

Optimización del Método Analítico  
mediante HPLC con Detector de  
Fluorescencia para la  
Determinación de Ciertos  
Compuestos Aromáticos  
Policíclicos en Muestras de  
Aguas Limpias

S. García Alonso  
R.M. Pérez Pastor





Optimización del Método Analítico  
mediante HPLC con Detector de  
Fluorescencia para la Determinación  
de Ciertos Compuestos Aromáticos  
Policíclicos en Muestras de  
Aguas Limpias

S. García Alonso  
R.M. Pérez Pastor



Toda correspondencia en relación con este trabajo debe dirigirse al Servicio de Información y Documentación, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, Ciudad Universitaria, 28040-MADRID, ESPAÑA.

Las solicitudes de ejemplares deben dirigirse a este mismo Servicio.

Los descriptores se han seleccionado del Thesaurus del DOE para describir las materias que contiene este informe con vistas a su recuperación. La catalogación se ha hecho utilizando el documento DOE/TIC-4602 (Rev. 1) Descriptive Cataloguing On-Line, y la clasificación de acuerdo con el documento DOE/TIC.4584-R7 Subject Categories and Scope publicados por el Office of Scientific and Technical Information del Departamento de Energía de los Estados Unidos.

Se autoriza la reproducción de los resúmenes analíticos que aparecen en esta publicación.

Catálogo general de publicaciones oficiales  
<http://www.060.es>

**Depósito Legal:** M -26385-2011

**ISSN:** 1135 - 9420

**NIPO:** 721-13-046-X

Editorial CIEMAT

## CLASIFICACIÓN DOE Y DESCRIPTORES

S37

AROMATIC COMPOUNDS; FLUORESCENCE; OPTIMIZATION; SOLVENT  
EXTRACTION; WATER; CHROMATOGRAPY

**Optimización del Método Analítico mediante HPLC con Detector de Fluorescencia para la Determinación de Ciertos Compuestos Aromáticos Policíclicos en Muestras de Aguas Limpias**

García Alonso, S.; Pérez Pastor, R.M.;

17 pp., 2 figs., 8 tablas, 11 refs.

**Resumen:**

Se presenta un estudio sobre la comparación y evaluación de 3 métodos miniaturizados de extracción para la determinación de compuestos aromáticos policíclicos (PACs) seleccionados en aguas limpias. El principal objetivo persigue la optimización y desarrollo de métodos mediante HPLC con detector por fluorescencia, simples, rápidos y de bajo coste, minimizando el uso de volumen de disolvente extractante. Para ello, el trabajo incluye un estudio sobre el alcance de los métodos desarrollados a bajos y altos niveles de concentración y de precisiones intermedias.

**Optimization of the Analytical Method Using HPLC with Fluorescence Detection to Determine Selected Polycyclic Aromatic Compounds in Clean Water Samples**

García Alonso, S.; Pérez Pastor, R.M.;

17 pp., 2 figs., 8 tablas, 11 refs.

**Abstracts:**

A study on the comparison and evaluation of 3 miniaturized extraction methods for the determination of selected PACs in clear waters is presented. Three types of liquid-liquid extraction were used for chromatographic analysis by HPLC with fluorescence detection. The main objective was the optimization and development of simple, rapid and low cost methods, minimizing the use of extracting solvent volume. The work also includes a study on the scope of the methods developed at low and high levels of concentration and intermediate precision.





## **INDICE**

<b>1 – INTRODUCCION</b>	<b>3</b>
<b>2 – EXPERIMENTAL</b>	<b>5</b>
2.1 Equipos y reactivos	5
2.2 Condiciones cromatográficas	5
2.3 Etapa de tratamiento de las muestras	6
<b>3 – RESULTADOS</b>	<b>7</b>
3.1 Optimización de la etapa de extracción	7
3.2 Ensayos de recuperación	9
3.3 Cálculo del sesgo proporcional	11
3.4 Estimación de las incertidumbres asociadas	13
<b>4 – CONCLUSIONES</b>	<b>16</b>
<b>5 – BIBLIOGRAFIA</b>	<b>17</b>



## 1. INTRODUCCION

Un estudio detallado sobre la aplicación de cuatro métodos de extracción para la determinación de PAHs en aguas limpias fue previamente realizado en nuestro laboratorio (1); el principal objetivo fue minimizar los volúmenes de muestras y reactivos para la optimización de métodos más prácticos, simples, rápidos y de bajo coste. En el trabajo que se presenta, se ha ampliado el estudio sobre la aplicación de estas metodologías para la determinación de 4 nitro derivados y 2 hidroxilados de hidrocarburos aromáticos policíclicos en aguas de matrices limpias.

El estudio presenta interés en base al tipo de compuestos caracterizados por ser escasamente estudiados en la bibliografía, especialmente en el caso de hidroxilados, y al empleo de métodos que implican volúmenes muy reducidos, simplicidad, bajo coste y alta disponibilidad.

En particular, se han investigado las siguientes metodologías:

- Extracción líquido-líquido (LLE).
- Extracción con acetonitrilo y adición de sulfato magnésico (QuEChers).
- Micro-extracción líquido-líquido dispersiva con un líquido iónico (IL-DLLME).

Respecto a la extracción líquido-líquido, los objetivos principales para conseguir la miniaturización metodológica son la simplicidad, rapidez, sensibilidad y bajo coste, minimizando el volumen de disolventes orgánicos (2). En este sentido, los volúmenes involucrados no llegan a ser tan reducidos como los relacionados con los métodos de micro-extracción, pero son muy bajos respecto a los métodos clásicos. Así, suelen requerir muestras de 10 mL y se añaden volúmenes de disolvente de extracción en torno a 500  $\mu$ L.

El método de extracción con adición de sulfato magnésico (tipo QuEChers) está basado en realizar una extracción con acetonitrilo y la adición a la muestra acuosa de una cantidad de sulfato magnésico anhidro para inducir la partición líquido-líquido (3).

La realización del proceso de extracción con acetonitrilo implica importantes ventajas como la posibilidad de no necesitar evaporación para la posterior reconstitución en el disolvente del análisis cromatográfico mediante HPLC. Esto es muy interesante para aquellos compuestos susceptibles de pérdidas durante la etapa de concentración. Sin embargo, en el caso del análisis de los nitro-derivados, dada la necesidad de aplicar una etapa de derivatización adicional, la realización de ésta partiendo de la disolución preparada en acetonitrilo no permite una cuantificación adecuada, siendo necesario el cambio de disolvente de acetonitrilo a metanol, como se detallará en la sección de resultados.

