Liquid-phase microextraction in a single drop of organic solvent by using a conventional microsyringe", *Anal. Chem.*, 69 (1997) 4634.
70. M. Ma, F. Cantwell, "Solvent microextraction with simultaneous back-extraction for sample cleanup and preconcentration: Preconcentration into a single microdrop", *Anal. Chem.*, 71 (1999) 388.
71. W. Liu, H. Lee, "Continuous-flow microextraction exceeding 1000-fold concentration of dilute analytes", *Anal. Chem.*, 72 (2000) 4462.
72. E. Psillakis, N. Kalogerakis, "Developments in single-drop microextraction", *Trends Anal. Chem.*, 21 (2002) 53.
73. L. Xu, C. Basheer, H. Lee, "Developments in single-drop microextraction", *J. Chromatogr. A*, 1152 (2007) 184.

#### • **Microextracción en gota**

74. A. Theis, A. Waldack, S. Hansen, M. Jeannot, "Headspace solvent microextraction", *Anal. Chem.*, 73 (2001) 5651.
75. G. Shen, H. Lee, "Headspace liquid-phase microextraction of chlorobenzenes in soil with gas chromatography-electron capture detection", *Anal. Chem.*, 75 (2003) 98.
76. L. Hou, H. Lee, "Application of static and dynamic liquid-phase microextraction in the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons", *J. Chromatogr. A*, 976 (2002) 377.
77. S.-W. Myung, S.-H. Yoon, M. Kim, "Analysis of benzene ethylamine derivatives in urine using the programmable dynamic liquid-phase microextraction (LPME) device", *Analyst*, 128 (2003) 1443.

78. M. Saraji, "Dynamic headspace liquid-phase microextraction of alcohols", *J. Chromatogr. A*, 1062 (2005) 15.
79. G. Ouyang, W. Zhao, J. Pawliszyn, "Kinetic calibration for automated headspace liquid-phase microextraction", *Anal. Chem.*, 77 (2005) 8122.
80. Y. He, Y.-J. Kang, "Single drop liquid-liquid-liquid microextraction of methamphetamine and amphetamine in urine", *J. Chromatogr. A*, 1133 (2006) 35.
81. L. Xia, B. Hu, Z. Jiang, Y. Wu, Y. Liang, "Single-drop microextraction combined with low-temperature electrothermal vaporization ICP-MS for the determination of trace Be, Co, Pd, and Cd in biological samples", *Anal. Chem.*, 76 (2004) 2910.
82. L. Yangcheng, L. Quan, L. Guangsheng, D. Youyuan, "Directly suspended droplet microextraction", *Anal. Chim. Acta*, 566 (2006) 259.
83. S. Berijani, Y. Assadi, M. Anbia, M.-R. Hosseini, E. Aghaee, "Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water", *J. Chromatogr. A*, 1123 (2006) 1.
84. R. Kozani, Y. Assadi, F. Shemirani, M.-R. Hosseini, M. Jamali, "Part-per-trillion determination of chlorobenzenes in water using dispersive liquid-liquid microextraction combined gas chromatography-electron capture detection", *Talanta*, 72 (2007) 387.
85. M.-R. Zanjani, Y. Yamini, S. Shariati, J. Jönsson, "A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop", *Anal. Chim. Acta*, 585 (2007) 286.
86. L.-L. Qian, Y.-Z. He, "Funnel-form single-drop microextraction for gas chromatography-electron-capture detection", *J. Chromatogr. A*, 1134 (2006) 32.
87. R. Batlle, P. López, C. Nerín, C. Crescenzi, "Active single-drop microextraction for the determination of gaseous diisocyanates", *J. Chromatogr. A*, 1185 (2008) 155.
88. J.-F. Liu, G.-B. Jiang, Y.-G. Chi, Y.-Q. Cai, Q.-X. Zhou, J.-T. Hu, "Use of ionic liquids for liquid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons", *Anal. Chem.*, 75 (2003) 5870.



89. J. Zhang, T. Su, H.-K. Lee, "Headspace water-based liquid-phase microextraction", *Anal. Chem.*, 77 (2005) 1988.
90. J.-F. Liu, Y.-G. Chi, G.-B. Jiang, C. Tai, J.-F. Peng, J.-T. Hu, "Ionic liquid-based liquid-phase microextraction, a new sample enrichment procedure for liquid chromatography", *J. Chromatogr. A*, 1026 (2004) 143.
91. F.J. López-Jiménez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, "Single-drop coacervative microextraction of organic compounds prior to liquid chromatography", *J. Chromatogr. A*, 1195 (2008) 25.
92. C.R. Schnobrich, M.A. Jeannot, "Steady-state kinetic model for headspace solvent microextraction", *J. Chromatogr. A*, 1215 (2008) 30.
93. W. Wardencki, J. Curylo, J. Namiesnik, "Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis", *J. Biochem. Biophys. Methods*, 70 (2007) 275.

#### • Líquidos iónicos como fase extractante

94. K. Seddon, A. Stark, M.-J. Torres, "Influence of chloride, water, and organic solvents on the physical properties of ionic liquids", *Pure Appl. Chem.*, 72 (2000) 2275.
95. J.-F. Liu, J. Jönsson, G.-B. Jiang, "Application of ionic liquids in analytical chemistry", *Trends Anal. Chem.*, 24 (2005) 20.
96. G. Baker, S. Baker, S. Pandey, F. Bright, "An analytical view of ionic liquids", *Analyst*, 130 (2005) 800.
97. S. Pandey, "Analytical applications of room-temperature ionic liquids: A review of recent efforts", *Anal. Chim. Acta*, 556 (2006) 38.
98. J. Anderson, D. Armstrong, G.-T. Wei, "Ionic liquids in analytical chemistry", *Anal. Chem.*, 78 (2006) 2893.
99. M. Koel, "Ionic liquids in chemical analysis", *Critical Rev. Anal. Chem.*, 35 (2005) 177.
100. H. Zhao, S. Xia, P. Ma, "Use of ionic liquids as "green" solvents for extractions", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 80 (2005) 1089.
101. H. Olivier-Bourbigou, L. Magna, "Ionic liquids: perspectives for organic and catalytic reactions", *J. Mol. Cat. A*, 182 (2002) 419.
102. J. Dupont, R.F. de Souza, P.A.Z. Suarez, "Ionic liquid (Molten Salt)



- phase organometallic catalysis", *Chem. Rev.*, 102 (2002) 3667.
103. D. Zhao, Y. Liao, Z. Zhang, "Toxicity of ionic liquids", *Clean*, 35 (2007) 42.
104. N. Gathergood, M.T. García, P.J. Scammells, "Biodegradable ionic liquids: Part I. Concept, preliminary targets and evaluation", *Green. Chem.*, 6 (2004) 166.
105. M.T. García, N. Gathergood, P.J. Scammells, "Biodegradable ionic liquids: Part II. Effect of the anion and toxicology", *Green. Chem.*, 7 (2005) 9.
106. N. Gathergood, P.J. Scammells, M.T. García, "Biodegradable ionic liquids: Part III. The first readily biodegradable ionic liquids", *Green. Chem.*, 8 (2006) 156.
107. J. Huddleston, H.D. Willauer, R. Swatoski, A. Visser, R. Rogers, "Room temperature ionic liquid as novel media for "clean" liquid-liquid extraction", *Chem. Commun.*, 16 (1998) 1765.
108. J.-F. Liu, Y.-G. Chi, G.-B. Jiang, "Screening the extractability of some typical environmental pollutants by ionic liquids in liquid-phase microextraction", *J. Sep. Sci.*, 28 (2005) 87.
109. J.-F. Peng, J.-F. Liu, G.-B. Jiang, C. Tai, M.-J. Huang, "Ionic liquid for high temperature headspace liquid-phase microextraction of chlorinated anilines in environmental water samples", *J. Chromatogr. A*, 1072 (2005) 3.
110. J.-F. Liu, J.-F. Peng, Y.-G. Chi, G.-B. Jiang, "Determination of formaldehyde in shiitake mushroom by ionic liquid-based liquid-phase microextraction coupled with liquid chromatography", *Talanta*, 65 (2005) 705.
111. C.-L. Ye, Q.-X. Zhou, X.-M. Wang, "Headspace liquid-phase microextraction using ionic liquid as extractant for the preconcentration of dichlorodiphenyltrichloroethane and its metabolites at trace levels in water samples", *Anal. Chim. Acta*, 572 (2006) 165.
112. C. Ye, Q. Zhou, X. Wang, J. Xiao, "Determination of phenols in environmental water samples by ionic liquid-based headspace liquid phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography", *J. Sep. Sci.*, 30 (2007) 42.

113. J.-F. Peng, J.-F. Liu, X.-L. Hu, G.-B. Jiang, "Direct determination of chlorophenols in environmental water samples by hollow fiber supported ionic liquid membrane extraction coupled with high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. A*, 1139 (2007) 165.
114. Q. Zhou, H. Bai, G. Xie, J. Xiao, "Temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid phase micro-extraction", *J. Chromatogr. A*, 1177 (2008) 43.
115. E. Aguilera-Herrador, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, "Direct coupling of ionic liquid based single-drop microextraction and GC/MS", *Anal. Chem.*, 80 (2008) 793.

- **Radiación de microondas para favorecer la extracción**

116. A. Abu-Samra, J. Morris, S. Koirtiyohann, "Wet ashing of some biological samples in a microwave oven", *Anal. Chem.*, 47 (1975) 1475.
117. C. Cámara, C. Pérez-Conde, "Preparación de la muestra para la determinación de analitos inorgánicos" en *Toma y tratamiento de muestra*, Ed. C. Cámara (Síntesis, 2002), cap. 5, p. 203.
118. D. Kou, S. Mitra, "Extraction of semivolatile organic compounds from solid matrices" en *Sample preparation techniques in analytical chemistry*, Ed. S. Mitra (John Wiley and Sons, Inc, 2003), cap. 3, p. 163.
119. H.M. (Skip) Kingston, P. Walter, S. Chalk, E. Lorentzen, D. Link, "Environmental microwave sample preparation: fundamentals, methods, and applications" en *Microwave-enhanced chemistry*, Ed. H.M. (Skip) Kingston y S. Haswell (American Chemical Society, DC 1997), cap. 3.
120. A. Zlotorzynski, "The application of microwave radiation to analytical and environmental chemistry", *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 25 (1995) 43.
121. E.D. Neas, M.J. Collins, "Microwave heating: Theoretical concepts and equipment design" en *Introduction to microwave sample preparation*, Ed. H.M. Kingston y L.B. Jassie (American Chemical Society, DC 1988), cap. 2, p. 7.

122. M.-C. Wei, J.-F. Jen, "Determination of aqueous chlorophenols by microwave-assisted headspace solid-phase microextraction and gas chromatography", *Chromatographia*, 55 (2002) 701.
123. Y.-I. Chen, Y.-S. Su, J.-F. Jen, "Determination of dichlorvos by on-line microwave-assisted extraction coupled to headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–electron-capture detection", *J. Chromatogr. A*, 976 (2002) 349.
124. G. Xiong, C. Goodridge, L. Wang, Y. Chen, J. Pawliszyn, "Microwave-assisted headspace solid-phase microextraction for the analysis of bioemissions from eucalyptus citriodora leaves", *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 7841.
125. M.-C. Wei, J.-F. Jen, "Determination of chlorophenols in soil samples by microwave assisted extraction coupled to headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–electron-capture detection", *J. Chromatogr. A*, 1012 (2003) 111.
126. H.-P. Li, G.-C. Li, J.-F. Jen, "Determination of organochlorine pesticides in water using microwave assisted headspace solid-phase microextraction and gas chromatography", *J. Chromatogr. A*, 1012 (2003) 129.
127. C.-T. Yan, J.-F. Jen, "Determination of aniline in water by microwave-assisted headspace solid-phase microextraction and gas chromatography", *Chromatographia*, 59 (2004) 517.
128. C.-T. Yan, T.-S. Shih, J.-F. Jen, "Determination of aniline in silica gel sorbent by one-step in situ microwave-assisted desorption coupled to headspace solid-phase microextraction and GC-FID", *Talanta*, 64 (2004) 650.
129. Y.-Y. Shu, S.-S. Wang, M. Tardif, Y. Huang, "Analysis of polychlorinated biphenyls in aqueous samples by microwave-assisted headspace solid-phase microextraction", *J. Chromatogr. A*, 1008 (2003) 1.
130. Y. Huang, Y.-C. Yang, Y.-Y. Shu, "Analysis of semi-volatile organic compounds in aqueous samples by microwave-assisted headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography–electron capture detection", *J. Chromatogr. A*, 1140 (2007) 35.

131. C. Deng, Y. Mao, F. Hu, X. Zhang, "Development of gas chromatography–mass spectrometry following microwave distillation and simultaneous headspace single-drop microextraction for fast determination of volatile fraction in Chinese herb", *J. Chromatogr. A*, 1152 (2007) 193.

• **Nuevos materiales como fase extractante: Nanomateriales de carbón**

132. M. Valcárcel, S. Cárdenas, B.M. Simonet, "Role of carbon nanotubes in analytical science", *Anal. Chem.*, 79 (2007) 4788.

133. A. Merkoçi, "Carbon nanotubes in analytical sciences", *Microchim. Acta*, 152 (2006) 157.

134. J.Y. Raty, G. Galli, "Optical properties and structure of nanodiamonds", *J. Electroanal. Chem.*, 584 (2005) 9.

135. G. Jiang, Q. Zheng, "Synthesis and application of new fullerene derivative", *J. Appl. Polymer Sci.*, 97 (2005) 2182.

136. D. Roy, M. Chhowalla, H. Wang, N. Sano, I. Alexandrou, T.W. Clyne, G.A.J. Amaratunga, "Characterisation of carbon nano-onions using raman spectroscopy", *Chem. Phys. Lett.*, 373 (2003) 52.

137. H. Dai, "Carbon nanotubes: opportunities and challenges", *Surf. Sci.*, 500 (2002) 218.

138. J.A. Nisha, M. Yudasaka, S. Bandow, F. Kokai, K. Takahashi, S. Iijima, "Adsorption and catalytic properties of single-wall carbon nanohorns", *Chem. Phys. Lett.*, 328 (2000) 381.

139. C.H.L. Quay, J. Cumings, S.J. Gamble, A. Yazdani, H. Kataura, D. Goldhaber-Gordon, "Transport properties of carbon nanotube C60 peapods", *Physical Rev. B*, 76 (2007) 073404.

140. Y. Yang, M.C. Gupta, K.L. Dudley, R.W. Lawrence, "The fabrication and electrical properties of carbon nanofibre–polystyrene composites", *Nanotechnology*, 15 (2004) 1545.

141. M. Sano, A. Kamino, J. Okamura, S. Shinkai, "Ring closure of carbon nanotubes", *Science*, 293 (2001) 1299.

142. H. Pan, L. Liu, Z.X. Guo, L. Dai, F. Zhang, D. Zhu, R. Czerw, D.L. Carroll, "Carbon nanotubols from mechanochemical reaction", *Nano Lett.*, 3 (2003) 29.
143. C.F. Poole, "New trends in solid-phase extraction", *Trends Anal. Chem.*, 22 (2003) 362.
144. N. Fontanals, R.M. Mercé, F. Borrull, "New hydrophilic materials for solid-phase extraction", *Trends Anal. Chem.*, 24 (2005) 394.
145. A. Serrano, M. Gallego, "Fullerenes as sorbent materials for benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene isomers preconcentration", *J. Sep. Sci.*, 29 (2006) 33.
146. C.H. Xiao, Z.L. Liu, Z.Y. Wang, C.Y. Wu, H.M. Han, "Use of polymeric fullerene as a new coating for solid-phase microextraction", *Chromatographia*, 52 (2000) 803.
147. C. Xiao, S. Han, Z. Wang, J. Xing, C. Wu, "Application of the polysilicone fullerene coating for solid-phase microextraction in the determination of semi-volatile compounds", *J. Chromatogr. A*, 927 (2001) 121.
148. J. Yu, L. Dong, C. Wu, L. Wu, J. Xing, "Hydroxyfullerene as a novel coating for solid-phase microextraction fiber with sol-gel technology", *J. Chromatogr. A*, 978 (2002) 37.
149. G.Z. Fang, J.X. He, S. Wang, "Multiwalled carbon nanotubes as sorbent for on-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of 10 sulfonamides in eggs and pork", *J. Chromatogr. A*, 978 (2002) 37.
150. Y.Q. Cai, G.B. Jiang, J.F. Liu, Q.X. Zhou, "Multiwalled carbon nanotubes as a solid-phase extraction adsorbent for the determination of bisphenol A, 4-n-nonylphenol, and 4-tert-octylphenol", *Anal. Chem.*, 75 (2003) 2517.
151. W.-D. Wang, Y.-M. Huang, W.-Q. Shu, J. Cao, "Multiwalled carbon nanotubes as adsorbents of solid-phase extraction for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental waters coupled with high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. A*, 1173 (2007) 27.
152. X. Liu, Y. Ji, Y. Zhang, H. Zhang, M. Liu, "Oxidized multiwalled carbon nanotubes as a novel solid-phase microextraction fiber for

determination of phenols in aqueous samples", *J. Chromatogr. A*, 1165 (2007) 10.

153. E. Adomaviciute, K. Jonusaite, J. Barkauskas, V. Vickackaite, "In-groove carbon nanotubes device for SPME of aromatic hydrocarbons", *Chromatographia*, 67 (2008) 599.
154. S. Macdonald, K. Szot, J. Niedziolka, F. Marken, M. Opallo, "Introducing hydrophilic carbon nanoparticles into hydrophilic sol-gel film electrodes", *J. Solid State Electrochem.*, 12 (2008) 287.
155. M. Amiri, S. Shahrokhian, E. Psillakis, F. Marken, "Electrostatic accumulation and determination of triclosan in ultrathin carbon nanoparticle composite film electrodes", *Anal. Chim. Acta*, 593 (2007) 117.

#### • **Diseño estadístico de experimentos**

156. D.C. Montgomery, "Diseño y análisis de experimentos", Ed. N. Grepe (Grupo Editorial Iberoamérica S.A. de C.V., 1991).
157. D.C. Montgomery, "Design and analysis of experiments", Ed. S. Russell (John Wiley & Sons, Inc., 2001), cap. 9, p. 383.
158. R.H. Myers, D.C. Montgomery, "Response surface methodology", Eds. P. Bloomfield y N. Cressie (John Wiley & Sons, Inc., 2002).
159. Y. Heyden, C. Hartmann, D. Massart, L. Michel, P. Kiechle, F. Erni, "Ruggedness tests for a high-performance liquid chromatographic assay: comparison of an evaluation at two and three levels by using two-level Plackett-Burman designs", *Anal. Chim. Acta*, 316 (1995) 15.
160. H. Fabre, N. Mesplet, "Robustness testing for a capillary electrophoresis method using the "short-end injection" technique", *J. Chromatogr. A*, 897 (2000) 329.

#### • **Analitos objeto de estudio**

161. Environmental Health Criteria No. 128, Ginebra 1991.
162. Environmental Health Criteria No. 195, Ginebra 1997.

163. Report on Carcinogens, Eleventh Edition. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program, 2005.
164. EC (European Community) Council directive 76/464/EEC on "Pollution caused by certain dangerous substances discharged into the aquatic environment of the Community". Official Journal L 129, 18 de Mayo de 1976.
165. A. Chisvert, A. Salvador, "UV filters in sunscreens and other cosmetics. Regulatory aspects and analytical methods in analysis of cosmetic products", Ed. A. Chisvert y A. Salvador (Elsevier, 2007).
166. L.G. Dimosthenis, A. Salvador, A. Chisvert, "UV filters: From sunscreens to human body and the environment", Trends Anal. Chem., 26 (2006) 360.
167. S.D. Richardson, "Water analysis: Emerging contaminants and current issues", Anal. Chem., 79 (2007) 4295.
168. T. Suzuki, S. Kitamura, R. Khota, K. Sugihara, N. Fujimoto, S. Ohta, "Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens", Toxicol. Appl. Pharmacol., 203 (2005) 9.
169. M. Schlumpf, P. Schmid, S. Durrer, M. Conscience, K. Maerkel, M. Henseler, M. Gruetter, I. Herzog, S. Reolon, R. Ceccatelli, O. Faass, E. Stutz, H. Jarry, W. Wuttke, W. Lichtensteiger, "Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters—an update", Toxicology, 205 (2004) 113.
170. T. Hayashi, Y. Okamoto, K. Ueda, N. Kojima, "Formation of estrogenic products from benzophenone after exposure to sunlight," Toxicol. Lett., 167 (2006) 1.
171. N.R. Janjua, B. Mogensen, A.M. Andersson, J.H. Petersen, M. Henriksen, N.E. Skakkebæk, H.C. Wulf, "Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octyl-methoxycinnamate, and 3-(4-methyl-benzylidene)camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans", J. Invest. Dermatol., 123 (2004) 57.
172. D.W. Kolpin, M. Skopec, M.T. Meyer, E.T. Furlong, S.D. Zaugg, "Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater

- contaminants to streams during differing flow conditions", *Sci. Total Environ.*, 328 (2004) 119.
173. D.W. Kolpin, E.T. Furlong, M.T. Meyer, E.M. Thurman, S.D. Zaugg, L.B. Barber, H.T. Buxton, "Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance", *Environ. Sci. Technol.*, 36 (2002) 1202.
174. A. Lindström, I.J. Buerge, T. Poiger, P. Bergqvist, M.D. Müller, H. Buser, "Occurrence and environmental behavior of the bactericide triclosan and its methyl derivative in surface waters and in wastewater", *Environ. Sci. Technol.*, 36 (2002) 2322.
175. C. Tixier, H. Singer, S. Canonica, S. Müller, "Phototransformation of triclosan in surface waters: A relevant elimination process for this widely used biocides laboratory studies, field measurements, and modeling", *Environ. Sci. Technol.*, 36 (2002) 3482.
176. A.M. Peck, "Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices", *Anal. Bioanal. Chem.*, 386 (2006) 907.
177. L. Sanchez-Prado, M. Llompart, M. Lores, M. Fernández-Alvarez, C. García-Jares, R. Cela, "Further research on the photo-SPME of triclosan", *Anal. Bioanal. Chem.*, 384 (2006) 1548.
178. D.E. Latch, J.L. Packer, W.A. Arnold, K. McNeill, "Photochemical conversion of triclosan to 2,8-dichlorodibenzo-p-dioxin in aqueous solution", *J. Photochem. Photobiol. A*, 158 (2003) 63.







Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

### **III. HERRAMIENTAS ANALÍTICAS**

---



El desarrollo de la parte experimental recogida en la presente memoria ha sido posible gracias al empleo de diversas herramientas analíticas, considerando como tales todos los elementos utilizados, desde los distintos reactivos, patrones y muestras reales hasta los instrumentos y equipos más sofisticados. En este apartado se realiza una descripción detallada de cada uno de los elementos empleados.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

### III.1. ESTÁNDARES Y REACTIVOS

#### III.1.1. Analitos

- *Compuestos bencénicos clorados*: 1,2-diclorobenceno, 1,3-diclorobenceno, 1,4-diclorobenceno, 1,2,3-triclorobenceno, 1,2,4-triclorobenceno, 1,3,5-triclorobenceno, 1,2,3,4-tetraclorobenceno, 1,2,4,5-tetraclorobenceno, pentaclorobenceno y hexaclorobenceno. Los diez analitos de calidad Pestanal fueron adquiridos de Riedel-de Haën (Seelze, Alemania). Se prepararon disoluciones de 500 y 1000 mg L<sup>-1</sup> en una mezcla de acetonitrilo/metanol (50/50, v/v) y metanol, respectivamente. Las disoluciones fueron conservadas a 4°C.
- La *benzofenona-3* (BZ3) fue adquirida de Aldrich (Steinheim, Alemania) con una pureza del 98%. Se preparó una disolución de 500 mg L<sup>-1</sup> en etanol y fue resguardada de la luz utilizando un vial de color topacio y dispuesta en sitio cerrado. Se preparó también una disolución de BZ3 de 500 mg L<sup>-1</sup> en agua, añadiendo previamente unas gotas de una disolución de NaOH al 10% para favorecer su disolución.
- El *triclosan* fue adquirido de Fluka (Buchs, Suiza) con una pureza del 97%. Se prepararon disoluciones de diferentes concentraciones en medio tamponado básico, utilizando una sal dibásica de fosfato potásico e hidróxido potásico.

#### III.1.2. Fases extractantes

- *Disolventes orgánicos*. Tolueno, n-hexano y n-heptano han sido estudiados como fases extractantes en el primer estudio de la presente memoria. Los disolventes de grado pesticida utilizados fueron adquiridos de la casa comercial Riedel-de Haën.
- *Líquidos iónicos*. Dos líquidos iónicos de la misma familia han sido estudiados como fase extractante. El 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] de grado síntesis fue adquirido de Merck (Darmstadt, Alemania). El 1-hexil-3-metilimidazolio

hexafluorofosfato  $[C_6MIM][PF_6]$  fue adquirido de la casa comercial Merck de grado síntesis y de la casa Green Solutions (Vigo, España) con una pureza superior al 98%.

- *Nanopartículas de carbón.* Un tipo de nanopartículas de carbón hidrofílicas funcionalizadas superficialmente con grupos tosilo han sido estudiadas como fase extractante. Estas nanopartículas son del tipo Emperor 2000, las cuales pertenecen a la casa comercial Cabot Corporation (Dukinfield, Reino Unido). En la [Figura 49](#) se muestra una imagen de las nanopartículas tomada mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Este tipo de nanopartículas se vende comercialmente para aplicaciones industriales como pigmentos y colorantes, que difiere ampliamente de la que aquí se propone.

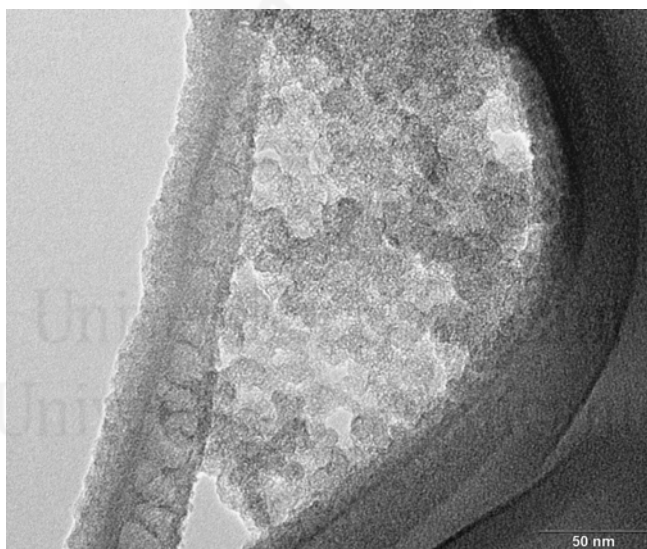


Figura 49. Imagen TEM de las nanopartículas de carbón.

### III.1.3. Reactivos

- *Patrón interno.* El 1,4-dibromobenceno ha sido utilizado como patrón interno en los estudios realizados con los clorobencenos, con el fin de corregir los posibles errores generados durante el proceso de extracción y debido a las variaciones en la gota. Este compuesto fue elegido como patrón interno debido a la similitud estructural, a su comportamiento en la extracción y porque su pico

cromatográfico tiene un tiempo de retención que no solapa con ninguno de los analitos. El patrón utilizado era también de calidad Pestanal y de la casa comercial Riedel-de Haën. Se preparó una disolución de 10 mg L<sup>-1</sup> en metanol y se conservó a 4°C.

- *Disolventes orgánicos.* Se han empleado para preparar las disoluciones de los patrones y también como componentes de las distintas fases móviles empleadas en LC. El metanol y acetonitrilo fueron de grado pesticida de Riedel-de Haën y de grado HPLC de Scharlau Chemie (Barcelona, España). El etanol de grado HPLC utilizado fue adquirido de Scharlau Chemie.
- *Sales.* El cloruro sódico (Merck) fue utilizado para ajustar la fuerza iónica de las muestras sometidas a extracción.
- *Ácidos y bases.* Los ajustes de pH se llevaron a cabo usando ácido fosfórico al 85% de Scharlau Chemie, ácido clorhídrico al 37% e hidróxido sódico de Merck, la sal dibásica del fosfato potásico al 98% e hidróxido potásico al 85%, ambos de Aldrich. Ácido acético de grado HPLC de Scharlau Chemie se utilizó en la fase móvil para LC.

#### III.1.4. Muestras reales

- *Aguas.* Las muestras reales de agua se recogieron en contenedores de vidrio color topacio y conservadas a 4°C durante el tiempo previo al análisis. Se utilizaron directamente sin ser previamente tratadas o filtradas. Las distintas aguas utilizadas fueron: aguas de red potable de Chania (Creta, Grecia) y de San Vicente del Raspeig (Alicante, España), agua de pozo del monasterio de Agia Triada (Chania), agua del río Ebro y agua residual de una planta de tratamiento de Bilbao (España).
- *Orina.* Muestras de orina de diferentes voluntarios se utilizaron durante el estudio de permeación cutánea de la BZ3. Las muestras fueron recogidas antes y después de la aplicación de la crema en recipientes esterilizados y conservadas a 4°C.

### III.1.5. Otros reactivos

- *Cremas solares*. Se preparó una crema solar en nuestro laboratorio con un contenido de BZ3 del 5%. La crema contenía también un 18% de una crema base para la elaboración de emulsiones aceite/agua (compuesta por una mezcla de miristato de miristilo, alcohol cetílico, laureato de monoglicerilo, octanoato de cetearilo, miristato de isopropilo y otros componentes de naturaleza lipófila), 5% de *aceite de aguacate* (se trata de una mezcla natural de ácidos grasos saturados, oléico y linoléico, y su función es de sobreengrasante de la piel y dermatoprotector), 5% de *dimeticona 350* (se trata de una mezcla de polímeros entre los que se encuentra dimetilsilicona y dimetilsiloxano, y su función es la de ayudar a la elaboración de emulsiones y proporcionar una mayor untuosidad y suavidad en la aplicación del producto, además de actuar como vehículo de componentes activos), 5% de *propilenglicol* (su función es la de emulgente, impidiendo la desecación de la capa córnea de la epidermis), 4% de *hidrovitón* (se trata de un preparado a base de aminoácidos, lactato sódico, urea, alantoína, alcoholes, cloruro sódico y humectantes, cuya función es la de hidratar la piel), 0.5% de *phenonip* (mezcla de parabenos y fenoxietanol, cuya función es la de conservador) y el resto, hasta completar el 100%, de *agua*. Todos los ingredientes de grado cosmético utilizados para la formulación de la crema solar fueron proporcionados por Guinama S.L. y RNB Cosmetics (Valencia).

### III.2. INSTRUMENTOS

Para el desarrollo de la presente memoria se utilizó un cromatógrafo de gases, un cromatógrafo de líquidos y un sistema potenciostato.



### III.2.1. Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas

La cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas ha sido utilizada para realizar la separación de los diez analitos clorados y del patrón interno y, posteriormente, ser detectados. El instrumento utilizado fue un Shimadzu GC-17A, modelo 3 QP-5050A, con fuente de impacto electrónico (70 eV) y analizador cuadrupolar. La separación se llevó a cabo en una columna capilar HP-5MS (30 m x 0.25 mm, 0.25  $\mu$ m) de Agilent y la adquisición y cuantificación se realizó mediante la monitorización selectiva de iones (SIM).

### III.2.2. Cromatógrafo de líquidos con un detector espectrofotométrico de fila de diodos

La cromatografía de líquidos acoplada a un detector espectrofotométrico de fila de diodos (PDA) ha sido utilizada para separar y detectar ocho de los diez analitos clorados y el filtro UV. El sistema de LC estaba compuesto por una bomba de gradiente cuaternaria modelo Waters 600E, un inyector Rheodyne de 6 puertos modelo 7725i, bucles de inyección de 5 y 10  $\mu$ L, un detector PDA modelo Waters 996 y la columna de separación. En los estudios llevados a cabo con muestras de agua, la columna utilizada fue una Luna C<sub>18</sub> de Phenomenex de fase invertida con unas dimensiones de 250 mm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno y 5  $\mu$ m de tamaño de partícula. En el estudio llevado a cabo con muestras de orina, la columna utilizada fue una LiChrospher<sup>®</sup> RP-18 de Merck también de fase invertida con unas dimensiones de 125 mm de longitud, 4 mm de diámetro interno y 5  $\mu$ m de tamaño de partícula. Ambas columnas contienen la fase estacionaria de sílice enlazada con grupos octadecilo.

### III.2.3. Sistema potencióstato

El sistema potencióstato ha sido utilizado para realizar determinaciones voltamperométricas cíclicas de los analitos BZ3 y triclosán,

con diferentes tipos de electrodos. El potenciostato utilizado fue del modelo micro-Autolab III para tres electrodos de la casa Eco Chemie. Los electrodos empleados fueron un electrodo auxiliar, uno de referencia y el de trabajo. El electrodo auxiliar era un alambre de platino de 2 cm de longitud y 0.5 mm de diámetro dispuesto en espiral; el electrodo de referencia era un electrodo de calomelanos saturado (KCl); y como electrodos de trabajo se emplearon dos tipos. Uno de ellos consistía en un disco plano de grafito pirolítico de 4.9 mm de diámetro de la casa LeCarbone Ltd. y el segundo era un disco de carbón vítreo de 3 mm de diámetro de la casa BAS Analytical. En la [Figura 50](#) se pueden observar los dos electrodos de trabajo utilizados.



[Figura 50](#). Electrodos de trabajo. (a) Grafito pirolítico; (b) carbón vítreo.

#### III.2.4. Otros instrumentos

- Un microscopio electrónico de transmisión (TEM) modelo JEM-2010 de la marca JEOL fue utilizado para obtener las imágenes de las nanopartículas de carbón, y verificar que el diámetro de las mismas coincidía con el proporcionado por la casa comercial. Una imagen ha sido presentada en la [Figura 49](#).
- Varios pH metros se han utilizado a lo largo de la presente memoria. La finalidad de los mismos ha sido el ajuste del pH de las muestras cuya extracción era dependiente del pH, así como la preparación de tampones. Los tres pH metros utilizados son: un pH

metro modelo Hydrus 300 de Fisher, el modelo Basic 20+ y el modelo micropH 2000, éstos dos últimos de la casa Crison.

### **III.3. APARATOS**

#### **III.3.1. Agitador magnético y placa calefactora**

Tres tipos de agitadores se han utilizado a lo largo de la presente memoria. El primero de ellos, y utilizado en la mayor parte de la experimentación, fue un agitador modelo A-163 de la marca SBS con una agitación máxima de 1580 rpm. El segundo de ellos es especial ya que es un agitador para microondas, para lo que no posee ninguna pieza metálica y funciona con el mismo rotor del microondas al acoplarlo con el asa giratoria que hace girar el plato. El agitador fue adquirido de Scienceware, Bel-Art Products, y la agitación única y máxima que proporciona es de 300 rpm. El tercero, y último de los agitadores, era también placa calefactora modelo 500 de la marca Darlab Egara S.L.

#### **III.3.2. Baño de ultrasonidos**

El baño de ultrasonidos ha sido utilizado con diferentes finalidades. Se realizó la preparación de la suspensión de las nanopartículas de carbón en agua, la extracción de los analitos de BZ3 y triclosán por las nanopartículas de carbón y para ayudar en la preparación de las disoluciones. Se han utilizado dos modelos, en el trabajo con las nanopartículas de carbón se empleó un baño modelo FB11012 de la casa comercial Fisher mientras que un baño modelo 300513 de Selecta fue utilizado en la preparación de las disoluciones.

#### **III.3.3. Microondas doméstico**

El microondas doméstico de la marca Samsung modelo M1711N utilizado estaba equipado con un magnetrón de 2.450 MHz y una potencia

máxima de 800W. La cavidad de microondas fue modificada al realizar un orificio de 18 mm de diámetro en su parte superior para acoplar el sistema de extracción. Por motivos de seguridad, las posibles fugas de radiación de microondas por dicho orificio se midieron con un detector de fugas. La figura del mismo puede observarse en el capítulo IV.3.

#### III.3.4. Centrífuga

Se ha utilizado una centrífuga para separar las nanopartículas de carbón de la muestra acuosa una vez finalizada la extracción. El modelo utilizado fue el 5415D de la casa Eppendorf.

### III.4. PROGRAMAS ESTADÍSTICOS

Las variables implicadas en la extracción han sido optimizadas en la mayoría de los estudios realizados mediante diseño experimental. Para tal finalidad se ha utilizado el programa estadístico "Statgraphics Plus 5.1".





Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **IV.PARTE EXPERIMENTAL, RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---





Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **Capítulo 1. Microextracción en gota**

---





El objetivo del trabajo presentado en este capítulo consiste en el uso de la técnica de extracción líquido-líquido miniaturizada, en la modalidad de microextracción en gota (SDME). Para cumplir este objetivo se requería de una problemática actual en la que se necesitara extraer un analito, o un grupo de analitos, contenido en una muestra de naturaleza líquida. Por ello se realizó una búsqueda minuciosa sobre una problemática actual en la que la técnica de SDME pudiera ser aplicada, y como resultado de esta búsqueda se encontró que la determinación de analitos bencénicos clorados en muestras de agua era de interés. Estos analitos han sido previamente presentados en el apartado II.8. y es bien conocido que son y han sido ampliamente utilizados en diversos campos y para diferentes aplicaciones. Además, hay que tener en cuenta que entre el grupo de analitos seleccionados estaban incluidos el 1,4-diclorobenceno y el hexaclorobenceno, compuestos considerados precursores de cáncer en humanos.

Hasta el momento, las técnicas de extracción que se habían utilizado en esta problemática habían sido la extracción líquido-líquido, la extracción en fase sólida (SPE) y la microextracción en fase sólida (SPME). Por lo tanto, uno de los objetivos principales del trabajo a llevar a cabo era proporcionar una serie de ventajas frente a estas técnicas. Por otro lado, la técnica de SDME era de reciente aparición y presentaba numerosas e importantes ventajas frente a la mayoría de técnicas de extracción utilizadas ampliamente a lo largo de los años. Por todo lo anterior se consideró prometedora la combinación de la SDME con la problemática que presentaba la contaminación de aguas por los analitos bencénicos clorados, con el objetivo final de obtener unos resultados notablemente satisfactorios y realizar un importante avance sobre los métodos ya existentes.

Por tanto, este primer trabajo presenta la aplicación de la SDME, en su modalidad de espacio de cabeza (HS-SDME), como técnica de extracción de diez analitos bencénicos clorados en muestras de aguas, y su posterior separación y detección por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). La parte experimental de este trabajo fue realizada durante una estancia breve en la Universidad Técnica de Creta (Grecia), bajo la dirección de la profesora Eleftheria Psillakis.



## Headspace single-drop microextraction for the analysis of chlorobenzenes in water samples

Lorena Vidal<sup>a</sup>, Antonio Canals<sup>a</sup>, Nicolas Kalogerakis<sup>b</sup>, Eleftheria Psillakis<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> *Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Universidad de Alicante, P.O. Box 99, E-03080, Alicante, Spain*

<sup>b</sup> *Department of Environmental Engineering, Technical University of Crete, Polytechnioupolis, GR-73100 Chania, Crete, Greece*

Received 17 March 2005; received in revised form 10 June 2005; accepted 21 June 2005

---

### Abstract

Exposing a microlitre organic solvent drop to the headspace of an aqueous sample contaminated with ten chlorobenzene compounds proved to be an excellent preconcentration method for headspace analysis by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). The proposed headspace single-drop microextraction (SDME) method was initially optimised and the optimum experimental conditions found were: 2.5  $\mu\text{L}$  toluene microdrop exposed for 5 min to the headspace of a 10 mL aqueous sample containing 30% (w/v) NaCl placed in 15 mL vial and stirred at 1000 rpm. The calculated calibration curves gave a high level of linearity for all target analytes with correlation coefficients ranging between 0.9901 and 0.9971, except for hexachlorobenzene where the correlation coefficient was found to be 0.9886. The repeatability of the proposed method, expressed as relative standard deviation varied between 2.1 and 13.2% ( $n = 5$ ). The limits of detection ranged between 0.003 and 0.031  $\mu\text{g/L}$  using GC–MS with selective ion monitoring. Analysis of spiked tap and well water samples revealed that matrix had little effect on extraction. A comparative study was performed between the proposed method, headspace solid-phase

microextraction (SPME), solid-phase extraction (SPE) and EPA method 8121. Overall, headspace SDME proved to be a rapid, simple and sensitive technique for the analysis of chlorobenzenes in water samples, representing an excellent alternative to traditional and other, recently introduced, methods.