Finalmente, la micro-extracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) fue introducida por Assadi et al en 2006 (4), y supone añadir un disolvente de extracción junto con uno dispersivo a la muestra acuosa para formar una disolución con formación de micro-burbujas. Esta formación lleva implícita un rápido alcance del equilibrio, con muy bajo consumo de disolventes y ciertamente simple. El principal inconveniente que conllevan estos métodos es que requieren el uso de disolventes de mayor densidad que el agua, habitualmente clorados y que se caracterizan por su carácter tóxico. Una alternativa es el empleo de líquidos iónicos, sales con puntos de fusión por debajo de los 30  $^{\circ}$ C. Se han denominado disolventes "verdes" porque tienen bajas presiones de vapor que minimizan la liberación de productos químicos a la atmósfera cuando son utilizados como disolventes.

Son líquidos formados por iones, por lo que su estructura es totalmente diferente a la de cualquier otro disolvente que esté formado por moléculas. Las propiedades de un disolvente dependen de la interacción entre las moléculas del mismo: si son fuertes, el disolvente es denominado "polar" y si son débiles, será "apolar". La gran originalidad de los líquidos iónicos es que los iones negativos están presentes en la misma cantidad que los positivos, de modo que el conjunto del líquido es eléctricamente neutro.

Los puntos de fusión de sales como cloruros de calcio, potasio, sodio se encuentran entre los 780-800 °C y la mayor parte de las moléculas orgánicas a estas temperaturas se descomponen. Las principales propiedades físico-químicas de los líquidos iónicos son que no tienen prácticamente presión de vapor y que presentan una elevada estabilidad electroquímica (5).

Presentan también algunas desventajas como alto precio y su difícil manejo por ser muy viscosos. Además, los iones perfluorados podrían no ser tan "verdes" como a menudo son considerados en base a la ruta de síntesis y de disposición final (6).

Para el desarrollo y optimización de los métodos planteados se ha considerado de gran interés la validación metodológica que asegure fiabilidad de los resultados. Así, se han investigado, por una parte, la posible existencia de sesgos en el método analítico y, por otra, las contribuciones más importantes de incertidumbre.

Cuando un método analítico se aplica en un intervalo amplio de concentraciones, la trazabilidad de los resultados debe verificarse calculando tanto el sesgo proporcional como el constante. El primero se caracteriza porque varía con la concentración y se expresa en términos de recuperación, mientras que el segundo permanece constante y se mide en términos de concentración. La estimación del sesgo proporcional se realiza utilizando muestras de referencia a varios niveles de concentración representativas de las muestras de rutina. Si no existe disponibilidad, se emplean muestras adicionadas.

Si la recuperación aparente es significativamente diferente del 100%, los resultados finales deberán corregirse. Una representación de la concentración encontrada frente a la concentración añadida proporciona una estimación de la recuperación del método a partir de la pendiente de la recta y del sesgo constante del método, según la ordenada en el origen. Así, resultados trazables corresponderán a que la pendiente de la recta no difiera significativamente de uno y que la ordenada de la recta no difiera de cero. Cuando no sean trazables, deberá revisarse el método o bien corregir los resultados aplicando el factor correspondiente.

Ante la presencia de sesgos en el método de análisis se hace necesaria la estimación de incertidumbres asociadas al mismo para lograr fiabilidad de las medidas realizadas. Considerando el número de compuestos y técnicas de extracción a comparar en este trabajo, se ha considerado de especial interés realizar una evaluación de las incertidumbres para completar la caracterización analítica. En particular, se han investigado en las tres etapas analíticas consideradas como fuentes de dispersión más importantes del procedimiento optimizado:

- Cuantificación cromatográfica
- Evaluación de sesgo
- Etapa de extracción

## 2 - EXPERIMENTAL

### 2.1 - Equipos y reactivos

- Balanza analítica "Denver Instruments" ( $\pm 0.00001$  g).
- Cromatógrafo de líquidos Agilent, con inyector automático y detector de fluorescencia serie 1100, módulo de desgasificación, bomba de gradientes cuaternaria.
- Columna Agilent XD (5  $\mu$ m, 150\*4.6mm).
- Acetonitrilo, metanol, calidad HPLC (Carlo Erba).
- Sulfato magnésico (Sigma Aldrich, 99%).
- Cloruro sódico (Sigma Aldrich)
- Tubos roscados de fondo cónico y con capacidad de 5 mL.

### 2.2 - Condiciones cromatográficas

Para realizar los análisis se utilizó un cromatógrafo Agilent series 1200 equipado con detector de fluorescencia serie 1100. La temperatura se mantuvo a 37 °C y las condiciones cromatográficas se detallan en la tabla.

Dada la naturaleza no fluorescente de los nitro-hidrocarburos aromáticos policíclicos, se realizó una derivatización previa para su análisis mediante reducción a compuestos aminados con borohidruro sódico/cloruro de cobre (7). Dicho procedimiento de derivatización ha sido optimizado previamente en nuestro laboratorio (8) investigando factores como masa de borohidruro sódico a añadir, tiempo de reacción, número de extracciones y temperatura. Las condiciones seleccionadas como óptimas fueron:

- Adición de 0.5 mL de una disolución acuosa de cloruro de cobre (0.05 %) y 0.05 g de borohidruro sódico a 1 mL del extracto en metanol.
- Agitación mediante ultrasonidos (15 min) y posteriormente mantenida a temperatura ambiente (1 hora).
- Adición de 1 mL de agua y 1 mL de diclorometano, agitando manualmente para la extracción de los amino derivados.
- Recolección de la fase orgánica de diclorometano con jeringa en el fondo del vial cónico y cambio de disolvente mediante concentrado bajo corriente de nitrógeno a acetonitrilo para su análisis cromatográfico.

Una recopilación de las principales condiciones instrumentales aplicadas para la determinación cromatográfica de los derivados policíclicos estudiados se incluye en la tabla 1. Cabe mencionar que para poder llevar a cabo el análisis del compuesto amino derivado de fluoranteno, fue necesario realizar un segundo análisis independiente (condiciones especificadas en la tabla 1 como 2º análisis), dada la coelución que se produce 1NPy/3NFI bajo las condiciones cromatográficas aplicadas.