*Keywords: Chlorinated benzenes; Headspace SDME; Solvent microextraction; Water analysis*

---

## 1. Introduction

Chlorobenzenes are a class of environmental pollutants used as industrial solvents, pesticides, dielectric fluids, deodorant and chemical intermediates. Their presence in the environment is a result of uncontrolled release of solid/liquid effluents as well as industrial atmospheric discharges [1]. It is well known that once chlorobenzenes enter the aquatic environment they tend to accumulate on living organisms [2]. This is of great concern given that chlorobenzenes feature prominently within several listings of priority hazardous substances due to their acute toxicity. Hexachlorobenzene and 1,4-dichlorobenzene were the first compounds included in the Third and Fifth (respectively) Annual Report on Carcinogens in the US Department of Health and Human Services as reasonably anticipated to be a human carcinogens based on sufficient evidence of carcinogenicity in experimental animals [3]. A number of chlorobenzene compounds are also included in the Council Directive 76/464/EEC [4] on pollution caused by certain dangerous substances discharged into the aquatic environment of the Community, and under the Water Framework Directive 2000/60/EC [5]. In light of this, research is directed towards developing inexpensive, simple and efficient sample preparation and analytical techniques for the detection of trace quantities of these compounds in water samples.

In general, liquid-liquid extraction (LLE) [6,7] and solid-phase extraction (SPE) [8,9] are the most commonly used sample pretreatment methods for the isolation and/or enrichment of chlorobenzenes. An alternative preconcentration method for aqueous samples is solid-phase

microextraction (SPME), according which, analytes partition between the stationary phase on a SPME fibre and the sample until equilibrium is achieved [10]. In SPME, there are two main types of SPME sampling: immersion sampling where the fibre is immersed into the aqueous solution and headspace sampling where the fibre is exposed to the headspace above the liquid (or solid) sample [11]. Immersion sampling is widespread in the SPME approach but for volatile compounds and dirty samples the headspace mode is preferred as it results into faster equilibration times and higher selectivity. Regarding the analysis of chlorobenzenes in water samples the headspace sampling mode has been previously reported [12], although immersion SPME has been used for the determination of fibre-water distribution constants [13] and testing a recently proposed semi-empirical model [14].

An attractive alternative to traditional and recently introduced extraction techniques is solvent microextraction, which is based on the miniaturisation of the traditional liquid-liquid extraction method, by greatly reducing the solvent to aqueous ratio. Single-drop microextraction (SDME) evolved from this approach where the extractant phase is a drop of a water-immiscible solvent suspended in the aqueous sample [15]. In 2001, the possibility of using a hanging microlitre solvent drop (headspace SDME) to achieve preconcentration in headspace analysis of volatile organic compounds (VOC) in an aqueous matrix was reported for the first time [16,17]. There are very few reports dealing with this new preconcentration methodology, which represents an emerging field of study due to the inherent advantages of being fast, inexpensive, precise and virtually solventless [18-25].

The objective of the present work is to investigate for the first time, the possibility of using headspace SDME for the analysis of ten chlorobenzenes in water samples. The proposed method was optimized by controlling parameters such as extraction solvent, drop volume, headspace/aqueous sample volume, agitation speed, ionic strength and sampling time. The performance of the developed protocol was evaluated and compared to that of other extraction methods.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals and aqueous samples

The ten chlorobenzene compounds considered in this work were: 1,3-dichlorobenzene (1,3-DCB), 1,4-dichlorobenzene (1,4-DCB), 1,2-dichlorobenzene (1,2-DCB), 1,3,5-trichlorobenzene (1,3,5-TCB), 1,2,4-trichlorobenzene (1,2,4-TCB), 1,2,3-trichlorobenzene (1,2,3-TCB), 1,2,4,5-tetrachlorobenzene (1,2,4,5-TeCB), 1,2,3,4-tetrachlorobenzene (1,2,3,4-TeCB), pentachlorobenzene (PCB) and hexachlorobenzene (HCB) were obtained from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). A toluene solution of 1,4-dibromobenzene (1,4-DBB) (Riedel-de Haën, Seelze, Germany) was prepared and used as the internal standard solution. All organic solvents (namely toluene, *n*-hexane, *n*-heptane, methanol and acetonitrile) were of pesticide grade and were also obtained from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Deionised water was prepared on a water purification system (EASYpure®RF) supplied by Barnstead/Thermolyne Corporation (Dubuque, IO, USA).

Standard stock solutions of 500 mg/L of target compounds were prepared in acetonitrile/methanol (50/50, v/v). All solutions were stored in the dark at 4 °C. Working solutions were prepared by dilution of standard stock solutions with deionised water. Sodium chloride (Merck, Darmstadt, Germany) was used to adjust the ionic strength of the aqueous samples.

Recovery studies were carried out using tap water obtained from the main area water-supply network of Chania (Greece) and well water obtained from a well in the Monastery of Agia Triada, in the Kounoupidiana area, Chania. Preliminary analyses on tap water and well water samples under the full-scan and selective ion monitoring (SIM) mass spectrometry modes ensured that they were free of all target analytes. All samples were collected in 250 mL Pyrex borosilicate amber glass containers with caps, lined with aluminium foil. They were stored in the dark at 4 °C and were analysed without previous treatment or filtration within 48 h of collection. Before extraction, the ionic strength of the water samples was adjusted to the one required by the extraction method used.

## 2.2. Headspace SDME

Unless otherwise stated within the text, for headspace SDME, 10 mL of a salted (30% w/v NaCl) aqueous solution spiked at a known concentration with all target analytes, was placed in a 15 mL crimp top glass vial containing a glass coated stirring bar and fitted with a Mininert Valve (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Magnetic stirring (typically 1000 rpm i.e. 90% of the stirrer's maximum speed) was applied before (allowing thus equilibrium to be attained between the aqueous and gaseous phases) and during extraction. It should be mentioned here, that in order to eliminate volatilisation losses, all aqueous samples were freshly prepared before each headspace SDME extraction.

A 10  $\mu\text{L}$  Hamilton Gastight syringe (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Switzerland), Model 1701, with a bevel needle tip (length: 5.1 cm, I.D.: 0.013 cm, bevel 22°), typically containing 2.5  $\mu\text{L}$  of the appropriate organic solvent was clamped above the vial containing the water sample. For all quantification experiments, 2.5  $\mu\text{L}$  of toluene solution spiked with a 10 mg/L of the internal standard was used instead. The microsyringe was then lowered and its needle passed through the Mininert valve until the tip of the needle was 1 cm below the lower surface of valve. The plunger was depressed and the 2.5- $\mu\text{L}$  drop of the organic phase was exposed to the headspace above the sample. The analytes were then allowed to partition between the headspace and the organic phase at room temperature (22 °C; air-conditioned) for 5 min (unless otherwise stated within the text). After extraction, 1.2  $\mu\text{L}$  of solvent were retracted into the microsyringe and transferred to the heated injection port of the gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS) for analysis.

## 2.3. GC-MS analysis

All analyses were carried-out on a Shimadzu GC-17A, Version 3, QP-5050A Gas Chromatograph/Mass Spectrometer system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a 30 m  $\times$  0.25 mm 0.25  $\mu\text{m}$  HP-5MS capillary column (Agilent Technologies). The injector was maintained at 200 °C and operated in the splitless mode with the split closed for 5 min.

Helium (> 99.999% pure) was used as the carrier gas at a flow-rate of 1.2 mL/min. The column oven was initially set at 40 °C for 4 min, programmed to 130 °C at a 5 °C/min rate, and finally to 220 °C at 10 °C/min rate, where it was held for 2 min. The interface temperature was set at 240 °C and the detector voltage at 1.50 kV. A 10 min solvent cut time was allowed for all analyses. The ionization mode was electron impact (70 eV). A SIM program was constructed for GC-MS acquisition and quantification. Acquisition of data was divided in five ion sets (each one having specific ions for the compounds eluting at this time frame) with acquisition starting at 11.50 min for ion set 1, 15.00 min for ion set 2, 20.00 min for ion set 3, 25.00 min ion set 4 and finally 28.00 min for ion set 5. The base peak ion of each analyte was chosen as the quantifying ion and two other significant ions were selected as qualifying ions. Overall, quantification was based on the following target ions ( $m/z$ ) 1,3-DCB: 146, 1,4-DCB: 146, 1,2-DCB: 146, 1,3,5-TCB: 180, 1,2,4-TCB: 180, 1,4-DBB: 236 (internal standard), 1,2,3-TCB: 180, 1,2,4,5-TeCB: 216, 1,2,3,4-TeCB: 216, PCB: 250 and HCB: 284. Prior to quantification in the SIM mode, the full scan mode ( $m/z$  40-350) was used for identification of all target compounds based on their mass spectra and GC retention times.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Optimization of headspace SDME

The first step in the optimisation procedure was to select an appropriate extraction solvent. Accordingly, high-purity toluene, *n*-hexane and *n*-heptane were tested as potential acceptor phases. Solvent selectivity was evaluated after exposing for 5 min 3- $\mu$ L organic solvent drop to the headspace of a 15 mL glass vial containing 10 mL deionised water samples, stirred at 1000 rpm and spiked at 50  $\mu$ g/L with all target analytes. From the three tested solvents, *n*-hexane had the tendency to evaporate in faster rates once exposed to the air, most probably due to the fact that it had the higher vapour pressure (20131.7 Pa) when compared to the others. *n*-Heptane was found to be more resistant to evaporation due to its lower vapour pressure (6132.8 Pa) and resulted in enhanced extraction of target



analytes when compared to n-hexane. Overall, toluene gave the best results by combining the highest extraction efficiency as well as having the lowest vapour pressure (3786.4 Pa). Toluene has been successfully used in the past for the dynamic headspace liquid-phase microextraction of five chlorobenzene compounds (1,3,5-TCB, 1,2,3,4-TeCB, 1,2,4,5-TeCB, PCB and HCB) from soil samples, where the microsyringe barrel is used as a separatory funnel, featuring the repeated movement of the syringe plunger [25]. It should be mentioned here that although octanol is commonly employed in headspace SDME, the possibility of using this extraction solvent was not investigated given that its solvent peak was found to interfere with the target eluting analytes [25].

In a separate set of experiments, the effect of the organic drop volume was investigated. Accordingly, toluene drop volumes of 2, 2.5 and 3  $\mu\text{L}$  were exposed separately for 5 min at 22 °C (air-conditioned) to the headspace of 10 mL aqueous solution spiked at 50  $\mu\text{g/L}$  with all target analytes and stirred at 1000 rpm. As expected, increasing the organic drop volume from 2 to 2.5  $\mu\text{L}$ , resulted in an increase of the extraction efficiency. However, a further increase of the toluene drop from 2.5  $\mu\text{L}$  to 3  $\mu\text{L}$  decreased extraction and the resulting analytical signal was approximately the same as for the 2  $\mu\text{L}$  toluene drop. This is not the first time that such a trend in extraction is observed while investigating the effect of the organic drop volume [18,20]. For example, a recent report investigated headspace SDME analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in 6 mL water samples, after exposing for 12 min in the sample-headspace 1-butanol drop volumes up to 3.5  $\mu\text{L}$  [20]. The authors reported that increasing the drop volume up to 3  $\mu\text{L}$ , resulted in enhanced extraction efficiency. However, the 3.5  $\mu\text{L}$  1-butanol drop resulted in decreased response of the analytical instrument and the authors concluded that the unfavourable effect of larger organic drop volumes is attributed to insufficient equilibration time [18,20]. In general, diffusion coefficients in the gas phase are much larger than the corresponding diffusion coefficients in condensed phases and as such mass transfer in the headspace is assumed to be a fast process [16]. Furthermore, during headspace SDME, headspace convection is induced due to stirring of the aqueous phase. Nonetheless, the microdrop is expected to be stagnant and consequently mass transfer into the drop is by diffusion

alone, representing thus a slow step in the overall extraction procedure and explaining the extended equilibration times needed for larger organic solvent drops [16]. Based on these considerations, it was decided to use a 2.5  $\mu\text{L}$  toluene drop for all subsequent experiments.

In order to evaluate the effect of aqueous sample volume upon extraction, additional experiments were performed using 15 mL vials containing sample volumes ranging from 5 to 10 mL. For these experiments, the variation of the analytical response of the instrument was monitored after exposing 2.5- $\mu\text{L}$  toluene drops for 5 min at 22 °C (air-conditioned) to the headspace of 5, 7 and 10 mL aqueous solutions each one spiked at 50  $\mu\text{g/L}$  with all target analytes and stirred at 1000 rpm. As expected, increasing the aqueous sample volume resulted in a net increase of the analytical signal [15], given that the total amount of analytes present in the solution and accordingly, the amount of target pollutants transferred in the headspace is larger. Furthermore, the headspace volume is decreased, and as such a net increase of the total amount of analytes to be extracted is also expected. Thus, for all subsequent experiments a 10 mL aqueous sample volume (5 mL headspace volume) was used.

As stated previously, stirring the aqueous sample results in a degree of convection of the headspace. Increasing the speed of sample agitation is expected to enhance the rate of extraction of all target analytes, suggesting thus that the aqueous-phase mass transfer corresponds to a limiting step in extraction [16]. In a separate set of experiments the effect of sample agitation on extraction was investigated. For the purpose of these experiments a 2.5  $\mu\text{L}$  toluene drop was used each time to extract for 5 min, at 22 °C (air-conditioned), water samples containing 50  $\mu\text{g/L}$  of all target analytes and stirred at different agitation rates (namely: 0, 400, 700, 1000 and 1250 rpm). As expected, the results revealed that agitation dramatically enhanced extraction reaching a maximum at 1000 rpm. At 1250 rpm (maximum speed of the magnetic stirrer), the stability of the drop was affected and depending on the analyte the resulting analytical signal either decreased or remained the same (when compared to 1000 rpm) [24]. Based on these observations stirring of the sample at 1000 rpm was selected, optimising thus the extraction efficiency for all target analytes.

Headspace SDME is an equilibrium rather than an exhaustive extraction technique [24]. In this context, a series of spiked-water samples were prepared and the variation of the analytical signal for each analyte was studied as a function of exposure time. For the purpose of the present experiments a 2.5  $\mu\text{L}$  of toluene drop was exposed for 1 to 7 min to the headspace of 10 mL aqueous sample containing 50  $\mu\text{g/L}$  of each target analyte and stirred at 1000 rpm. Longer extraction times were avoided as they typically resulted in significant solvent evaporation. On the basis of the curves obtained (Fig. 1) the only analytes which appear to reach equilibrium after sampling the headspace for 5 min are PCB and HCB. Nonetheless, for quantitative headspace SDME analysis, it is not necessary for the analytes to have reached equilibrium, only to allow sufficient mass transfer into the organic drop and exact reproducible extraction time [17,23]. To avoid incidents of drop evaporation, due to increased exposure times, a 5 min sampling period was selected for all subsequent analyses.

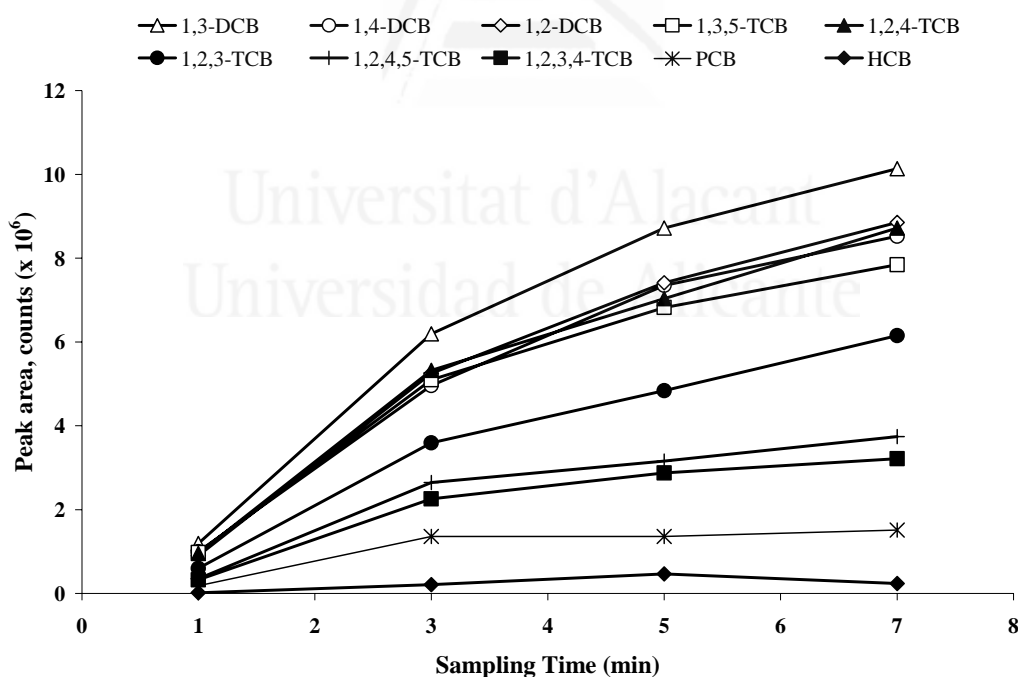


Fig. 1. Effect of sampling time on the extraction efficiency of headspace SDME used for the analysis of chlorobenzenes in water samples. Other experimental conditions: 50  $\mu\text{g/L}$  concentration level; 10 mL aqueous sample in 15 mL glass vial; 2.5  $\mu\text{L}$  toluene drop volume; 1000 rpm stirring rate.

In order to examine the effect of ionic strength of the sample matrix on extraction (salting-out effect) [23,24,26], a series of experiments were carried out with the aqueous samples containing each time different amounts of NaCl. For the purpose of these experiments, 10 mL aqueous solutions spiked at 50 µg/L with all target analytes and having a salt content ranging from 0 to 30% w/v NaCl were extracted using 2.5-µL toluene drops for 5 min. The results are depicted in Fig. 2, where the ratio of peak areas at various salt concentrations ( $A_i$ ) to the peak area without salt ( $A_0$ ) is given as a function of the ionic strength of the aqueous solution, demonstrating thus the positive effect of salt on extraction. On the whole, the presence of salt greatly enhanced extraction for all target analytes, reaching a maximum at 30% w/v NaCl salt content. Based on these observations, it was decided to maintain the salt content at 30% w/v NaCl for all subsequent experiments.

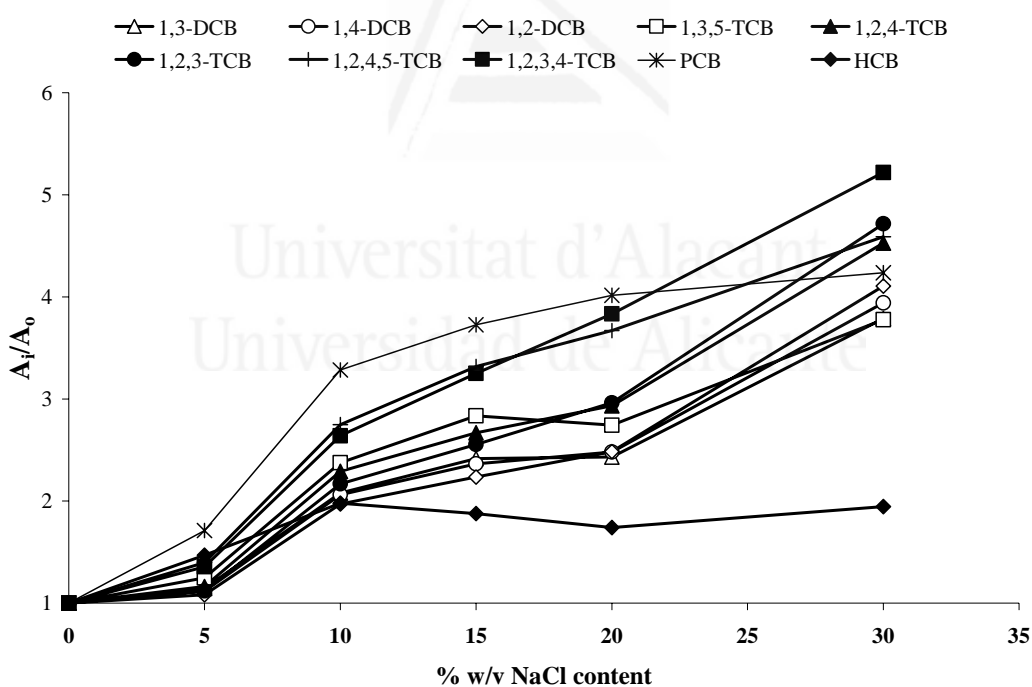


Fig. 2. Effect of ionic strength on the extraction efficiency of headspace SDME used for the analysis of chlorobenzenes in water samples. The ratio of peak areas at various salt concentrations to the peak area without salt ( $A_i/A_0$ ) is given as a function of the ionic strength of the aqueous solution. Other experimental conditions: 50 µg/L concentration level; 10 mL aqueous sample in 15 mL glass vial; 2.5 µL toluene drop volume; 1000 rpm stirring rate; 5 min sampling time.

Overall, the optimised extraction conditions found in the present studies were: a 2.5  $\mu\text{L}$  toluene microdrop was exposed for 5 min to the headspace of a 10 mL aqueous sample containing 30% w/v NaCl placed in a 15 mL vial and stirred at 1000 rpm. Under these optimum experimental conditions the enrichment factor defined as the ratio between the final analyte concentration in the organic acceptor phase and the initial analyte concentration within the sample was evaluated and was found to range between 157 and 92 for most target analytes except for PCB and HCB that were found to be 31 and 17 respectively.

### 3.2. Evaluation of headspace SDME performance

The performance of the proposed method was evaluated by extracting for 5 min the headspace of 10 mL aqueous solutions containing 30% NaCl (w/v) stirred at 1000 rpm and spiked with all target analytes using five concentration levels ranging from 0.02 to 50  $\mu\text{g/L}$ . It should be mentioned here, that for all quantification experiments, the organic solvent acceptor phase consisted of a toluene solution of the internal standard. The calculated calibration curves gave a high level of linearity for all target analytes with correlation coefficients ( $r^2$ ) ranging between 0.9901 and 0.9971, except for HCB where the correlation coefficient was found to be 0.9886 (Table 1). Furthermore, the repeatability of the proposed method, expressed as relative standard deviation (RSD), was evaluated by extracting five consecutive aqueous samples spiked at 1  $\mu\text{g/L}$  with each target analyte and was found to vary between 2.1 and 13.2% with a mean value of 6.7% (Table 1).

The limits of detection (LODs) for all target analytes (Table 1) were determined according to published guidelines at a signal-to-noise ratio ( $S/N$ ) of three [27]. They were found to be in the low  $\mu\text{g/L}$  level ranging between 0.003 to 0.031  $\mu\text{g/L}$ .

Table 1 also provides the reported LODs values found in the literature for the analysis of chlorobenzenes in water samples when using EPA Method 8121 (GC coupled to an Electron Capture Detector - ECD) [28] and those obtained when applying SPE coupled to GC-MS-SIM [8] and headspace SPME coupled to GC-MS-SIM [12]. As can be seen the LODs obtained with

headspace SDME are superior to those obtained with EPA Method 8121 (except for HCB) as well as with the SPE-based method. Comparison of the present optimised method with headspace SPME shows that the two methods have comparable LODs for most target analytes, with the exception of PCB and HCB. Nonetheless, headspace SDME is a much faster extraction method given that these LOD values were obtained after sampling the water samples for only 5 min instead of 30 min used in the case of headspace SPME. Furthermore, contrary to SPME, the present method requires no dedicated and expensive instrumentation minimising thus the costs of analysis per sample.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

Table 1

Main method parameters for the extraction of chlorobenzenes from water samples using the optimized headspace SDME method; Limits of detection (LODs) when using SPME and SPE technique and the ones reported in EPA method 8121

Analyte	Correlation Coefficient ( $r^2$ ) <sup>a</sup>	RSD (n=5) (%) <sup>b</sup>	LODs Headspace SDME ( $\mu\text{g/L}$ ) <sup>c</sup>	LODs EPA 8121 ( $\mu\text{g/L}$ ) <sup>d</sup>	LODs SPE ( $\mu\text{g/L}$ ) <sup>e</sup>	LODs Headspace SPME ( $\mu\text{g/L}$ ) <sup>f</sup>
1,3-DCB	0.9933	2.2	0.003	0.250	0.010	0.006
1,4-DCB	0.9929	2.1	0.006	0.890	NA <sup>g</sup>	0.006
1,2-DCB	0.9931	4.8	0.006	0.270	0.012	0.006
1,3,5-TCB	0.9942	6.7	0.004	0.012	0.019	0.004
1,2,4-TCB	0.9912	6.1	0.006	0.130	0.031	0.004
1,2,3-TCB	0.9938	7.1	0.006	0.039	0.013	0.004
1,2,4,5-TeCB	0.9971	7.5	0.003	0.010	0.020	0.003
1,2,3,4-TeCB	0.9964	4.8	0.003	0.010	0.028	0.003
PCB	0.9901	13.2	0.016	0.038	0.028	0.004
HCB	0.9886	12.9	0.031	0.006	0.045	0.006

<sup>a</sup> Linear range 0.02-50  $\mu\text{g/L}$  (number of calibration points=5).

<sup>b</sup> Relative standard deviation (RSD); mean value for five replicate analyses; spiking level 1  $\mu\text{g/L}$ .

<sup>c</sup> Limits of detection (LODs) were calculated for a three signal to noise ratio ( $S/N = 3$ ).

<sup>d</sup> Data taken from reference [28]; EPA 8121 (GC-ECD).

<sup>e</sup> Data taken from reference [8]; C18 cartridges, 200 mL water samples GC-MS-SIM analysis.

<sup>f</sup> Data taken from reference [12]; (PDMS 100  $\mu\text{m}$  SPME fibre, 30 min headspace SPME sampling of 5 mL samples containing 20% (w/v) NaCl, at room temperature stirred at 1500 rpm, GC-MS-SIM analysis).

<sup>g</sup> Not available.

During the present investigations, matrix effects upon extraction were also evaluated by investigating the applicability of the proposed method to determine chlorobenzene contamination in natural water samples. Although less applicable when performing headspace analysis of volatile compounds, it is possible that the developed headspace SDME method as an equilibrium technique, may undergo competitive adsorption to suspended solids present in the aqueous matrix, reducing thus the quantity of analyte transferred into the headspace and as a result into the organic acceptor phase. Analyte losses to suspended solids may be more difficult to control [29], and there is always the need to determine their extent. In this context, two separate sets of experiments were performed by extracting in five replicate runs and under the optimised experimental conditions all target analytes from tap and well water samples spiked at 1 µg/L with each chlorobenzene compound. It should be mentioned here, that all samples were initially analysed (under the full-scan and MS-SIM conditions) and were found to be free of all target compounds. For each set of experiments the relative recoveries, determined as the ratio of the concentrations found in environmental and deionised water samples, spiked at the same contamination level, were evaluated [26]. The results summarised in Table 2, show that for the tap water samples relative recoveries ranged between 84 and 99% with a mean value of 94%, and for the well water samples between 82 and 107% with a mean value of 97%. As can be seen, matrix had little effect on the developed headspace SDME method. Relative standard deviation values were ranged between 6.0-20% and 4.0-14%, for tap and well water samples respectively.



Table 2

Mean relative recoveries and RSD values of the ten chlorobenzene compounds in natural water samples

Analyte	Relative recoveries (%) and RSD values (%) in parentheses <sup>a,b</sup>	
	Tap water	Well water
1,3-DCB	96 (4.3)	102 (6.6)
1,4-DCB	84 (10.1)	98 (7.4)
1,2-DCB	94 (6.1)	104 (7.0)
1,3,5-TCB	92 (11.8)	98 (6.5)
1,2,4-TCB	93 (8.0)	107 (11.0)
1,2,3-TCB	91 (9.5)	100 (4.8)
1,2,4,5-TeCB	96 (10.7)	91 (5.4)
1,2,3,4-TeCB	92 (10.1)	88 (4.4)
PCB	99 (11.7)	87 (10.1)
HCB	98 (19.7)	82 (14.0)

<sup>a</sup> Spiking level: 1 µg/L.

<sup>b</sup> Mean of five replicate analyses.

#### 4. Conclusions

A new analytical method comprising headspace SDME coupled with GC-MS has been developed, quantifying trace levels of chlorobenzenes in water samples. Sample preparation time as well as consumption of toxic organic solvents were minimised without affecting the sensitivity of the method. This easy to use and cost-effective method represents an attractive alternative to traditional and recently introduced methods as well as an emerging field of research.

#### Acknowledgements

The authors would like to thank the Spanish Ministry of Education and Science (project n. DPI2002-04305-C02-01) for the financial support of this work. L.V. also thanks COST (European Science Foundation, EU) for her grant.

## References

- [1] M.N. Sarrion, F.J. Santos, M.T. Galceran, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14 (2000) 2271.
- [2] M. MacLeod, D. Mackay, *Chemosphere*, 38 (1999) 1777.
- [3] World Health Organisation (WHO), 10<sup>th</sup> Report on Carcinogens, National Toxicology Program, Public Health Service, 2002.
- [4] EC (European Community) Council Directive 76/464/EEC on pollution caused by certain dangerous substances discharged into the aquatic environment of the Community. *Official Journal L* 129, 18 May 1976.
- [5] EC (European Community), 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Official Journal L* 327, 22 December 2000.
- [6] B.G. Oliver, K.D. Bothen, *Anal. Chem.* 52 (1980) 2066.
- [7] R.G. Melcher, P.L. Morabito, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2183.
- [8] Y. Wang, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A* 803 (1998) 219.
- [9] R. Barro, S. Ares, C. Garcia-Jares, M. Llompert, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1045 (2004) 189.
- [10] C. L. Arthur, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145.
- [11] R. Eisert, J. Pawliszyn, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 27 (1997) 103.
- [12] Y. He, Y. Wang, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A* 874 (2000) 149.
- [13] A. Paschke, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 999 (2003) 35.
- [14] A. Paschke, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1025 (2004) 11.
- [15] E. Psillakis, N. Kalogerakis, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 53.
- [16] A.L. Theis, A.J. Waldack, S.M. Hansen, M.A. Jeannot, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5651.
- [17] A. Tankeviciute, R. Kazlauskas, V. Vickackaite, *Analyst* 126 (2001) 1674.
- [18] A. Przyjazny, J.M. Kokosa, *J. Chromatogr. A* 977 (2002) 143.
- [19] A. Przyjazny, J.M. Kokosa, *J. Chromatogr. A* 983 (2003) 205.
- [20] S. Shariati-Feizabadi, Y. Yamini, N. Bahramifar, *Anal. Chim. Acta* 489 (2003) 21.
- [21] D.C. Wood, J.M. Miller, I. Christ, *LC GC N. Am.* 22 (2004) 516.

- [22] N. Bahramifar, Y. Yamini, S. Shariati-Feizabadi, M. Shamsipur, J. Chromatogr. A 1042 (2004) 211.
- [23] Y. Yamini, M. Hojjati, M. Haji-Hosseini, M. Shamsipur, Talanta 62 (2004) 265.
- [24] R-S. Zhao, W-J. Lao, X-B Xu, Talanta 62 (2004) 751.
- [25] G. Shen, H.K. Lee, Anal. Chem. 75 (2003) 98.
- [26] E. Psillakis, N. Kalogerakis, J. Chromatogr. A 907 (2001) 211.
- [27] L.H. Keith, W. Crummett, J. Deegan, R.A. Libby, J.K. Taylor, G. Wentler, Anal. Chem. 55 (1983) 2210.
- [28] EPA Method 8121, SW-846, Chlorinated Hydrocarbons by Gas Chromatography: Capillary Column Technique, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, D.C., 1994.
- [29] J.J. Langenfeld, S.B. Hawthorne, D.J. Miller, Anal. Chem. 68, (1996) 144.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **Capítulo 2. Líquidos iónicos como fase extractante**

---



En este capítulo se presenta el uso de diferentes líquidos iónicos como fase extractante. El objetivo era superar una serie de limitaciones mostradas por los disolventes orgánicos, concretamente por el tolueno, el cual ha sido utilizado en el capítulo previo.

El principal problema que presentan los disolventes orgánicos para ser utilizados como fase extractante en SDME es su elevada volatilidad, fundamentalmente si se trabaja en la modalidad headspace, así como su toxicidad para los humanos y el medio ambiente. Por ello, se planteó el uso de los líquidos iónicos (ILs) como fase extractante debido a todas las características positivas que presentan para ser utilizados como fase extractante. Como se ha descrito en el apartado II.4., los ILs poseen una elevada viscosidad y una baja volatilidad, lo que permite trabajar con mayores volúmenes de gota con una mayor estabilidad y no tener pérdidas por evaporación, lo que permite utilizar mayores tiempos de extracción. Justamente estas eran las limitaciones que presentaba el tolueno, el cual no permitía utilizar volúmenes de gota superiores a 3  $\mu\text{L}$  ni tiempos de extracción superiores a 5 minutos. Una de las características que ha hecho más famosos a los ILs ha sido su carácter benigno con el medio ambiente y con los humanos, desplazando así a los disolvente orgánicos. Sin embargo, tal y como ha sido comentado previamente en el apartado II.4., estudios recientes han puesto en duda su carácter ecológico y respetuoso con el medioambiente.

El trabajo experimental que se presenta en este capítulo se puede dividir en dos partes:

- ✓ La primera de ellas engloba la determinación de ocho clorobencenos en muestras de aguas mediante su extracción en modo HS-SDME y su posterior separación y detección por cromatografía líquida (LC) acoplada a un detector de fotodiodos en línea (PDA).
- ✓ En la segunda de ellas se realiza la monitorización de excreción urinaria en humanos de la BZ3, el filtro UV más utilizado en productos cosméticos. La decisión de determinar filtros UV se debe a que actualmente son ampliamente utilizados en todo tipo

de productos cosméticos para protegernos de la radiación ultravioleta A y B y, además, recientemente se han publicado estudios que indican los posibles efectos estrogénicos y antiandrogénicos que pueden presentar al penetrar en el cuerpo humano a través de la piel. Este estudio está basado en la determinación del filtro BZ3 en orina de voluntarios excretada antes y después de la aplicación de un producto cosmético, en este caso una crema de protección solar. Para ello se utilizó la técnica de SDME, en su modalidad de inmersión directa, para realizar la extracción seguida de su posterior separación y detección mediante LC-PDA.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Analytica Chimica Acta 584 (2007) 189-195

## An ionic liquid as a solvent for headspace single drop microextraction of chlorobenzenes from water samples

Lorena Vidal<sup>a</sup>, Eleftheria Psillakis<sup>b</sup>, Claudia E. Domini<sup>a</sup>, Nuria Grané<sup>a</sup>, Frank Marken<sup>c</sup>, Antonio Canals<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Universidad de Alicante, P.O. Box 99, E-03080, Alicante, Spain*

<sup>b</sup> *Department of Environmental Engineering, Technical University of Crete, Polytechnioupolis, GR-73100 Chania, Crete, Greece*

<sup>c</sup> *Department of Chemistry, University of Bath, Bath BA2 7AY, UK*

Received 11 September 2006; received in revised form 25 October 2006; accepted 31 October 2006

### Abstract

A headspace single-drop microextraction (HS-SDME) procedure using room temperature ionic liquid and coupled to high-performance liquid chromatography capable of quantifying trace amounts of chlorobenzenes in environmental water samples is proposed. A Plackett–Burman design for screening was carried out in order to determine the significant experimental conditions affecting the HS-SDME process (namely drop volume, aqueous sample volume, stirring speed, ionic strength, extraction time and temperature), and then a central composite design was used to optimize the significant conditions. The optimum experimental conditions found from this statistical evaluation were: a 5  $\mu\text{L}$  microdrop of 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, exposed for 37 min to the headspace of a 10mL aqueous sample placed in a 15mL vial, stirred at 1580 rpm at room temperature and containing 30% (w/v) NaCl. The calculated



calibration curves gave a high level of linearity for all target analytes with correlation coefficients ranging between 0.9981 and 0.9997. The repeatability of the proposed method, expressed as relative standard deviation, varied between 1.6 and 5.1% (n=5). The limits of detection ranged between 0.102 and 0.203  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Matrix effects upon extraction were evaluated by analysing spiked tap and river water as well as effluent water samples originating from a municipal wastewater treatment plant.

*Keywords: Chlorinated benzenes; Headspace single-drop microextraction (HS-SDME); Solvent microextraction; Ionic liquid; Water analysis; High-performance liquid chromatography (HPLC)*

---

## 1. Introduction

Recently there is a strong move toward the miniaturization of chemical analysis systems since they have several distinct advantages (e.g., faster analysis, smaller sample volume and portability). In addition, an environmentally friendly feature of the miniaturized analysis systems is that the consumption of reagents is reduced. Miniaturization has reached most steps in quantitative analysis, and among them, sample preparation. Single-drop microextraction (SDME) is a miniaturization of the traditional liquid-liquid extraction (LLE) technique, whereby a microlitre drop of a water immiscible solvent is exposed to the sample solution achieving thus preconcentration of the target pollutants in a simple and fast step [1]. However, evaporation of the extracting solvent drop is an important drawback that deteriorates the method figures of merit.

Room temperature ionic liquids (ILs) are a group of new organic salts consisting of a combination of organic cations and various anions that are liquids at room temperature. Important features of ILs include their immeasurably low vapour pressure, high stability, large viscosity, moderate dissolvability of organic compounds as well as adjustable miscibility and polarity [2-5]. Recently the possibility of using ILs as the acceptor phase for SDME has been reported [6]. A 10  $\mu\text{L}$  droplet of IL was immersed into the sample solution and recoveries ranging between 90-113% were obtained for two major alkylphenols (4-nonylphenol and 4-*tert*-octylphenol) in an

aquatic environment. The main advantages of ILs when used for SDME are that they allow the application of longer sampling times as well as the use of larger drop volumes, thus leading to the development of high-performance liquid chromatography (HPLC) protocols with increased sensitivity.

Chlorobenzenes are listed priority hazardous substances [7-9] constituting a serious environmental concern given that biological accumulation can be expected to occur once they enter the aquatic ecosystem [10]. Despite their acute toxicity they are widely used as raw materials and intermediates in the manufacture of pesticides and chlorinated phenols, and as process solvents and as such they may enter the aquatic environment through solid and liquid effluents as well as atmospheric discharges [11].

In general, trace determination of chlorobenzenes in water is usually performed by gas chromatography coupled with a sample pre-treatment step such as the traditionally used liquid-liquid extraction (LLE) [12,13], or even the more recently introduced solid-phase extraction [14,15] and solid-phase microextraction techniques [16]. We have recently reported the applicability of headspace single-drop microextraction for the extraction of chlorobenzenes in aqueous samples [17]. The developed method proved to be an excellent preconcentration tool and according to the results, exposing a microlitre organic solvent drop to the headspace of an aqueous sample contaminated with 10 chlorobenzene compounds prior to gas chromatography-mass spectrometry, yielded detection as well as quantification of the target pollutants in the  $\mu\text{g L}^{-1}$  concentration level. However, the liquid organic drop evaporates decreasing the droplet size that deteriorates precision and sensitivity. The latter figure of merit is reduced due to the shortening on sampling times.

Advantageous properties of ILs are especially attractive for efficient SDME. The use of an ionic liquid as the acceptor/extractant phase afforded more reproducible extraction conditions, the application of longer extraction times as well as the use of a larger drop volume. 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate  $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]$  is one of the ILs most commonly used in microextraction [18,19]. Therefore, the possibility of using  $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]$  for the determination of chlorobenzenes in

environmental water samples using headspace SDME coupled to HPLC is evaluated.

In general, the traditional methods of optimization evaluate the effect of one variable at-a-time, keeping all the others variables constant during experiments with the exception of the one being evaluated. This type of experiment does not allow to determine interaction between variables nor the statistical significance of the variables. However, experimental design, a multivariate optimization strategy, enables estimating simultaneously the effects of several variables alleviating the limitations described above. As a result fewer measurements than the classical one-at-a-time experiment are required yielding however, the same precision.

The main objective of this study was to evaluate the possibility of using an IL during the headspace SDME of chlorobenzenes from water samples. For the purpose of these studies 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] was used as the extractant IL phase. Variables, such as, drop volume, aqueous sample volume, stirring speed, ionic strength, extraction time and temperature were optimized by a multivariate strategy based on an experimental design using a Plackett-Burman design for screening and a central composite design for optimizing the significant parameters and the optimized procedure was applied to determine chlorobenzenes in aqueous samples.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals and solutions

1,2-dichlorobenzene (1,2-DCB), 1,4-dichlorobenzene (1,4-DCB), 1,3-dichlorobenzene (1,3-DCB), 1,2,3-trichlorobenzene (1,2,3-TCB), 1,2,4-trichlorobenzene (1,2,4-TCB), 1,3,5-trichlorobenzene (1,3,5-TCB), 1,2,3,4-tetrachlorobenzene (1,2,3,4-TeCB) and 1,2,4,5-tetrachlorobenzene (1,2,4,5-TeCB) were obtained from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). The internal standard solution consisted of a methanol solution of 1,4-dibromobenzene (1,4-DBB) (Riedel-de Haën, Seelze, Germany). Methanol and acetonitrile were HPLC-grade and were obtained from Scharlau Chemie

(Barcelona, Spain). Deionised water was prepared on a water purification system (Milli-Q Biocel A10) supplied by Millipore (Billerica, MA, USA).

Synthesis-grade ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>], was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium chloride (Merck, Darmstadt, Germany) was used to adjust the ionic strength of the aqueous samples. Stock standard solutions of 1000 mg L<sup>-1</sup> of target compounds were prepared in methanol. Working solutions were prepared by dilution of standard stock solutions. All solutions were stored in the dark at 4°C.

## 2.2. Environmental water samples

Tap water from the main area water-supply network of San Vicente del Raspeig (Alicante, Spain), river water from the Ebro river (Spain) and effluent water (Bilbao, Spain) from a municipal wastewater treatment plant were used for the recovery studies. Samples were collected in 250 mL Pyrex borosilicate amber glass containers with caps, lined with aluminium foil, stored in the dark at 4°C and were analysed without previous treatment or filtration within 48 h of collection. Initial analysis confirmed that they were free of all target analytes.

## 2.3. Headspace SDME

The general headspace SDME procedure followed in the present studies was according to our previous guidelines [17]. In short and unless otherwise stated within the text, 10 mL of a freshly prepared aqueous solution, spiked at a known concentration with all target analytes and containing 30% w/v NaCl, was placed in a 15 mL crimp top glass vial. A home-made glass coated stirring bar was added and a Mininert valve (Supelco, Bellefonte, PA, USA) was fitted to the vial. Magnetic stirring at the stirrer's maximum speed (1580 rpm) was then applied. For all quantification experiments, aqueous samples were also spiked with a known amount of the internal standard solution.

A 3 mm long polytetrafluoroethylene (PTFE) tube (i.d.: 0.8-mm; o.d.: 1.6-mm) was fitted to the blunt needle tip of a 25 µL Hamilton Gastight

syringe (Model 1702 Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Switzerland; length: 5.1 cm, i.d.: 0.015 cm), maximising thus the contact area between the drop and the needle tip. The microsyringe, typically contained 5  $\mu\text{L}$  of the ionic liquid acceptor phase, was clamped above the vial and its needle passed through the Mininert valve until its tip was 1 cm below the lower surface of valve. The plunger was depressed and a microdrop of the ionic liquid phase was exposed to the headspace above the sample at room temperature typically for 37 min. After extraction, the microdrop was retracted into the microsyringe, the PTFE tube was removed and the acceptor phase was injected into the HPLC system for analysis.

#### *2.4. HPLC determination*

The HPLC equipment included a Waters 600E System Controller and a Waters 996 Photodiode Array Detector (PDA) set at 210 nm (Milford, MA, USA). A personal computer equipped with a Milenium32 Waters program for LC systems was used to process all chromatographic data. A 7725i Rheodyne injector (Rohnert Park, CA, USA) and a Phenomenex Luna C<sub>18</sub> column (250 mm x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$  particle size) were used respectively for injection and separation of the target analytes. The mobile phase was a 65:35 (v/v) mixture of acetonitrile-water and the flowrate was set at 1 mL  $\text{min}^{-1}$ . Fig. 1 shows a typical chromatogram.

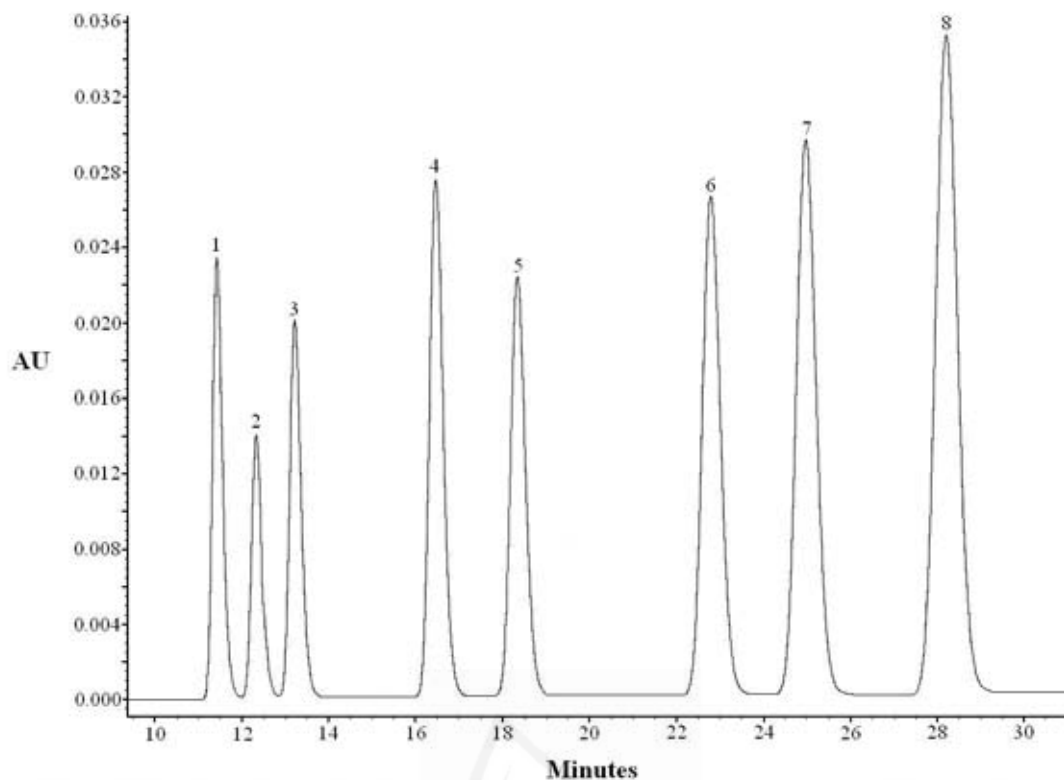


Fig. 1. Typical chromatogram of chlorobenzenes studied. (1) 1,2-DCB; (2) 1,4-DCB; (3) 1,3-DCB; (4) 1,2,3-TCB; (5) 1,2,4-TCB; (6) 1,3,5-TCB; (7) 1,2,3,4-TeCB; and (8) 1,2,4,5-TeCB.  $\lambda = 210$  nm. IL elutes firstly showing a broad peak (mean retention time = 3.0 min).

### 2.5. Data processing

Statgraphics Statistical Computer Package "Statgraphics Plus 5.1" was used to construct experimental design matrices and evaluate the results.

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Screening design

Screening is the first step in the efficient assessment of the factors involved in the studied analytical system. If a large number of factors are involved, reduced factorial designs are employed. A particular type of those designs is the Plackett-Burman design [20,21], which assumes that the interactions can be completely ignored and so the main effects are

calculated with a reduced number of experiments. In this work, six variables were selected to define the experimental field with two levels for each factor. The variables considered in the present studies were ionic strength, drop volume, aqueous sample volume, extraction time, stirring speed, and extraction temperature and the examined levels are given in Table 1.

Table 1  
Experimental variables and levels of the Plackett-Burman design

Variable	Level	
	Low	High
Ionic strength (NaCl concentration; %, w/v)	0	30
Drop volume ( $\mu\text{L}$ )	5	10
Sample volume (mL)	5	10
Extraction time (min)	10	30
Stirring speed (rpm)	0	1580
Extraction temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	25	55

A Plackett-Burman design was applied to evaluate the main effects. The overall design matrix shows 12 runs randomly carried out trying to nullify the effect of extraneous or nuisance variables. The data obtained were evaluated by ANOVA test and the results were visualized by using main effects Pareto charts shown in Fig. 2. The charts for 1,3-DCB and 1,4-DCB, 1,3,5-TCB and 1,2,3-TCB, and 1,2,3,4-TeCB are not shown since they are similar to 1,2-DCB, 1,2,4-TCB and 1,2,4,5-TeCB, respectively. In Fig. 2 the bar lengths are proportional to the absolute value of the estimated main effect and a vertical reference line corresponding to the 95% confidence interval is included for each Pareto chart. An effect which exceeds this vertical reference line may be considered significant with regard to the response. Furthermore, the positive or negative sign (corresponding to a black or white bar filling) reveals the cases when the instrument's response can be enhanced or reduced, respectively, when passing from the lowest to the highest level set for the specific factor.

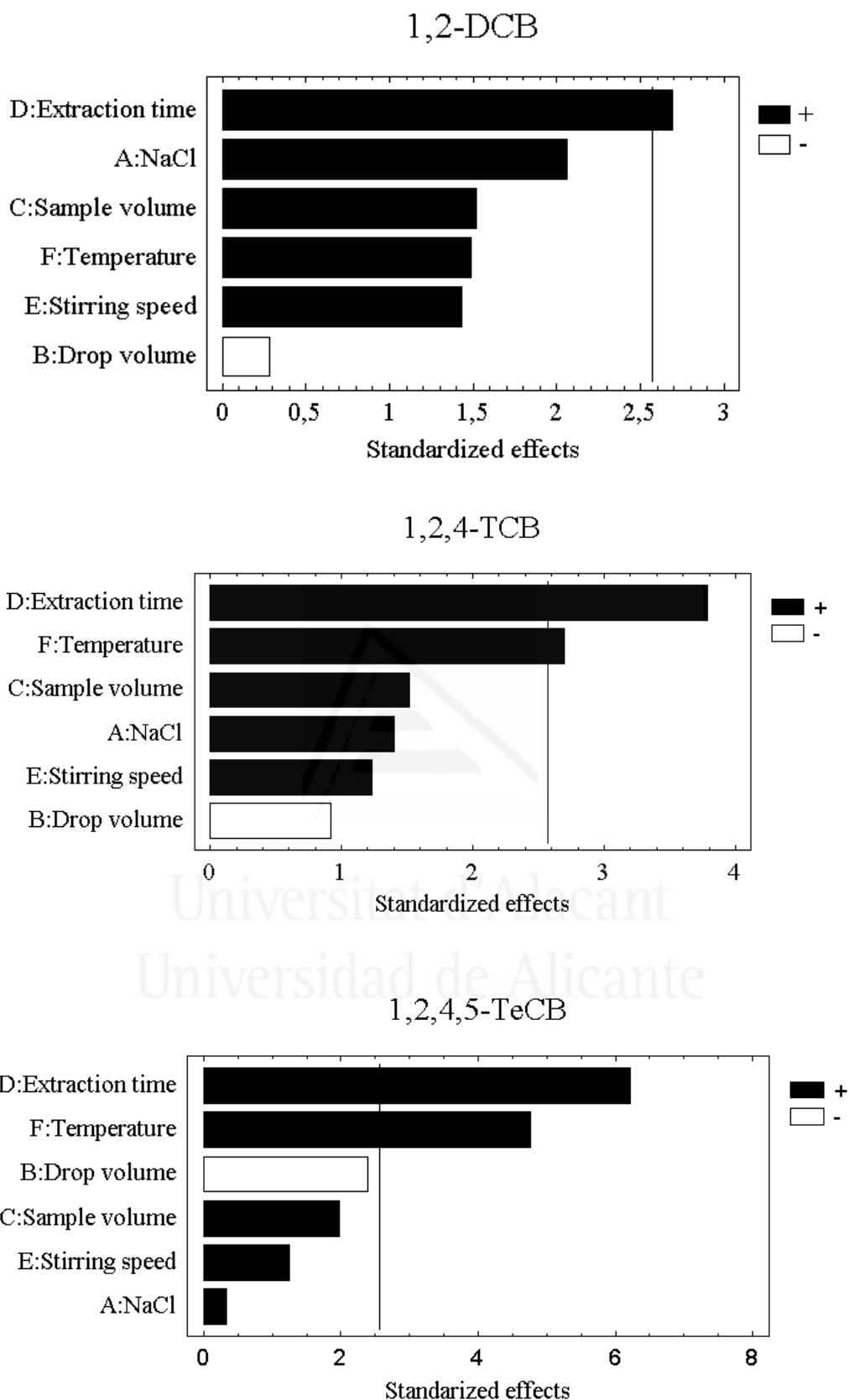


Fig. 2. Pareto charts of the main effects obtained from Plackett-Burman design for 1,2-dichlorobenzene, 1,2,4-trichlorobenzene, and 1,2,4,5-tetrachlorobenzene.



According to Fig. 2, in this study, the extraction time is the most significant variable having a positive sign for all target analytes. Extraction temperature is the next most significant variable for five, the more chlorinated and relatively less volatile chlorobenzene compounds, of the eight analytes, showing a positive effect for all the analytes studied. Sodium chloride concentration does not appear as a significant variable in the Pareto chart but it was chosen as the next most significant variable because of the results given by the normal probabilistic plots (not included) for some of the analytes and according to previous experiments of the same type which proved the influence of this variable on the extraction efficiency [22]. Sodium chloride showed a positive effect upon extraction and the effect appears to be more pronounced in the case of the less chlorinated organic contaminants.

Fig. 2 also reveals that sample volume appeared to have a positive yet non-significant effect upon extraction. In general, increasing the aqueous sample volume results in an increase of the total amount of target pollutants transferred in the headspace, enhancing thus preconcentration. A similar conclusion can be made in the case of the effect of stirring speed upon extraction. Increasing the speed of sample stirring is expected to enhance the rate of extraction of all target analytes, and this is a positive yet non-significant effect as shown in the Pareto charts of Fig. 2.

Drop volume shows the only negative, yet, non-significant effect (Fig. 2). This negative effect is in agreement with previously published results [23,24] and is attributed to the fact that larger organic solvent drops require extended equilibration times given that mass transfer into the drop is by diffusion alone, representing thus a slow step in the overall extraction procedure [25].

Overall, the results of this first screening study revealed that three variables could be fixed (namely ionic liquid drop volume: 5  $\mu$ L; volume of sample: 10 mL; and stirring speed: 1580 rpm) for the following optimization step.

### 3.2. Optimization design

The second step concerned the improvement of the analytical system's output, as a function of several experimental factors. Many designs for modelling are based on the central composite design (CCD, sometimes called a response surface design), which is constructed by several superimposed designs and consists of a factorial design ( $2^k$ ) augmented with ( $2k$ ) star points, and with central points ( $n$ ) [20,26]. The star points were located at  $+\alpha$  and  $-\alpha$  from the centre of the experimental domain. An axial distance  $\alpha$  was selected with a value of 1.682 in order to establish the rotatability condition of the central composite design. It is assumed that the central point for each factor is 0, and the design is symmetric around this. The runs at the centre of the experimental field were performed nine times. Therefore, the overall matrix of CCD design involved 23 experiments. This design was used to optimize and evaluate main effects, interaction effects, and quadratic effects. A 3-factor, 3-level design used is suitable for exploring quadratic response surfaces and constructing second-order polynomial models. The nonlinear computer-generated quadratic model is given as:

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2$$

where  $x_1$ ,  $x_2$  and  $x_3$  are the independent variables,  $\beta_0$  is an intercept,  $\beta_1$ - $\beta_{33}$  are the regression coefficients and  $y$  is the response function (in our case, sum of the peak areas of all the target analytes obtained by HPLC). In light of this, the next step consisted of finding the optimum conditions of the three variables. In this study, the three variables considered were: sodium chloride concentration (ionic strength), extraction time and extraction temperature. The lower, central, and upper levels of these variables as well as the location of their star points are given in Table 2.

Table 2

Experimental variables, levels and star points of the central composite design (CCD)

Variable	Level			Star Points ( $\alpha = 1.682$ )	
	Lower	Central	Upper	$-\alpha$	$+\alpha$
Ionic strength (NaCl concentration; %, w/v)	8	16	25	2	30
Extraction time (min)	10	20	30	3	37
Extraction temperature (°C)	25	37	50	17	70

It should be mentioned here that the overall optimum conditions were the same based on each individual analyte peak area, with all the other analytes in the matrix, and based on a response function sum of all the peak areas of target analytes. This is in accordance with several previous reports dealing with the optimization design of the solid-phase microextraction (SPME) conditions [27-29]. Accordingly, the response used in the present work was based on the sum of the peak areas (total area) of the HPLC-PDA analysis after extracting the target compounds with headspace SDME under the conditions of the central composite design.

The data obtained were evaluated by ANOVA test and the effects were visualized by using Pareto chart shown in Fig. 3. As can be seen, extraction time and sodium chloride concentration were the most important variables, both showing a positive effect. Interestingly, temperature was found to have a non-significant positive effect. Furthermore, examination of the effect (interaction) of one variable to another and quadratic effects also given in Fig. 3, revealed that the interaction between temperature and sodium chloride concentration (denoted as AC) and the quadratic effect of temperature (CC) [20] were statistically significant, exhibiting a negative effect upon extraction.

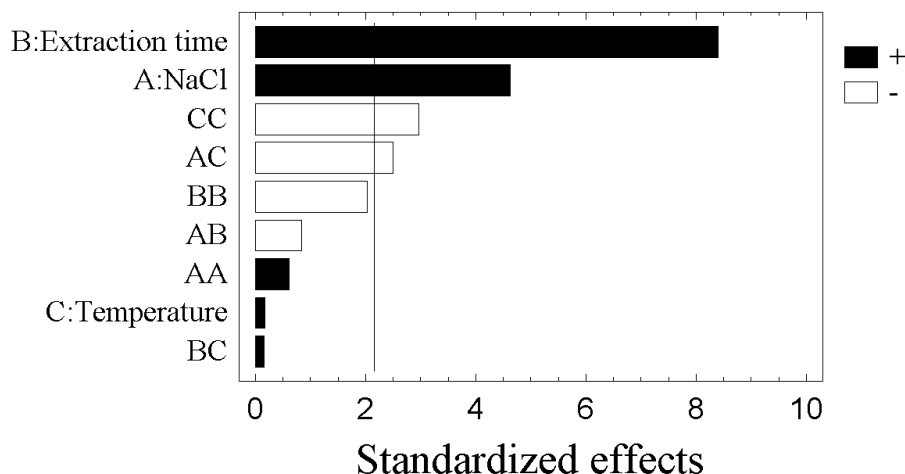


Fig. 3. Pareto chart of main effects in the central composite design for total chromatographic peak area. AA, BB and CC are the quadratic effects of sodium chloride concentration, extraction time and temperature respectively. AB, AC, and BC are the interaction effects between sodium chloride concentration and extraction time, between sodium chloride concentration and temperature, and between extraction time and temperature respectively.

Given that it is not possible to plot simultaneously the response as a function of all the factors controlling the extraction process, the effects of pairs of factors were considered separately. Accordingly, the plots given in Fig. 4, are useful for interpreting graphically the variation of the instrument's response as a function of each pair of independent variables. Accordingly, Fig. 4a shows the instrument's response surface obtained by plotting sodium chloride concentration versus extraction time with the extraction temperature fixed at 37 °C, Fig. 4b shows the response surface developed for extraction time and extraction temperature, whilst keeping a sodium chloride concentration of the order of 16% (w/v) and finally, Fig. 4c shows the response surface obtained as a function of sodium chloride concentration and extraction temperature, for a set extraction time of the order of 20 min.

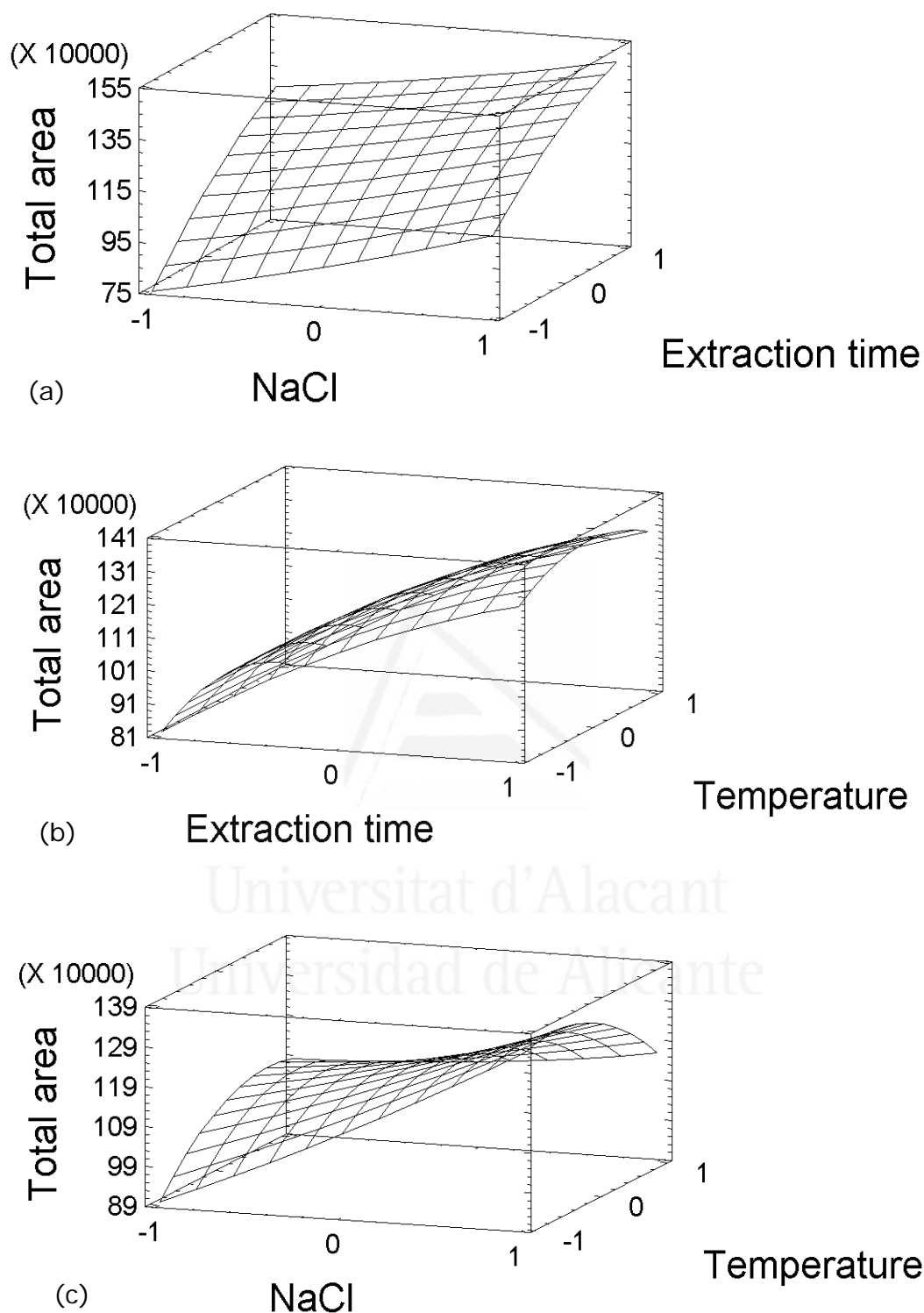


Fig. 4. Response surfaces for total chromatographic peak area using the central composite design obtained by plotting: (a) NaCl concentration vs. extraction time (extraction temperature: 37 °C); (b) extraction time vs. temperature (NaCl: 16%, w/v); and (c) NaCl concentration vs. temperature (extraction time: 20 minutes).

As can be seen, the presence of salt greatly enhances extraction for all target analytes (Fig. 4a and 4c), reaching a maximum at 30% w/v NaCl salt content. The positive effect of the addition of sodium chloride upon extraction has been discussed by many authors [30,31]. In general, addition of NaCl in the aqueous solution is expected to enhance extraction due to the salting-out effect where fewer water molecules are available for dissolving the analyte molecules, preferably forming hydration spheres around the salt ions [17,32]. This is expected to increase the total amount of analytes transferred in the headspace and as such enhance extraction [33,34].

The non-significant positive effect of temperature upon extraction shown in Fig. 3 is not confirmed by Fig. 4b and 4c. Fig. 4c confirms the existence of the significant negative interaction between sodium chloride and temperature, which reveals that room temperature is the optimum value upon extraction and Fig. 4b also reveals that the response of the analytical instrument is optimized when extracting the target analytes at room temperature. A previous report, dealing with the determination of BTEX in water samples using IL-coated stainless steel wires investigated the effect of temperature (in the range of 0-50 °C) upon extraction [35]. The results revealed that peak areas of target analytes increased when increasing the temperature from 0 to 20 °C and then decreased for sampling temperatures from 20 to 50 °C. The authors concluded that although high temperatures increase diffusion coefficients of analytes in water and from liquid sample to the headspace, it may also decrease the partition coefficients of analytes in the IL fiber coating, thereby decreasing extraction efficiencies. Due to the similarities between both headspace ILs uses (coating fiber and single drop microextractions), accordingly, if a temperature increase results in a decrease of the rate of analyte adsorption on the outer surface of the microdrop then this is expected to reduce extraction.

From the second optimization study, the response of the analytical instrument is expected to be maximized in terms of total area for a sodium chloride concentration reaching the value of 30% (w/v) (+ $\alpha$ ), extraction time reaching the value of 37 min (+ $\alpha$ ) and extraction temperature reaching the value of 25°C (-1). Overall, summarising the results of the two

step optimization yields the following optimum experimental conditions: sodium chloride concentration, 30% (w/v); extraction time, 37 min; extraction temperature, 25°C; drop volume, 5 µL; sample volume, 10 mL; and stirring speed, 1580 rpm.

### 3.3. Evaluation of headspace IL-SDME

Quality parameters of the proposed method were evaluated. In order to test the linearity, calibration studies were performed and the concentration range tested was from 5 to 160 µg L<sup>-1</sup> for all target analytes. The calculated calibration curves gave a high level of linearity for all target analytes with correlation coefficients (*r*) ranging between 0.9981 and 0.9997 as shown in Table 3. The repeatability of the proposed method, expressed as relative standard deviation (R.S.D.), was evaluated by extracting five consecutive aqueous samples (spiked at 20 µg L<sup>-1</sup> with each target analyte) and was found to vary between 1.6 and 5.1% with a mean value of 3.4% (Table 3). Indeed the use of ionic liquid as the acceptor phase in headspace SDME as well as the fact that HPLC instrumentation is used resulted in a net decrease of the R.S.D. values when compared to other headspace SDME methods used for the determination of chlorobenzenes in water [36].

Table 3

Main method parameters for the extraction of chlorobenzenes from water samples using the optimized headspace ionic liquid SDME method

Analyte	Slope ± S.D.	Intercept ± S.D.	Correlation coefficient ( <i>r</i> ) <sup>a</sup>	R.S.D. (%) <sup>b</sup>	LOD (µg L <sup>-1</sup> )	LOQ (µg L <sup>-1</sup> )
1,2-DCB	0.109 ± 0.001	-0.038 ± 0.012	0.9997	5.1	0.102	0.338
1,4-DCB	0.065 ± 0.002	-0.116 ± 0.150	0.9981	2.3	0.203	0.677
1,3-DCB	0.090 ± 0.001	-0.022 ± 0.075	0.9997	5.0	0.152	0.508
1,2,3-TCB	0.171 ± 0.004	-0.039 ± 0.325	0.9987	1.6	0.102	0.338
1,2,4-TCB	0.141 ± 0.002	0.134 ± 0.139	0.9996	3.4	0.122	0.406
1,3,5-TCB	0.178 ± 0.003	0.146 ± 0.245	0.9993	4.1	0.122	0.406
1,2,3,4-TeCB	0.247 ± 0.003	0.358 ± 0.247	0.9996	3.1	0.102	0.338
1,2,4,5-TeCB	0.272 ± 0.005	0.750 ± 0.398	0.9992	3.0	0.102	0.338

<sup>a</sup> Linear range: 5-160 µg L<sup>-1</sup> (number of calibration points=6).

<sup>b</sup> Relative standard deviation (R.S.D.); mean value for five replicate analyses; spiking level 20 µg L<sup>-1</sup>.

Next, the limits of detection (LODs) for all target analytes were determined according to a signal-to-noise-ratio (S/N) of three and the limits of quantification (LOQs) as ten times the above mentioned ratio. As can be seen in Table 3, the LODs and LOQs values were found to be in the low  $\mu\text{g L}^{-1}$  level ranging between 0.102 to 0.203  $\mu\text{g L}^{-1}$  and between 0.338 to 0.677  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectively. It should be mentioned here, that these values are considerably lower than the ones reported so far dealing with the HPLC analysis of aqueous samples containing chlorobenzenes [37,38].

Although there are no reports stating the influence of sample matrix upon the headspace SDME procedure, the feasibility of this liquid phase microextraction procedure must be demonstrated with real samples. Accordingly, method validation was also performed with three different environmental water samples, namely tap water, river water and effluent wastewater originating from a municipal wastewater treatment plant. Initial headspace SDME analyses of these samples did not show detectable concentrations of the target compounds and as such they were found suitable for recovery experiments. For the purpose of the present studies, eight replicate analyses under the optimized experimental conditions were performed for each type of environmental water. Relative recoveries were determined as the ratio of the concentrations found in real and deionised water samples spiked at the same contamination level (20  $\mu\text{g L}^{-1}$  for each target contaminant) [17,32]. The results for each set of experiments, summarised in Table 4, show that for the tap water samples relative recoveries ranged between 94 and 101%, with a mean value of 96%, for the river water samples between 99 and 107%, with a mean value of 102%, and for effluent water samples between 61 and 121%, with a mean value of 92%. As can be seen, the results revealed that relatively elevated R.S.D. values as well as decreased relative recoveries were observed for the more hydrophobic target pollutants (namely 1,2,3,4-tetrachlorobenzene and 1,2,4,5-tetrachlorobenzene) when examined in the effluent water matrix. This is most probably due to the fact that competitive adsorption to suspended solids can indeed reduce the effective concentration of the analyte in the aqueous phase, therefore reducing the quantity of analyte transferred into the headspace and as a consequence the amount of analyte



extracted into the acceptor phase. For the rest of the analytes, it appears that matrix had little effect upon extraction.

Table 4

Relative recoveries and R.S.D. values of the eight chlorobenzenes studied in real water samples

Analyte	Relative recoveries (%) and R.S.D. values (%) in parentheses <sup>a</sup>		
	Tap water	River water	Effluent water
1,2-DCB	97.3 (4.2)	101.1 (5.8)	114.1 (3.2)
1,4-DCB	98.0 (3.1)	100.5 (1.9)	120.6 (2.4)
1,3-DCB	100.9 (6.5)	106.6 (3.1)	112.1 (3.8)
1,2,3-TCB	96.0 (1.3)	101.0 (2.1)	86.0 (2.8)
1,2,4-TCB	96.5 (1.7)	99.3 (2.5)	89.5 (5.1)
1,3,5-TCB	94.1 (2.0)	101.2 (4.5)	83.2 (4.4)
1,2,3,4-TeCB	95.9 (2.8)	101.6 (3.9)	60.8 (6.6)
1,2,4,5-TeCB	96.8 (2.8)	106.1 (3.1)	66.0 (6.8)

<sup>a</sup> Eight replicate analyses at a 20 µg L<sup>-1</sup> spiking level.

#### 4. Conclusions

The multivariate optimization strategy used here, allowed the successful determination of the optimum conditions for the main operational parameters taken into consideration during headspace SDME. The resulting optimized procedure combined with the unique properties of IL (namely non-volatility and adequate viscosity) allowed quantification of trace levels of different polychlorinated benzenes in water samples whilst using a headspace SDME approach coupled to HPLC.

The “green character” of ILs has been recently questioned since some of them show dermal toxicity on fish [39]. However, the small droplet volume used on SDME reconciles ILs with the general environmental-friendliness of microextraction.

## Acknowledgements

The authors would like to thank the Spanish Ministry of Education and Science (projects n. DPI2002-04305-C02-01, PTR1995-0882-OP-02-01, CTQ2005-09079-C03-01/BQU and CAL03-078-C3-2) for the financial support of this work. This work has been undertaken as part of the EU sponsored COST programme (Action D32, working group D32/005/04, "Microwaves and Ultrasound Activation in Chemical Analysis"). L.V also thanks "Vicerrectorado de Investigación, Desarrollo e Innovación" of University of Alicante for her scholarship.

## References

- [1] E. Psillakis, N. Kalogerakis, Trends Anal. Chem. 21 (2002) 53.
- [2] J.G. Huddleston, H.D. Willauer, R.P. Swatloski, A.E. Visser, R.D. Rogers, Chem. Commun. 16 (1998) 1765.
- [3] D.W. Armstrong, L. He, Y.-S. Liu, Anal. Chem. 71 (1999) 3873.
- [4] J.G. Huddleston, A.E. Visser, W.M. Reichert, H.D. Willauer, G.A. Broker, R.D. Rogers, Green Chem. 3 (2001) 156.
- [5] J.-F. Liu, G.-B. Jiang, Y.-G. Chi, Y.-Q. Cai, Q.-X. Zhou, J.-T. Hu, Anal. Chem. 75 (2003) 5870.
- [6] J.-F. Liu, Y.-G. Chi, G.-B. Jiang, C. Tai, J.-F. Peng, J.-T. Hu, J. Chromatogr. A 1026 (2004) 143.
- [7] World Health Organisation (WHO), 10th Report on Carcinogens, National Toxicology Program, Public Health Service, 2002.
- [8] EC (European Community) Council Directive 76/464/EEC on pollution caused by certain dangerous substances discharged into the aquatic environment of the Community. Official Journal L 129, May 18, 1976.
- [9] EC (European Community), 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for Community action in the field of water policy. Official Journal L 327, December 22, 2000.
- [10] M. MacLeod, D. Mackay, Chemosphere 38 (1999) 1777.
- [11] M.N. Sarrion, F.J. Santos, M.T. Galceran, Rapid Commun. Mass Spectrom. 14 (2000) 2271.

- [12] B.G. Oliver, K.D. Bothen, *Anal. Chem.* 52 (1980) 2066.
- [13] R.G. Melcher, P.L. Morabito, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2183.
- [14] Y. Wang, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A* 803 (1998) 219.
- [15] R. Barro, S. Ares, C. Garcia-Jares, M. Llompart, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1045 (2004) 189.
- [16] Y. He, Y. Wang, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A* 874 (2000) 149.
- [17] L. Vidal, A. Canals, N. Kalogerakis, E. Psillakis, *J. Chromatogr. A* 1089 (2005) 25.
- [18] H. Zhao, S. Xia, P. Ma, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80 (2005) 1089.
- [19] J.-F. Peng, J.-F. Liu, G.-B. Jiang, C. Tai, M.-J. Huang, *J. Chromatogr. A* 1072 (2005) 3.
- [20] R.H. Myers, D.C. Montgomery, *Response Surface Methodology*, Wiley, New York, 2002.
- [21] F. Reche, M. Garrigós, M. Marín, A. Cantó, A. Jiménez, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 419.
- [22] I. Arambarri, M. Lasa, R. García, E. Millán, *J. Chromatogr. A* 1033 (2004) 193.
- [23] A. Przyjazny, J.M. Kokosa, *J. Chromatogr. A* 977 (2002) 143.
- [24] S. Shariati-Feizabadi, Y. Yamini, N. Bahramifar, *Anal. Chim. Acta* 489 (2003) 21.
- [25] A.L. Theis, A.J. Waldadack, S.M. Hansen, M.A. Jeannot, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5651.
- [26] R. Rodil, A. Carro, R. Lorenzo, M. Abuín, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 313.
- [27] F. Pellati, S. Benvenuti, F. Yoshizaki, D. Bertelli, M. Rossi, *J. Chromatogr. A* 1087 (2005) 265.
- [28] R. Castro, R. Natera, M. García, C. García, *J. Chromatogr. A* 953 (2002) 7.
- [29] P. Diaz, F.J. Señoráns, G. Reglero, E. Ibáñez, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 6468.
- [30] F. Piazza, A. Barbieri, F.S. Violante, A. Roda, *Chemosphere* 44 (2001) 539.
- [31] J.C. Flórez, M.L. Fernández, J.E. Sánchez, E. Fernández, A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta* 415 (2000) 9.
- [32] E. Psillakis, N. Kalogerakis, *J. Chromatogr. A* 907 (2001) 211.

- [33] Y. Yamini, M. Hojjati, M. Haji-Hosseini, M. Shamsipur, *Talanta* 62 (2004) 265.
- [34] R.-S. Zhao, W.-J. Lao, X.-B. Xu, *Talanta* 62 (2004) 751.
- [35] J.-F. Liu, N. Li, G.-B. Jiang, J.-M. Liu, J. Jönsson, M.-J. Wen, *J. Chromatogr. A* 1066 (2005) 27.
- [36] M. Khajeh, Y. Yamini, J. Hassan, *Talanta* 69 (2006) 1088.
- [37] P. Jandera, J. Fischer, B. Prokes, *Chromatographia* 54 (2001) 581.
- [38] J. Lehotay, K. Hromulakova, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 20 (1997) 3193.
- [39] C. Pretti, C. Chiappe, D. Pieraccini, M. Gregori, F. Abramo, G. Monni, L. Intorre, *Green Chem.* 8 (2006) 238.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



## Sensitive determination of free benzophenone-3 in human urine samples based on an ionic liquid as extractant phase in single-drop microextraction prior to liquid chromatography analysis

Lorena Vidal<sup>a</sup>, Alberto Chisvert<sup>a,\*</sup>, Antonio Canals<sup>a,\*</sup>, Amparo Salvador<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Ciencias, Universidad de Alicante, P.O. Box 99, E-03080 Alicante, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

### Abstract

Benzophenone-3 (BZ3), one of the compounds most commonly used as UV filter in cosmetic products, can be absorbed through the skin into the human body, since it can be found at trace levels in urine from users of cosmetics products that contain BZ3. Moreover, different undesirable effects have been attributed to this compound. Thus, sensitive analytical methods to monitor urinary excretion of this compound should be developed. This paper presents a selective and sensitive methodology for BZ3 determination at ultratrace levels in human urine samples. The methodology is based on a novel microextraction technique, known as single-drop microextraction (SDME). An ionic liquid (IL) has been used as extractant phase instead of an organic solvent. After the microextraction process, the extractant phase was injected into a liquid chromatography system. The variables of interest in the SDME process were optimized using a multivariate optimization approach. A Plackett-Burman design for screening and a circumscribed central composite design for optimizing the significant variables were applied. Ionic strength, extraction time, stirring speed, pH, ionic liquid type, drop volume and sample volume were the variables studied. The optimum

experimental conditions found were: sodium chloride concentration, 13% (w/v); extraction time, 25 min; stirring speed, 900 rpm; pH, 2; ionic liquid type, 1-hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([C<sub>6</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]); drop volume, 5 μL; and sample volume, 10 mL. The proposed method requires a standard addition calibration approach, and it has been successfully employed to determine free BZ3 in urine samples coming from human volunteers who applied a sunscreen cosmetic containing this UV filter. The limit of detection was in the order of 1.3 ng mL<sup>-1</sup> and repeatability of the method, expressed as relative standard deviation, was 6% (n=8).