	PAHs	NPAHs	OHPAHs
Columna	Supelcosil C18 (5 µm, 250*4.6 mm)	Eclipse XDB C18 (5 µm, 150*4.6 mm)	
Disolventes	AcN/H <sub>2</sub> O 1.5 mL.min <sup>-1</sup>	AcN/H <sub>2</sub> O (1% AcOH) 1 mL.min <sup>-1</sup>	
Bomba	Gradiente	Gradiente	Isocrático
	0' - 45/55	0' - 50/50	0' - 60/40
	2' - 45/55	12' - 100	4.5' - 60/40
	28' - 100/0	15' - 100	
	31' - 100/0	20' - 50/50	
	33' - 45/55		
	37' - 45/55		
Detector FD	? <sub>exc</sub> ? <sub>em</sub>	? <sub>exc</sub> ? <sub>em</sub>	? <sub>exc</sub> ? <sub>em</sub>
	0' - 280/320 (Na, Ace,F)	1 <sup>o</sup> análisis	0' - 259/386 (OHPH)
	13.10' - 250/360 (Ph)	0' - 243/429 (3NPh)	4.5' - 242/388 (OHPyr)
	14.15' - 250/370 (An)	(9NPh)	
	15.45' - 240/460 (Fl)	7' - 372/445 (1NPyr)	
	16.65' - 250/370 (Pyr)	2 <sup>o</sup> análisis	
	19.10' - 270/390 (BaA, Cry)	0' - 300/530 (3NFI)	
	21.80' - 300/430 (BbF, BkF, BaP, DBA, BghiP)		

Tabla 1 - Condiciones experimentales aplicadas durante el análisis cromatográfico de los PACs investigados.

### 2.3 – Etapa de tratamiento de las muestras

A continuación se describe el procedimiento de extracción desarrollado para cada uno de los métodos ensayados.

**LLE.** El método miniaturizado de la extracción líquido-líquido convencional se optimizó tras añadir a 7.5 mL de muestra acuosa, 1 mL de diclorometano, procediendo a la agitación de la mezcla y centrifugado a 2500 rpm (10 min) para separar fases. Se recogen 250 µL de extracto y se procede a su re-constitución en acetonitrilo con volumen final de la disolución para inyectar entre 150 µL y 1 mL según los niveles de concentración.

**QuEChers.** Se mezclan 5 mL de disolución acuosa con 5 mL de acetonitrilo y se añaden 2 g de sulfato magnésico anhidro más 1 g de cloruro sódico. Transcurridos un par de minutos se recoge el sobrenadante (próximo a 1 mL) y, si los niveles de concentración son suficientemente altos, se reserva para la inyección en el cromatógrafo.

**IL-DLLME.** Se prepara una disolución por pesada de líquido iónico (alrededor de 0.7 g) en acetona (10 mL). Conocida la densidad del reactivo podrá calcularse el volumen inicial de cada adición. A 7.5 mL de muestra acuosa se añaden 1 mL de disolución de líquido iónico disuelto en acetona, en tubo de 10 mL de fondo cónico. Se realizan hasta 4 emboladas con la jeringa de 1 mL para favorecer la formación de microgotas y facilitar la extracción. Se procede a la centrifugación a 2500 rpm (10 min). Se recogen alrededor de 30 µL depositados en el fondo de los tubos.

En particular, el disolvente extractante se preparó por pesada de 0.53442 g de líquido iónico hexafluorofosfato ([C<sub>8</sub>MiM][PF<sub>6</sub>]) disuelto en 10 mL de acetona. Considerando la densidad del [C<sub>8</sub>MiM][PF<sub>6</sub>], 1.362 g/cc:

$$0.70 \cdot 1 \text{ mL} / 1.362 = 514 \text{ µL}$$

514 µL \* 1 mL acetona/10 mL acetona= 51.4 µL de [C<sub>8</sub>MiM][PF<sub>6</sub>] se añadieron por cada mililitro de disolución de acetona.

Partiendo de estos cálculos y del volumen final recogido depositado tras centrifugación (alrededor de 30  $\mu\text{L}$ ), se dedujeron los correspondientes rendimientos de recuperación.

En general, fue necesaria una etapa adicional de cambio de disolventes mediante concentración bajo corriente de nitrógeno. Esta etapa debe ser rigurosamente controlada y efectuarla muy lentamente, asegurando la eliminación del disolvente original. Existe un alto potencial para involucrar significativos errores por pérdidas, contaminaciones o efectos de dilución teniendo en cuenta los volúmenes tan reducidos que están implicados. En el caso de los PAHs, se realizó un cambio de disolvente a acetonitrilo, mientras que los NPAHs requirieron un cambio a metanol. Debido a ello, el extracto se dividió en dos alícuotas para cada análisis. Los análisis cromatográficos de los hidroxilados no mostraron importantes diferencias cuando se empleó acetonitrilo o metanol como disolvente de medida.

### **3 RESULTADOS**

#### **3.1 – Optimización de la etapa de extracción**

Se estableció un volumen no inferior a 150  $\mu\text{L}$  como valor umbral para asegurar la correcta medida volumétrica de inyección en los viales convencionales; así, en algunos de los métodos propuestos, el factor de enriquecimiento que se ganaba reduciendo el volumen añadido de disolvente de extracción, se perdía por efecto de dilución al volumen final de inyección.

Teniendo en cuenta el alto riesgo de error por posibles pérdidas y contaminaciones en la medida final que presentaba la etapa de concentración bajo corriente de nitrógeno, se realizaron ensayos para investigar su influencia. En particular, se estudió la variación de los rendimientos de recuperación tras la concentración de las disoluciones finales a 1 mL, 0.5 mL y 150  $\mu\text{L}$  trabajando con extrema precaución de manipulación con disoluciones marcadas a diferentes niveles de concentración (2.5, 5, 10 y 25 ppb). A partir de los resultados obtenidos y tras la aplicación de un análisis de varianza de una variable, no se encontraron diferencias significativas entre las disoluciones sin aplicar concentración y las que habían tenido concentración previa.

Para optimizar la extracción líquido-líquido, se plantearon ensayos utilizando volúmenes de 0.5 y 1 mL de hexano y cloruro de metileno para la extracción de 7.5 mL de disoluciones acuosas marcadas en concentración 1  $\mu\text{g/L}$ . Los resultados obtenidos se recopilan en la tabla 2, a partir de los cuales se seleccionó 1 mL de diclorometano como disolvente de extracción.

PAHs	DCM		Hx
	0.5 mL	1 mL	1 mL
<b>F</b>	73	105	92
<b>Ph</b>	82	113	99
<b>An</b>	70	103	88
<b>Fl</b>	65	113	107
<b>Pyr</b>	60	94	72
<b>BaA</b>	55	87	71
<b>Cry</b>	63	85	71
<b>BbF</b>	57	89	72
<b>BkF</b>	53	86	69
<b>BaP</b>	41	72	56
<b>DBA</b>	61	73	73
<b>BghiP</b>	52	70	62
<b>NNa</b>	73	112	123
<b>NPhe</b>	83	102	126
<b>NPyr</b>	40	64	76
<b>NFI</b>	48	73	77
<b>OHPH</b>	109	93	68
<b>OHPyr</b>	64	64	56

Tabla 2 – Rendimientos (%) obtenidos tras efectuar los ensayos de recuperación con diclorometano (DCM) y hexano (Hx) como disolventes de extracción de disolución acuosa de  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (7.5 mL).

La presencia de cualquier resto o porción de fase acuosa en la fase orgánica de diclorometano conlleva importantes errores cuantitativos por efecto de dilución, teniendo en cuenta los volúmenes tan reducidos que se utilizan. Debido a ello, es imprescindible la centrifugación de la mezcla para obtener la separación de ambas fases y recoger al menos el 80% del volumen de diclorometano inicialmente añadido. Es importante asegurar la composición orgánica del extracto, sin presencia de agua. Como se ha detallado en la sección de experimental, la etapa de concentración es crítica, de realización muy lenta por riesgo de pérdidas o de error por no asegurar acetonitrilo como disolvente final.

Los ensayos de optimización de extracción tipo QuEChers se iniciaron partiendo de las siguientes condiciones establecidas convencionalmente (2, 9) y a partir de los resultados obtenidos durante la optimización del método analítico para la determinación de PAHs en aguas (1):

- 5 mL de muestra acuosa (0,5  $\mu\text{g}/\text{L}$ )
- 5 mL de acetonitrilo
- 2 g de sulfato magnésico
- 1 g de cloruro sódico

Los rendimientos para los PAHs fueron en general satisfactorios, entre el 90 y 100%, mientras que para los NPAHs y OHPAHs seleccionados se alcanzaron rendimientos por encima del 70%, a excepción del NFI que estuvieron alrededor del 50% (tabla 2).

Dado que se produce un calentamiento de la disolución tras la adición de sulfato magnésico, se realizaron ensayos en baño de hielo para evitar la posible volatilización o degradación de algunos de los compuestos. En general, se dedujeron rendimientos relativamente más altos cuando se aplicó baño frío (Figura 1).



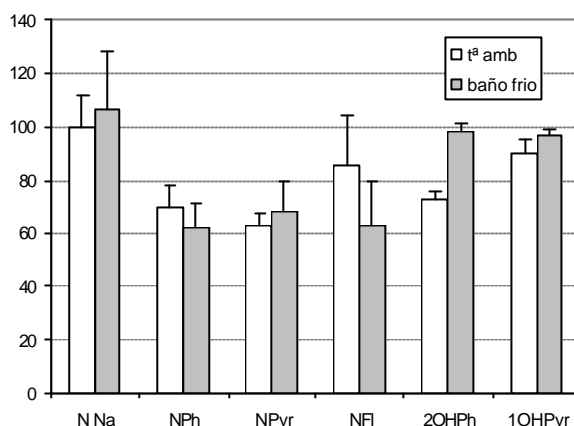


Figura 1 – Resultados de recuperaciones (%) obtenidas para los nitro e hidroxi derivados estudiados a temperatura ambiente y aplicando baño de hielo durante la mezcla de la disolución acuosa/sulfato magnésico.

En cuanto a la etapa de derivatización de los compuestos nitroderivados a amino-derivados, ésta fue relativamente delicada por manejo de volúmenes muy reducidos y la necesidad de:

- Realizar un cambio previo de disolventes de acetonitrilo a metanol. Teniendo en cuenta la miscibilidad entre acetonitrilo/diclorometano, el volumen final tras la derivatización es difícilmente medible si el extracto se mantiene en acetonitrilo.
- Realizar etapa adicional de centrifugación a 2500 rpm (12 min), para asegurar la separación de fases acuosa/diclorometano.

La realización de ensayos previos con cloroformo como disolvente en micro-extracción dispersiva llevó a la obtención de resultados poco reproducibles y rendimientos extremadamente bajos en el caso del nitro-pireno. Teniendo en cuenta las dificultades que implica el manejo de volúmenes tan pequeños de este disolvente, su volatilidad y toxicidad, junto con la reducida eficacia para extraer el hidroxi-pireno y nitro-derivados más pesados, se descartó su uso.

### 3.2 – Ensayos de recuperación

Según la metodología descrita en el apartado de experimental y en base a la bibliografía revisada (10, 11), se realizaron ensayos preparando disoluciones de PACs a distintos niveles de concentración en agua. Los resultados de recuperación (%) obtenidos tras efectuar ensayos comparativos para investigar el alcance de los métodos desarrollados se recogen en la tabla 3. En particular, se llevaron a cabo con disoluciones en concentración desde 0.1 µg/L a 40 µg/L y efectuando 4 ensayos en cada nivel de concentración.

Respecto a IL-DLLME, se alcanzaron rendimientos de extracción próximos al 100% para los PAHs con concentraciones altas, mientras que para los PAHs más pesados (a partir de BbF) los resultados fueron peores conforme disminuyó su concentración.

En el caso de los dos hidroxi-derivados investigados, el hidroxi-fenantreno se recuperó con rendimientos del 100 %, sin influencia de los niveles de concentración, si bien los rendimientos del hidroxi-pireno fueron solo del 50 % para niveles de concentración de 30 µg/L y tan solo del 14 y 8 % cuando los niveles fueron de 3 y 0.3 µg/L, respectivamente.

Para intentar mejorar estos escasos rendimientos, se estudió la posible influencia de diferentes parámetros:

- Ensayos realizados con metanol y acetona como disolventes utilizados para la preparación de la disolución de agente de líquido iónico no indicaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos.
- Otro parámetro con posible influencia en la eficacia de recuperación de este hidroxido-derivado fue la temperatura. Se plantearon ensayos sometiendo las muestras acuosas tratadas con líquido iónico como extractante, a una congelación previa y posterior centrifugación a menor r.p.m. (1500) y tiempo de aplicación (3 min). Sin embargo, los resultados obtenidos no indicaron incrementos en la recuperación del hidroxido-pireno, si bien se alcanzó una rápida separación de fases acuosa/líquido iónico.
- Tampoco se observó influencia por efecto del tiempo desde la adición de la disolución de líquido iónico. Así, transcurrida una hora, los resultados fueron similares a los obtenidos en los ensayos en los que se procedía a la centrifugación inmediata tras la mezcla.