*Keywords:* Benzophenone-3; UV filter; Sunscreen; Cosmetic; Urine; Single-drop microextraction (SDME); Ionic liquid; Multivariate optimization; Liquid chromatography

---

## 1. Introduction

The damage that the ozone layer has suffered in recent years has increased the solar UV radiation reaching Earth. It is largely reported elsewhere that exposure to this UV radiation in small amounts has a therapeutic effect on human health; however, it is also well-documented that over-exposure to sunlight can promote different harmful effects on human health, including skin cancer. So, the use of sunscreen cosmetic products incorporating UV filters, which quench the harmful solar radiation, may prevent or minimize these negative effects of sunlight.

Nowadays, in order to achieve greater protection to solar radiation, UV filters are added not only to cosmetics to be used for sunbathing but also to daily cosmetic products, such as face day-creams, after-shave products, makeup formulations, lipsticks, shampoos, etc.

The number and maximum concentration of UV filters to be used in cosmetics is regulated by the legislation in force in each country [1], since different dermatological side-effects have been attributed to these cosmetic ingredients [2,3].

On the other hand, different studies carried out *in vitro* or *in vivo* (using animals, e.g. fishes or rats) seem to indicate that some organic UV filters have significant estrogenic and/or antiandrogenic activity [4-6]. However, a study on changes in hormonal levels of human volunteers after

applying certain sunscreens seems to indicate that these are not very great [7]. These contradictions indicate that more studies using human volunteers must be done.

UV filters can penetrate the human body through the skin, being excreted at trace levels in urine [8]. Therefore, studies in this field could help to obtain data on bioaccumulation, metabolism and excretion of these compounds. Thus, the development of sensitive and selective analytical methods plays an important role, since they can become powerful tools in obtaining essential data. These analytical methods could aid both the cosmetic industry (developing new UV filters with lower percutaneous absorption level) and administration (amending legislation in force, by changing the authorized compounds or their maximum permitted concentrations). However, there are few reports on the determination of UV filters in urine of human volunteers, which are reviewed in a recently published paper [8].

Benzophenone-3 (BZ3), also known as oxybenzone or 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone, is, by far, the most commonly used UV filter in cosmetic formulations worldwide. As recently reviewed [8], very few methods have been reported on BZ3 determination in urine from human volunteers after topical application of cosmetic products. Hayden et al. [9] determined BZ3 by liquid chromatography (LC) with ultraviolet spectrometry (UV) detection in urine from nine human volunteers for 48 h after the application of a sunscreen cosmetic product. In their study, urine was treated with  $\beta$ -glucuronidase in order to hydrolyze BZ3-glucuronic acid conjugates. However, neither further experimental details, nor figures of merit concerning the method were given.

Later, Felix et al. [10] determined free BZ3 by gas chromatography (GC) with mass spectrometry (MS) detection, and urine samples were subjected to solid-phase microextraction (SPME). The method required calibration by the standard addition method in order to avoid matrix interferences. The reported limit of detection was  $5 \text{ ng mL}^{-1}$ . Only one urine sample was collected after a 4 h time period and analyzed, finding around  $260 \text{ ng mL}^{-1}$ .

More recently, Gustavsson et al. [11] studied the excretion of BZ3 by LC-UV in eleven human volunteers for a 48 h time period, after product

application. Urine samples were boiled with 6 M HCl for 30 min in order to hydrolyze BZ3 conjugates and, after cooling and neutralizing, samples were subjected to solid-phase extraction (SPE). Data on figures of merit were not given, although authors claimed that the method was adapted from two previous papers [12,13].

Sarveiya et al. [14] also proposed a LC-UV method to study the urinary excretion of BZ3. Urine from three female volunteers was collected for the 48 h post-application period of a sunscreen product containing the target UV filter. Samples were buffered and treated with  $\beta$ -glucuronidase for 24 h, centrifuged, evaporated to dryness and re-suspended in methanol prior injection into the LC system. The limit of detection achieved by this method was 80 ng mL<sup>-1</sup>.

Janjua et al. [7] studied the relationship between the application of sunscreens containing BZ3, and other UV filters, and the levels of endogenous reproductive hormones. They also determined BZ3 in urine from 32 two human volunteers, but the analytical procedure was not described.

Finally, Gonzalez et al. [15] extended and improved their previous study [11], by studying the effect of repeated topical applications of a sunscreen and the influence of UV irradiation on BZ3 skin permeation.

Other studies have been reported on BZ3 determination in urine from animals, such as rats [12] and piglets [16].

Other UV filters in urine from human volunteers have also been analyzed. For instance, methods for phenylbenzimidazole sulphonic acid [17], terephthalidene dicamphor sulphonic acid [18], ethylhexyl methoxycinnamate and 4-methylbenzylidene camphor [7], disodium phenyl dibenzimidazole tetrasulphonate [19] and p-aminobenzoic acid [20] can be found in the specialised literature.

All these methods and other related-analytical methods focusing on the UV-filter determination in other types of biological fluids have recently been reviewed by Giokas et al. [8]. In most of them, an extraction step is used in order to clean up and concentrate the analytes. Commonly, liquid-liquid extraction (LLE) is the technique of choice; however, it is time-consuming and uses large amounts of potentially toxic and normally expensive organic solvents and samples. SPE partially solves these



disadvantages, although the cost is usually higher. In recent years, efforts have been focused to miniaturize the LLE and SPE techniques, in order to solve the aforementioned disadvantages and improve extraction yield by means of microextraction procedures.

Single drop microextraction (SDME) is a miniaturization of the traditional LLE technique, where the extractant phase is a drop of a few microlitres of a sample-immiscible solvent that can be directly immersed in the sample (immersion mode) by means of a microsyringe. An alternative to this approach, for volatile analytes, is to suspend the drop in the headspace of the vial containing the sample (headspace mode). This preconcentration methodology has been proven an interesting and promising alternative to other microextraction techniques, like SPME, stir-bar sorptive extraction (SBSE), etc., since it is simple to operate and use, fast, inexpensive, precise, virtually solventless and environmentally friendly. In addition, it is characterized by its affordability, due to its independence of a commercial source. The origins and evolution of this promising methodology have been compiled by Psikallis and Kalogerakis [21]. Recently, Xu et al. [22] have written a review about updated developments and applications of SDME.

Although organic solvents (i.e., octanol, cyclohexane, toluene, etc.) are useful as extractant phase, recently, the use of ionic liquids (ILs) has been proposed in SDME [22-27]. ILs are organic salts that are liquids at room temperature and have high boiling points. They have various advantages over traditional organic solvents, such as low vapour pressure, high stability, large viscosity, moderate dissolvability of organic compounds, adjustable miscibility and polarity, good extractability for different organic and inorganic compounds, as well as the possibility of using longer sampling time and larger droplet volume [23-25]. Moreover, owing to their low volatility, flammability and toxicity, ILs have been proposed as an alternative to organic solvents, as green solvents for extraction [28,29]. Nevertheless, despite their advantages, few papers have been published reporting the use of ILs employed for SDME.

This paper focused on developing a user-friendly, sensitive and environmentally friendly analytical method able to determine free BZ3 in human urine samples. To do this, urine was taken after applying sunscreen

products containing this UV filter, in order to establish an analytical methodology that provided data on urinary excretion of this compound. The method was based on the use of an IL as extractant phase in SDME, carrying out both pre-concentration and clean-up steps. The method was able to determine it at ultratrace levels, employing common and inexpensive instrumentation, such as liquid chromatography with UV detection.

To our knowledge, there are no published methods based on SDME focusing on either UV filter determination or any other type of cosmetic ingredient.

## 2. Experimental

### 2.1. Apparatus

A Waters LC system equipped with a Waters 600E high-pressure pump and a Waters 996 diode array detection (DAD) system set at 289 nm (Milford, MA, USA) was employed. A personal computer equipped with a Milenium32 Waters program for LC system was used to process all chromatographic data. A 7725i Rheodyne injector (Rohnert Park, CA, USA) and a LiChrospher RP-18 (125 x 4 mm I.D., 5  $\mu\text{m}$  particle size) column from Merck (Darmstadt, Germany) were also used for injection and separation of the target analyte, respectively.

A Crison (Alella, Spain) micropH 2000 pH meter was used for the pH measurements.

### 2.2. Reagents and samples

Benzophenone-3 (BZ3; 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone or oxybenzone) was obtained from Aldrich (Steinheim, Germany). Stock solution of BZ3 (500 mg L<sup>-1</sup>) was prepared in de-ionized water adding few drops of 10% NaOH solution. Working solutions were prepared by dilution of standard stock solution with de-ionized water.

Synthesis-grade acetic acid (HAc) and LC-grade ethanol (EtOH) from Scharlau Chemie (Barcelona, Spain), and de-ionized water (resistivity  $\geq 18$

M $\Omega$  cm) obtained from a water purification system (Milli-Q Biocel A10) supplied by Millipore (Billerica, MA, USA) were used to prepare the mobile phase in the LC system.

Synthesis-grade ionic liquids (1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] and 1-hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate [C<sub>6</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]), were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

Hydrochloric acid and sodium chloride from Merck were used to adjust the pH and the ionic strength of the samples, respectively.

Typical cosmetic-grade ingredients from Guinama (Valencia, Spain) and RNB (Valencia, Spain) such as emollients, surfactants, smoothing agents, hydrating agents, preservatives, perfumes, etc. were used to prepare a laboratory-made sunscreen cream sample containing BZ3 (5%), according to an adapted protocol from ref. [30].

Urine samples from human volunteers who did not use any cosmetics containing BZ3 were collected in sterilized containers. Also, urine samples from a human volunteer who applied 15 g of the aforementioned laboratory-made sunscreen cosmetic cream were also collected in sterilized containers, before and at different times after cosmetic application.

All urine samples were kept at 4°C until the analysis.

### 2.3. SDME

For SDME, sample solution was placed in a 15 mL crimp top glass vial containing a glass-coated stirring bar.

A 3-mm-long polytetrafluoroethylene (PTFE) tube (0.8 mm I.D.; 1.6 mm O.D.) was fitted to the blunt needle tip of a 25  $\mu$ L Hamilton (Bonaduz, Switzerland) syringe (model 1702, 5.1 cm length, 0.015 cm I.D.), maximizing thus the contact area between the drop and the needle tip. The microsyringe, containing a known volume of the ionic liquid acceptor phase, was clamped above the vial and its needle was immersed into the sample. The plunger was depressed and a microdrop of the ionic liquid phase was exposed to the sample at room temperature with magnetic stirring. It should be mentioned that during extraction, the ionic liquid can be partially solved into the sample, thus reducing the volume of the acceptor phase.

Finally, after extraction, the remainder volume of ionic liquid acceptor phase was retracted into the microsyringe, the PTFE tube was removed, and then the extract was ready for LC analysis.

#### 2.4. Proposed method for BZ3 determination in human urine

Urine samples were filtered through common lab filter paper from Albet (Sant Boi de Llobregat, Spain) and adjusted to pH 2 with 12 M HCl. The dilution factor was not considered relevant since only 1 to 2 drops of HCl were needed.

Next, to prepare a standard addition calibration, five aliquots of 9800  $\mu\text{L}$  of each urine sample were placed in 15 mL crimp top glass vials containing a glass-coated stirring bar, and afterwards were spiked with 0, 10, 70, 140 and 200  $\mu\text{L}$  of a 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  BZ3 aqueous solution, to which 200, 190, 130, 60 and 0  $\mu\text{L}$  of pure water were added, respectively, in order to reach an equal volume (10 mL).

Then, each solution was subjected to the SDME procedure described above, using 5  $\mu\text{L}$   $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{PF}_6]$  as acceptor phase. The extraction was accomplished after 25 min magnetically stirring at 900 rpm, and afterwards the remaining acceptor phase volume (2.5  $\mu\text{L}$ ) was injected into the LC system for analysis where EtOH:1% HAc 60:40 (v/v) at 1  $\text{mL min}^{-1}$  flow rate was used as mobile phase, these chromatographic conditions being based on a previous work [31]. Figure 1 shows a chromatogram of a real spiked urine sample containing 250  $\text{ng mL}^{-1}$  of BZ3.

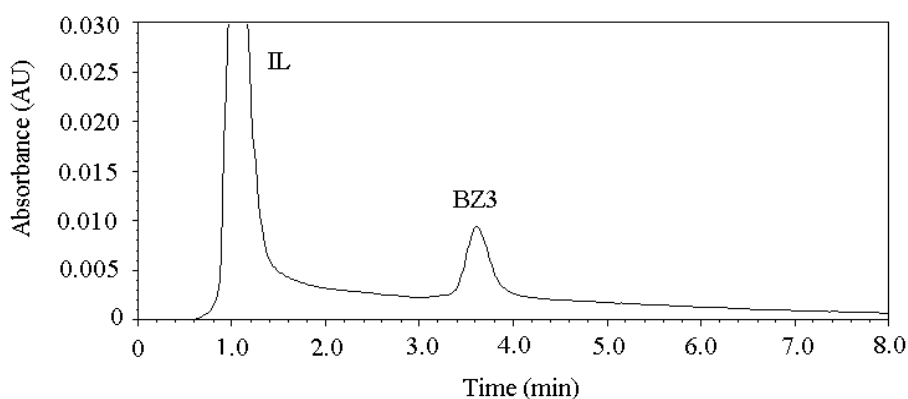


Fig. 1. Chromatogram of a real spiked urine sample (BZ3 at 250  $\text{ng mL}^{-1}$ ) subjected to the SDME procedure (see Section 2.4 for details). BZ3: benzophenone-3; IL: ionic liquid ( $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{PF}_6]$ ).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Study of experimental variables involved in SDME

Different variables can affect the extraction yield in the SDME procedure as described by Psillakis and Kalogerakis [21], and in most cases they are correlated. Therefore, their optimization through a multivariate approach is recommended. However, some of them might not have a significant effect and can, thus, be obviated. In this respect, a screening step, prior to the optimization step, is helpful in order to assess the significant variables involved in the analytical system under study.

In this case, based on the literature and the previous experience of our group [26,27], the influence of seven variables, namely pH, ionic liquid type, drop volume, sample volume, ionic strength, stirring speed and extraction time, were studied in order to maximize the extraction yield of BZ3 in the SDME procedure,.

##### 3.1.1. Screening step

When a large number of variables are involved, reduced factorial designs are employed for screening purposes. One particular design is the Plackett-Burman design, which assumes that the interactions can be completely ignored and so the main effects are calculated with a reduced number of experiments. A saturated Plackett-Burman matrix was employed because of the large number of variables to be tested. A matrix with 11 variables (corresponding to seven real variables and four dummy variables) was used. The effects of dummy variables are used to estimate the experimental error used in the statistical interpretation [27,32]. For each variable, two levels were considered, which were chosen according to preliminary experiments. Table 1 shows the variables, levels and matrix of the Plackett-Burman design composed of 12 experiments. The experiments were randomly carried out in order to nullify the effect of extraneous or nuisance variables, by using aqueous solutions of BZ3 (500 ng mL<sup>-1</sup>) and evaluating its LC peak area for each experiment.

Table 1  
Experimental variables, levels and matrix of the Plackett-Burman design

Variables	Code	Level	
		Low (-1)	High (+1)
pH	pH	2	5
Ionic liquid type	IL	[C <sub>4</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ]	[C <sub>6</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ]
Drop volume (μL)	D	3	5
Sample volume (mL)	V	5	10
Ionic strength (NaCl concentration; %, w/v)	I	0	20
Stirring speed (rpm)	S	0	450
Extraction time (min)	t	10	20

Run	pH	IL	D	V	I	S	t	Dummy 1	Dummy 2	Dummy 3	Dummy 4
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1
2	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1
3	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
5	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
6	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
7	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
9	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
10	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
11	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1
12	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1

An ANOVA (analysis of variance) test was used to evaluate the data and statistically significant effects were determined using a *t*-test with 95% probability [32,33]. The results were visualized using the main effect Pareto chart shown in Fig. 2. The bar length is proportional to the absolute value of the estimated main effect and a vertical reference line corresponding to 95% confidence interval is included. An effect which exceeds this vertical reference line may be considered significant with regard to the response. Furthermore, the positive or negative sign (corresponding to a black or white bar filling) reveals the cases when the response (i.e., BZ3 peak area) is enhanced or reduced, respectively, when passing from the lowest to the highest level set for the specific variable.

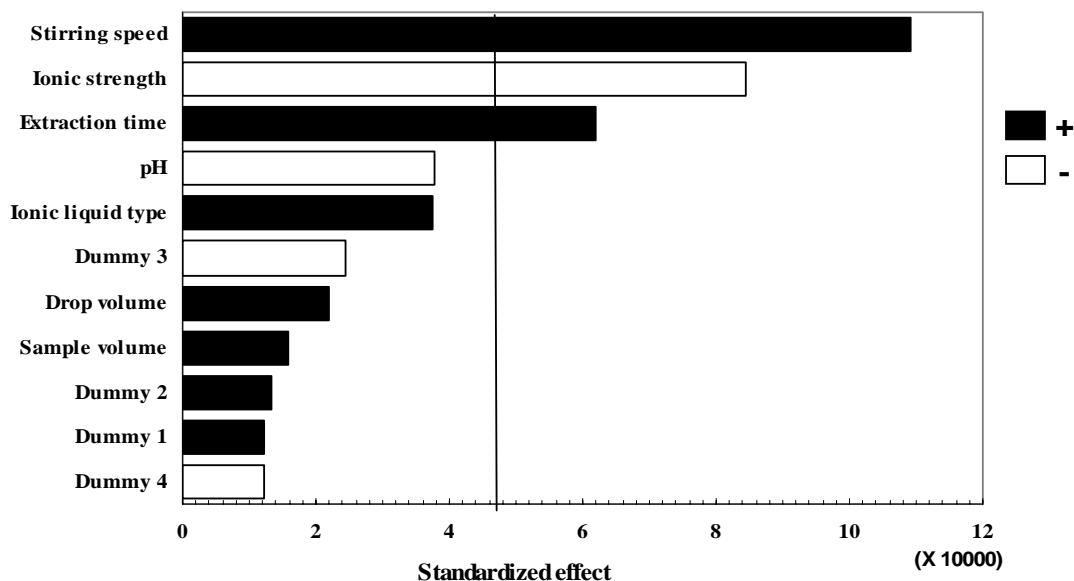


Fig. 2. Pareto chart of the main effects obtained from the Plackett-Burman design.

According to Fig. 2, stirring speed is the most significant variable having a positive sign. Ionic strength is the next most significant variable showing a negative sign and extraction time is the third most significant variable with a positive sign. The influence of all these variables will be discussed in greater depth in the following Section 3.1.2.

Fig. 2 also reveals that pH appeared to have a negative non-significant effect upon extraction. This negative effect is in agreement with the assumption that the phenolic moiety of BZ3 may be partially ionized when pH is increased, thus increasing the polarity of BZ3 and thus the extraction yield is decreased [34].

Ionic liquid type showed a positive non-significant effect and this observation is in agreement with previously published results [24,27].

Drop volume showed a positive non-significant effect, which is due to the higher volume of the drop, therefore a higher quantity of analyte is extracted [24]. However, a drop volume greater than 5  $\mu\text{L}$  was not possible because of drop instability.

Sample volume also had a positive non-significant effect upon extraction. In general, increasing the aqueous sample volume leads to an increase in the total amount of target analyte [24,27]. A 10 mL sample volume was considered the upper limit since insufficient sample volume could be provided when real urine samples were considered.

Overall, the results of this first screening study revealed that four variables could be fixed since their effect was not significant (namely pH, 2; ionic liquid type, [C<sub>6</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]; drop volume, 5 μL; and sample volume, 10 mL), and the rest were considered in the following optimization step.

### 3.1.2. Optimization step

The second step is concerned with optimizing the values of the significant variables in order to obtain the best response (in our case the extraction yield of BZ3, which is monitored by means of the LC peak area). Different experimental designs can be found in the literature, many of them are based on the so-called response surface designs. Box-Wilson or central composite design (CCD) is one of the most frequently used response surface designs, which is constructed by several superimposed designs. It consists of a factorial design ( $2^k$ ) augmented with  $(2k)$  star points, where  $k$  is the number of variables to be optimized, and with a central point, which can be run  $n$  times [35,36]. A circumscribed central composite design (CCCD) was employed, where the star points were located at  $\pm\alpha$  from the centre of the experimental domain, which was situated in 0. In order to establish the rotatability and orthogonality of the experimental design,  $n$  was set at 9 and  $\alpha = \sqrt[4]{2^k} = 1.682$  [35]. Therefore, the overall matrix of CCCD design involved 23 experiments (Table 2). This design was used to optimize and evaluate the main effects, interaction effects, and quadratic effects. A 3-factor, 3-level design used is suitable for exploring quadratic response surfaces and constructing second-order polynomial models. In this study, the three variables considered were: extraction time ( $t$ ), stirring speed ( $S$ ) and sodium chloride concentration (ionic strength) ( $I$ ). The low (-1), central (0), and high (+1) levels of these variables, as well as the location of their star points, are also given in Table 2.



Table 2

Experimental variables, levels and matrix of the circumscribed central composite design (CCCD)

Variables	Level			Star Points ( $\alpha = 1.682$ )	
	Low (-1)	Central (0)	High (+1)	- $\alpha$	+ $\alpha$
Ionic strength ( <i>I</i> ) (NaCl concentration; %, w/v)	6	15	24	0	30
Stirring speed ( <i>S</i> ) (rpm)	300	525	750	150	900
Extraction time ( <i>t</i> ) (min)	10	20	30	3	37

Run	<i>I</i>	<i>S</i>	<i>t</i>
1	0	0	0
2	1	-1	-1
3	-1.682	0	0
4	1	1	-1
5	0	1.682	0
6	-1	1	-1
7	0	0	-1.682
8	-1	-1	-1
9	1.682	0	0
10	-1	1	1
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	0	-1.682	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	1.682
18	0	0	0
19	0	0	0
20	1	1	1
21	0	0	0
22	1	-1	1
23	-1	-1	1

The data obtained were evaluated by an ANOVA test, and the effects were visualized using Pareto chart (Fig. 3). As can be seen, the three variables considered were significant. Extraction time and stirring speed showed a positive effect, whilst ionic strength showed a negative effect upon extraction. Furthermore, examination of the quadratic effects, also shown in Fig. 3, revealed that the quadratic effect of extraction time ( $t^2$ ) and ionic strength ( $I^2$ ) were statistically significant, exhibiting a negative effect upon extraction.

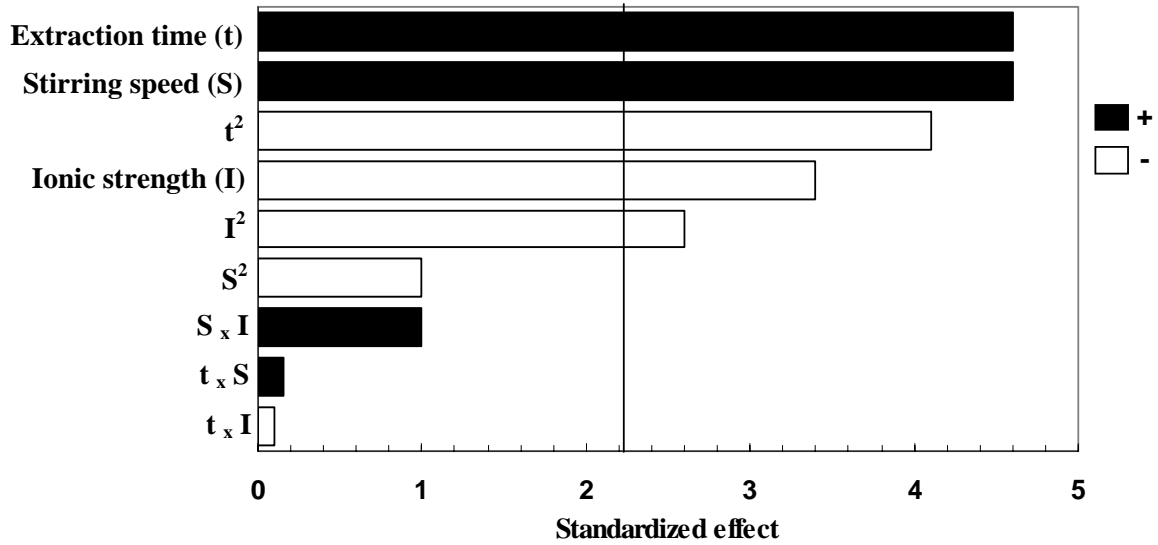


Fig. 3. Pareto chart of the main effects obtained from the circumscribed central composite design.

Given that it is not possible to simultaneously plot the instrumental response as a function of all the variables controlling the extraction process, the effects of pairs of variables were considered separately. Accordingly, the plots shown in Fig. 4 are useful for graphically interpreting the variation of the instrumental response as a function of each pair of independent variables. Accordingly, Fig. 4a shows the response surface obtained by plotting extraction time versus ionic strength with the stirring speed fixed at 525 rpm, Fig. 4b shows the response surface developed for extraction time and stirring speed, whilst keeping a sodium chloride concentration of 15% (w/v) and finally, Fig. 4c shows the response surface obtained as a function of stirring speed and ionic strength, for an extraction time of 20 minutes. As can be seen, extraction time shows a positive effect upon extraction (Fig. 4a and 4b). Indeed, increasing the extraction time results in an increase in the total amount of analyte extracted, reaching a maximum at 25 minutes, and undergoing a decrease after that. As expected, stirring speed also shows a positive effect (Fig. 4b and 4c), reaching a maximum at 900 rpm. Increasing the speed of sample stirring is expected to enhance the extraction rate of the analyte since mass transference is increased. However, values over 900 rpm were not tested because they caused the drop to fall. On the other hand, ionic strength shows a negative effect (Fig.

4a and 4c), reaching a maximum at 13% (w/v). This negative effect is in accordance with previously published results [10,34].

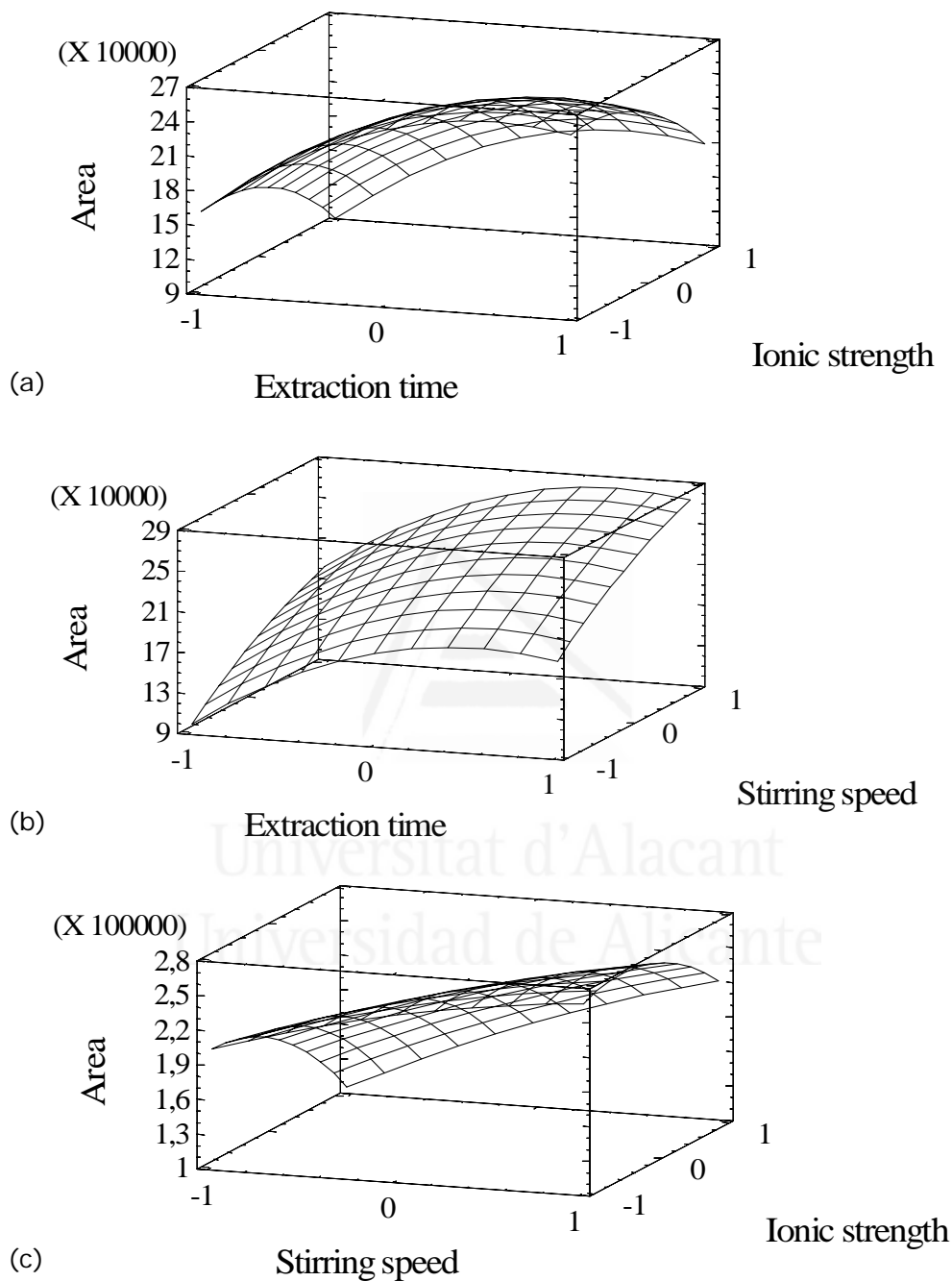


Fig. 4. Response surfaces using the circumscribed central composite design obtained by plotting: (a) extraction time vs. ionic strength (stirring speed: 525 rpm); (b) extraction time vs. stirring speed (NaCl: 15%, w/v); and (c) stirring speed vs. ionic strength (extraction time: 20 min).

From this optimization study, the LC peak area for BZ3 is expected to be maximized for a sodium chloride concentration reaching the value of 13% (w/v), extraction time reaching the value of 25 min and stirring speed reaching the value of 900 rpm. Overall, summarizing the results of both screening and optimization steps yield the following optimum experimental conditions: sodium chloride concentration, 13%; extraction time, 25 min; stirring speed, 900 rpm; pH, 2; ionic liquid type, [C<sub>6</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]; drop volume, 5  $\mu$ L; and sample volume, 10 mL.

However, it should be emphasized that the ionic strength is an uncontrollable variable when urine is considered instead of pure water. Urine samples contain different amounts of salts that affect the ionic strength value, and thus cause an uncontrolled matrix effect that influences the extraction yield. In order to solve this effect, sodium chloride was added until saturation point in order to assure that all urine samples had the same ionic strength, but unfortunately the extraction yield was five times lower as a result. Moreover, despite of this strategy, the matrix effect was not completely removed, and it was also attributed to other compounds present in the urine. This matrix effect was shown to be different for different urine samples, so the use of a BZ3-free urine sample as a solvent to construct the calibration curve was not feasible. Consequently, the urine samples were finally analyzed by the standard addition method [37], obviating the ionic strength adjustment.

### *3.2. Stability of the urine samples*

Two portions from a BZ3-free urine sample were taken and spiked with 50 ng mL<sup>-1</sup> BZ3. One of them was stored at room temperature and the other at 4°C. In order to determine their stability, BZ3 was extracted (in triplicate) from each sample on different days according to the proposed method, and the LC peak area of BZ3 was evaluated. As can be concluded from Fig. 5, if the analysis is not carried out on the same day the sample is taken, it is necessary to keep urine samples at a low temperature to avoid possible BZ3 degradation, which may affect its determination.

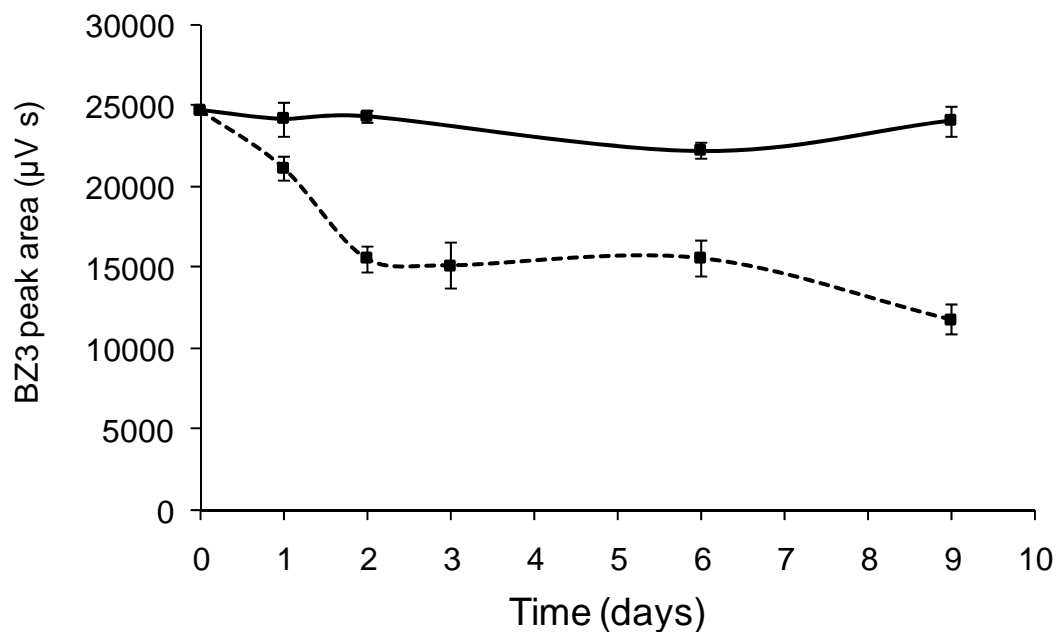


Fig. 5. Influence of the urine storage temperature on the BZ3 concentration. Data shown are mean ( $n=3$ )  $\pm$  SD. Dotted line: room temperature; solid line:  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3. Study of the accuracy of the method

The proposed method was applied to the analysis of urine samples taken from different human volunteers who were known not to use any cosmetic containing BZ3. Samples were analyzed and they were BZ3-free. Hence, spiked urine samples were prepared by adding known amounts of BZ3, and then, BZ3 was determined by the proposed method, providing the results shown in Table 3. The obtained results were compared statistically with the added amounts by using the Student's t-test [37]. The tabulated t-value ( $t_{\text{tab}}$ ) for a 5% significance level and  $N-2=3$  degrees of freedom (where  $N$  is the number of points of the standard addition calibration curve) is 3.18, being higher than the calculated t values ( $t_{\text{cal}}$ ) shown in Table 3, thus accepting the null hypothesis of no differences between both data series, which shows the accuracy of the method.

Table 3

Determination of free BZ3 in spiked real urine samples

Added concentration (ng mL <sup>-1</sup> )	Found concentration (ng mL <sup>-1</sup> ) ± SD	t <sub>cal</sub> <sup>a</sup>
20	16 ± 7	1.27
50	40 ± 9	2.48
100	89 ± 8	3.07
150	140 ± 9	2.48

<sup>a</sup> t<sub>tab(0.05,N-2=3)</sub> = 3.18

### 3.4. Analytical figures of merit of the proposed method

Quality parameters of the proposed method were also evaluated. The enrichment factor of the proposed procedure, defined as the ratio of  $C_o/C_a$ , where  $C_o$  is the concentration of analytes in the ILs phase after extraction and  $C_a$  is the original concentration of analytes in the aqueous phase, measured by repeated enrichment of standard solution containing 500 ng mL<sup>-1</sup> ( $n=3$ ) was 23. The linearity studied reached at least 300 ng mL<sup>-1</sup> of BZ3 in all the cases. The employed working range was set from 0 to 100 ng mL<sup>-1</sup> (number of calibration points,  $N=5$ ). The calculated calibration curves gave a high level of linearity with a correlation coefficient ( $r$ ) ranged from 0.996 to 0.9998. In addition, the Student's t-test was applied to assess the linearity showing values ranging from 19.31 ( $r=0.996$ ;  $N=5$ ) to 86.59 ( $r=0.9998$ ;  $N=5$ ), thus rejecting the null hypothesis of non-linear correlation for a 5% significance level and 3 degrees of freedom ( $t_{0.05,3} = 3.18$ ) [37]. The repeatability of the proposed method, expressed as relative standard deviation (RSD), was evaluated by extracting BZ3 from eight aliquots of the same vial of urine samples (spiked at 20 ng mL<sup>-1</sup>) and RSD value was found to be 6%.

The sensitivity of the instrumental measurements estimated by means of the slope of the standard addition calibration curves of the urine samples analyzed ranged from 605 to 665 ( $\mu\text{V s}$ ) / (ng mL<sup>-1</sup>).

The limit of detection (LOD) was estimated using a three signal-to-noise ratio criteria and the limit of quantification (LOQ) as ten times the above mentioned ratio, being 1.3 ng mL<sup>-1</sup> and 4.4 ng mL<sup>-1</sup>, respectively. The LOD value obtained in this study improved 3.8-fold compared to the value obtained by Felix et al. [10] using a more expensive and sensitive SPME-

GC-MS and 61 times better than the previous one obtained with similar instrumentation (i.e. LC-UV/Vis) [14]. This shows SDME to be a powerful and suitable preconcentration methodology for trace analysis.

### 3.5. Application of the proposed method to determine free BZ3 in real urine samples

An amount of 15 g of a laboratory-made sun cream containing BZ3 (5%) was topically applied to the body of a human volunteer, whose urine samples were collected before and after the application at two hourly intervals for a period of 12 h. The urine samples were analyzed for free BZ3 determination according to the proposed method. Table 4 shows the results obtained with their standard deviation (SD) values. As can be seen, the urinary excretion of BZ3 increases with time from the application. Despite not completing the whole study of the urinary excretion of BZ3, which is not the aim of this paper, the data shows the proposed method is useful to perform these studies.

Table 4  
Free BZ3 found in real urine samples at different excretion time

Excretion time (h)	Excreted volume (mL)	Concentration (ng mL <sup>-1</sup> ) ± SD	Mass (µg) ± SD
0 <sup>a</sup>	300	< LOD <sup>b</sup>	< LOD
2	140	25 ± 3	3.5 ± 0.4
4	700	7 ± 1	5.0 ± 0.5
6	550	13 ± 2	7 ± 1
8	400	13 ± 1	5.5 ± 0.6
10	123	48 ± 3	5.9 ± 0.4
12	405	40 ± 1	15.7 ± 0.3

<sup>a</sup> Urine excreted before the sun cream was applied.

<sup>b</sup> LOD, limit of detection

## 4. Conclusions

A sensitive method based on liquid chromatography with conventional UV detection that can determine free BZ3 at ultratrace levels in human urine samples is proposed. An easy sample pre-treatment is carried out, based on the use of a novel microextraction technique named single-drop microextraction, which has proven useful to carry out both preconcentration

and clean-up steps. The preconcentration achieved via this methodology is adequate to determine free BZ3 at ultratrace levels.