PAHs	LLE		QuEChEr			IL-DLLME		
	0.1 µg/L	30 µg/L	0.1 µg/L	2.5 µg/L	30 µg/L	0.3 µg/mL	3 µg/mL	30 µg/mL
F	98±4.6	116±4.4	104±8.5	91±16	87±1.2	117±4.3	116±8.3	125±7.8
Ph	109±5.1	108±8.1	91±2.8	86±6.1	87±1.5	116±10	115±9.0	122±10
An	89±4.9	110±4.0	103±9.2	90±15	74±0.8	126±5.5	130±8.9	130±11
Fl	92±4.4	114±3.4	103±4.2	90±16	85±2.3	120±7.2	110±6.9	111±10
Pyr	102±4.5	95±5.1	106±7.1	95±3.3	74±2.2	91±6.0	92±5.0	93±8.9
BaA	77±3.9	100±3.3	103±9.2	90±16	71±1.2	62±3.5	75±3.3	95±8.3
Cry	80±2.4	101±3.6	109±9.9	70±3.0	73±1.6	100±20	86±17	101±11
BbF	67±2.7	96±4.6	96±11	88±11	77±4.1	50±3.8	61±1.7	85±5.8
BkF	68±3.3	101±4.7	95±11	87±11	82±1.5	45±3.0	67±2.5	106±10
BaP	61±3.8	82±4.3	96±9.0	87±11	59±2.4	38±2.2	60±2.6	98±8.4
DBA	52±9.2	78±7.0	90±11	85±8.0	70±2.3	33±1.9	64±3.7	97±10
BghiP	57±6.6	65±5.9	91±6.4	85±7.6	64±2.2	36±4.2	62±2.2	92±10
<b>NPAHs</b>	<b>1 µg/L</b>	<b>30 µg/L</b>	<b>0.4 µg/L</b>	<b>1 µg/L</b>	<b>40 µg/L</b>	<b>0.3 µg/mL</b>	<b>3 µg/mL</b>	<b>30 µg/mL</b>
NNa	112±20	111±22	101±8.9	88±13	108±9.4	79±11	104±22	79±11
NPhe	102±9.5	80±11	53±12	70±9.7	80±3.6	37±9.0	52±5.0	53±7.6
NPy	64±7.9	44±7.0	42±12	55±17	80±10	104±9.7	107±11	104±9.4
NFl	73±10	125±22	55±6.4	38±6.0	83±7.7	99±18	114±9.0	110±19
<b>OHPAHs</b>	<b>1 µg/L</b>	<b>30 µg/L</b>	<b>0.4 µg/L</b>	<b>1 µg/L</b>	<b>40 µg/L</b>	<b>0.3 µg/mL</b>	<b>3 µg/mL</b>	<b>30 µg/mL</b>
OHPPh	103±13	121±4.5	90±11	95±1.1	101±4.6	105±12	109±5.1	97±9.1
OHPyr	64±8.6	80±15	69±16	82±6.4	92±24	7.9±1.8	14±4.1	53±13

Tabla 3 – Resultados de rendimientos obtenidos (%) a diferentes niveles de concentración de los compuestos de interés.

Respecto a la extracción tipo QuEChEr, lo más significativo fue una cierta disminución en el rendimiento conforme se incrementaba el nivel de concentración de los PAHs. El efecto fue más acusado para los compuestos más pesados. Esto implicaría la necesidad de modificar las proporciones de reactivos para evitar efectos posibles de saturación del agente extractante. Los nitro-derivados indicaron menores rendimientos por debajo de 1 µg/L y para los hidroxido-derivados fueron similares los rendimientos por encima de 1 µg/L.

Dos posibles causas pueden justificar los bajos rendimientos deducidos para algunos de los compuestos investigados:

1. Trabajar con muestras con niveles de concentración del compuesto de interés fuera del intervalo de aplicabilidad de los métodos desarrollados.
2. El método no es adecuado para la extracción eficaz del compuesto.

Causa	PAC	Técnica	Nivel de concentración (µg/L)
1	PAHs pesados (desde BaA)	LLE y ILDLLME	=1
		QuECher	=30
1	NFI	QuECher	= 3
1	OHPyr	LLE y QuECher	=1
2	NPhe	IL-DLLME	
2	NPyr	LLE y QuECher	
2	OHPyr	ILDLLME	

Tabla 4 – Resumen de los PACs con bajos resultados de recuperación obtenidos tras aplicar los métodos de extracción propuestos en este trabajo.

Para establecer en más detalle estos aspectos, el siguiente apartado incluye una detallada evaluación de sesgos proporcionales.

### 3.3 – Cálculo de sesgo proporcional (8)

Se planteó la verificación de para qué compuestos y aplicando qué técnica podía considerarse significativa la variabilidad de algunos de los resultados de recuperación obtenidos en función del nivel de concentración. Para ello, se dedujo el valor medio de las recuperaciones obtenidas en cada una de las técnicas investigadas, según:

$$\bar{R} = \frac{\sum R_i}{n}$$

Donde  $\bar{R}$  corresponde a la recuperación media,  $R_i$  es cada uno de los valores obtenidos a cada nivel de concentración estudiado y  $n$  es el número total de muestras adicionadas. Como cada ensayo se realizó por cuadruplicado,  $n=4*3$  para QuECher e IL-DLLME y  $n=4*2$  para LLE.

Asimismo, es necesario hacer una estimación de la incertidumbre asociada y, en base a estos dos parámetros, calcular un parámetro “t” y compararlo con el tabulado para finalmente establecer si es o no significativo el valor de sesgo proporcional deducido. Se ha calculado como precisión intermedia, aplicando la siguiente ecuación:

$$U_{RSD} = \sqrt{\frac{\sum (RSD_i^2 \cdot (n_i - 1))}{\sum (n_i - 1)}}$$

Siendo  $U_{RSD}$  el parámetro de incertidumbre estimado como precisión intermedia a partir de las desviaciones típicas relativas obtenidas para cada nivel de concentración (RSD) y  $n$  es el número de ensayos realizados en cada uno de dichos niveles. Finalmente, el parámetro “t” se calcula a partir de la siguiente ecuación

$$t = \frac{|\bar{R} - 1|}{U_{RSD}}$$

Y es comparado con el tabulado según una distribución T de Student, de dos colas, para un nivel de significancia de 0.05 y n-1 grados de libertad, siendo n el número de muestras adicionadas analizadas (n=4\*2 para ensayos LLME y n=4\*3 para ensayos QuECher y IL-DLLME).