The multivariate optimization strategy used enabled successful determination of the optimum conditions for the main experimental parameters taken into consideration during SDME.

Standard addition calibration is proposed in order to correct matrix effects caused mainly by the different ionic strength of each urine sample.

The sensitivity of the method enables free BZ3 to be determined in urine samples taken from human volunteers after topical application of a sunscreen. These results show the applicability of the proposed method to study bioaccumulation and excretion mechanisms in controlled experiments (e.g., taking into account the applied amount of sunscreen cosmetic, the vehicle of the sunscreen, the total release time from application, temperature, physical considerations of volunteers, etc).

### **Acknowledgements**

The authors acknowledge the financial support of the Spanish Government (projects PTR1995-0882-OP-02-01, CTQ2005-09079-C03-01/BQU and CTQ2006-00296/PPT). L.V. also thanks "Vicerrectorado de Investigación, Desarrollo e Innovación" of University of Alicante for her scholarship. The authors also acknowledge Professor C.E. Domini for the interesting discussions and her assistance in multivariate optimization, which undoubtedly enhanced this work.

### **References**

- [1] A. Chisvert, A. Salvador, in: A. Salvador, A. Chisvert (Eds.), *Analysis of Cosmetic Products*, Elsevier, Amsterdam, 2007, p. 83.
- [2] S. Schauder, H. Ippen, *Contact Dermatitis* 37 (1997) 221.
- [3] E. Rodríguez, M.C. Valbuena, M. Rey, L.P. de Quintana, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 22 (2006) 189.
- [4] M. Schlumpf, B. Cotton, M. Conscience, V. Haller, B. Steinmann, W. Lichtensteiger, *Environ. Health Perspect.* 109 (2001) 239.



- [5] R. Ma, B. Cotton, W. Lichtensteiger, M. Schlumpf, *Toxicol. Lett.* 74 (2003) 43.
- [6] P.Y. Kunz, H.F. Galicia, K. Fent, *Toxicol. Sci.* 90 (2006) 349.
- [7] N.R. Janjua, B. Mogensen, A.M. Andersson, J.H. Petersen, M. Henriksen, N.E. Skakkebaek, H.C. Wulf, *J. Invest. Dermatol.* 123 (2004) 57.
- [8] D.L. Giokas, A. Salvador, A. Chisvert, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 360.
- [9] C.G.J. Hayden, M.S. Roberts, H.A.E. Benson, *Lancet* 350 (1997) 863.
- [10] T. Felix, B.J. Hall, J.S. Brodbelt, *Anal. Chim. Acta* 371 (1998) 195.
- [11] H. Gustavsson-Gonzalez, A. Farbroth, O. Larkö, *Clin. Exper. Dermatol.* 27 (2002) 691.
- [12] I.M. Abdel-Nabi, A.M. Kadry, R.A. Davis, M.S. Andel-Rahman, *J. Appl. Toxicol.* 12 (1992) 255.
- [13] R. Jiang, C.G.J. Hayden, R.J. Prankerd, M.S. Roberts, H.A.E. Benson, *J. Chromatogr. B* 682 (1996) 137.
- [14] V. Sarveiya, S. Risk, H.A.E. Benson, *J. Chromatogr. A* 803 (2004) 225.
- [15] H. Gonzalez, A. Farbroth, O. Larkö, A.M. Wennberg, *Br. J. Dermatol.* 154 (2006) 337.
- [16] S. Kasichayanula, J.D. House, T. Wang, X. Gu, *J. Chromatogr. B* 822 (2005) 271.
- [17] M.T. Vidal, A. Chisvert, A. Salvador, *Talanta* 29 (2003) 591.
- [18] F. Benech-Kieffer, W.J.A. Meuling, C. Leclerc, L. Roza, J. Leclaire, G. Nohynek, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 16 (2003) 343.
- [19] A. Balaguer, A. Chisvert, A. Salvador, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 922.
- [20] L.H. Wang, W.S. Huang, H.M. Tai, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 1430.
- [21] E. Psillakis, N. Kalogerakis, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 53.
- [22] L. Xu, C. Basheer, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 184.
- [23] J-F. Liu, G-B. Jiang, Y-G. Chi, Y-Q. Cai, Q-X. Zhou, J-T. Hu, *Anal. Chem.* 75 (2003) 5870.
- [24] J-F. Liu, Y-G. Chi, G-B. Jiang, C. Tai, J-F. Peng, J-T. Hu, *J. Chromatogr. A* 1026 (2004) 143.
- [25] J. Liu, J.A. Jönsson, G. Jiang, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 20.

- [26] L. Vidal, E. Psillakis, C.E. Domini, N. Grané, F. Marken, A. Canals, *Anal. Chim. Acta* 584 (2007) 189.
- [27] L. Vidal, C.E. Domini, N. Grané, E. Psillakis, A. Canals, *Anal. Chim. Acta* 592 (2007) 9.
- [28] C.F. Poole, *J. Chromatogr. A* 1037 (2004) 49.
- [29] H. Zhao, S. Xia, P. Ma, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80 (2005) 1089.
- [30] M.C. Jordán, A.M. Jordán, *Formulario de Cosmética*, NAU llibres, Valencia, 1991.
- [31] A. Salvador, A. Chisvert, *Anal. Chim. Acta* 537 (2005) 15.
- [32] H. Fabre, N. Mesplet, *J. Chromatogr. A* 897 (2000) 329.
- [33] Y.V. Heyden, C. Hartmann, D.L. Massart, L. Michel, P. Kiechle, F. Erni, *Anal. Chim. Acta* 316 (1995) 15.
- [34] D.A. Lambropoulou, D.L. Giokas, V.A. Sakkas, T.A. Albanis, M.I. Karayannis, *J. Chromatogr. A* 967 (2002) 243.
- [35] R.H. Myers, D.C. Montgomery, *Response Surface Methodology*, Wiley, New York, 2002.
- [36] R. Rodil, A. Carro, R. Lorenzo, M. Abuín, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 313.
- [37] J.C. Miller, J.N. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 2005.





Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **Capítulo 3. Radiación de microondas para favorecer la extracción**

---



En este capítulo se presenta el uso de la radiación de microondas para favorecer la extracción en la modalidad de HS-SDME. La radiación de microondas se utiliza con el objetivo de mejorar el proceso de volatilización de los analitos volátiles desde la muestra al espacio de cabeza. Sin embargo, había que resolver el problema que presenta el aumento de temperatura sobre la etapa de sorción de los analitos por parte de la microgota.

Para lograr tal objetivo se desarrolló un sistema que permite realizar la sorción al mismo tiempo que se irradia la muestra con microondas, permaneciendo la fase extractante fuera del campo de irradiación. Hasta la fecha, los antecedentes existentes de la misma técnica se reducían a una única publicación en la que se utilizaba como muestra unas hierbas medicinales. Sin embargo, sí existían más antecedentes relacionados con la técnica de SPME (ver apartado II.5.2.). El sistema desarrollado en este trabajo se describe con detalle a continuación, y hay que remarcar que es similar al presentado en las publicaciones previas de otros autores.

Como objetivo general de este trabajo se pretendía mostrar nuevos avances de la técnica de SDME y mejorar la sensibilidad del método propuesto en el capítulo anterior.

El trabajo llevado a cabo en este capítulo consiste en la determinación de los anteriormente comentados ocho clorobencenos en muestras de agua, mediante la técnica de SDME, utilizando un IL como fase extractante e irradiando la muestra con microondas. La posterior separación y detección se realiza mediante LC-PDA.



## Microwave-assisted headspace single-drop microextraction of chlorobenzenes from water samples

Lorena Vidal<sup>a</sup>, Claudia E. Domini<sup>a</sup>, Nuria Grané<sup>a</sup>, Elefteria Psillakis<sup>b</sup>, Antonio Canals<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Universidad de Alicante, P.O. Box 99, E-03080, Alicante, Spain*

<sup>b</sup> *Department of Environmental Engineering, Technical University of Crete, Polytechniopolis, GR-73100 Chania, Crete, Greece*

Received 30 January 2007; received in revised form 27 March 2007; accepted 28 March 2007

### Abstract

A one-step and in-situ sample preparation method used for quantifying chlorobenzene compounds in water samples has been developed, coupling microwave and headspace single-drop microextraction (MW-HS-SDME). The chlorobenzenes in water samples were extracted directly onto an ionic liquid single-drop in headspace mode under the aid of microwave radiation. For optimization, a Plackett-Burman screening design was initially used, followed by a mixed-level factorial design. The factors considered were: drop volume, aqueous sample volume, stirring speed, ionic strength, extraction time, ionic liquid type, microwave power and length of the Y-shaped glass-tube. The optimum experimental conditions found from this statistical evaluation were: a 5  $\mu$ L microdrop of 1-hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate exposed for 20 min to the headspace of a 30 mL aqueous sample, irradiated by microwaves at 200 W and placed in a 50 mL spherical flask connected to a 25 cm Y-shaped glass-tube. Under the optimised experimental conditions, the response of a high

performance liquid chromatographic system was found to be linear over the range studied and with correlation coefficients ranging between 0.9995 and 0.9999. The method showed a good level of repeatability, with relative standard deviations varying between 2.3 and 8.3% (n=5). Detection limits were found in the low  $\mu\text{g L}^{-1}$  range varying between 0.016 and 0.039  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Overall, the performance of the proposed method demonstrated the favourable effect of microwave sample irradiation upon HS-SDME. Finally, recovery studies from different types of environmental water samples revealed that matrix had little effect upon extraction.

*Keywords: Chlorinated aromatic compounds; Microwave-assisted; Liquid phase microextraction; Ionic liquid; Experimental design; Water analysis; Sample pretreatment*

---

## 1. Introduction

Over the past two decades there have been some major breakthroughs in the area of sample preparation. The new methods that were introduced were specifically developed to provide rapid sample preparation addressing thus many of the challenges related with sample pretreatment. In 1990, Arthur and Pawliszyn developed a new solvent-free extraction technique, termed Solid-Phase Microextraction (SPME), according which target analytes partitioned between the sample matrix and a small amount of extractant phase dispersed on a solid support [1]. SPME rapidly gained the attention of many research groups around the world counting today numerous applications [2,3]. In 1996, the first configuration of solvent microextraction appeared in the literature [4,5] triggering new investigations on sample preparation techniques based on the miniaturization of the traditional liquid-liquid extraction whereby the solvent (acceptor) to aqueous (donor) phase ratio was greatly reduced. A technique that evolved from this approach was single-drop microextraction (SDME). Initially SDME sampling was accomplished using the immersion method, where the extractant phase consisted of a water-immiscible organic solvent microdrop suspended on the tip of a conventional microsyringe, immersed in a water-sample [6-8]. In 2001, the headspace sampling mode (HS-SDME) was introduced enabling extraction/preconcentration of more volatile



analytes from the vapours above the sample, avoiding thus interferences from the sample matrix [9,10]. It is well understood that successful HS-SDME relies on the efficient transfer of target analytes from the sample matrix into the headspace and this is commonly done by using conventional external heat sources. However, previous reports investigating the effect of conventional heating upon HS-SDME concluded that although the amount of target analytes present in the headspace is increased, partition coefficients between the drop and the headspace decrease, limiting thus extraction [11,12].

The possibility of using microwave (MW) energy for the extraction of pollutants from environmental samples has been investigated over the past decade and new analytical protocols have been developed [13-15]. The heating mechanism of microwave, which can be mainly interpreted by dielectric polarization and conduction, is very different from that of conventional heating. Microwaves directly couple with the species present in the sample matrix leading to an instantaneous localized superheating [14]. MW has been successfully coupled in the past with SPME for the analysis of polychlorinated biphenyls [16], organochlorinated pesticides [17], semi-volatile compounds (including six chlorobenzenes) [18] and polycyclic aromatic hydrocarbons [19] in water samples. This could indicate that microwave heating has the potential to improve HS-SDME sampling for organic compounds. To the best of our knowledge there are no reports dealing with the coupling MW and HS-SDME and used for the determination of environmental pollutants present in water samples. Microwave irradiation and HS-SDME has been successfully used in the past for the extraction of medicines from dry roots using a two step procedure (microwave heating and subsequent HS-SDME extraction) [20] and volatile compounds from Chinese herbs (simultaneous microwave and HS-SDME) [21].

The main objective of this study was to evaluate for the first time the possibility of using microwave energy to assist the extraction of chlorobenzene priority listed compounds [22-24] from water samples whilst using HS-SDME. To this end a special home-made experimental set up was prepared allowing MW-HS-SDME extraction of target analytes in one step and in-situ. The system allows to heat the sample-to-headspace step as long as the headspace-to-drop step is not heated. An ionic liquid was used

as the acceptor phase and high performance liquid chromatography-photodiode array detector (HPLC-PDA) was used for separation and detection of target analytes. Factors, such as, drop volume, aqueous sample volume, stirring speed, ionic strength, extraction time, ionic liquid type, microwave power and length of the Y-shaped glass-tube were optimized following a two-step multivariate strategy based on experimental design (Plackett-Burman design for screening and a mixed-level factorial design for optimizing the significant factors). The performance of the optimized method was validated and matrix effects upon extraction were evaluated.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals and "real-world" water samples

Eight chlorobenzene compounds were used in the present studies, namely: 1,2-dichlorobenzene (1,2-DCB), 1,4-dichlorobenzene (1,4-DCB), 1,3-dichlorobenzene (1,3-DCB), 1,2,3-trichlorobenzene (1,2,3-TCB), 1,2,4-trichlorobenzene (1,2,4-TCB), 1,3,5-trichlorobenzene (1,3,5-TCB), 1,2,3,4-tetrachlorobenzene (1,2,3,4-TeCB) and 1,2,4,5-tetrachlorobenzene (1,2,4,5-TeCB) all obtained from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). The internal standard solution consisted of a methanol solution of 1,4-dibromobenzene (1,4-DBB), the reagent was obtained from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Methanol and acetonitrile were HPLC-grade and were obtained from Scharlau Chemie (Barcelona, Spain). Deionised water was prepared on a water purification system (Milli-Q Biocel A10) supplied by Millipore (Billerica, MA, USA). Synthesis-grade ionic liquids (1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate [ $C_4MIM$ ][ $PF_6$ ] and 1-hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate [ $C_6MIM$ ][ $PF_6$ ]), were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium chloride from Merck (Darmstadt, Germany) was used to adjust the ionic strength of the aqueous samples. Stock standard solutions of  $1000\text{ mg L}^{-1}$  of target compounds were prepared in methanol. Working solutions were prepared by dilution of standard stock solutions. All solutions were stored in the dark at  $4^\circ\text{C}$ .

The recovery studies were carried out using tap water from the main area water-supply network of San Vicente del Raspeig (Alicante, Spain),

river water from the Ebro River (Spain) and effluent wastewater (Bilbao, Spain) from a municipal wastewater treatment plant. Samples were collected in 250 mL Pyrex borosilicate amber glass containers with caps, lined with aluminium foil, stored in the dark at 4°C and were analysed without previous treatment or filtration within 48 h of collection. Initial analysis confirmed that they were free of all target analytes.

### *2.2. MW-HS-SDME and HPLC analysis*

The microwave oven used in this work was a domestic Samsung M1711N (2450 MHz, Taiwan) with a maximum power of 800 W, which had a hole (18 mm diameter) in the top of the oven. A microwave stirrer from Scienceware, Bel-Art Products (Pequannock, NJ, USA) was used for stirring the samples at 300 rpm during extraction. The proposed MW-HS-SDME system is shown in Fig. 1 and it is similar to the system shown in Fig. 1 on ref. [17]. Caution: Be aware of microwave leakage. To this end, a general brand microwave leakage detector was used to check the safety aspects.

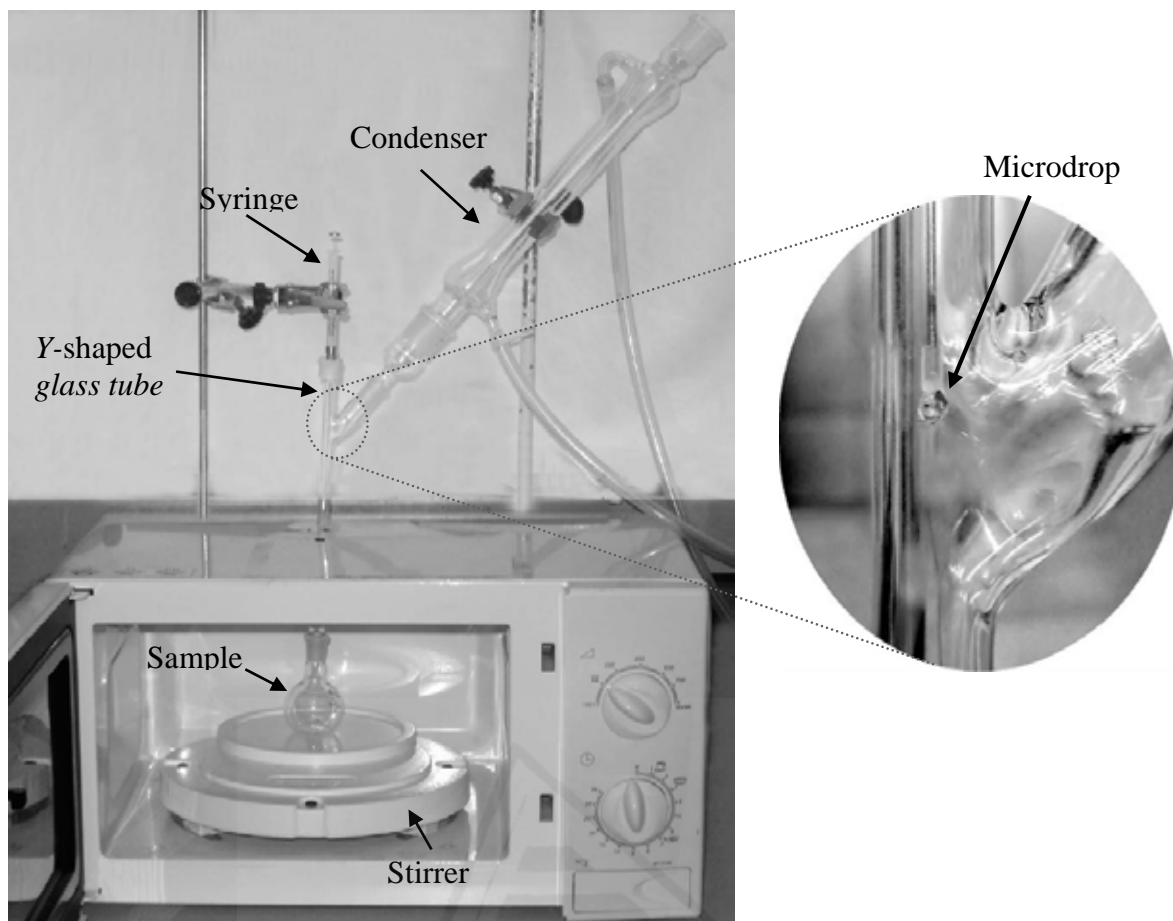


Fig. 1. The assembly of the MW-HS-SDME.

The SDME device consisted of a 25  $\mu\text{L}$  Hamilton Gastight syringe (Model 1702 Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Switzerland; length: 5.1 cm, I.D.: 0.015 cm) where a 3 mm long polytetrafluoroethylene (PTFE) tube (I.D.: 0.8-mm; O.D.:1.6-mm) was fitted to the blunt needle tip, maximising thus the contact area between the drop and the needle tip. All analyses were performed using a 50-mL spherical flask containing 30 mL of sample solution. The flask was connected to a silanized Y-shaped glass-tube (25 cm length, I.D.: 7 mm) one arm of which was connected to a water condenser (temperature, 21°C) (Fig. 1). For all quantification experiments, aqueous samples were also spiked with a known amount of the internal standard solution. The microsyringe (typically containing 5  $\mu\text{L}$  of the ionic liquid acceptor phase) was clamped above the Y-shaped glass-tube and its needle passed through the septum, a turn-over flange stopper obtained from Saint-Gobain Verneret (Charmy, France), until its tip was 5.5 cm below the surface of septum. The plunger was depressed and the microdrop of the

ionic liquid phase was exposed to the headspace of the sample in the Y-shaped glass-tube situated outside the microwave oven. As such, the IL drop was not irradiated when the sample was irradiated at 200 W. It should be mentioned here that in order to avoid a marked increase of the headspace temperature, the sample was initially irradiated for 3 minutes and then MW energy was applied in the pulse mode in cycles consisting of 30 s "on" followed by 60 s "off". The sampling times examined here were 10, 15 and 20 min corresponding to a 5, 7 and 8.5 min of microwave irradiation time, respectively. After extracting the target analytes the microdrop was retracted into the microsyringe, the PTFE tube was removed and the IL acceptor phase was injected into the HPLC system for analysis following a published procedure [12]. In short, a 7725i Rheodyne injector (Rohnert Park, CA, USA) and a Phenomenex Luna C<sub>18</sub> column (250 mm x 4.6 mm, 5µm particle size) were used respectively for injection and separation of the target analytes. A Photodiode Array Detector (PDA) set at 210 nm from Waters (Milford, MA, USA) was used for detecting all target analytes. The mobile phase consisted of a 65:35 (v/v) mixture of acetonitrile-water at a 1 mL min<sup>-1</sup> flowrate. Fig. 1 on Ref. [12] shows a typical chromatogram.

### *2.3. Data handling and processing*

According to previous reports, the response of the instrument used in the present studies was based on the sum of the areas of the individual peaks eluting during HPLC-PDA analysis [12, 25-27].

Experimental design matrices were constructed and the results were evaluated using the Statgraphics Statistical Computer Package "Statgraphics Plus 5.1".

## **3. Results and Discussion**

### *3.1. Screening design*

Screening is the first step in the efficient assessment of the factors involved in the studied analytical system. If a large number of factors are

involved, reduced factorial designs are employed. A particular type of those designs is the Plackett-Burman design [28], which assumes that the interactions can be completely ignored and so the main effects are calculated with a reduced number of experiments. A saturated Plackett-Burman matrix was employed because of the large number of parameters to be tested. A matrix with 11 factors (eight real factors and three fictitious factors or dummy factors) was used. The effects of dummy factors are used for the estimation of the experimental error used in the statistical interpretation [29,30].

Based on the literature and the experience of the laboratories eight real factors were selected to define the experimental field (namely: drop volume, aqueous sample volume, stirring speed, ionic strength, extraction time, ionic liquid type, microwave power and length of the Y-shaped glass-tube) with two levels for each factor. Table 1 gives the examined levels for each factor and matrix design. The latter had 12 runs randomly carried out in order to nullify the effect of extraneous or nuisance factors.

Table 1  
Experimental factors, levels and matrix of the Plackett-Burman design

Factor	Code	Level	
		Low (-)	High (+)
Ionic strength (NaCl concentration; %, w/v)	NaCl	0	30
Drop volume (µL)	D	5	8
Sample volume (mL)	V	10	30
Extraction time (min)	t	10	20
Stirring speed (rpm)	S	0	300
Ionic liquid type	IL	[C <sub>4</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ]	[C <sub>6</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ]
Microwave power (W)	P	100	200
Y-shaped glass-tube length (cm)	L	25	35

Run	NaCl	D	V	t	S	IL	P	L	Dummy 1	Dummy 2	Dummy 3
1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
2	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
3	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
4	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
5	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1
6	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
7	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1
8	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
9	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
10	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

An ANOVA test was used to evaluate the data and statistically significant effects were determined using a *t*-test with a 95% probability [29,30]. Effects were also visualized by drawing normal probability plots for the normalized effects. According to the results, extraction time was the most significant factor having a positive sign for most of the target analytes. Sample volume followed by ionic liquid type were the next most significant factors showing a positive sign for most of the target analytes. Interestingly, microwave power appeared to have a positive yet non-significant effect upon extraction. A possible explanation for this positive behaviour might be the fact that at 200W, microwave radiation is applied for longer times enhancing thus mass transfer from the aqueous sample to the headspace. As expected drop volume showed a negative, yet, non-significant effect. This is in agreement with previously published results [9,12,31-33] and it is attributed to the fact that larger organic solvent drops require extended equilibration times given that mass transfer into the drop is by diffusion alone, representing thus a slow step in the overall extraction procedure [9]. In addition, stirring speed appeared to have a negative non-significant effect. This is most probably due to the fact that the maximum agitation speed that could be applied here was 300 rpm a relatively low value with possibly negligible effect upon extraction. As expected, the Y-shaped glass-tube length appears to have a negative non-significant effect upon extraction. Increasing the length of the glass-tube results in an increase of the headspace volume, reducing thus the total amount of target analytes that can be extracted. Ionic strength also shows a negative non-significant effect and this observation is in agreement with previously published results [12,16,34] and it could be attributed to the existence of a negative interaction between temperature and sodium chloride [12] that produce a negative effect upon extraction. Overall, the results of this first screening study revealed that five factors could be fixed (namely: 200 W microwave power, 5  $\mu$ L ionic liquid drop volume; 25 cm Y-shaped glass-tube length, no agitation or addition of NaCl) for the following optimization step.



### 3.2. Optimization design

Next, a factorial design was carried out to assess the influence of the three main factors on the microwave-microextraction process in order to obtain the optimal working conditions. Given that one of the main factors considered was limited at two levels and the other two were able to work at three levels, a mixed-level factorial design was used. This type of experimental design consists of all level combination of two or more factors, where the user sets the number of levels. In our case, the general mixed-level factorial design is  $\{2^k \times 3^{k'}\}$ , where the exponents represent the number of factors for each level and the bases stand for the levels of each factor in the experiments [35-37]. The factors included in the factorial design were: Ionic liquid type, at two levels ( $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]$  and  $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{PF}_6]$ ), extraction time at three levels (10, 15 and 20 min) and sample volume at three levels (10, 20 and 30 mL) (Table 2). The overall design, expressed as  $\{2^1 \times 3^2\}$ , involved 36 runs (18 runs in duplicate).

Table 2

Experimental factors, levels and matrix of the mixed-level factorial design

Factor	Code	Level		
		Lower (-)	Central (0)	Upper (+)
Sample volume (mL)	V	10	20	30
Extraction time (min)	t	10	15	20
Ionic liquid type	IL	$[\text{C}_4\text{MIM}][\text{PF}_6]$	-	$[\text{C}_6\text{MIM}][\text{PF}_6]$

Run	V	t	IL
1	1	0	-1
2	-1	1	1
3	0	1	-1
4	1	-1	1
5	-1	-1	1
6	0	0	-1
7	1	-1	-1
8	1	1	-1
9	0	0	1
10	-1	-1	-1
11	0	1	1
12	-1	1	-1
13	1	0	1
14	-1	0	1
15	1	1	1
16	0	-1	1
17	0	-1	-1
18	-1	0	-1

The data obtained were evaluated by ANOVA test and the effects were visualized using Pareto chart shown in Fig. 2. As can be seen, sample volume and extraction time were the most significant factors, both exhibiting a positive effect, whilst the type of ionic liquid was found to have a non-significant positive effect. A closer examination of the interaction between two factors revealed that the interaction between sample volume and extraction time (denoted as AB in Fig. 2) was statistically significant, showing a positive effect upon extraction.

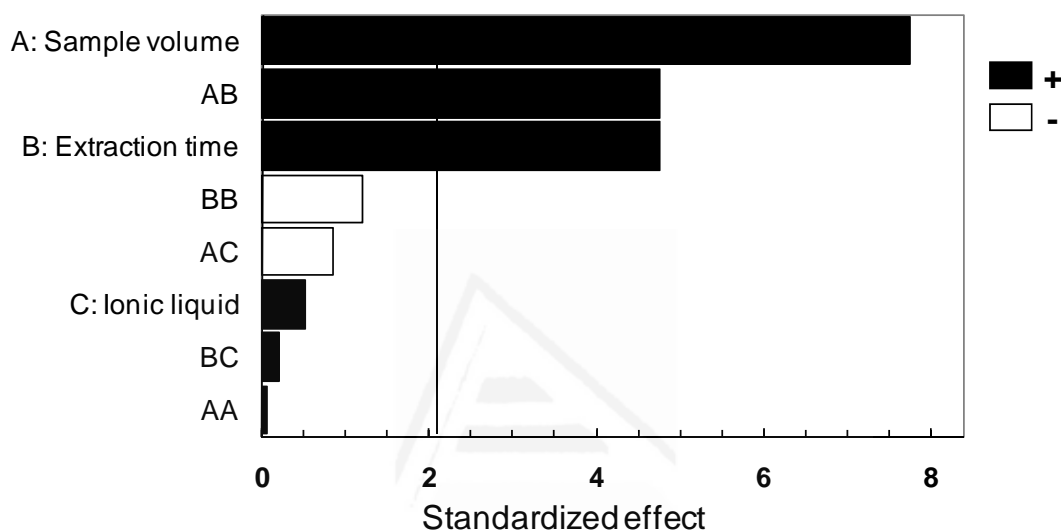


Fig. 2. Pareto chart of the three main factors in the mixed-level factorial design.

Furthermore, plotting the instrumental response as a function of all the factors controlling the extraction process enabled visualisation of the separate effects of pairs of factors. The resulting plots are given in Fig. 3 where the instrument's response surface is obtained by plotting sample volume versus extraction time ( $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{PF}_6]$  as extractant) (Fig. 3a), sample volume versus ionic liquid type (extraction time of 15 min) (Fig. 3b), and extraction time versus ionic liquid type (20 mL sample volume) (Fig. 3c). As can be seen, sample volume shows a clear positive effect upon extraction (Fig. 3a and 3b), reaching a maximum at 30 mL. As expected, increasing the aqueous sample volume appears to be beneficial for the instrument's signal, given that the total amount of analytes present in the reduced headspace is increased. Extraction time also shows a positive effect upon extraction (Fig. 3a and 3c), reaching a maximum at 20 min. Indeed,

increasing the extraction time and as a consequence the irradiation time leads to an increase of the total amount of analytes present in the headspace. Finally, the type of ionic liquid shows a non-significant positive effect (Fig. 3b and 3c) and this observation is in agreement with previously published results [38].

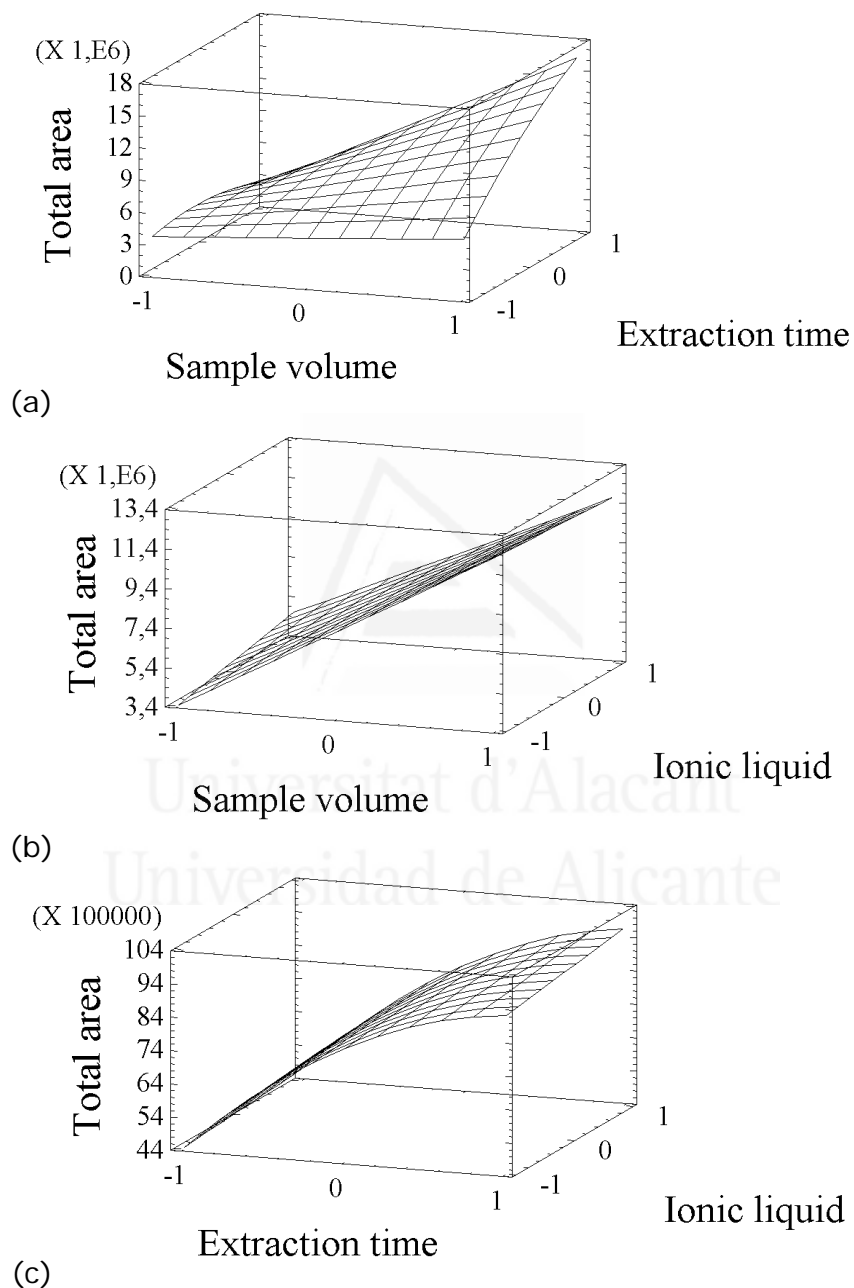


Fig. 3. Response surfaces for total chromatographic peak area using the mixed-level factorial design obtained by plotting: (a) sample volume vs. extraction time (ionic liquid:  $[C_6MIM][PF_6]$ ); (b) sample volume vs. ionic liquid type (extraction time: 15 min); and (c) extraction time vs. ionic liquid type (sample volume: 20 mL).

The results of this second optimization study revealed that the response of the analytical instrument is expected to be maximized when using a 30 mL sample volume, a 20 min extraction time and with [C<sub>6</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] as the acceptor phase. Overall, the results of the two steps yielded the following optimum experimental conditions: 30 mL sample volume; 20 min extraction time; [C<sub>6</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] as ionic liquid; 200 W microwave power; 5  $\mu$ L ionic liquid drop volume; 25 cm Y-shaped glass-tube length, and no agitation or addition of NaCl.

### 3.3. Validation of MW-HS-SDME

The optimum MW-HS-SDME conditions were then used to test the applicability of the proposed method for quantitative determination of target analytes. A calibration study was performed by spiking pure water with analytes over the concentration range of 1-320  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. The calculated calibration curves gave a high level of linearity for all target analytes with correlation coefficients (*r*) ranging between 0.9995 and 0.9999 as shown in Table 3. The repeatability of the proposed method, expressed as relative standard deviation (R.S.D.), was evaluated by extracting five consecutive aqueous samples (spiked at 40  $\mu$ g L<sup>-1</sup> with each target analyte) and was found to vary between 2.3 and 8.3% with a mean value of 4.8% (Table 3). The limits of detection (LODs) for all target analytes were determined according to a signal-to-noise-ratio (S/N) of three and the limits of quantification (LOQs) as ten times the above mentioned ratio. As can be seen in Table 3, the LODs and LOQs values were found to be in the low  $\mu$ g L<sup>-1</sup> level ranging between 0.016 to 0.039  $\mu$ g L<sup>-1</sup> and between 0.054 to 0.130  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, respectively. It should be mentioned here, that these values are considerably lower than the ones previously reported for HPLC analysis of chlorobenzenes in water samples [12,39,40]. In particular when the same HS-SDME approach is adopted without heating, LODs and LOQs were found to range between 0.102 to 0.203  $\mu$ g L<sup>-1</sup> and between 0.338 to 0.677  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, respectively [12]. This clearly demonstrates the favourable effect of microwave heating upon HS-SDME.

Table 3

Main method parameters for the extraction of chlorobenzenes from water samples using the optimized microwave-assisted headspace SDME method

Analyte	Slope $\pm$ SD	Intercept $\pm$ SD	Correlation Coefficient (r) <sup>a</sup>	R.S.D. (%) <sup>b</sup>	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) <sup>c</sup>	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) <sup>d</sup>
1,2-DCB	0.1075 $\pm$ 0.0008	0.1 $\pm$ 0.1	0.9998	2.7	0.024	0.081
1,4-DCB	0.0669 $\pm$ 0.0005	-0.03 $\pm$ 0.07	0.9998	2.3	0.039	0.130
1,3-DCB	0.0951 $\pm$ 0.0003	-0.04 $\pm$ 0.04	0.9999	2.9	0.032	0.108
1,2,3-TCB	0.199 $\pm$ 0.002	-0.4 $\pm$ 0.2	0.9998	5.7	0.016	0.054
1,2,4-TCB	0.168 $\pm$ 0.003	0.2 $\pm$ 0.4	0.9995	5.6	0.022	0.072
1,3,5-TCB	0.218 $\pm$ 0.002	-0.2 $\pm$ 0.2	0.9998	3.8	0.022	0.072
1,2,3,4-TeCB	0.268 $\pm$ 0.002	-0.3 $\pm$ 0.2	0.9998	8.3	0.016	0.054
1,2,4,5-TeCB	0.361 $\pm$ 0.004	0.8 $\pm$ 0.5	0.9996	7.1	0.016	0.054

<sup>a</sup> Linear range: 1-320  $\mu\text{g L}^{-1}$  (number of calibration points=9).

<sup>b</sup> Relative standard deviation (R.S.D.); mean value for five replicate analyses; spiking level 40  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

<sup>c</sup> Limits of detection (LODs) were calculated for a three signal-to-noise ratio (S/N=3).

<sup>d</sup> Limits of quantification (LOQs) were calculated for a ten signal-to-noise ratio (S/N=10).

In order to investigate the effect of sample matrix upon the MW-HS-SDME procedure five replicate analyses of different types of “real-world” water samples (namely tap water, river water and effluent wastewater) were spiked at 40  $\mu\text{g L}^{-1}$  with each target contaminant and were analysed under the optimized experimental conditions. It should be mentioned here that none of these selected samples showed initial detectable concentration of the target compounds. Relative recoveries were determined as the ratio of the concentrations found in real and deionised water samples spiked at the same contamination level [12]. The results for each set of experiments, summarised in Table 4, show that for the tap water samples relative recoveries ranged between 91 and 104%, with a mean value of 99%, for the river water samples between 98 and 106%, with a mean value of 101%, and for effluent wastewater samples between 82 and 99%, with a mean value of 89%. This is in agreement with our previous investigations on the recovery studies using no heated HS-SDME where the relatively elevated R.S.D. values as well as decreased relative recoveries observed in the case of the effluent wastewater matrix were attributed to possible competitive adsorption of target analytes to suspended solids reducing thus the effective concentration of pollutants in the aqueous phase. Nevertheless, the matrix effect in the effluent wastewater has been reduced

for the more hydrophobic target pollutants (namely: 1,2,3,4-tetrachlorobenzene and 1,2,4,5-tetrachlorobenzene) [12].

Table 4

Relative recoveries and R.S.D. values of the eight chlorobenzenes studied in “real-world” water samples

Analyte	Relative recoveries (%) and R.S.D. values (%) in parentheses <sup>a</sup>		
	Tap water	River water	Urban water
1,2-DCB	96.2 (1.8)	100.9 (4.0)	88.6 (7.4)
1,4-DCB	91.4 (5.2)	98.1 (5.9)	83.7 (11.3)
1,3-DCB	96.2 (3.7)	99.0 (5.9)	82.9 (12.0)
1,2,3-TCB	100.1 (2.1)	99.7 (2.3)	94.9 (1.7)
1,2,4-TCB	103.9 (5.6)	101.4 (3.3)	90.8 (5.0)
1,3,5-TCB	101.3 (5.8)	99.7 (4.1)	81.7 (11.7)
1,2,3,4-TeCB	102.5 (4.4)	105.5 (6.1)	98.9 (4.4)
1,2,4,5-TeCB	101.7 (3.4)	100.2 (3.0)	93.3 (1.8)

<sup>a</sup> Five replicate analyses at a 40 µg L<sup>-1</sup> spiking level.