La tabla 5 recopila los valores calculados, apareciendo en cursiva aquellos que superan los establecidos teóricamente y que, por tanto, indican la presencia de sesgo proporcional en la metodología desarrollada. Esto implica, como ya se ha indicado previamente, la revisión del método y aplicación en su caso de un factor de corrección en los resultados. Asimismo, es de especial interés evaluar la contribución de incertidumbre del parámetro en la medida analítica final.

PAHs	LLE			QuECher			IL-DLLME		
	R prom	uRSD	t	R prom	uRSD	t	R prom	uRSD	t
<b>F</b>	1.05	0.043	1.16	0.89	0.112	1.01	1.19	0.059	3.28
<b>Ph</b>	1.09	0.063	1.43	0.85	0.046	3.31	1.18	0.082	2.15
<b>An</b>	0.98	0.047	0.43	0.85	0.109	1.35	1.29	0.068	4.24
<b>Fl</b>	1.01	0.040	0.25	0.90	0.106	0.94	1.14	0.072	1.91
<b>Pyr</b>	0.99	0.049	0.20	0.86	0.047	3.03	0.93	0.074	1.00
<b>BaA</b>	0.87	0.043	3.02	0.82	0.115	1.53	0.78	0.065	3.40
<b>Cry</b>	0.89	0.033	3.33	0.85	0.059	2.45	0.96	0.174	0.24
<b>BbF</b>	0.79	0.044	4.77	0.80	0.103	1.92	0.65	0.061	5.66
<b>BkF</b>	0.82	0.048	3.75	0.81	0.100	1.88	0.72	0.070	3.94
<b>BaP</b>	0.70	0.057	5.26	0.75	0.094	2.67	0.66	0.065	5.32
<b>DBA</b>	0.63	0.140	2.64	0.76	0.091	2.59	0.65	0.076	4.65
<b>BghiP</b>	0.60	0.104	3.85	0.74	0.069	3.76	0.64	0.094	3.86
<b>NNa</b>	1.08	0.189	0.42	0.98	0.112	0.21	0.75	0.167	1.48
<b>NPhe</b>	0.95	0.117	0.40	0.64	0.155	2.35	0.44	0.172	3.26
<b>NPyr</b>	0.57	0.142	3.01	0.54	0.225	2.03	0.96	0.096	0.47
<b>NFl</b>	0.83	0.158	1.09	0.49	0.125	4.08	0.94	0.152	0.37
<b>OHPH</b>	1.08	0.132	0.61	0.90	0.076	1.37	1.05	0.090	0.56
<b>OHPyr</b>	0.72	0.160	1.75	0.81	0.206	0.94	0.29	0.257	2.75
t tab			2.365			2.228			2.228

Tabla 5 – Parámetros implicados en el cálculo de sesgo proporcional, a partir de los resultados de recuperaciones realizados y aplicando los métodos desarrollados en base a las tres técnicas investigadas.

De los resultados obtenidos, se deduce:

- Ö BaP, DBA y BghiP presentan sesgos asociados a las medidas efectuadas aplicando las tres técnicas de extracción estudiadas. Estos corresponden a los PAHs más pesados y apolares, últimos que eluyen de la columna cromatográfica y que suelen llevar asociadas siempre mayores dispersiones y errores de medida.
- Ö LLE: Además de los PAHs más pesados, se obtienen sesgos de medida para los NPAHs. Para el NPyr se alcanzan rendimientos de recuperación satisfactorios (por encima del 80%), sin la presencia de variación de sesgo de medida con la concentración analizada (intervalo 0.1-30 µg/L). Finalmente, en el caso de los dos hidroxilados estudiados, el más polar (OHPyr) corresponde con un importante sesgo según las concentraciones analizadas; en este sentido, cabe señalar la naturaleza apolar del disolvente utilizado durante la etapa de extracción frente al mayor carácter polar del OHPyr .
- Ö QuECher: según los resultados obtenidos, es la técnica que proporciona los mejores valores de rendimientos y menor número de PAHs con sesgos analíticos; por tanto, sería la técnica recomendada para el análisis de estos compuestos, si bien a niveles altos de concentración (30 µg/L) se obtienen rendimientos más bajos que, probablemente, se justifiquen por escapar del margen de aplicabilidad del método en

las condiciones experimentales. Los dos hidroxilados también se miden con buenas recuperaciones y ausencia de sesgos analíticos. Para los NPAHs, sin embargo, sólo se obtienen buenos resultados, tanto de recuperación como en cuanto a ausencia de sesgo, para el análisis de NNa (compuesto más polar del grupo considerado).

Ö IL-DLLME: Según el método desarrollado, los resultados indican limitado margen de aplicabilidad para la mayor parte de PAHs, NPhe e OHPyr, con presencia de sesgos analíticos significativos conforme disminuye la concentración analítica del analito. La aplicación del método desarrollado sería más adecuado para niveles de concentración superiores a 3 µg/L con mayores recuperaciones para un número más amplio de los compuestos investigados.

### 3.4 – Estimación de incertidumbres asociadas

Las componentes de incertidumbre más importantes se establecieron en el proceso de calibrado (análisis cromatográfico), proceso de validación del método (análisis de muestras adicionadas a distintos niveles) y proceso de extracción (tratamiento de la muestra).

#### Análisis cromatográfico

Principalmente afectadas por:

- Preparación de las disoluciones de calibrado ( $u_{Cstd}$ ).
- Calibración cromatográfica a partir de la estimación de la concentración aplicando ajuste por mínimos cuadrados ( $u_{Cx}$ ).

Respecto a aquellas asociadas con la preparación de las disoluciones de calibración, se incluyen las asociadas a la disolución stock de acuerdo a su certificación y a la cadena de dilución. Se considera más significativa la incertidumbre aportada por el suministrador de la disolución stock ( $\pm 1\%$ ), estimándose una contribución  $u_{Cpat}/C_{pat}$  de 0.02 (1% Dr. Ehrenstörfer, 10 µg/mL).