#### 4. Conclusions

A one-step microwave-assisted headspace single-drop microextraction procedure has been developed to extract chlorobenzenes from water samples. The new method combines synergistically the advantages of headspace single-drop microextraction (i.e., miniaturization), ionic liquid as extractant (i.e., environmentally friendly and low vapour pressure) and microwave heating (i.e., speed). The favourable effect of microwave upon headspace single-drop microextraction has been demonstrated and the results indicate that this extraction procedure is efficient, sensitive and precise exhibiting better extraction efficiency when compared to the previous no heated HS-SDME [12].

#### Acknowledgements

The authors would like to thank the Spanish Ministry of Education and Science (projects n. PTR1995-0882-OP-02-01, CTQ2005-09079-C03-01/BQU and CAL03-078-C3-2) for the financial support of this work. This work has been undertaken as part of the EU sponsored COST programme (Action D32, working group D32/005/04, “Microwaves and Ultrasound Activation in Chemical Analysis”). L.V also thanks “Vicerrectorado de

Investigación, Desarrollo e Innovación" of University of Alicante for her scholarship.

## References

- [1] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145.
- [2] H. Lord, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 153.
- [3] C. Dietz, J. Sanz, C. Cámara, *J. Chromatogr. A* 1103 (2006) 183.
- [4] H. Liu, P.K. Dasgupta, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1817.
- [5] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2236.
- [6] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, *Anal. Chem.* 69 (1997) 235.
- [7] Y. He, H.K. Lee, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4634.
- [8] E. Psillakis, N. Kalogerakis, *TrAC Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 53.
- [9] A.L. Theis, A.J. Waldack, S.M. Hansen, M.A. Jeannot, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5651.
- [10] A. Tankeviciute, R. Kazlauskas, V. Vickackaite, *Analyst* 126 (2001) 1674.
- [11] J.-F. Liu, N. Li, G.-B. Jiang, J.-M. Liu, J. Jönsson, M.-J. Wen, *J. Chromatogr. A* 1066 (2005) 27.
- [12] L. Vidal, E. Psillakis, C. Domini, N. Grané, F. Marken, A. Canals, *Anal. Chim. Acta* 584 (2007) 189.
- [13] F. Smith, G. Xiong, The use of microwave-assisted techniques for samples preparation in environmental organic analysis, in: R.A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Wiley, Chichester, UK, 2000.
- [14] C.S. Eskilsson, E. Björklund, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 227.
- [15] V. Camel, *TrAC Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 229.
- [16] Y.Y. Shu, S.S. Wang, M. Tardif, Y. Huang, *J. Chromatogr. A* 1008 (2003) 1.
- [17] H.-P. Li, G.-C. Li, J.-F. Jen, *J. Chromatogr. A* 1012 (2003) 129.
- [18] Y. Huang, Y.-C. Yang, Y.Y. Shu, *J. Chromatogr. A* 1140 (2007) 35.
- [19] M.-C. Wei, J.-F. Jen, *Talanta* 72 (2007) 1269.
- [20] C. Deng, Y. Mao, F. Hu, X. Zhang, *J. Chromatogr. A* 1103 (2006) 15.
- [21] C. Deng, Y. Mao, F. Hu, X. Zhang, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 193.

- [22] World Health Organisation (WHO), 10th Report on Carcinogens, National Toxicology Program, Public Health Service, 2002.
- [23] EC (European Community) Council Directive 76/464/EEC on pollution caused by certain dangerous substances discharged into the aquatic environment of the Community. Official Journal L 129, 18 May 1976.
- [24] EC (European Community), 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for Community action in the field of water policy. Official Journal L 327, 22 December 2000.
- [25] F. Pellati, S. Benvenuti, F. Yoshizaki, D. Bertelli, M. Rossi, J. Chromatogr. A 1087 (2005) 265.
- [26] R. Castro, R. Natera, M. García, C. García, J. Chromatogr. A 953 (2002) 7.
- [27] P. Diaz, F.J. Señoráns, G. Reglero, E. Ibáñez, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 6468.
- [28] R.H. Myers, D.C. Montgomery, Response Surface Methodology, Wiley, New York, 2002.
- [29] H. Fabre, N. Mesplet, J. Chromatogr. A 897 (2000) 329.
- [30] Y.V. Heyden, C. Hartmann, D.L. Massart, L. Michel, P. Kiechle, F. Erni, Anal. Chim. Acta 316 (1995) 15.
- [31] L. Vidal, A. Canals, N. Kalogerakis, E. Psillakis, J. Chromatogr. A 1089 (2005) 25.
- [32] A. Przyjazny, J.M. Kokosa, J. Chromatogr. A 977 (2002) 143.
- [33] S. Shariati-Feizabadi, Y. Yamini, N. Bahramifar, Anal. Chim. Acta 489 (2003) 21.
- [34] Y.-I. Chen, Y.-S. Su, J.-F. Jen, J. Chromatogr. A 976 (2002) 349.
- [35] D.C. Montgomery, Design and Analysis of Experiments, Wiley, New York, 2005.
- [36] J. Lamas, C. Salgado, C. García, M. Llompart, R. Cela, M. Gómez, J. Chromatogr. A 1046 (2004) 241.
- [37] V. Casas, M. Llompart, C. García, R. Cela, T. Dagnac, J. Chromatogr. A 1124 (2006) 148.
- [38] J.-F. Liu, G.-B. Jiang, Y.-G. Chi, Y.-Q. Cai, Q.-X. Zhou, J.-T. Hu, Anal. Chem. 75 (2003) 5870.
- [39] P. Jandera, J. Fischer, B. Prokes, Chromatographia 54 (2001) 581.



- [40] J. Lehotay, K. Hromulakova, J. Liq. Chromatogr. Related Technol. 20 (1997) 3193.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**Capítulo 4. Nuevos materiales como fase extractante:  
Nanomateriales de carbón**

---



El trabajo presentado en este capítulo difiere del presentado en los capítulos anteriores. Se presenta la posibilidad de utilizar un nuevo material, cuya aplicación original es totalmente diferente de la que aquí se propone, como fase extractante.

Como ha sido comentado en el capítulo II.6., diferentes formas de nanomateriales de carbón han sido utilizadas anteriormente en la extracción de analitos. Por ello, el objetivo de este trabajo es presentar las nanopartículas de carbón funcionalizadas superficialmente con grupos tosilo como un nuevo tipo de material extractante.

Para mostrar su utilidad como fase extractante se eligieron dos analitos modelo, el filtro UV BZ3 y el anti-microbiano triclosán, actualmente muy utilizados en productos de cuidado personal y farmacéuticos.

La extracción de los analitos se realiza mediante dos configuraciones, las cuales son descritas a continuación, y la determinación se lleva a cabo mediante voltamperometría cíclica utilizando un sistema potenciostato de tres electrodos.

La parte experimental de este trabajo fue realizada durante una estancia en la Universidad de Bath (Inglaterra), bajo la dirección del doctor Frank Marken.



ELSEVIER

ANALYTICA  
CHIMICA  
ACTA

www.elsevier.com/locate/aca

Analytica Chimica Acta 616 (2008) 28-35

## Chemically surface-modified carbon nanoparticle carrier for phenolic pollutants: Extraction and electrochemical determination of benzophenone-3 and triclosan

Lorena Vidal<sup>a</sup>, Alberto Chisvert<sup>a</sup>, Antonio Canals<sup>a</sup>, Eleftheria Psillakis<sup>b</sup>, Alexei Lapkin<sup>c</sup>, Fernando Acosta<sup>c</sup>, Karen J. Edler<sup>d</sup>, James A. Holdaway<sup>d</sup>, Frank Marken<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Universidad de Alicante, P.O. Box 99, E-03080, Alicante, Spain

<sup>b</sup> Laboratory of Aquatic Chemistry, Department of Environmental Engineering, Technical University of Crete, Polytechniopolis, 73100 Chania-Crete, Greece

<sup>c</sup> Department of Chemical Engineering, University of Bath, Bath BA2 7AY, UK

<sup>d</sup> Department of Chemistry, University of Bath, Bath BA2 7AY, UK

Received 2 February 2008; received in revised form 2 April 2008; accepted 6 April 2008

### Abstract

Chemically surface-modified (tosyl-functionalized) carbon nanoparticles (Emperor 2000 from Cabot Corp.) are employed for the extraction and electrochemical determination of phenolic impurities such as benzophenone-3 (2-hydroxy-4-methoxybenzophenone) or triclosan (5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol). The hydrophilic carbon nanoparticles are readily suspended and separated by centrifugation prior to deposition onto suitable electrode surfaces and voltammetric analysis. Voltammetric peaks provide concentration information over a 10–100  $\mu\text{M}$  range and an estimated limit of detection of ca. 10  $\mu\text{M}$  (or 2.3 ppm) for benzophenone-3 and ca. 20  $\mu\text{M}$  (or 5.8 ppm) for triclosan.

Alternatively, analyte-free carbon nanoparticles immobilized at a graphite or glassy carbon electrode surface and directly immersed in analyte solution bind benzophenone-3 and triclosan (both with an estimated Langmuirian binding constants of  $K \approx 6000 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$  at pH 9.5) and they also give characteristic voltammetric responses (anodic for triclosan and cathodic for benzophenone-3) with a linear range of ca. 1–120  $\mu\text{M}$ . The estimated limit of detection is improved to ca. 5  $\mu\text{M}$  (or 1.2 ppm) for benzophenone-3 and ca. 10  $\mu\text{M}$  (or 2.3 ppm) for triclosan. Surface functionalization is discussed as the key to further improvements in extraction and detection efficiency.

*Keywords:* Carbon nanoparticle; Voltammetry; Sensor; Extraction; Benzophenone-3; UV filter; Triclosan; Fungicide; Biocide.

## 1. Introduction

The recently increased interest in the analysis of ingredients in pharmaceutical and personal care products (PCP) entering the environment is due to the need to monitor the build up of detectable and potentially harmful concentrations [1]. In addition to the well-recognized “priority” pollutants (pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, etc.) the release and transportation pathways of pharmaceutical and PCP ingredients into the aquatic environment has attracted particular attention [2,3]. The occurrence of pharmaceutical residues in the environment was recognized in 1976 [4] and confirmed in untreated sewage [5], surface water [6,7], groundwater, and in drinking water [3,8].

Active ingredients of sunscreens in particular UV filters (which help to reduce skin damage from sunlight [9] and which are now part of many everyday products such as face creams, after shave products, shampoos, lipsticks, makeup formulations, etc.) are potentially toxic [10,11] and now widely found in the environment. Toxicity studies carried out in vitro or in vivo seem to indicate that some UV filters have significant estrogenic and/or antiandrogenic activity [12–14]. However, a study on changes in hormonal levels of human volunteers after applying certain sunscreen products seems to indicate that these are only minor effects [15]. Benzophenone-3 (BZ3), also known as oxybenzone or 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (see Fig.

1), is by far the most commonly used UV filter in cosmetic formulations worldwide [16].

Anti-microbial agents, which are used in many PCP products, can also be found in the environment. Triclosan, 5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol (see Fig. 1), is an active ingredient in many household disinfectants and has been used extensively in improving environmental hygiene [17]. This chemical can also be found as an antiseptic component in medical products such as hand disinfecting soaps, medical skin creams, dental products, as well as in cosmetic products, deodorants, etc. As a consumer product ingredient, the majority of triclosan enters sewer systems and is transported to wastewater sewage treatment plants. Triclosan has been detected in sewage sludge, discharge effluent, receiving surface waters and sediments [16,18]. This compound has also been found in rivers, lakes and the open sea at  $\text{ng L}^{-1}$  levels [19–21]. The toxicity of triclosan on humans has been investigated for many years. The adverse effects include only mild itching and allergic redness on sensitive skins. Thus, triclosan is generally regarded as a low toxicity chemical [22,23]. However, under some conditions photodegradation of triclosan may lead to the formation of dioxin-type derivatives, chlorophenols, and chloroform [24,25], which may require monitoring.

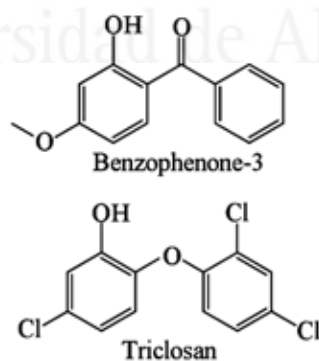


Fig. 1. Chemical structures of benzophenone-3 and triclosan.

This study focuses on the determination of the widely used ingredients benzophenone-3 and triclosan. The extraction and determination in water samples is the main aim of this work. Previously, extraction and determination of these substances in water samples has

been attempted by solid phase microextraction (SPME) [26–28], solid phase extraction (SPE) [24,29], ad-vesicle solid phase dispersion (ASPD) [30], stirbar sorptive extraction (SBSE) [31], semi-permeable membrane devices (SPMDs) [32,33], liquid–liquid extraction (LLE) [34,35] and cloud point extraction (CPE) [36] coupled to chromatography, and by electrochemical methods [37–39].

A range of carbon materials, such as nanotubes and nanofibers have been used in solid phase extraction [40] and solid phase microextraction [41–43] usually as extractant phases for organic compounds. Carbon nanoparticles (or chemically surface functionalized carbon black) represent a very interesting carbon material which offers all the advantages of nanocarbons (extremely high surface area, adsorption sites, reactive surface sites, conductivity, etc.). Here a hydrophilic type of carbon nanoparticles with a tosyl functionalized surface is employed. These carbon nanoparticles are shown to provide a new pre-concentration or extraction tool/material for benzophenone-3 and for triclosan analytes in water samples. Two approaches are employed based on (i) the addition of carbon nanoparticles to the analyte solution, centrifugation, separation and transfer to an electrode surface and voltammetric determination and (ii) the immobilization of carbon nanoparticles at carbon electrode surfaces and direct voltammetric determination. The effectiveness of the two methods is compared and an estimate of the binding constant of the pollutants to the carbon nanoparticle surface is obtained.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemical reagents

Benzophenone-3 (2-hydroxy-4-methoxybenzophenone, oxybenzone or BZ3) 98% was obtained from Aldrich (Steinheim, Germany). Triclosan (Irgasan, 5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol) 97% was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). Carbon nanoparticles (ca.7.8 nm mean diameter, Emperor 2000) were obtained from Cabot Corporation (Dukinfield, United Kingdom). De-ionized water (resistivity not less than 18 M $\Omega$  cm) was obtained from a water purification system (Milli-Q Biocel A10)



supplied by Millipore (Billerica, MA, USA). Potassium phosphate dibasic salt (98%) and potassium hydroxide pellets (85%) from Aldrich were used to prepare phosphate buffer solutions. Argon (Pureshield, BOC) was employed for de-aeration of electrolyte solutions. Experiments were conducted at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ .

## 2.2. Instrumentation

A three-electrode micro-Autolab III potentiostat system (Eco Chemie, NL) was employed to control the potential at the working electrode. The counter electrode was a platinum wire (0.5 mm diameter, 2 cm long) and a KCl saturated calomel electrode (SCE, Radiometer) was the reference electrode. The working electrode consisted of a 4.9 mm diameter basal plane pyrolytic graphite inlaid disc ('Pyrocarbon', LeCarbone Ltd., Sussex, UK) or 3 mm diameter glassy carbon inlaid disc (BAS Analytical). Working electrodes were polished on microcloth (Buehler) with 1  $\mu\text{m}$  alumina abrasive after measurements and prior to surface modification. A Hydrus 300 pH meter and FB 11012 ultrasonic bath (Fisher, UK) were used for the pH measurements and sample sonication, respectively. An Eppendorf (Hamburg, Germany) 5415D centrifuge was used to separate carbon nanoparticles from the analyte solution.

BET isotherm data were recorded on a Micrometrics ASAP 2010 BET V5.02 using a 5-point method. The sample was carefully dried at  $150^\circ\text{C}$  under vacuum before analysis. Scanning electron microscopy images were obtained with a Leo 1530 Field Emission Gun Scanning Electron Microscope (FEGSEM) system after gold sputter coating of the sample. A SAXS/WAXS (simultaneous small-angle X-ray scattering and wide-angle X-ray scattering) pattern of the colloidal carbon nanoparticle solution (6 wt.% in water) was obtained on a SAXSess system using a PW3830 X-ray generator, and the X-ray image plates were observed using a Perkin Elmer cyclone storage phosphor system. A colloidal solution in a capillary was employed and the patterns recorded in transmission mode with Cu K $\alpha$  radiation ( $1\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ ) at 40 kV and 50 mA with an exposure time of 20 min. A background pattern from a clean capillary was subtracted and the data corrected for slit smearing before fitting the SAXS data (employing the

package from the SANS group at NIST [44]). Spherical graphite particles of  $1.9 \text{ g cm}^{-3}$  density were assumed.

### 2.3. Procedures

#### 2.3.1. Extraction with carbon nanoparticles and voltammetric determination

For the extraction process employing carbon nanoparticles in the analyte solution, 1 mg of the nanoparticles were added to 4 mL of the analyte solution (0.1 M phosphate buffer pH 9.5 containing either triclosan with  $\text{pK}_A \approx 8$  [45] or benzophenone-3 with  $\text{pK}_A \approx 9.5$  [46]; the buffer pH was selected to provide sufficient solubility for both systems and there is currently no systematic data available on the effect of the pH on the extraction process) and sonicated for 10 minutes. Next, 1 mL of this solution was centrifuged for 20 minutes at 8000 rpm. Once the nanoparticles with adsorbed analyte were separated from the suspension, 600  $\mu\text{L}$  of de-ionized water were added and the carbon nanoparticles were re-suspended with ultrasound. Finally, 40  $\mu\text{L}$  of the latter suspension (with 17  $\mu\text{g}$  carbon nanoparticles) were deposited onto the electrode surface and dried in an oven at 90  $^\circ\text{C}$ . Once the evaporation was completed, the electrode was introduced into the electrochemical cell (containing an aqueous 0.1 M phosphate buffer solution at pH 9.5) for voltammetric measurement. In some cases the extraction process was repeated (adding again 1 mg carbon nanoparticles into the remaining analyte solution) to explore the effectiveness of the extraction process.

#### 2.3.2. Immobilisation of carbon nanoparticles and direct voltammetric determination

For the second process based on the in situ preconcentration and measurement, films of carbon nanoparticles on the electrode surface were prepared by depositing 40  $\mu\text{L}$  drop of a suspension, which contained 3 mg of carbon nanoparticles in 10 mL of de-ionized water (suspended by sonicating for 30 minutes). This electrode (with 12  $\mu\text{g}$  carbon nanoparticles) is then employed directly by immersion into a solution of analyte in aqueous 0.1 M

phosphate buffer at pH 9.5, a 5 minute pre-concentration at open circuit, and direct voltammetric measurement.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. *Extraction of benzophenone-3 from aqueous media onto surface-modified carbon nanoparticles*

Hydrophilic carbon nanoparticles offer an interesting adsorbent material for impurities in water and in particular for traces of aromatic compounds. The intrinsic electrical conductivity of carbon also provides the basis for the electrochemical detection of adsorbed species at the carbon nanoparticle surface. Due to the surface functionalisation of these nanoparticles with anionic tosyl groups they are readily dispersed (with ultrasound) and they offer a considerable surface area for extraction purposes.

Analysis of the surface area of the dry carbon nanoparticle powder gives a BET isotherm area of  $346 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  (5 point BET, see Section 2). When assuming spherical carbon particles with the density of graphite a radius of ca. 3.9 nm can be predicted based on this BET surface area. Scanning electron micrographs (see Fig. 2A) of the carbon nanoparticle material confirm a particle size in the order of 5 nm radius. Next, small angle X-ray scattering experiments were carried out with a colloidal solution of 6% (w/v) carbon nanoparticles in water in order to further quantify the particle radius (see Fig. 2B). The mean particle radius 3.8 nm obtained by fitting the model of spherical particles is in excellent agreement with the BET prediction and the Schultz distribution shown in Fig. 2C represents a measure of the range of particle sizes encountered in this material.

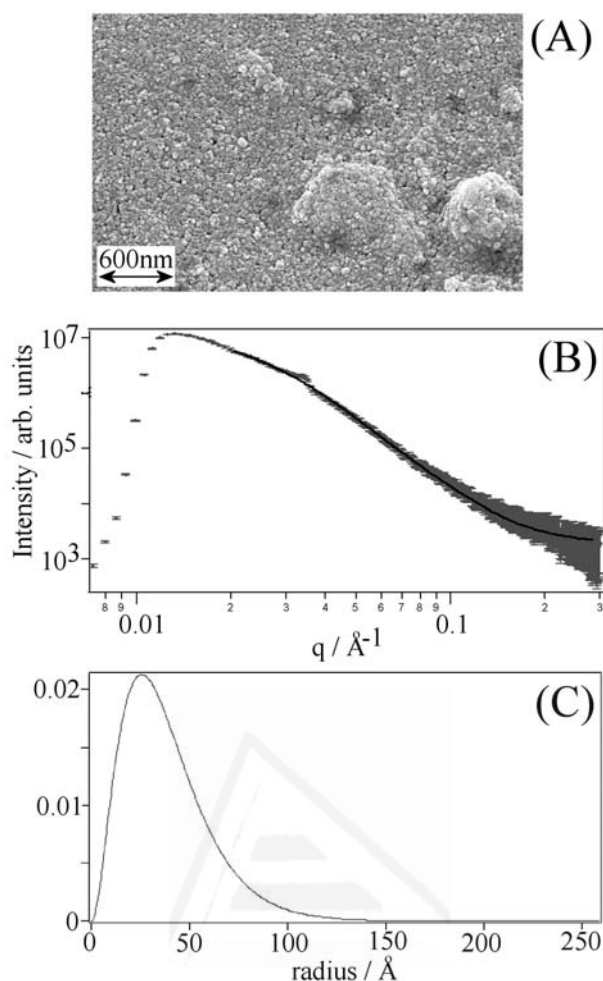


Fig. 2. (A) SEM image of carbon nanoparticles (gold sputter coated prior to imaging). (B) SAXS data (with error bars shown) for a 6% (w/v) carbon nanoparticle solution in water. The black line shows the theoretical fit assuming spherical particles with a mean radius of  $38 \pm 2 \text{ \AA}$  and a polydispersity of 0.57. (C) Schultz distribution calculated by fitting SAXS data.

Extraction experiments were first carried out in solution of analyte (benzophenone-3) in aqueous 0.1 M phosphate buffer pH 9.5. After addition of carbon nanoparticles, sonication, and centrifugation (see Section 2), a solid carbon nanoparticle residue is obtained with the analyte bound to the surface. A small amount of the re-suspended carbon nanoparticles ( $17 \mu\text{g}$ ) are then deposited onto an electrode surface and used for voltammetric analysis. Figure 3A and B shows typical voltammetric responses observed at glassy carbon and at basal plane pyrolytic graphite electrodes.

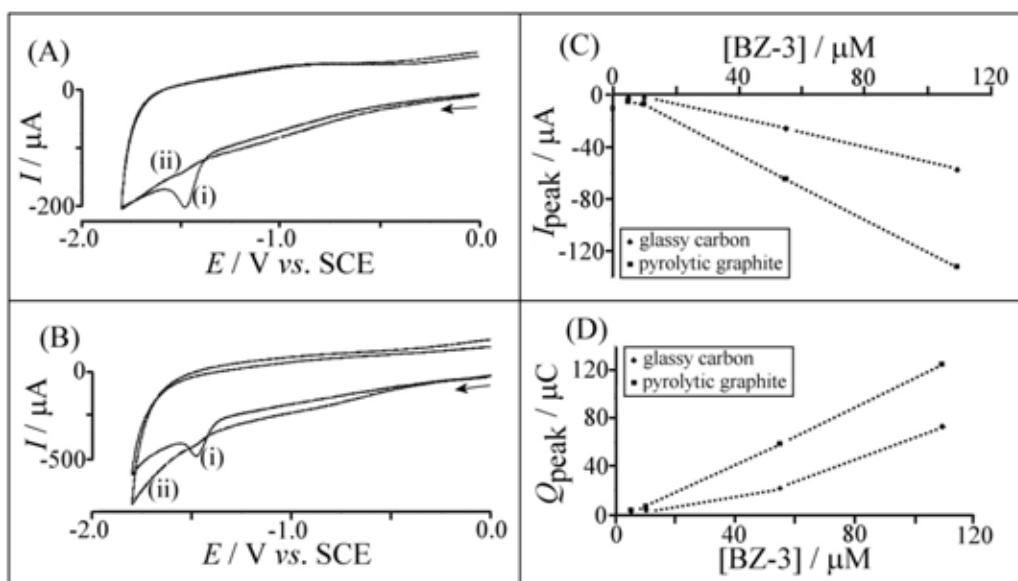
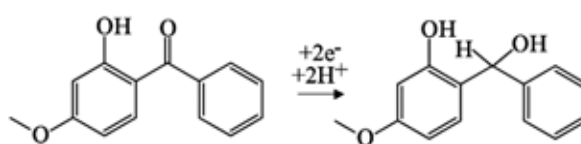


Fig. 3. (A) Cyclic voltammograms (scan rate  $0.1 \text{ V s}^{-1}$ ) obtained at a 3-mm-diameter glassy carbon electrode for the reduction of benzophenone-3 immobilized at carbon nanoparticles ( $17 \mu\text{g}$  immobilized at the electrode surface) after extraction from a solution of  $109 \mu\text{M}$  benzophenone-3 in aqueous  $0.1 \text{ M}$  phosphate buffer pH 9.5. Scan (i) shows the voltammetric response after the first extraction and scan (ii) shows the response after a consecutive second extraction. (B) Voltammetric data for the same experiment carried out with a 4.9-mm-diameter basal plane pyrolytic graphite electrode. (C) Plot of the cathodic peak current for the reduction of benzophenone-3 versus the starting concentration in the analyte solution. (D) Plot of the cathodic peak charge for the reduction of benzophenone-3 versus the starting concentration in the analyte solution.

Results obtained with the basal plane pyrolytic graphite electrode are slightly better probably due to the higher surface area and better adhesion of the carbon nanoparticles. It can be seen that with a scan rate of  $0.1 \text{ V s}^{-1}$  a well-defined reduction peak response occurs at a potential of  $-1.48 \text{ V}$  versus SCE. This reduction response is consistent with literature reports [47,48] and it can be identified as the two-electron reduction of benzophenone-3 (see eq. (1)).



(1)

Both, the peak current and the peak charge (see Fig. 3C and D) are dependent on the concentration of benzophenone-3. The approximately linear dependence suggests that under conditions chosen in this experiment, the surface of the carbon nanoparticles is far from saturated. The limit of detection is governed by the considerable capacitive background current and can be estimated from the plot in Fig. 3D as 10  $\mu\text{M}$  (or 2.3 ppm).

During the extraction process the solution is considerably depleted of benzophenone-3. A repeat extraction employing the same analyte solution (adding another 1 mg into 4 mL) shows only very low signals (see Fig. 3A and B) consistent with only traces of benzophenone-3 remaining in solution after the first extraction. In fact the ratio of the peak currents observed in the first and in the second extraction can be employed to derive an approximate value for the binding constant (vide infra).

### *3.2. Extraction of triclosan from aqueous media onto surface-modified carbon nanoparticles*

Next, extraction experiments with triclosan (5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)-phenol) are reported. Triclosan is soluble in alkaline aqueous media and used here in 0.1 M phosphate buffer solution at pH 9.5. Carbon nanoparticles added into the solution, sonicated for 10 minutes, and then extracted by centrifugation were deposited onto glassy carbon (Fig. 4A) and basal plane pyrolytic graphite (Fig. 4B) electrodes.

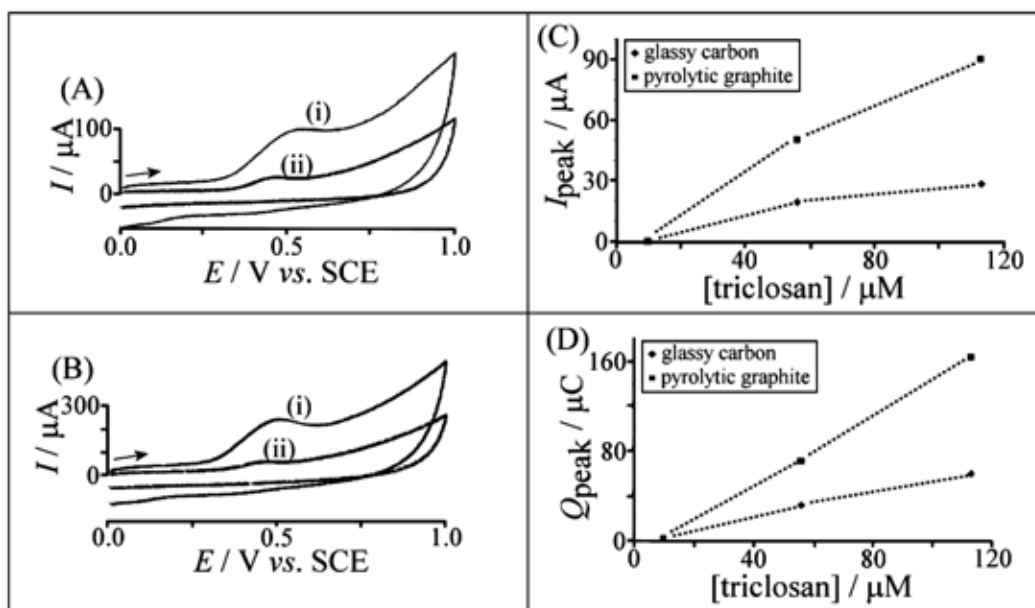
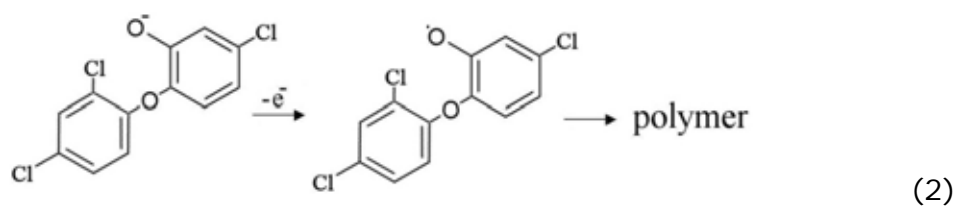


Fig. 4. (A) Cyclic voltammograms (scan rate  $0.1 \text{ V s}^{-1}$ ) for the oxidation of triclosan adsorbed onto carbon nanoparticles (1 mg of carbon nanoparticles in 4 mL of  $113 \text{ } \mu\text{M}$  triclosan in  $0.1 \text{ M}$  phosphate buffer pH 9.5) and immobilized onto a 3-mm-diameter glassy carbon electrode ( $17 \text{ } \mu\text{g}$  carbon nanoparticles were deposited by evaporation of an aqueous suspension, see Section 2). The voltammetric responses are shown for the first extraction process (i) and for the second extraction process (ii). (B) The same experiment conducted with a 4.9-mm-diameter basal plane pyrolytic graphite electrode. (C) Plot of the peak current for the triclosan oxidation versus analyte concentration. (D) Plot of the charge under the triclosan oxidation peak versus analyte concentration.

The characteristic oxidation response for triclosan at  $0.5 \text{ V}$  versus SCE is observed and the peak current and the peak charge (see Fig. 4C and D) are found to be proportional to the analyte concentration. The oxidation is chemically irreversible and has been proposed to follow a one-electron pathway [49] (see eq. (2)).



The peak observed after the second extraction (see scan (ii) in Fig. 4A and B) is considerably lower suggesting under the conditions of the

experiment an approximately 90% effective removal of triclosan from the solution (the ratio of first extraction peak current to second extraction peak current is approximately 10). The limit of detection under these conditions can be estimated from the plot in Fig. 4D as ca. 20  $\mu\text{M}$  (or 5.8 ppm).

In both extraction experiments, for benzophenone-3 and for triclosan, the ratio of the peak current after the first extraction and the peak current after the second consecutive extraction is approximately 10 suggesting similar binding ability under these conditions. It is interesting to evaluate this parameter by introducing a simple Langmuir binding model (eq. (3)).

$$\frac{\Gamma_1}{\Gamma_0} = \frac{Kc_1}{1 + Kc_1} \quad (3)$$

In this equation the surface coverage,  $\Gamma_1$ , is given by the available surface sites,  $\Gamma_0$ , the binding constant,  $K$ , and the solution concentration after the first extraction,  $c_1$ . After equilibration the concentration  $c_1 = c_0 - \frac{\Gamma_1 A}{V}$  will be lower than the initial concentration  $c_0$  due to the surface coverage  $\Gamma_1$  multiplied by the carbon nanoparticle area  $A$  and divided by the solution volume  $V$ . The parameter  $c_1$  in eq. (3) is substituted and the expression resolved for  $\Gamma_1$ . The resulting expression for the coverage (which is assumed to be proportional to the peak current) as a function of the initial concentration is a quadratic expression (see eq. (4)).

$$\Gamma_1 = \left( \frac{c_0 V}{2A} + \frac{V}{2AK} + \frac{\Gamma_0}{2} \right) - \sqrt{\left( \frac{c_0 V}{2A} + \frac{V}{2AK} + \frac{\Gamma_0}{2} \right)^2 - \frac{c_0 \Gamma_0 V}{A}} \quad (4)$$

Fig. 5A shows a plot of the surface coverage predicted under the experimental conditions ( $V = 4 \times 10^{-6} \text{ m}^3$ ,  $A = 0.346 \text{ m}^2$ ,  $\Gamma_0 = 2.7 \times 10^{-6} \text{ mol m}^{-2}$  assuming a molecular area of ca.  $2 \times 10^{-19} \text{ m}^2$ ) and for three different binding constants. An expression similar to eq. (4) but for the second extraction (using  $c_2 = c_0 - \frac{\Gamma_1 A}{V} - \frac{\Gamma_2 A}{V}$ ) can be employed similarly to



express the surface coverage  $\Gamma_2$ . The plot in Fig. 5B shows the ratio of coverage for the first and second extraction (which is assumed to be approximately equivalent to the ratio of the peak currents observed for the first and second extraction). As expected, at very high analyte concentration the ratio is unity but at very low concentration the ratio becomes constant and proportional to the binding constant.

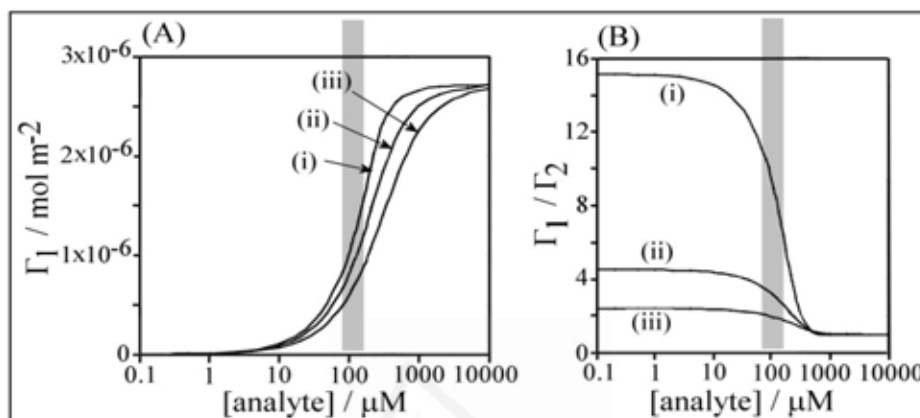


Fig. 5. (A) Plot of the surface coverage during the first extraction step assuming (i)  $K = 60,000 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ , (ii)  $K = 15,000 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ , and (iii)  $K = 6000 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$  ( $V = 4 \times 10^{-6} \text{ m}^3$ ,  $A = 0.346 \text{ m}^2$ ,  $\Gamma_0 = 2.7 \times 10^{-6} \text{ mol m}^{-2}$  assuming a molecular area of ca.  $2 \times 10^{-19} \text{ m}^2$ ). (B) Plot of the ratio of surface coverages in extraction 1 and 2 versus the initial analyte concentration. The grey zone is indicating the experimental value of  $109 \mu\text{M}$  (see above).

Based on the ratio of the peak currents for the first and second extraction of approximately 10 for an analyte concentration of  $109 \mu\text{M}$  (see Figs. 3A and B and 4A and B), the binding constant can be estimated from Fig. 5B as  $K \approx 60,000 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$  (curve (i)). However, this value has to be regarded only as a higher limit due to considerable uncertainty in the peak current data. It can be seen that plots in Fig. 4C and D and 3C and D do not go through the origin, and therefore, low concentration peaks are smaller than predicted from a simple linear relationship. Also, the charge under the voltammetric peaks is lower than that expected based on the simple Langmuir model. It seems, therefore, likely that after immersion of the modified electrode into the analyte-free buffer solution gradual loss of analyte or loss of some carbon material from the surface occurs. In the next

section an alternative approach to quantitative analysis of analyte binding is investigated.

### *3.3. Voltammetric determination of benzophenone-3 at carbon nanoparticle modified electrodes*

Next, voltammetric experiments were conducted with the carbon nanoparticles directly immobilized at the electrode surface which is then immersed directly into the analyte solution (see Section 2). In this way, the carbon nanoparticles act as the adsorption medium and enhanced voltammetric signals are observed without changing the solution. In stagnant solution, carbon nanoparticles were found to remain immobilized at the electrode surface and a typical set of voltammograms for the reduction of benzophenone-3 is shown in Fig. 6A. A well-defined chemically irreversible reduction response is observed in the presence of 12  $\mu\text{g}$  carbon nanoparticles and for concentrations of 5, 10, 55, and 109  $\mu\text{M}$  benzophenone-3 in aqueous 0.1 M phosphate buffer pH 9.5. In the absence of the carbon nanoparticles a much smaller reduction response is detected.

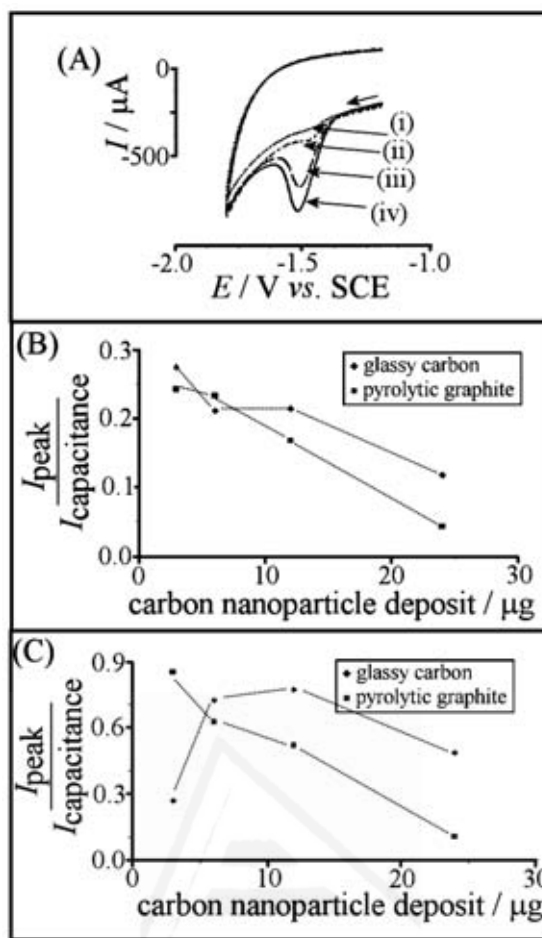


Fig. 6. (A) Cyclic voltammograms (scan rate  $0.1 \text{ V s}^{-1}$ ) for the reduction of benzophenone-3 at a 4.9-mm-diameter basal plane pyrolytic graphite electrode with  $12 \mu\text{g}$  carbon nanoparticles immobilised and immersed in (i)  $5 \mu\text{M}$ , (ii)  $10 \mu\text{M}$ , (iii)  $55 \mu\text{M}$ , and (iv)  $109 \mu\text{M}$  benzophenone-3 in  $0.1 \text{ M}$  phosphate buffer pH 9.5. (B) Plot of the normalized peak current (peak current/capacitive current) for the reduction of  $10 \mu\text{M}$  benzophenone-3 in  $0.1 \text{ M}$  phosphate buffer pH 9.5 versus the amount of carbon nanoparticles deposited at the electrode surface. (C) Plot of the normalized peak current (peak current/capacitive current) for the oxidation of  $10 \mu\text{M}$  triclosan in  $0.1 \text{ M}$  phosphate buffer pH 9.5 versus the amount of carbon nanoparticles deposited at the electrode surface.