La incertidumbre asociada a la calibración por mínimos cuadrados incluye la variabilidad en la respuesta analítica y es evaluada por las desviaciones estándar de ordenada en el origen y pendiente de la línea de calibrado. Disoluciones con 4 niveles de concentración fueron preparadas y analizadas regularmente durante un periodo de 3 meses (5 puntos a cada nivel de concentración).

La segunda contribución importante en la determinación cromatográfica es la repetibilidad de la respuesta analítica cromatográfica y fue deducida a partir del análisis de 6 alícuotas de una disolución estándar. En definitiva, la incertidumbre relativa de la concentración de analito prevista ( $u_{Cx}/C_x$ ) a partir del calibrado por mínimos cuadrados fue calculada aplicando la siguiente ecuación:

$$\frac{u_{Cx}^2}{C_x^2} = \frac{u_y^2}{(y-b)^2} + \frac{u_b^2}{(y-b)^2} + \frac{u_m^2}{m^2}$$

Donde  $y$  es el valor promedio de la respuesta analítica de las cinco alícuotas de disolución patrón,  $u_y$  es la incertidumbre ( $w \cdot s_y / \sqrt{n}$ ) y aplicando la regresión lineal por mínimos cuadrados,  $b$  es la ordenada en el origen,  $u_b$  es la incertidumbre deducida de la desviación estándar ( $s_b$ ),  $m$  es la pendiente y  $u_m$  es la incertidumbre derivada ( $s_m$ ).

La combinación final de incertidumbres asociadas a la preparación de las disoluciones y recta de calibrado ( $u_{Cx}^2/X^2$ ) estuvo por debajo del 5% para los PACs investigados,

siendo las contribuciones procedentes de la preparación de estándar mayor que la procedente del ajuste de calibrado (Tabla 6). Solo las medidas de Pyr, NPh y NFI mostraron mayores contribuciones del ajuste de calibrado, especialmente para el NFI, que alcanzó el 22%. Estos resultados son coherentes con la baja sensibilidad que presenta la determinación cromatográfica del compuesto (valor bajo del parámetro de pendiente del ajuste de calibrado).

	$(u_{C_{pat}})^2/C_{pat}^2$	$(u_{C_x})^2/C_x^2$	$u_x^2/x^2$	$u_x/x$ (%)
<b>F</b>	0.0004	0.000347	0.00075	2.7
<b>Ph</b>	0.0004	0.000073	0.00047	2.2
<b>An</b>	0.0004	0.000366	0.00077	2.8
<b>Fl</b>	0.0004	0.000614	0.001	3.2
<b>Pyr</b>	0.0004	0.001879	0.0023	4.8
<b>BaA</b>	0.0004	0.000218	0.00062	2.5
<b>Cry</b>	0.0004	0.000066	0.00047	2.2
<b>BbF</b>	0.0004	0.000377	0.00078	2.8
<b>BkF</b>	0.0004	0.000011	0.00041	2.0
<b>BaP</b>	0.0004	0.000184	0.00058	2.4
<b>DBA</b>	0.0004	0.000104	0.0005	2.2
<b>BghiP</b>	0.0004	0.000202	0.0006	2.4
<b>3-NPh</b>	0.0004	0.000636	0.00096	3.1
<b>9-NPh</b>	0.0004	0.008831	0.00915	9.6
<b>1-NPyr</b>	0.0004	0.000231	0.00055	2.3
<b>3-NFI</b>	0.0004	0.04906	0.04906	22
<b>OH-Ph</b>	0.0004	0.0003326	0.00073	2.7
<b>OH-Pyr</b>	0.0004	0.0000815	0.00048	2.2

Tabla 6 - Componentes de incertidumbre del proceso de calibrado en las medidas cromatográficas de los PACs de interés.

### Sesgo proporcional

Las correspondientes contribuciones asociadas a la variabilidad del análisis cromatográfico en función de los niveles de concentración, fueron previamente evaluadas y están incluidas en la tabla como incertidumbres relativas intermedias ( $u_{RSD}$ ). Como puede verse, las contribuciones estuvieron alrededor del 10% para los PAHs seleccionados para las tres técnicas de extracción; en el caso de los NPAHs los valores fueron del orden del 15%, si bien hubo alguno de los compuestos que alcanzó el 20% (NFI mediante LLE y NPyr mediante QuEChers). De los hidroxilados, el OHPyr correspondió con las mayores dispersiones (20-25%), lo que corresponde con su baja sensibilidad (igual al caso de NFI).

### Etapas de extracción

La incertidumbre del procedimiento considera la variabilidad experimental debida a los errores aleatorios y a las condiciones en las que se realizan los análisis, como día, calibrado, etc. El término corresponde a la precisión del método en condiciones intermedias y para su cálculo se han considerado los resultados obtenidos a partir de las muestras analizadas con mayores rendimientos de recuperación. En particular, se han considerado los resultados de las muestras marcadas a niveles en torno a 1 µg/L para los ensayos realizados con LLME y QuEChers y a 30 µg/L para los correspondientes a IL-DLLME. A partir de los valores de recuperación medidos en distintas series y días, se han calculado los valores promedio y desviaciones típicas relativas, deduciendo el valor de incertidumbre del procedimiento ( $u_{proced}$ ) tras la aplicación de la ecuación:

$$u_{proced} = \frac{RSD_l}{\sqrt{n_1}}$$

Siendo,  $RSD_i$  la desviación típica relativa de las medidas realizadas en condiciones intermedias y  $n_i$  el número de dichas medidas.

Los resultados se recopilan en la tabla 7, expresados en tanto por ciento.

<b>u<sub>SI</sub> (%)</b>	<b>LLE</b>	<b>QuECher</b>	<b>IL-DLLME</b>
<b>F</b>	8.9	6.7	2.9
<b>Ph</b>	1.9	3.2	3.2
<b>An</b>	6.7	6.6	2.8
<b>Fl</b>	5.1	5.1	2.8
<b>Pyr</b>	4.9	11	2.8
<b>BaA</b>	5.0	8.6	5.9
<b>Cry</b>	6.0	14	6.7
<b>BbF</b>	9.3	8.8	3.9
<b>BkF</b>	9.1	8.0	5.4
<b>BaP</b>	4.1	10	4.9
<b>DBA</b>	12	7.7	6.1
<b>BghiP</b>	6.4	9.0	6.3
<b>N Na</b>	10	4.3	22
<b>NPh</b>	5.4	8.4	20
<b>NPyr</b>	7.1	12	20
<b>NFI</b>	8.1	9.2	20
<b>2OHPh</b>	12	3.5	2.6
<b>1OHPyr</b>	17	5.6	11

Tabla 7 – Contribuciones de incertidumbre correspondiente al procedimiento expresadas en % para cada uno de los métodos desarrollados.