The amount of carbon nanoparticles employed in these experiments is crucial, and therefore, several sets of experiments were conducted to optimize this parameter. Data in Fig. 6B shows the normalized peak current (the peak current divided by the capacitive current) for the benzophenone-3 reduction. Perhaps surprisingly, this value is reduced for higher loading which suggests an increased capacitive background with only little

improvement in the faradaic signal. It seems possible that for a higher loading with carbon nanoparticles the time for uptake of analyte increases significantly and only the capacitive current is increased. Therefore, under conditions of the experiment a carbon nanoparticle deposit of 12  $\mu\text{g}$  was chosen as a compromise to provide good sensitivity for both glassy carbon and basal plane pyrolytic graphite at low concentration of analyte.

Next, the effect of the benzophenone-3 concentration on the reduction response is investigated. Data in Fig. 7A and B demonstrate a systematic change in the peak current with concentration for both glassy carbon and graphite electrodes.

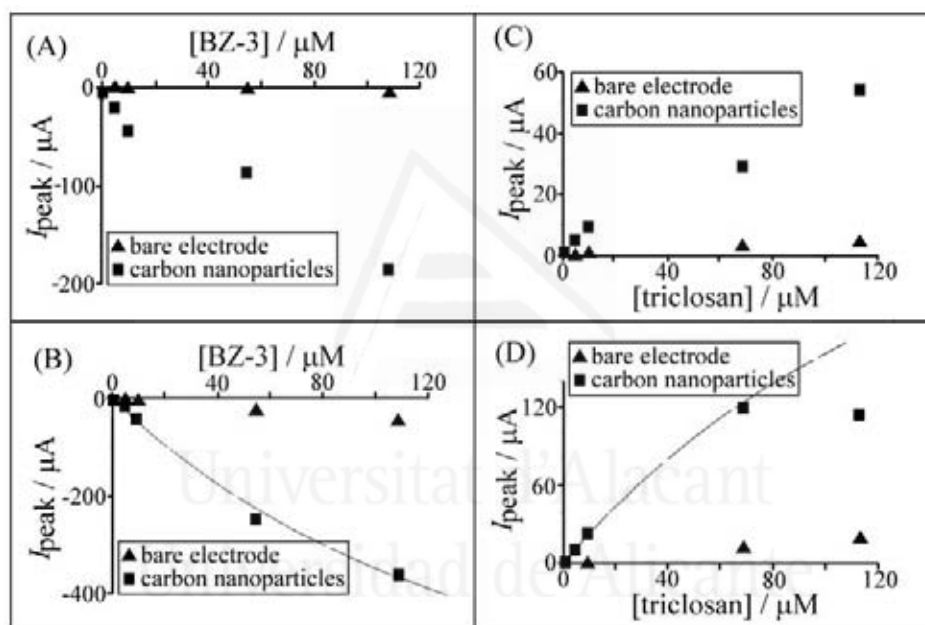


Fig. 7. (A) Plot of the voltammetric peak current (scan rate  $0.1 \text{ V s}^{-1}$ ) for the reduction of benzophenone-3 at a 3-mm-diameter glassy carbon electrode with 12  $\mu\text{g}$  carbon nanoparticles versus concentration in aqueous 0.1 M phosphate buffer pH 9.5. (B) Plot for data obtained at a 4.9-mm-diameter basal plane pyrolytic graphite electrode. The line is indicating a Langmuir isotherm trend line with  $K \approx 6000 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ . (C) Plot of the voltammetric peak current (scan rate  $0.1 \text{ V s}^{-1}$ ) for the oxidation of triclosan at a 3-mm-diameter glassy carbon electrode with 12  $\mu\text{g}$  carbon nanoparticles versus concentration in aqueous phosphate buffer pH 9.5. (D) Plot for data obtained at a 4.9-mm-diameter basal plane pyrolytic graphite electrode. The line is indicating a Langmuir isotherm trend line with  $K \approx 6000 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ .

It is possible to obtain information about the binding constant (at least approximate) of benzophenone-3 onto the carbon nanoparticle substrate by fitting a Langmuir isotherm model into the data point in Fig. 7B. For a binding constant of  $K \approx 60000 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$  (vide supra) the deviation in all data points is considerable but for  $K \approx 6000 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$  a reasonable agreement between theory and experiment is achieved. The higher binding constant obtained above with the centrifugation procedure appears less accurate due to non-linearity at low analyte concentration (vide supra) and therefore  $K \approx 6000 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$  appears to be the more accurate result. In order to improve the considerable uncertainty in this estimate a more extensive data set (over a wider concentration range and for different carbon loadings) would be required. For analytical purposes, for this experiment the limit of detection can be estimated from the plot in Fig. 7B as ca. 5  $\mu\text{M}$  (or 1.2 ppm).

#### *3.4. Voltammetric determination of triclosan at carbon nanoparticle modified electrodes*

The adsorption of triclosan from 0.1 M phosphate solution (pH 9.5) onto carbon nanoparticles is also observed when carbon nanoparticles are immobilized at the electrode surface and measurements are conducted in stagnant solution. Data in Fig. 6C suggest that good results are obtained with a 12  $\mu\text{g}$  carbon nanoparticle deposit for both glassy carbon and for basal plane pyrolytic graphite electrodes. Fig. 7C and D gives concentration dependent peak currents which suggest close to linear dependence and an approximate limit of detection at 10  $\mu\text{M}$  (or 2.3 ppm, estimated from the plot in Fig. 7D). The binding constant  $K \approx 6000 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$  is very similar for triclosan and for benzophenone-3.

## **4. Summary**

It has been shown that 7.8 nm diameter carbon nanoparticles (surface functionalized with tosyl groups) effectively bind polyaromatic phenols from aqueous media. Two experimental approaches have been investigated: (i) the extraction of aromatic phenols onto carbon

nanoparticles followed by deposition onto electrodes and (ii) the adsorption of aromatic phenols directly onto carbon nanoparticles immobilized at electrodes. The extraction process has been demonstrated to be highly effective. However, details of the adsorption mechanism and the molecular interaction between analyte and carbon nanoparticles are currently not fully understood. In both cases the limit of detection is in the 5-20  $\mu\text{M}$  (or 2-6 ppm) range, but the detection with carbon nanoparticles immobilized at basal plane pyrolytic graphite is the method of choice for both triclosan and benzophenone-3 analytes. In future, the surface functionalisation of the carbon nanoparticles could be improved to further enhance the binding effects or the binding specificity. For example, naphthylsulfonate functionalisation or introducing further cationic components could dramatically change the extraction behaviour of the carbon nanoparticle material. Therefore, surface-modified/funcionalized carbon nanoparticle based materials are promising reagents for the removal and the detection of redox active aromatics.

### Acknowledgements

The authors thank the COST network (Action D32, working group D32/005/04 "Microwave and Ultrasound Activation in Chemical Analysis) for support of this work. We thank Cabot Corporation for generous supply with carbon nanomaterials. L.V. thanks "Vicerrectorado de Investigación, Desarrollo e Inovación" (University of Alicante) for the financial support.

### References

- [1] D. Barcelo, P. Grathwohl, K. Jones, K.U. Totsche, Identification of priority compound classes. SOVA Report 1: Integrated Soil and Water Protection (2003) p. 5.
- [2] C.G. Daughton, T.A. Ternes, *Environ. Health Persp.* 107 (1999) 907.
- [3] M.E. Lindsey, M. Meyer, E.M. Thurman, *Anal. Chem.* 73 (2001) 4640.
- [4] A.W. Garrison, J.D. Pope, F.R. Allen, in: C.H. Keith (Ed.), *Identification and Analysis of Organic Pollutants in Water*, Ann Arbor Science Publication, Ann Arbor, MI, 1976, p. pp.517.

- [5] R. Hirsch, T.A. Ternes, K. Haberer, K.-L. Kratz, *Sci. Total Environ.* 225 (1999) 109.
- [6] H. Buser, T. Poiger, M.D. Müller, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 3449.
- [7] T.A. Ternes, *Water Res.* 32 (1998) 3245.
- [8] C. Potera, *Environ. Health Persp.* 108 (2000) A446.
- [9] A. Chisvert, A. Salvador, *UV Filters in Sunscreens and Other Cosmetics. Regulatory Aspects and Analytical Methods*, in *Analysis of Cosmetic Products*, Elsevier, Amsterdam, 2007.
- [10] L.G. Dimosthenis, A. Salvador, A. Chisvert, *TRAC Trends Anal. Chem.* 26 (2006) 360.
- [11] S.D. Richardson, *Anal. Chem.* 79 (2007) 4295.
- [12] T. Suzuki, S. Kitamura, R. Khota, K. Sugihara, N. Fujimoto, S. Ohta, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203 (2005) 9.
- [13] M. Schlumpf, P. Schmid, S. Durrer, M. Conscience, K. Maerkel, M. Henseler, M. Gruetter, I. Herzog, S. Reolon, R. Ceccatelli, O. Faass, E. Stutz, H. Jarry, W. Wuttke, W. Lichtensteiger, *Toxicology* 205 (2004) 113.
- [14] T. Hayashi, Y. Okamoto, K. Ueda, N. Kojima, *Toxicol. Lett.* 167 (2006) 1.
- [15] N.R. Janjua, B. Mogensen, A.M. Andersson, J.H. Petersen, M. Henriksen, N.E. Skakkebæk, H.C. Wulf, *J. Invest. Dermatol.* 123 (2004) 57.
- [16] A.M. Peck, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 907.
- [17] T. Okumura, Y. Nishikawa, *Anal. Chim. Acta* 325 (1996) 175.
- [18] W. Hua, E.R. Bennett, R.J. Letcher, *Environ. Int.* 31 (2005) 621.
- [19] D.W. Kolpin, M. Skopec, M.T. Meyer, E.T. Furlong, S.D. Zaugg, *Sci. Total Environ.* 328 (2004) 119.
- [20] P.M. Thomas, G.D. Foster, *J. Environ. Sci. Health A* 39 (2004) 1969.
- [21] D.W. Kolpin, E.T. Furlong, M.T. Meyer, E.M. Thurman, S.D. Zaugg, L.B. Barber, H.T. Buxton, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 1202.
- [22] A. Lindström, I.J. Buerge, T. Poiger, P. Bergqvist, M.D. Müller, H. Buser, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 2322.
- [23] C. Tixier, H. Singer, S. Canonica, S. Müller, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 3482.

- [24] L. Sanchez-Prado, M. Llompарт, M. Lores, M. Fernandez-Alvarez, C. Garcia-Jares, R. Cela, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 1548.
- [25] D.E. Latch, J.L. Packer, W.A. Arnold, K. McNeill, *J. Photochem. Photobiol. A* 158 (2003) 63.
- [26] T. Felix, B.J. Hall, J.S. Brodbelt, *Anal. Chim. Acta* 371 (1998) 195.
- [27] D.A. Lambropoulou, D.L. Giokas, V.A. Sakkas, T.A. Albanis, M.I. Karayannis, *J. Chromatogr. A* 967 (2002) 243.
- [28] P. Canosa, I. Rodriguez, E. Rubi, R. Cela, *Anal. Chem.* 79 (2007) 1675.
- [29] R. Gibson, E. Becerril-Bravo, V. Silva-Castro, B. Jiménez, *J. Chromatogr. A* 1169 (2007) 31.
- [30] N.A. Parisis, D.L. Giokas, A.G. Vlessidis, N.P. Evmiridis, *J. Chromatogr. A* 1097 (2005) 17.
- [31] M. Kawaguchi, R. Ito, N. Endo, N. Sakui, N. Okanouchi, K. Saito, N. Sato, T. Shiozaki, H. Nakazawa, *Anal. Chim. Acta* 557 (2006) 272.
- [32] M.E. Balmer, H.R. Buser, M.D. Müller, T. Poiger, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 953.
- [33] A. Lindstrom, I.J. Buerge, T. Poiger, P.A. Bergqvist, M.D. Muller, H.R. Buser, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 2322.
- [34] L. Vidal, A. Chisvert, A. Canals, A. Salvador, *J. Chromatogr. A* 1174 (2007) 95.
- [35] H.K. Jeon, Y. Chung, J.C. Ryu, *J. Chromatogr. A* 1131 (2006) 192.
- [36] D.L. Giokas, V.A. Sakkas, T.A. Albanis, D.A. Lambropoulou, *J. Chromatogr. A* 1077 (2005) 19.
- [37] M. Amiri, S. Shahrokhian, E. Psillakis, F. Marken, *Anal. Chim. Acta* 593 (2007) 117.
- [38] M.A. Ghanem, R.G. Compton, B.A. Coles, E. Psillakis, M.A. Kulandainathan, F. Marken, *Electrochim. Acta* 53 (2007) 1092.
- [39] L.-H. Wang, *Electroanalysis* 14 (2002) 773.
- [40] Q. Zhou, W. Wang, J. Xiao, *Anal. Chim. Acta* 559 (2006) 200.
- [41] X. Liu, Y. Ji, Y. Zhang, H. Zhang, M. Liu, *J. Chromatogr. A* 1165 (2007) 10.
- [42] T. Sun, J. Jia, N. Fang, Y. Wang, *Anal. Chim. Acta* 530 (2005) 33.
- [43] J.-X. Wang, D.-Q. Jiang, Z.-Y. Gu, X.-P. Yan, *J. Chromatogr. A* 1137 (2006) 8.
- [44] S.R. Kline, *J. Appl. Cryst.* 39 (2006) 895.



- [45] A. Safavi, N. Maleki, H.R. Shahbaazia, *Bull. Electrochem.* 21 (2005) 229.
- [46] G.T. Castro, O.S. Giordano, S.E. Blanco, *J. Mol. Struc.-Theochem.* 626 (2003) 167.
- [47] A.P. da Silva, M.A.G. Trindade, V.S. Ferreira, *Talanta* 68 (2006) 679.
- [48] M. Chandrasekaran, M. Noel, V. Krishnan, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 56 (1991) 2055.
- [49] R.M. Pemberton, J.P. Hart, *Anal. Chim. Acta* 390 (1999) 107.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante







Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **V. DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS/ GENERAL DISCUSSION OF THE RESULTS**

---



En esta memoria se ha tratado de desarrollar y evaluar nuevas estrategias para la miniaturización de la preparación de la muestra, principalmente en la técnica de microextracción en gota, debido a las numerosas ventajas que posee. Además, también se ha presentado un nuevo nanomaterial de carbón como fase extractante que se ajusta a la línea general de miniaturización de la presente memoria. La mayor parte de los procesos analíticos descritos se basan en el uso de la cromatografía tanto de gases como de líquidos como técnica de separación previa a la detección, realizándose esta última bien por espectrometría de masas o bien por absorción en la región ultravioleta-visible. Por otro lado, la voltamperometría cíclica también ha sido utilizada para realizar la determinación de dos de los analitos estudiados.

En este apartado se pretende ofrecer un enfoque general de los resultados más relevantes alcanzados en esta memoria, dentro de los objetivos inicialmente marcados en la misma. Para ello, se han tratado con detenimiento los aspectos relacionados con los elementos comunes a todos los capítulos que son la miniaturización de la preparación de la muestra y el desarrollo de métodos ecológicos, económicos, rápidos, sencillos, sensibles y precisos. También se discuten los elementos diferenciadores entre los capítulos como son los tipos de fases extractantes, analitos, muestras, modos de extracción y de calentamiento, métodos de optimización y sistemas de separación y detección.

## V.1. Elementos comunes de la memoria

El objetivo general de la presente memoria es, como su propio nombre indica, aportar nuevas estrategias para la miniaturización de la preparación de la muestra. Como ha sido descrito previamente en el apartado II, el miniaturizar esta etapa del proceso analítico presenta numerosas ventajas, y por ello en la última década, junto con la automatización, son dos de las temáticas más investigadas. Por ello, el objetivo general de todos los capítulos descritos es *desarrollar y evaluar nuevos elementos que aporten mejoras a la etapa de preparación de la muestra*, mejorando así el conjunto global del proceso analítico.

En todos los capítulos la técnica analítica objeto de estudio ha sido la *extracción*, que como ya se ha indicado en el apartado II.2. es la técnica más utilizada hoy día para la preparación de la muestra. De los cuatro capítulos incluidos en la parte experimental se pueden diferenciar los tres primeros del cuarto y último. Así, mientras en los tres primeros capítulos se presentan avances para la microextracción en gota, en el cuarto capítulo se presenta y evalúa un nuevo material de carbón para su uso en extracción. También cabe destacar que las metodologías utilizadas en todos los capítulos experimentales conllevan la *miniaturización* de la extracción, bien porque se emplea una microgota o bien porque se utilizan nanomateriales, lo que también nos permite una reducción de las dimensiones de la fase extractante.

Otro de los elementos comunes que se pueden destacar es el uso de *cantidades* del orden de los *microlitros*, *microgramos* o *miligramo* de las diferentes fases extractantes, lo que ha permitido la reducción de cantidades tanto de fases extractantes como de muestras y reactivos, permitiendo la miniaturización y el desarrollo de métodos más ecológicos. La reducción de volúmenes, además, permite realizar la extracción y preconcentración de los analitos desde su matriz en una única etapa. Esto es posible debido a que el analito pasa de unos mililitros de muestra a unos pocos microlitros o microgramos de fase extractante. La preconcentración ha sido un factor que se ha tenido muy en cuenta a lo largo de la presente memoria debido a que los analitos se encuentran, en la mayoría de los casos a niveles de (ultra)traza.

También conviene destacar que debido a la técnica de extracción estudiada en los capítulos experimentales 1, 2 y 3 y a las metodologías seguidas en el capítulo experimental 4, los métodos desarrollados en todos los capítulos anteriores comparten los mismos principios generales, cuyas características comunes son:

- *Sencillos*, debido a la simplicidad de la instrumentación utilizada y al escaso o nulo pretratamiento de la muestra;
- *Económicos*, debido a la reducción en las cantidades de reactivos y al material utilizado;
- *Ecológicos*, debido a la eliminación de disolventes orgánicos tóxicos y a la reducción de cantidades de reactivos y muestra utilizados;
- *Rápidos*, por la simplicidad y el fácil manejo de la metodología propuesta;
- *Sensibles*, debido al importante efecto de preconcentración que se produce, exceptuando el último capítulo experimental en el que se presentan estudios preliminares;
- *Precisos*, las metodologías de extracción utilizadas presentan una excelente precisión.

La metodología general de trabajo seguida en la mayoría de los capítulos se basa en la realización de tres etapas; la primera de ellas conlleva la optimización de todas las variables que influyen en la extracción, la segunda consiste en evaluar el método, obteniendo sus características analíticas y la tercera y última consiste en la aplicación del método a muestras reales, debido a la inexistencia de muestras certificadas.

A continuación en la [Tabla 3](#) se presentan, a modo de resumen, algunos datos representativos de los métodos desarrollados en la presente memoria.



Tabla 3. Datos representativos de los métodos desarrollados en la presente memoria.

Apartado	Muestra	Fase extractante	Volumen – masa extractante	Volumen muestra (mL)	Tiempo extracción (min)
<b>Clorobencenos</b>					
IV.1.	Agua	Tolueno	2,5 µL	10	5
IV.2.1.	Agua	[C <sub>4</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ]	5 µL	10	37
IV.3.	Agua	[C <sub>6</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ]	5 µL	30	20
<b>Benzofenona-3</b>					
IV.2.2.	Orina	[C <sub>6</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ]	5 µL	10	25
IV.4.	Agua	Nanopartículas de carbón	Estrategia 1: 1 mg	4	10
			Estrategia 2: 12 µg	100	5
<b>Triclosán</b>					
IV.4.	Agua	Nanopartículas de carbón	Estrategia 1: 1 mg	4	10
			Estrategia 2: 12 µg	100	5

En los capítulos 1, 2 y 3 se ha utilizado la técnica de microextracción en gota para extraer analitos bencénicos clorados y un filtro UV de diferentes matrices, empleando diferentes modos de extracción. En la [Tabla 4](#) se resumen las figuras de mérito de los métodos desarrollados para los distintos analitos. A la vista de los resultados obtenidos se puede afirmar que la técnica de SDME, tanto en su modalidad de espacio de cabeza como de inmersión directa, es una técnica *precisa*, proporciona generalmente unos valores de la desviación estándar relativa (RSD) inferiores al 10%, y *sensible*, los límites de detección se encuentran en el intervalo comprendido entre  $3 \text{ ng L}^{-1}$  y  $1.3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  en función del modo de extracción del analito, de la matriz, pero fundamentalmente del sistema de detección; esto permite determinar concentraciones a niveles de (ultra)traza. Además, en todos los métodos desarrollados la linealidad se cumple satisfactoriamente en el intervalo de trabajo estudiado. Para evaluar esta figura de mérito se han utilizado dos aproximaciones; la representación gráfica de los datos experimentales y la utilización del coeficiente de correlación, parámetro cuyos valores en todos los casos estudiados se encuentran comprendidos entre 0.994 y 0.9999.

Valorando los resultados obtenidos con el mismo conjunto de analitos a lo largo de la memoria (i.e., clorobencenos en los tres primeros capítulos de la parte experimental) permite observar claramente los avances y mejoras que se han aportado a la técnica de SDME. En la [Tabla 4](#) se puede observar que la precisión del método se ve mejorada en algunos casos al emplear los ILs como fase extractante. Este hecho es meritorio teniendo en cuenta que no se utiliza un patrón interno en la gota para corregir la inestabilidad originada por la misma, elemento que sí se emplea al utilizar tolueno como fase extractante debido a su evaporación. Este hecho nos confirma la estabilidad que presentan los ILs debido a su viscosidad y baja presión de vapor. Por otro lado, la linealidad en los intervalos de trabajo seleccionados también se ve mejorada por el uso de ILs, teniendo el mismo valor el peor coeficiente de correlación obtenido al utilizar IL que el mejor obtenido al utilizar tolueno. Sin embargo, en términos generales, la sensibilidad es peor al utilizar un IL como fase extractante, como consecuencia de que el uso de los ILs obliga a utilizar la cromatografía líquida acoplada a un detector UV-Vis, y la sensibilidad de este detector

empleado es inferior a la sensibilidad del detector empleado en cromatografía de gases (i.e., espectrometría de masas).



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

Tabla 4. Figuras de mérito de los métodos desarrollados para los diferentes analitos.

Apartado	Figura	Analito										
		1,3-DCB	1,4-DCB	1,2-DCB	1,3,5-TCB	1,2,4-TCB	1,2,3-TCB	1,2,4,5-TeCB	1,2,3,4-TeCB	PCB	HCB	BZ3
IV.1.	Coefficiente de correlación (r) <sup>a</sup>	0.997	0.996	0.996	0.997	0.996	0.997	0.998	0.998	0.995	0.994	N.D. <sup>d</sup>
	RSD (%) <sup>b</sup>	2.2	2.1	4.8	6.7	6.1	7.1	7.5	4.8	13.2	12.9	N.D.
	LOD (µg L <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	0.003	0.006	0.006	0.004	0.006	0.006	0.003	0.003	0.016	0.031	N.D.
IV.2.1.	Coefficiente de correlación (r) <sup>a</sup>	0.9997	0.998	0.9997	0.9993	0.9996	0.9990	0.9996	0.9992	N.D.	N.D.	N.D.
	RSD (%) <sup>b</sup>	5.0	2.3	5.1	4.1	3.4	1.6	3.0	3.1	N.D.	N.D.	N.D.
	LOD (µg L <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	0.152	0.203	0.102	0.122	0.122	0.102	0.102	0.102	N.D.	N.D.	N.D.
	Factor preconcentración	1090	980	940	1080	1030	890	1040	840	N.D.	N.D.	N.D.
IV.2.2.	Coefficiente de correlación (r) <sup>a</sup>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.996- 0.9998
	RSD (%) <sup>b</sup>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	6
	LOD (µg L <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.3
	Factor preconcentración	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	23

IV.3.	Coefficiente de correlación (r) <sup>a</sup>	0.9999	0.9998	0.9998	0.9998	0.9995	0.9998	0.9996	0.9998	N.D.	N.D.	N.D.
	RSD (%) <sup>b</sup>	2.9	2.3	2.7	3.8	5.6	5.7	7.1	8.3	N.D.	N.D.	N.D.
	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) <sup>c</sup>	0.032	0.039	0.024	0.022	0.022	0.016	0.016	0.016	N.D.	N.D.	N.D.
	Factor preconcentración	2800	2600	2400	2700	3500	2300	2400	3300	N.D.	N.D.	N.D.

<sup>a</sup> Intervalo de trabajo: Apartado IV.1.: 0.02-50  $\mu\text{g L}^{-1}$  (N=5); Apartado IV.2.1.: 5-160  $\mu\text{g L}^{-1}$  (N=6); Apartado IV.2.2.: 0-100  $\mu\text{g L}^{-1}$  (N=5); Apartado IV.3.: 1-320  $\mu\text{g L}^{-1}$  (N=9).

<sup>b</sup> Desviación estándar relativa (RSD); Apartado IV.1.: 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  (n=5); Apartado IV.2.1.: 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  (n=5); Apartado IV.2.2.: 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  (n=8); Apartado IV.3.: 40  $\mu\text{g L}^{-1}$  (n=5).

<sup>c</sup> Los límites de detección (LOD) fueron calculados utilizando el criterio S/N=3.

<sup>d</sup> N.D.: Analito no determinado.

Los métodos propuestos en los capítulos 1, 2 y 3 se han aplicado en muestras reales de agua, las cuales no estaban contaminadas con el analito sometido a estudio. En la [Tabla 5](#) se muestran las recuperaciones relativas obtenidas con los distintos métodos en los diferentes tipos de muestras de aguas utilizadas. Se presentan las recuperaciones relativas debido a que la técnica de SDME no es exhaustiva y la cantidad de analito que se extrae deja la muestra prácticamente inalterada. Por ello las recuperaciones que se muestran han sido calculadas realizando el cociente entre la cantidad determinada del analito en la muestra real de agua y la determinada en una muestra de agua desionizada, siendo ambas muestras previamente dopadas con la misma cantidad. Los resultados obtenidos nos indican que en general no existe efecto de matriz para ninguna de las muestras de agua estudiadas, exceptuando la muestra de agua residual que presenta un ligero efecto de matriz para el 1,2,4,5-TeCB y el 1,2,3,4-TeCB al emplear el método desarrollado en el apartado IV.2.1. Sin embargo, este efecto de matriz desaparece al aplicar el método desarrollado en el apartado IV.3. en el que se irradia la muestra con microondas.

Resumiendo, se puede afirmar que la técnica de microextracción en gota puede ser empleada con éxito para la determinación de distintos analitos en diferentes tipos de aguas, en ambas modalidades de extracción y sin sufrir efectos importantes de la matriz. Esto permite realizar la extracción sin efectuar un tratamiento previo de la muestra, siendo la manipulación de la misma mínima y eliminando todos los inconvenientes que ello conlleva.

Tabla 5. Recuperaciones relativas (%).

		Analito									
		1,3-DCB	1,4-DCB	1,2-DCB	1,3,5-TCB	1,2,4-TCB	1,2,3-TCB	1,2,4,5-TeCB	1,2,3,4-TeCB	PCB	HCB
Apartado	Muestra										
IV.1.	Agua de grifo <sup>a,1</sup>	96	84	94	92	93	91	96	92	99	98
	Agua de pozo <sup>b,1</sup>	102	98	104	98	107	100	91	88	87	82
IV.2.1.	Agua de grifo <sup>c,2</sup>	101	98	97	94	96	96	97	96	-	-
	Agua de río <sup>d,2</sup>	107	100	101	101	99	101	106	102	-	-
	Agua residual <sup>e,2</sup>	112	121	114	83	89	86	66	61	-	-
IV.3.	Agua de grifo <sup>c,3</sup>	96	91	96	101	104	100	102	102	-	-
	Agua de río <sup>d,3</sup>	99	98	101	100	101	100	100	105	-	-
	Agua residual <sup>e,3</sup>	83	84	89	82	91	95	93	99	-	-

<sup>a</sup> Chania (Creta, Grecia); <sup>b</sup> Monasterio Agia Triada (Creta); <sup>c</sup> San Vicente del Raspeig (Alicante, España); <sup>d</sup> Río Ebro (Zaragoza, España); <sup>e</sup> Planta municipal de tratamiento de Bilbao (España).

<sup>1</sup> 1 µg L<sup>-1</sup> (n=5); <sup>2</sup> 20 µg L<sup>-1</sup> (n=8); <sup>3</sup> 40 µg L<sup>-1</sup> (n=5).

## V.2. Elementos no comunes de la memoria

Las principales diferencias introducidas en los distintos capítulos de la memoria consisten en la naturaleza de la *fase extractante* empleada, los *analitos* a determinar, las *muestras*, los *modos de extracción*, los *modos de calentamiento*, *métodos de optimización*, el uso o no de *separación cromatográfica* y, finalmente, el empleo de distintos tipos de *detectores*. En el siguiente esquema se muestran de modo resumido todos estos elementos diferenciadores (Figura 51).



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



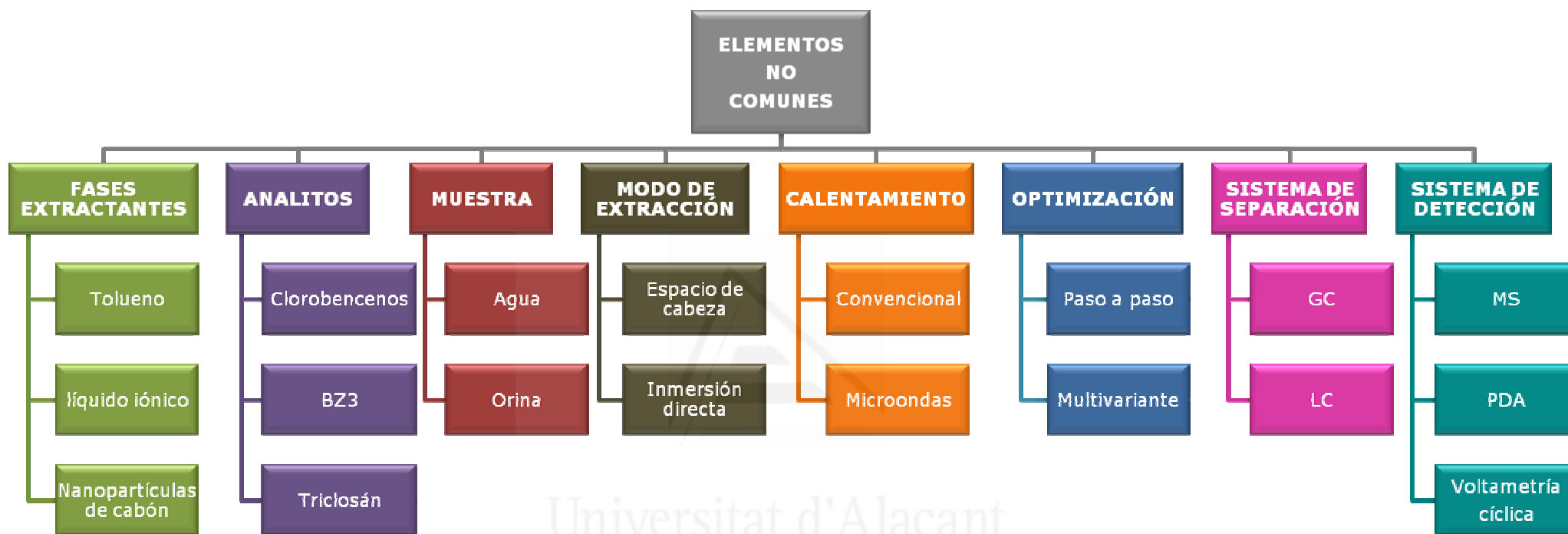


Figura 51. Esquema de los elementos diferenciadores entre los capítulos de la presente memoria.

En los diferentes capítulos de la parte experimental se estudian diferentes *fases extractantes* como el tolueno, n-hexano y n-heptano (apartado IV.1.), los líquidos iónicos [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] (apartado IV.2.1.) y [C<sub>6</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] (apartados IV.2.2. y IV.3.), así como nanopartículas de carbón (apartado IV.4.). Los líquidos iónicos han sido fundamentalmente utilizados debido a las ventajas que presentan frente a los disolventes orgánicos convencionales y a que uno de los objetivos del presente trabajo experimental era eliminar su uso para desarrollar métodos ecológicos. Los líquidos iónicos estudiados pertenecen a la familia que proporciona los mejores resultados en procesos de extracción debido a las propiedades que presentan (ver [Tabla 1](#) apartado II.4.). Entre ellos el más utilizado ha sido el [C<sub>6</sub>MIM][PF<sub>6</sub>], principalmente por ser más apolar, al poseer una cadena alquílica con un número mayor de átomos de carbono, y presentar una menor solubilidad en agua que el [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]; esto hace que proporcione mejores resultados de extracción y, por lo tanto, mejores factores de preconcentración ([Tabla 4](#)) así como menores problemas de disolución de la gota al trabajar en modalidad de inmersión directa. Por el mismo razonamiento el [C<sub>8</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] presenta una menor polaridad y menor solubilidad en agua que el [C<sub>6</sub>MIM][PF<sub>6</sub>], pero presenta un inconveniente debido a las impurezas que los líquidos iónicos contienen. Los líquidos iónicos utilizados han sido de una gran pureza, en todos los casos superior al 98%, pero las posibles impurezas remanentes interfieren en ocasiones solapando la señal de los analitos. Este solapamiento de la impureza depende del tiempo de retención del analito y de la longitud de onda a la que se registra el cromatograma. Por otro lado, un tipo específico de nanopartículas de carbón funcionalizadas se presentan por primera vez como fase extractante. Lo más importante de ellas es su capacidad de extracción y a su vez de preconcentración. Otros aspectos a tener en cuenta son que su principal aplicación actual difiere totalmente de la realizada en el presente trabajo y su bajo precio en el mercado. Esto permite desarrollar nuevos métodos más económicos que los ya presentados, igualando o mejorando las figuras de mérito. Además, también ofrece la posibilidad de diversificar la configuración química superficial, modificando o añadiendo grupos funcionales en la superficie, lo que permitirá variar, y seleccionar la selectividad de las nanopartículas.

Analitos de diferente naturaleza han sido determinados a lo largo de la presente memoria. La selección de los *analitos* se ha hecho teniendo en cuenta principalmente su relevancia medioambiental, su uso, sus características contaminantes y tóxicas, y por su contacto directo con el ser humano. Como ya se hizo en el apartado II.8., éstos han sido clasificados en tres grupos, el primero de ellos es el de la familia de los clorobencenos, mientras que la BZ3 y el triclosán son ejemplos representativos de los filtros UV liposolubles y compuestos anti-microbianos, respectivamente. La mayor parte del trabajo experimental que se presenta (apartados IV.1., IV.2.1. y IV.3.) se centra en la determinación de 10 y 8 analitos de la familia de los clorobencenos. Estos analitos han sido seleccionados como analitos modelo debido a su excepcional extracción tanto en tolueno como en los diferentes líquidos iónicos estudiados. También cabe destacar su versatilidad en la separación mediante cromatografía de gases o líquidos, así como la posibilidad de ser detectados mediante MS y PDA. El filtro UV BZ3 ha sido después de los clorobencenos el analito más estudiado (apartados IV.2.2. y IV.4). Este analito también ha mostrado una buena capacidad para ser extraído tanto con los líquidos iónicos como con las nanopartículas de carbón. La importancia de la determinación de la BZ3 reside principalmente en su uso directo y diario por el ser humano y por sus posibles efectos tóxicos. El triclosán (apartado IV.4.) ha sido estudiado principalmente por su uso y contacto directo con el ser humano y con objeto de evaluar la posibilidad de extraerlo con una nueva fase extractante como son las nanopartículas de carbón.

Las *muestras* estudiadas se pueden dividir en dos grupos; el primero de ellos engloba a todas las muestras de agua de origen residual, superficial, estancadas y potables y el segundo de ellos corresponde a las muestras de orina. Las muestras de agua de diferente origen han sido las más estudiadas debido a la gran importancia que presenta este elemento en un nuestra vida diaria. Además, es un recurso cada día más escaso y por ello se hace imprescindible controlar la calidad y los niveles de contaminación de la misma. Por otro lado, las muestras de orina permiten, por un lado, realizar estudios en una matriz diferente a la del agua y, por otro, estudiar la excreción de la BZ3 por nuestro organismo. Este proceso tiene prácticamente lugar casi a diario debido al uso masivo que hacemos

de los productos de cuidado personal, por lo que también es de vital importancia su estudio y control.

Otro de los aspectos diferenciadores entre capítulos es el modo de extracción. Éstos pueden ser clasificados en dos grupos; en el primero de ellos se incluye el modo en el que la extracción se realiza en el espacio de cabeza (apartados IV.1., IV.2.1. y IV.3.) y el segundo de ellos en el que la extracción se realiza en modo de inmersión directa (apartados IV.2.2. y IV.4.), en la que el extractante está en contacto directo con la muestra. En el primer grupo se emplea la técnica de SDME en modalidad de espacio de cabeza ya que se realiza la determinación de analitos volátiles y semivolátiles como los clorobencenos. Este modo de extracción es recomendable en el caso de que se trabaje con matrices sucias y analitos volátiles o semivolátiles, ya que permite evitar problemas a la fase extractante y mejorar la extracción de los analitos, pues la difusión en fase gas es más rápida. Dentro del grupo dedicado a la inmersión directa podemos diferenciar el empleo de la técnica de SDME y las nanopartículas de carbón. La modalidad de inmersión directa es empleada en la determinación de la BZ3 debido a que este analito no es volátil. Sin embargo, este modo de extracción presenta una serie de inconvenientes: (i) una ligera disminución de la sensibilidad (debido a que la difusión en medio líquido es menor) y; (ii) la disolución parcial de la fase extractante. Las nanopartículas de carbón también han sido utilizadas en contacto directo con la muestra debido a que los analitos seleccionados para realizar el estudio no son volátiles. En este caso se presentan dos modalidades de extracción diferente; en la primera de ellas se realiza separadamente la extracción y determinación mientras que en la segunda ambas etapas se realizan en un único paso. La primera modalidad permite realizar una extracción casi total del analito, permitiéndonos eliminar el contaminante, mientras que la segunda modalidad lleva a cabo una extracción que deja a la muestra inalterada, presentando un mayor efecto de preconcentración debido a los pocos  $\mu\text{g}$  de nanopartículas que se utilizan.

Dos *modos de calentamiento* han sido estudiados en este trabajo. En el apartado IV.2.1. se ha estudiado el efecto que presenta la temperatura sobre la extracción y para ello se ha empleado un sistema de calentamiento convencional. Sin embargo, este modo de calentamiento posee una serie de

inconvenientes. Por ello, en el apartado IV.3. se utiliza la energía de microondas como alternativa para eliminar estos inconvenientes. Se obtienen de este modo, junto con el uso del  $[C_6MIM][PF_6]$  como líquido iónico, mejores factores de preconcentración, y como consecuencia una mayor sensibilidad, y mejores recuperaciones (ver [Tabla 4](#) y [5](#)).