#### 4 - CONCLUSIONES

La tabla 8 presenta una recopilación comparativa entre los distintos métodos investigados incluyendo las condiciones experimentales de operación y los principales parámetros analíticos deducidos.

	LLME	QuEChEr	IL-DLLE
<b>Vol agua (mL)</b>	7.5	5	7.5
<b>Disolvente extracción</b>	DCM	Acetonitrilo	IL
<b>Vol. Extractante (mL)</b>	1	5	0.10
<b>Influencia temperatura</b>	No	Sí	No
<b>Tiempo prep 4 muestras (min)</b>	50	44	50
<b>R% &gt; 85%</b>	F, Ph, An, Fl, Pyr, Cry, NNa, NPhe, OHPH	PAHs (exc. BaP, DBA, BghiP), OHPH	F, Ph, An, Fl, Pyr, Cry, NNa, NPyr, NFI, OHPH
<b>Lim detec (<math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>	PAHs(*): 0.1 NPAHs (*): 1 OHPAHs (*): 1	PAHs(**): 0.1 NPAHs (**): 0.4 OHPAHs (**): 0.4	PAHs(***): 0.3 NPAHs (***): 0.3 OHPAHs (***): 0.3
<b>Precisión intermedia (%)</b>	2-17	3-12	3-22

Tabla 8 – Recopilación de las condiciones experimentales y principales parámetros analíticos involucrados en los métodos desarrollados en este trabajo.

(\*) excepto BaA, BbF, BkF, BaP, DBA, BghiP, NPyr y OHPyr

(\*\*) excepto BaP, DBA, BghiP, NPhe, NPyr, NFI, OHPyr

(\*\*\*) excepto BaA, BbF, BkF, BaP, DBA, BghiP, NPhe, OHPyr

Finalmente, la figura 2 corresponde a una representación de la suma de las varianzas consideradas como más importantes en los procedimientos analíticos estudiados. El cálculo se ha basado en efectuar la raíz cuadrada de la suma de dichas contribuciones expresadas como varianzas. Como puede apreciarse, en general, para los PAHs estudiados se alcanzaron incertidumbres entre 5-10% mediante LLE y LLME dispersiva con líquido iónico, mientras que el método tipo QuEChEr produjo contribuciones próximas al 15%. Para los NPAHs, el método tipo QuEChEr llevó implícitas dispersiones entre 15-20 % para NNa y NPhe y del orden del 25% para NPyr y NFI. Finalmente, para los hidroxilados no se obtuvieron significativas diferencias entre las técnicas utilizadas, si bien quedó constancia de las mayores dispersiones asociadas al análisis de OHPyr, debidas fundamentalmente a sus contribuciones procedentes de la determinación cromatográfica. Las mismas conclusiones pueden efectuarse para el caso del NFI.

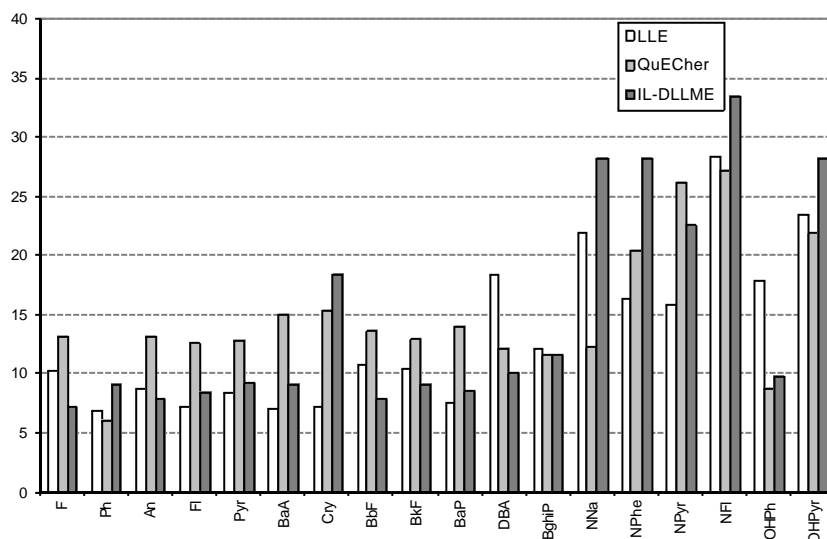


Figura 2 – Contribución de incertidumbre analítica(%) como suma de las tres componentes consideradas como más importantes según cada método propuesto.



## 5 BIBLIOGRAFIA

- 1 S. García-Alonso, R.M. Pérez-Pastor, O. Fernández. 2012. Informe Técnico CIEMAT 1246.
- 2 M. Shamsipur, J. Hassan. 2010. J. Chromatogr. A, 1217, 4877-4882.
- 3 G. Liu, L. Rong, B Guo, M. Zhang, S. Li, Q. Wu, J. Chen, B. Chen, S. Yao. 2011. J. Chromatogr. A, 1218, 1429-1436.
- 4 H. Xu, Z. Ding, L.Lv, D. Song, Y. Fena. 2009. Anal. Chim. Acta, 636, 28-33.
- 5 G. A. Baker, S.N. Backer, S. Pandey, F. V. Bright. 2005. Analyst. 130, 800-808.
- 6 Berthod, S. Carda-Broch. [www.mariecurie.org/annals/volume3/berthod.pdf](http://www.mariecurie.org/annals/volume3/berthod.pdf).
- 7 T.L. Gibson. 1982. Atmos. Environ. 16(8), 2037-2040.
- 8 S. García-Alonso, A.I. Barrado-Olmedo, R.M. Pérez-Pastor. 2012. Polycyclic Aromatic Compounds, 32, 669-682.
- 9 S.H.G. Brondi, A.N. Macedo, G.H.L. Vicente, A.R.A. Nogueira. 2011. Bull Environ. Contam. Toxicol. 86, 18-22.
- 10 M. T. Pena, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela. 2009. J. Chromatogr. A. 1216, 6356-6364.
- 11 R. M. Maduro, M. Aznar. 2010. Fluid Phase Equilibria. 296, 88-94.