Los factores que afectan a la extracción han sido *optimizados* mediante el método convencional paso a paso (apartado IV.1.) y mediante optimización multivariante (apartado IV.2.1., IV.2.2. y IV.3.). En el primer capítulo experimental se realiza la optimización de las variables paso a paso, empleándose tiempos y número de experimentos mayores, y desconociendo la existencia de posibles interacciones entre variables. Por ello, en los apartados posteriores se realiza la optimización de las variables mediante diseño experimental. En todos los casos se realiza previamente un cribado debido al elevado número de variables que influyen en la extracción. Una vez conocidas las variables con mayor influencia se aplica un diseño central compuesto o un diseño mixto, dependiendo de si todas las variables son cuantitativas o si alguna de ellas es cualitativa. Al aplicar este método de optimización se ha observado una importante interacción entre la temperatura y la fuerza iónica, hecho que no hubiera sido posible con la optimización convencional paso a paso.

La *cromatografía* ha sido ampliamente utilizada como *técnica de separación* previa a la detección en casi todos los capítulos. La cromatografía de líquidos ha sido empleada en mayor grado (apartados IV.2.1., IV.2.2. y IV.3.) debido a la limitación que presentan los líquidos iónicos para ser utilizados en cromatografía de gases (apartado IV.1.). Se han empleado varios tipos de columnas y fases móviles en LC dependiendo del tipo de analito estudiado. En el caso de los clorobencenos determinados en aguas se ha utilizado una columna de fase invertida de 250 x 4.6 mm y 5  $\mu$ m. En el caso de la determinación de BZ3 en orina se ha utilizado una columna, también de fase invertida, con una longitud de 125 mm debido a que la única separación esperada era la del analito del líquido iónico, acortando de este modo el tiempo del cromatograma. Se han utilizado diferentes condiciones experimentales dependiendo de los analitos. En la siguiente tabla ([Tabla 6](#)) se muestran las condiciones de separación utilizadas en LC para los diferentes analitos. El ácido acético se ha empleado

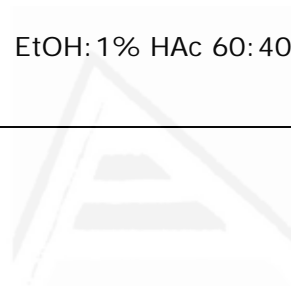
para evitar los posibles problemas de aparición de cola que presenta la BZ3. La cromatografía de gases ha sido únicamente utilizada en el apartado IV.1. ya que el empleo de tolueno como fase extractante lo permite, obteniendo unos límites de detección un orden de magnitud más bajos al poder utilizar sistemas de detección más sensibles.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

Tabla 6. Condiciones de separación utilizadas en cromatografía de líquidos.

Apartado	Muestra	Columna	Fase móvil	Flujo (mL min <sup>-1</sup> )	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)
<b>Clorobencenos</b>					
IV.2.1.; IV.3.	Agua	250 x 4.6 mm, 5 $\mu\text{m}$	MeCN:Agua 65:35 (v/v)	1	210
<b>Benzofenona-3</b>					
IV.2.2.	Orina	125 x 4.0 mm, 5 $\mu\text{m}$	EtOH:1% HAc 60:40 (v/v)	1	289



Universitat d'Alacant  
 Universidad de Alicante

Por último, indicar que diferentes *sistemas de detección* han sido utilizados. Cuando se ha empleado la GC como técnica de separación se ha utilizado la espectrometría de masas como sistema de detección (apartado IV.1). Se ha trabajado con monitorización selectiva de iones (SIM) para aumentar la sensibilidad del detector y minimizar las señales procedentes de la matriz. En el caso de la LC se ha utilizado un detector de fotodiodos en línea, lo que permite seleccionar la máxima absorbancia tras hacer barridos rápidos de la absorción en un amplio intervalo de longitudes de onda. En el caso de las nanopartículas de carbón se ha empleado la voltamperometría cíclica como sistema de detección. Los dos analitos seleccionados han permitido estudiar un perfil de reducción, para el caso de la BZ3, y uno de oxidación, en el caso del triclosán. El empleo de este sistema ha permitido estudiar de una forma rápida la extracción de estos analitos por las nanopartículas. Para tal fin éstas han sido depositadas directamente sobre la superficie de los electrodos antes o después de realizar la extracción. Además, las partículas aumentan al mismo tiempo la superficie de los electrodos. El principal inconveniente que presenta este sistema de detección es su baja sensibilidad por lo que los límites de detección obtenidos son del orden de los  $\text{mg L}^{-1}$ . En este punto conviene indicar que los resultados obtenidos con las nanopartículas de carbón modificadas superficialmente únicamente pretenden mostrar su posible utilidad como fase extractante y no el desarrollo de un método analítico que permite alcanzar unos bajos LODs.



The aim of this overview has been to develop and evaluate new strategies for the miniaturization of sample preparation and mainly concerns single-drop microextraction given the many advantages it offers. Moreover, a new carbon nanomaterial is also presented as extractant phase in accordance with the general line of miniaturization. Most analytical processes described are based on using both gas and liquid chromatography as a separation technique before the detection step. Detection is by mass spectrometry or absorption in the UV-Vis spectrum range. On the other hand, the cyclic voltammetry has also been used to determine two of the analytes under study.

This section offers a general focus on the most relevant results obtained in accordance with the initial objectives of this work. In order to achieve this the aspects related with the common elements to all the chapters, such as sample preparation miniaturization and development of ecological, economical, fast, simple, sensitive and precise methods, are dealt with in depth. The non-common elements are also discussed in the different chapters, such as extractant phases, analytes, samples, extraction modes, heating source, optimization methods and separation and detection systems.

## V.1. Common elements of the overview

The general objective of this overview is, as the title indicates, to provide new strategies for sample preparation miniaturization. As previously described in section II, miniaturizing this step of the analytical process affords many advantages, and for this reason it is one of the most investigated topics together with automatization in the last decade. Thus, the general objective of all the chapters is the *development and evaluation of new elements that help to improve the sample preparation step*, thereby improving the whole analytical process.

All the chapters deal with *extraction* and, as mentioned in section II.2., it is the most commonly used technique to prepare samples nowadays. Of the four chapters describing the experimental part, the first three can be distinguished from the fourth and last. While, the first three chapters discuss advances in single-drop microextraction, the fourth chapter presents and evaluates a new carbon material for use in extraction. It is also important to remark that the methodologies discussed in all the experimental chapters entail the miniaturization of extraction because they use either the microdrop method or carbon nanomaterial.

Another common element to be emphasized is the use of *microlitres, micrograms or milligrams* for the different extractant phases. Therefore the quantities of either extractant phases and samples and reagents can be reduced, and thus, the methods developed are miniaturized and more ecological. The volume reduction also enables extraction and preconcentration of the analytes from the matrix to be done in a single step. This is possible because the analyte is moved from millilitres of sample to a few microlitres or micrograms of extractant phase. The preconcentration has been an important factor considered in this overview because in the most cases the analyte concentrations are present at (ultra)trace levels in samples.

It is also important to remark that because single-drop microextraction is studied in experimental chapters 1, 2 and 3, and the methodologies which are applied in experimental chapter 4, the methods developed in these all chapters share the same general principles, and their common characteristics are:

- *Simple*, due to the simplicity of the instrumentation used, the nonexistent or minimal pretreatment of the sample;
- *Economical*, due to the reduction of reagent quantities and the instruments used;
- *Ecological*, due to the elimination of toxic organic solvents and the reduction of sample and reagents quantities;
- *Fast*, because of the simplicity and the ease of handling the proposed methodology;
- *Sensitive*, due to the preconcentration effect produced, except for the last experimental chapter where preliminary studies are presented;
- *Precise*, the used extraction methodologies afford excellent precision.

The methodology applied in most chapters is based on three main steps; the first step entails the optimization of all the variables that influence extraction, the second step involves the evaluation of the method, and the third step consists of applying the method to real samples, given the non-existence of certified samples.

The table below (Table 3) presents the most representative parameters of the methods developed in the present overview.

Table 3. Representative parameters of the methods developed in the present overview.

Section	Sample	Extractant phase	Extractant Volume – mass	Sample Volume (mL)	Extraction Time (min)
<b>Chlorobenzenes</b>					
IV.1.	Water	Toluene	2,5 $\mu$ L	10	5
IV.2.1.	Water	[C <sub>4</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ]	5 $\mu$ L	10	37
IV.3.	Water	[C <sub>6</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ]	5 $\mu$ L	30	20
<b>Benzophenone-3</b>					
IV.2.2.	Urine	[C <sub>6</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ]	5 $\mu$ L	10	25
IV.4.	Water	Carbon nanoparticles	Strategy 1: 1 mg	4	10
			Strategy 2: 12 $\mu$ g	100	5
<b>Trichlosan</b>					
IV.4.	Water	Carbon nanoparticles	Strategy 1: 1 mg	4	10
			Strategy 2: 12 $\mu$ g	100	5

In chapters 1, 2 and 3 the single-drop microextraction technique is used to extract chlorobenzene analytes and BZ3 UV filter from different matrices employing different extraction modes. Table 4 shows a summary of the figures of merit for each method developed for the different analytes. On studying the results, the SDME technique can be confirmed as a high precision technique, both in headspace modality and in direct immersion, showing relative standard deviation values below 10%. The SDME technique is also considered sensitive because the detection limits range between 3 ng L<sup>-1</sup> and 1.3 µg L<sup>-1</sup>, depending on the extraction mode/matrix, but mainly on the detection system. Moreover, the linearity of the developed methods is given for the studied working range. In order to evaluate this figure of merit, two approximations have been used; the graphical representation and the correlation coefficient, whose parameter ranges between 0.994 and 0.9999.

Evaluating the results obtained for the same family of analytes (i.e., chlorobenzenes in the first three chapters of the experimental part) enables one to clearly observe the progress and improvements made upon the SDME technique. Table 4 shows that the precision of the technique improves in some cases when IL is used as extractant phase. This fact is important if we consider that an internal standard is not used with IL, as it is for toluene, in order to correct the instability drop for evaporation. This fact also confirms the stability of the ILs due to their viscosity and low vapor pressure. On the other hand, the linearity of the working ranges selected is also improved when IL is used, with the worst correlation coefficient value obtained with IL being the same as the best value obtained with toluene. However, sensitivity is worse when an IL is used as extractant phase. The use of ILs is limited by the use of liquid chromatography connected to a UV-Vis detector, because the sensitivity of this detector is lower than the sensitivity of the detector employed for gas chromatography (i.e., mass spectrometry).

Table 4. Figures of merit of the developed methods for the different analytes.

Section	Figure of merit	Analyte										
		1,3-DCB	1,4-DCB	1,2-DCB	1,3,5-TCB	1,2,4-TCB	1,2,3-TCB	1,2,4,5-TeCB	1,2,3,4-TeCB	PCB	HCB	BZ3
IV.1.	Correlation coefficient (r) <sup>a</sup>	0.997	0.996	0.996	0.997	0.996	0.997	0.998	0.998	0.995	0.994	N.D. <sup>d</sup>
	RSD (%) <sup>b</sup>	2.2	2.1	4.8	6.7	6.1	7.1	7.5	4.8	13.2	12.9	N.D.
	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) <sup>c</sup>	0.003	0.006	0.006	0.004	0.006	0.006	0.003	0.003	0.016	0.031	N.D.
IV.2.1.	Correlation coefficient (r) <sup>a</sup>	0.9997	0.998	0.9997	0.9993	0.9996	0.9990	0.9996	0.9992	N.D.	N.D.	N.D.
	RSD (%) <sup>b</sup>	5.0	2.3	5.1	4.1	3.4	1.6	3.0	3.1	N.D.	N.D.	N.D.
	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) <sup>c</sup>	0.152	0.203	0.102	0.122	0.122	0.102	0.102	0.102	N.D.	N.D.	N.D.
	Preconcentration factor	1090	980	940	1080	1030	890	1040	840	N.D.	N.D.	N.D.
IV.2.2.	Correlation coefficient (r) <sup>a</sup>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.996- 0.9998
	RSD (%) <sup>b</sup>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	6
	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) <sup>c</sup>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.3
	Preconcentration factor	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	23

IV.3.	Correlation coefficient (r) <sup>a</sup>	0.9999	0.9998	0.9998	0.9998	0.9995	0.9998	0.9996	0.9998	N.D.	N.D.	N.D.
	RSD (%) <sup>b</sup>	2.9	2.3	2.7	3.8	5.6	5.7	7.1	8.3	N.D.	N.D.	N.D.
	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) <sup>c</sup>	0.032	0.039	0.024	0.022	0.022	0.016	0.016	0.016	N.D.	N.D.	N.D.
	Preconcentration factor	2800	2600	2400	2700	3500	2300	2400	3300	N.D.	N.D.	N.D.

<sup>a</sup> Working range: Section IV.1.: 0.02-50  $\mu\text{g L}^{-1}$  (N=5); section IV.2.1.: 5-160  $\mu\text{g L}^{-1}$  (N=6); section IV.2.2.: 0-100  $\mu\text{g L}^{-1}$  (N=5); section IV.3.: 1-320  $\mu\text{g L}^{-1}$  (N=9).

<sup>b</sup> Relative standard deviation (RSD); Section IV.1.: 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  (n=5); section IV.2.1.: 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  (n=5); section IV.2.2.: 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  (n=8); section IV.3.: 40  $\mu\text{g L}^{-1}$  (n=5).

<sup>c</sup> Limits of detection (LOD) were calculated for a three signal to noise ratio (S/N=3).

<sup>d</sup> N.D.: Not determined analyte.

The methods proposed in chapters 1, 2 and 3 have been applied to real water samples, which were not contaminated with the analytes studied. Table 5 shows the relative recoveries obtained with the different methods for the different kinds of water samples. Relative recoveries are presented because the SDME technique is not an exhaustive technique and the quantity of extracted analyte does not disturb the sample. For this reason the recoveries presented have been calculated as the ratio between concentrations found in real and deionised water samples, spiked at the same contamination level. The results obtained indicate that in general there is no a matrix effect for the water samples studied, except for the wastewater which exerts a slight matrix effect for 1,2,4,5-TeCB and 1,2,3,4-TeCB when the developed method was applied in section IV.2.1. However, this matrix effect disappeared when the method developed in section IV.3., using microwave radiation, was applied.

To sum up, it can be confirmed that the single-drop microextraction technique can be employed successfully to determine different analytes in different kinds of samples, working with both extraction modalities and without being affected by the matrix. This enables extraction to be done without the need for previous treatment of the sample, thereby reducing sample handling and avoiding all the disadvantages this entails.



Table 5. Relative recoveries (%).

		Analyte									
		1,3-DCB	1,4-DCB	1,2-DCB	1,3,5-TCB	1,2,4-TCB	1,2,3-TCB	1,2,4,5-TeCB	1,2,3,4-TeCB	PCB	HCB
Section	Sample										
IV.1.	Tap water <sup>a,1</sup>	96	84	94	92	93	91	96	92	99	98
	Well water <sup>b,1</sup>	102	98	104	98	107	100	91	88	87	82
IV.2.1.	Tap water <sup>c,2</sup>	101	98	97	94	96	96	97	96	N.D.	N.D.
	River water <sup>d,2</sup>	107	100	101	101	99	101	106	102	N.D.	N.D.
	Wastewater <sup>e,2</sup>	112	121	114	83	89	86	66	61	N.D.	N.D.
IV.3.	Tap water <sup>c,3</sup>	96	91	96	101	104	100	102	102	N.D.	N.D.
	River water <sup>d,3</sup>	99	98	101	100	101	100	100	105	N.D.	N.D.
	Wastewater <sup>e,3</sup>	83	84	89	82	91	95	93	99	N.D.	N.D.

<sup>a</sup> Chania (Creete, Greece); <sup>b</sup> Monastery of Agia Triada (Creete); <sup>c</sup> San Vicente del Raspeig (Alicante, Spain); <sup>d</sup> Ebro river (Zaragoza, Spain); <sup>e</sup> Municipal wastewater treatment plant (Bilbao, Spain).

<sup>1</sup> 1 µg L<sup>-1</sup> (n=5); <sup>2</sup> 20 µg L<sup>-1</sup> (n=8); <sup>3</sup> 40 µg L<sup>-1</sup> (n=5).

## V.2. Non common elements of the overview

The main differences between the different chapters comprised in this overview relate to the nature of the *extractant phase* employed, *analytes* to be determined, nature of the *samples*, *extraction modes*, *heating sources*, *optimization methods*, the use of *chromatographic separation* and, the *detection systems*. The chart below (Figure 51) provides a summary of all these non-common elements.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

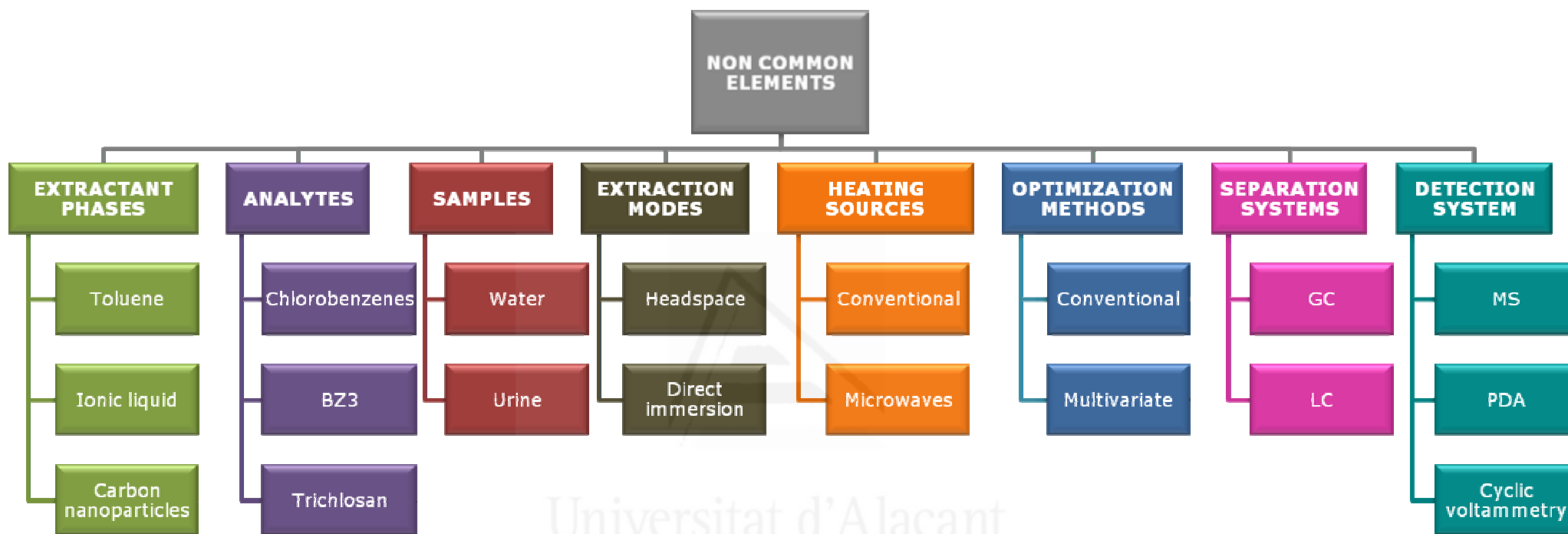


Figure 51. Chart of the non-common elements between the different chapters of this overview.

Different *extractant phases* have been studied in the different chapters of the experimental part, such as toluene, n-hexane and n-heptane (section IV.1.), ionic liquids [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] (section IV.2.1.) and [C<sub>6</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] (section IV.2.2. and IV.3.), and also carbon nanoparticles (section IV.4.). Ionic liquids have been used mainly because of the different advantages they afford in comparison with organic solvents. In fact, one of the purposes of the present work was to eliminate them in order to develop more ecological methods. The ionic liquids studied belong to the family that gives best results in the extraction process due to their properties (see Table 1 section II.4.). Among them [C<sub>6</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] was used the most because it is more apolar since it has a longer aliphatic chain and lower water solubility than [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]. This provides better extraction results, and thus, better preconcentration factors (Table 4) and less dissolution problems than when direct immersion is used. For the same reason [C<sub>8</sub>MIM][PF<sub>6</sub>] is less polar and less soluble in water than [C<sub>6</sub>MIM][PF<sub>6</sub>], but presents certain disadvantages due to its impurities. Ionic liquids with a high degree of purity have been used, in all cases above 98%, but the impurities can sometimes overlap the analyte signal. This overlapping of the impurity depends on the retention time of the analyte and the wavelength selected for the chromatogram. On the other hand, for the first time a specific kind of functionalized carbon nanoparticle is proposed as extractant phase. The simultaneous extraction and preconcentration capacity it provides is of utmost importance. Other outstanding factors are its low cost and the fact that its main applications are completely different to those proposed here. This permits more economical methods to be developed, thereby improving the figures of merit already presented. Moreover, it also offers the possibility of diversifying the chemical surface configuration, modifying or adding functional groups.

Different analytes have been determined in this overview. *Analytes* were selected considering their environmental relevance, uses, contaminant and toxic traits and contact with human beings. As in section II.8., these have been classified into three groups, the first is the group of the chlorobenzenes family, the second and third are BZ3 and trichlosan respectively. Most of the experimental work presented (section IV.1., IV.2.1. and IV.3.) aims to determine ten and eight analytes of the

chlorobenzenes family. These analytes have been selected as model analytes due to their exceptional extraction both in toluene and in ionic liquids. It is also important to remark their separation versatility in gas and liquid chromatography, and their possible detection by means of MS and PDA. BZ3 has been the second most studied analyte (section IV.2.2. and IV.4.). This analyte has shown good extractability both in ionic liquids and in carbon nanoparticles. The importance of BZ3 determination lies in its direct and daily use by human beings and its possible toxic effects. Trichlosan (section IV.4.) has been studied mainly because of its use and direct contact with human beings and in order to assess the possibility of extracting it by carbon nanoparticles.

The *samples* studied can be split into two groups: the first group includes all the water samples, such as wastewater, surface, stagnant and drinkable water; and, the second group includes urine samples. Water samples from different sources have been the object of most studies due to the importance that water has in our daily life. Besides, water is becoming an increasingly limited resource and it is very important to control its quality and contamination levels. On the other hand, urine samples enable us to study a matrix other than water and to study BZ3 excretion by the human organism. This process happens on a daily basis due to the massive use of personal care products and its study and control is of utmost importance.

Another non-common element between the chapters is the *extraction mode*. These can be classified in two groups: the first group includes the extraction in headspace (section IV.1., IV.2.1. and IV.3.); and, the second encompasses extraction in direct immersion (section IV.2.2. and IV.4.), where the extractant is in contact with the sample. The headspace extraction mode employed in the first group is used because the analytes to be determined are volatile and semivolatile, like chlorobenzenes. This extraction mode is also preferred for dirty matrices and volatile analytes, because it avoids problems in the extractant phase and improves analyte extraction, since diffusion in the gas phase is quicker. The SDME technique and carbon nanoparticles can be separated into the group dedicated to direct immersion. The direct immersion mode is employed to determine BZ3 because it is not a volatile compound. However, this extraction mode affords certain disadvantages: (i) slight reduction in sensitivity (lower

diffusion in liquid medium) and; (ii) partial dissolution of the extractant phase. Carbon nanoparticles have also been used in direct contact with the sample because the analytes selected for the study are not volatile. In this case two different extraction modalities are presented; in the first the extraction and determination are carried out separately, while in the second mode both stages are done in a single step. The first mode extracts almost all the analyte from the sample, eliminating the contaminant, while the second mode carries out an extraction where the sample is not disturbed, providing a superior preconcentration effect given just a few micrograms of nanoparticles are employed.

Two *heating sources* have been studied in this work. In section IV.2.1. the effect of temperature upon extraction has been studied, and with that aim a conventional heating source has been employed. However, this heating source poses certain disadvantages. For this reason microwave radiation is used in section IV.3. in order to avoid these disadvantages. The use of microwave radiation and  $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{PF}_6]$  as ionic liquid provides better preconcentration factors, higher sensitivity and better recoveries (see Tables 4 and 5).

The factors influencing extraction have been *optimized* by a step-by-step conventional method (section IV.1.) and multivariate optimization (section IV.2.1., IV.2.2. and IV.3.). Variables of the first experimental chapter are optimized via step-by-step optimization, taking a longer time and necessitating more experiments. Furthermore, the possible interaction between variables is unknown. For this reason, the variables used in the following chapters are optimized by experimental design. Screening is carried out in all cases due to the high number of variables that exert an influence on extraction. Once the variables exerting an important influence on extraction are known a central composite or a mixed-level design is applied, depending on whether all the variables are quantitative or some of them are qualitative. When the multivariate optimization is applied an important interaction between the temperature and ionic strength is observed. This fact would not have been observed with conventional optimization.

*Chromatography* has been widely used as a separation technique previous to detection in almost all the chapters. Liquid chromatography has

been employed (section IV.2.1., IV.2.2. and IV.3.) more than gas chromatography (section IV.1.) due to the limitation of the ionic liquid used in gas chromatography. Different columns and mobile phases have been employed in liquid chromatography depending on the analyte under study. A reverse phase column (250 x 4.6 mm and 5  $\mu\text{m}$ ) has been used to determine chlorobenzenes in water samples. To determine BZ3 in urine samples a shorter reverse-phase column measuring 125 mm in length was used because it was only necessary to separate the ionic liquid from the analyte, shortening the chromatogram time. Different experimental conditions have been used depending on the analytes. Table 6 shows the separation conditions used in liquid chromatography for the different analytes. Acetic acid has been employed with the aim of avoiding tailing problems of the UV filter. Gas chromatography has only been used in section IV.1. because toluene was used as extractant phase, obtaining detection limits one order of magnitude lower by using a more sensitive detection system.

Table 6. Separation conditions used in liquid chromatography.

Section	Sample	Column	Mobile phase	Flow (mL min <sup>-1</sup> )	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)
<b>Chlorobenzenes</b>					
IV.2.1.; IV.3.	Water	250 x 4.6 mm, 5 $\mu\text{m}$	MeCN:Water 65:35 (v/v)	1.0	210
<b>Benzophenone-3</b>					
IV.2.2.	Urine	125 x 4.0 mm, 5 $\mu\text{m}$	EtOH:1% HAc 60:40 (v/v)	1.0	289



Different *detection systems* have been used. When GC was employed as the separation technique, mass spectrometry was used as the detection system (section IV.1.). Selective ion monitoring (SIM) was selected with the aim of increasing the detector sensitivity and reducing matrix signal. A photodiode array detector has been used in the case of LC, which enables the maximum absorbance to be selected after a quick study in a wide range of wavelengths. Cyclic voltammetry was employed as the detection system when carbon nanoparticles were used. The selected analytes enabled the study of a reduction profile for BZ3 and an oxidation profile for trichlosan. Using this system enables a fast study to be made of the extraction of these analytes by carbon nanoparticles. To this end, carbon nanoparticles have been deposited over the electrode surface before or after extraction. Besides, the particles increase the electrode surface at the same time. The main disadvantage of this detection system is its low sensitivity, and as a consequence the limits of detection obtained are around  $\text{mg L}^{-1}$ . At this point it is important to remark that the results obtained with surface modified carbon nanoparticles intend to show its use as extractant phase and not to develop an analytical method with low LOD values.







Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **VI. CONCLUSIONES GENERALES/ GENERAL CONCLUSIONS**

---



Las principales conclusiones obtenidas del desarrollo de la investigación que se recoge en esta memoria se presentan a continuación:

- ✓ La técnica de microextracción en gota se ha consolidado como una técnica que puede emplearse con éxito para la determinación de distintos analitos en diferentes tipos de muestras y en ambas modalidades de extracción. Además, no sufre efectos de matriz importantes con la mayoría de las muestras, lo que permite realizar la extracción sin efectuar un tratamiento previo de la muestra evitando la manipulación de la misma y, por tanto, eliminando todos los inconvenientes que ello conlleva. Las figuras de mérito que se obtienen son comparables o incluso mejores a las proporcionadas por otras técnicas similares utilizadas para los mismos fines.
- ✓ Se ha probado experimentalmente que los líquidos iónicos son una excelente y versátil fase extractante con unas propiedades físicas y químicas únicas, siendo la más importante la baja volatilidad lo que reduce su toxicidad por inhalación al trabajar con ellos. Además, la gran diversidad de grupos catiónicos y aniónicos permite seleccionar el tipo más apropiado para cada aplicación concreta.
- ✓ La radiación de microondas es un tipo de energía que permite calentar únicamente a la muestra en unos pocos segundos permaneciendo a temperatura ambiente el resto del sistema. Este comportamiento mejora la extracción debido a la eliminación del efecto negativo que produce un aumento de la temperatura sobre la constante de partición entre la fase dadora y la extractante. El dispositivo experimental presentado en este trabajo es barato y fácil de montar, y mejora la sensibilidad.
- ✓ Las nanopartículas de carbón han mostrado ser excelentes extractantes. Su tamaño y su bajo precio ofrecen la posibilidad de realizar múltiples configuraciones para diversas aplicaciones.
- ✓ Todos los métodos propuestos son rápidos, sencillos, ecológicos, sensibles, precisos, exactos y económicos, encontrándose al alcance de todos los laboratorios analíticos ya que no es necesario

realizar una inversión importante en instrumentación cara y sofisticada.

- ✓ Las estrategias de optimización empleadas permiten reducir apreciablemente el tiempo y el número de experimentos a realizar, disminuyendo así la cantidad de muestra y reactivos utilizados y proporcionando mayor información que las estrategias de optimización convencional paso a paso.
- ✓ Parte de los analitos estudiados pertenecen a listas prioritarias de carcinogénicos y contaminantes, y el resto son considerados contaminantes emergentes por sus posibles efectos sobre el medioambiente y el ser humano. Por ello, los estudios llevados a cabo en el presente trabajo experimental son considerados hoy día imprescindibles.
- ✓ Finalmente, y de forma general, en el presente trabajo se han desarrollado y evaluado nuevas estrategias para la miniaturización de la preparación de la muestra, mejorando así la etapa más crítica del proceso analítico total.

The main conclusions of this research, which are outlined in this overview, are presented below:

- ✓ Single drop microextraction technique has been consolidated as a technique which can be employed successfully to determine different analytes in different kinds of samples and in both extraction modalities. Moreover, there are no important matrix effects for most samples, which enables extraction to be done without a previous pretreatment of the sample, thereby avoiding handling, and avoiding all the related drawbacks this entails. The figures of merit obtained are comparable or even better than the values obtained by other similar techniques employed for the same purposes.
- ✓ It has been experimentally proven that ionic liquids are an excellence and versatile extractant phase with unique physical and chemical properties, with low volatility being the most important in reducing inhalation toxicity when working with them. Moreover, the wide diversity of the cationic and anionic groups allows the appropriate ionic liquid to be selected for each application.
- ✓ Microwave radiation is energy able to heat the sample in a few seconds maintaining the room temperature for the rest of the system. This improves extraction by eliminating the negative effect of increased temperature on the partition coefficient between the acceptor and donor phase. The apparatus presented in this work is economical, easy-to-handle and improves sensitivity.
- ✓ Carbon nanoparticles have been shown to be an excellent extractant. Their size and low price afford the possibility of using multiple configurations for different applications.
- ✓ All the proposed methods are considered to be fast, simple, ecological, sensitive, precise, accurate and economical; thereby remaining within reach of all analytical laboratories as there is no need for any heavy investments to be made in expensive and sophisticated instrumentation.



- ✓ The optimization strategies employed significantly reduce time and the number of experiments, decreasing the quantity of sample and reagents used and providing more information than conventional optimization strategies.
- ✓ Some of the analytes under study belong to priority lists of carcinogenics and contaminants, and the rest are considered to be emergent contaminants because of their effects on the environment and human beings. Therefore, the studies carried out are considered essential nowadays.
- ✓ Finally, and on the whole, new strategies for the miniaturization of sample preparation have been developed and evaluated in the present work, improving the critical step of the total analytical process.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante







Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **VII. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN/ FUTURE WORKS**

---



El trabajo experimental descrito en la presente memoria de investigación no se puede considerar un punto y final. Como en todo trabajo experimental extenso se han realizado aportaciones significativas, pero durante el desarrollo del mismo también se han planteado nuevas preguntas o retos que es necesario abordar. Entre ellos se encuentran:

- ✓ Desarrollo de una interfase de desorción que permita utilizar los líquidos iónicos en la cromatografía de gases y obtener así una mejor sensibilidad.
- ✓ Desarrollo de nuevos métodos en los que se utilicen las nanopartículas de carbón en diferentes configuraciones con la finalidad de mejorar la sensibilidad y selectividad y ampliar el intervalo de analitos a extraer.
- ✓ Introducir nuevos nanomateriales como fases extractantes como las nanopartículas magnéticas.
- ✓ Aplicación de la técnica de microextracción en gota para la determinación de compuestos inorgánicos, especialmente organometálicos.
- ✓ Seguir desarrollando nuevas metodologías de la técnica de microextracción en gota con el fin de eliminar los escasos inconvenientes que todavía presenta.
- ✓ Y en definitiva, seguir trabajando en el desarrollo de métodos sencillos, rápidos, sensibles, precisos, exactos, pero sobre todo ecológicos y económicos, que no requieran la utilización de una instrumentación cara y costosa y, por tanto, de difícil acceso para la mayoría de los laboratorios analíticos.

The experimental work described in the present research report cannot be considered as finished. All extensive experimental work provides significant contributions, but new questions or challenges also come up. Among them we can find those listed below:

- ✓ Develop a desorption interface with the aim of using the ionic liquids with gas chromatography in order to obtain greater sensitivity.
- ✓ Develop new methods where carbon nanoparticles with different configurations will be used with a view to improving the sensitivity, selectivity and increasing the number of analytes to be extracted.
- ✓ Test new nanomaterials as extractant phases, such as magnetic nanoparticles.
- ✓ Apply the single-drop microextraction technique to determine inorganic analytes, especially organometallic ones.
- ✓ Develop new methodologies of the microextraction technique in order to eliminate the few drawbacks it still poses.
- ✓ On the whole, develop fast, simple, sensitive, accurate, precise, but mainly ecological and economical methods with no requirements of expensive and sophisticated instrumentation, which is not within reach of most analytical laboratories.









Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **ANEXOS**

---





Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **A. Coeficientes de partición octanol-agua de los analitos**

---



<b>Analito</b>	<b>Log <math>K_{o/w}</math></b>
• 1,3-Diclorobenceno	3.48
• 1,4-Diclorobenceno	3.38
• 1,2-Diclorobenceno	3.38
• 1,3,5-Triclorobenceno	4.02
• 1,2,4-Triclorobenceno	3.98
• 1,2,3- Triclorobenceno	4.04
• 1,2,4,5-Tetraclorobenceno	4.51
• 1,2,3,4-Tetraclorobenceno	4.55
• Pentaclorobenceno	5.03
• Hexaclorobenceno	5.86
• Benzofenona-3 (BZ3)	3.52
• Triclosán	4.76

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante





Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## **B. Comunicaciones a congresos**

---





---

## 12<sup>as</sup> Jornadas de Análisis Instrumental, Barcelona (España), octubre 2008

- Comunicación oral: A simple and commercial-readily available approach for the direct use of ionic liquid-based single-drop microextraction prior to gas chromatography: determination of chlorobenzenes in real water samples. Román, I.P.; Vidal, L.; Chisvert, A.; Canals, A.
- Póster: Determination of organochlorine pesticides by single drop microextraction (SDME) in complex matrices. Cortada, C.; Vidal, L.; Tejada, S.; Romo, A.; Canals, A.

## II Workshop Nanociencia y Nanotecnología Analíticas, Tarragona (España), septiembre 2008

- Póster y presentación flash: Chemically surface-modified carbon nanoparticle carrier for phenolic pollutants: Extraction and electrochemical determination of benzophenone-3 and triclosan. Vidal, L.; Chisvert, A.; Psillakis, E.; Canals, A.; Marken, F.

## 35<sup>th</sup> International Symposium on Environmental Analytical Chemistry, Gdansk (Polonia), junio 2008

- Póster: Determination of organochlorine pesticides in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction prior to gas chromatography-mass spectrometry. Canals, A.; Cortada, C.; Pastor, R.; Santiago, N.; Vidal, L.
- Póster: Development of a novel analytical method for the determination of UV filters in surface water samples using single-drop microextraction prior to liquid chromatography analysis. Canals, A.; Chisvert, A.; Salvador, A.; Vidal, L.

### **Trends in Sample Preparation 07, Graz (Austria), junio 2007**

- Comunicación oral: Microwave-assisted headspace ionic-liquid single-drop microextraction of chlorobenzenes from water samples.  
Vidal, L.; Psillakis, E.; Grané, N.; Marken, F.; Canals, A.

### **Ninth International Symposium on Advances in Extraction Technologies, Extech®2007, Aalesund (Noruega), junio 2007**

- Comunicación oral: Determination of Benzophenone-3 in human urine by ionic-liquid single-drop microextraction.  
Vidal, L.; Chisvert, A.; Salvador, A.; Canals, A.

### **12<sup>th</sup> Symposium on Sample Handling for Environmental and Biological Analysis, Zaragoza (España), octubre 2006**

- Póster: Multivariate optimization of headspace ionic liquid single drop microextraction of chlorobenzenes from water samples.  
Vidal, L.; Psillakis, E.; Domini, C.; Grané, N.; Marken, F.; Canals, A.  
Póster premiado con el *Roland W. Frei Award* concedido por "*The International Association of Environmental Analytical Chemistry (IAEAC)*".

### **11<sup>as</sup> Jornadas de Análisis Instrumental, Barcelona (España), noviembre 2005**

- Póster: Headspace single-drop microextraction for the analysis of chlorobenzenes in water samples.  
Vidal, L.; Kalogerakis, N.; Psillakis, E.; Canals, A.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

### **C. Otras publicaciones**

---



**C.1. Capítulo de libro:**

- C.E. Domini, L. Vidal, A. Canals, "Main parameters and assays involved with organic pollution of water" en Handbook of Water Analysis 2nd edition, Ed. L.M.L Nollet, (Taylor an Francis Group, 2007).

**C.2. Artículos en revistas:**

- A. Chisvert, I.P. Román, L. Vidal, A. Canals, "Simple and commercial readily-available approach for the direct use of ionic liquid-based single-drop microextraction prior to gas chromatography. Determination of chlorobenzenes in real water samples as model analytical application", J. Chromatr. A, en prensa.
- F. Pena-Pereira, I. Lavilla, C. Bendicho, L. Vidal, A. Canals, "Speciation of mercury by ionic liquid-based single-drop microextraction combined with high performance liquid chromatography-photodiode array detection", Talanta, en prensa.







Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la fecha acordó otorgar, por \_\_\_\_\_ a  
la Tesis Doctoral de Don/Dña. \_\_\_\_\_ la calificación de \_\_\_\_\_.

Alicante \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

El Secretario,

El Presidente,



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante  
**UNIVERSIDAD DE ALICANTE**  
**Comisión de Doctorado**

La presente Tesis de D. \_\_\_\_\_ ha sido  
registrada con el nº \_\_\_\_\_ del registro de entrada correspondiente.

Alicante \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

El Encargado del Registro,



La defensa de la tesis doctoral realizada por D/D<sup>a</sup> \_\_\_\_\_ se ha realizado en las siguientes lenguas: \_\_\_\_\_ y \_\_\_\_\_, lo que unido al cumplimiento del resto de requisitos establecidos en la Normativa propia de la UA le otorga la mención de “Doctor Europeo”.

Alicante, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

EL SECRETARIO

EL PRESIDENTE



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante