

Aplicaciones de la  
Cromatografía Líquida  
con Detector de Diodos  
y Fluorescencia al Análisis  
de Contaminantes  
Medioambientales

S. García

R. M. Pérez





Aplicaciones de la  
Cromatografía Líquida con  
Detector de Diodos  
y Fluorescencia al Análisis  
de Contaminantes  
Medioambientales

S. García  
R. M. Pérez



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:** 721-12-005-2

Editorial CIEMAT

## CLASIFICACIÓN DOE Y DESCRIPTORES

S54

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY; FLUORESCENCE; DETECTION;  
ENVIRONMENT; POLLUTION; CHEMICAL EFFLUENTS

**Aplicaciones de la Cromatografía Líquida con Detector de Diodos y Fluorescencia  
al Análisis de Contaminantes Medioambientales**

García, S.; Pérez, R. M.

37 pp. 53 ref. 3 tablas

**Resumen:**

Se presenta una revisión sobre la determinación de los principales tipos de contaminantes orgánicos en muestras ambientales que puede realizarse mediante HPLC con detector de diodos o fluorescencia molecular. El principal objetivo ha sido hacer una recopilación del potencial analítico de la técnica basada en estudios bibliográficos y de nuestro laboratorio sobre los principales aspectos relacionados con la metodología analítica empleada en la determinación de este tipo de compuestos.

**Applications of Liquid Chromatography with Fluorescence Detector Diodes and the  
Analysis of Environmental Pollutants**

García, S.; Pérez, R. M.

37 pp. 53 ref. 3 tablas

**Abstract:**

It presents a review on the determination of major types of organic pollutants in environmental samples by HPLC with diode array or fluorescence molecular detectors. Main objective has been to make a compilation of the analytical potential of the technique based on literature and our laboratory studies on the main aspects of analytical methodology used in the determination of these compounds.





## INDICE

<b>1 – INTRODUCCION</b>	<b>6</b>
<b>2 – COMPUESTOS CARBONILICOS</b>	<b>8</b>
<b>3 – PACs</b>	<b>11</b>
<b>3.1 – PAHs</b>	<b>12</b>
<b>3.2 – Hidroxi PAHs</b>	<b>13</b>
<b>3.3 – Nitro PAHs</b>	<b>14</b>
<b>4 – FENOLES</b>	<b>16</b>
<b>5 – FTALATOS ESTERES</b>	<b>18</b>
<b>6 – ISOCIANATOS</b>	<b>20</b>
<b>7 – PESTICIDAS</b>	<b>21</b>
<b>7.1 – Carbamatos</b>	<b>22</b>
<b>7.2 – Benzimidazoles</b>	<b>23</b>
<b>7.3 – Triazinas</b>	<b>24</b>
<b>8 – COMPUESTOS FARMACEUTICOS</b>	<b>26</b>
<b>8.1 – Antibióticos</b>	<b>26</b>
<b>8.2 – Estrógenos</b>	<b>30</b>
<b>8.3 – Otros compuestos farmacéuticos</b>	<b>31</b>
<b>9 – LINEAS DE EVOLUCION</b>	<b>32</b>
<b>10 – BIBLIOGRAFIA</b>	<b>33</b>



## 1 – INTRODUCCION

El análisis de contaminantes orgánicos en matrices medioambientales tiene dos etapas fundamentales de similar importancia: una de tratamiento de muestra y otra de análisis. La etapa de preparación de muestra es muy crítica en matrices medioambientales, porque suelen ser muy complejas con contenidos muy bajos de los analitos. Las técnicas utilizadas tradicionalmente en los métodos de pre-tratamiento incluyen la extracción Soxhlet y asistida por ultrasonidos; estos métodos solían ser bastante laboriosos, de larga duración y con la necesidad de grandes volúmenes de disolventes orgánicos, que además suelen ser tóxicos. Actualmente, sin embargo, los procedimientos que emplean estas técnicas tienden a estar optimizados para utilizar volúmenes y tiempos muy reducidos. Principalmente aquellos basados en ultrasonidos se caracterizan por minimizar los costes involucrados durante el análisis con volúmenes de 5 o 10 mL y tiempos de 15 minutos, que los hace una interesante alternativa a los más automatizados y costosos (1)

Dentro del grupo de técnicas más novedosas se encuentran la extracción con fluidos supercríticos, la asistida con microondas y la acelerada con disolventes, caracterizadas por la utilización de bajos volúmenes de disolvente, tiempos de extracción y obtención de altas recuperaciones. Su principal limitación se encuentra en los elevados costes asociados tanto para la adquisición de la instrumentación como en el mantenimiento de la misma, así como en el material necesario en cada extracción de muestra.

Para el tratamiento de muestras líquidas la microextracción en fase sólida (SPME), extracción de sorción con barras magnéticas y microextracción en fase líquida (LPME) son las técnicas que actualmente más se estudian. En la SPME se produce la extracción y pre-concentración simultánea de los analitos desde las muestras acuosas o en el espacio cabeza de las mismas; sin embargo, el equipo es relativamente caro, especialmente las fibras, las cuales son muy frágiles y tienen una vida limitada, y el traslado de la muestra es delicado. En la LPME la cantidad de disolvente es mínimo, es un método barato, fácil de usar y requiere una mínima exposición a disolventes tóxicos; sin embargo, la técnica supone pequeñas superficies de contacto, la necesidad de largos tiempos de tratamiento y sin alcanzar estado de equilibrio en muchos casos (2)

La microextracción dispersiva líquido-líquido es otra alternativa muy interesante en la que el disolvente de extracción consiste en una mezcla ternaria de componentes que permite extracción líquida-líquida homogénea y como punto de nube. Como ventajas presenta simplicidad, rapidez, bajo coste, alta recuperación y factores de

enriquecimiento; sin embargo suele ofrecer bajas reproducibilidades, dificultad para automatizar y la necesidad de utilizar un tercer componente (disolvente dispersivo), el cual normalmente reduce el coeficiente de partición de los analitos en el disolvente de extracción. H. Yan et al (2) aplicaron un método basado en la formación de emulsiones generadas por ultrasonidos para acelerar la formación de una disolución de finas gotas tipo nube con menos disolvente dispersivo, favoreciendo así la eficiencia de extracción y reduciendo el tiempo de equilibrio. La aplicación adecuada de esta técnica requiere proceder a la optimización de parámetros que tienen cierta influencia como tipo y volumen del disolvente tanto de extracción como dispersivo, tiempo de extracción, cantidad de muestra, pH y adición o no de sales.

En cuanto a la etapa de análisis de contaminantes orgánicos fundamentalmente se emplean las técnicas cromatográficas, destacando las aplicaciones de la cromatografía de gases y de líquidos:

- Aunque la GC es la técnica cromatográfica más extensamente aplicada y con mayor versatilidad en el análisis de contaminantes ambientales, su aplicación se ve altamente limitada por la ausencia de volatilidad de muchos compuestos y/o la inestabilidad térmica que presenten. Para estos compuestos, el análisis cromatográfico alternativo suele ser la cromatografía de líquidos acoplada a diversos detectores, entre los que más aplicaciones presenta es el de absorción por ultravioleta y fluorescencia.
- El detector de absorción en ultravioleta-visible acoplado a HPLC es probablemente el más empleado en estudios medioambientales por su amplia versatilidad en la detección de la mayor parte de los contaminantes medioambientales analizados por cromatografía de líquidos. Sin embargo, presenta una limitada sensibilidad y selectividad cuando las muestras medioambientales son complejas y los contaminantes se encuentran a niveles traza.
- La fluorescencia es de particular interés por su alta sensibilidad y selectividad. El HPLC acoplado al detector de fluorescencia aporta un aumento de sensibilidad frente al detector por ultravioleta del orden de 20-30 veces y puede ser algo más sensible que GC/MS en algunos casos. HPLC/FD incluso puede ser considerada más interesante desde el punto de vista analítico en el análisis de restos farmacéuticos en aguas residuales que HPLC/MS; esto es debido a que pese a que el acoplamiento con detector de masas proporciona un aumento de sensibilidad en la determinación de este tipo de compuestos en aguas, cuando la muestra de agua está altamente contaminada puede

provocar que la ionización por electrospray no funcione correctamente, impidiendo por tanto el análisis correcto de los analitos. Además, HPLC/FD no requiere líneas de gas portador a altas presiones y su mantenimiento es sencillo. Como desventajas, para algunas familias de compuestos no fluorescentes es necesaria una etapa de derivatización que permita la conversión a un producto fluorescente. Se ha utilizado para la determinación de muchas familias químicas, tales como PAHs, pesticidas, compuestos organoclorados y compuestos farmacéuticos.

Los objetivos de este trabajo se centran en una revisión bibliográfica actualizada, básicamente de los últimos diez años, sobre las aplicaciones de la cromatografía de líquidos operando en fase inversa y acoplada al detector de ultravioleta y fluorescencia en el análisis de compuestos orgánicos de interés medioambiental. Todo ello enfocado a proporcionar una alternativa interesante a otras técnicas cromatográficas como HPLC/MS o CG/MS por su bajo coste, simplicidad y robustez en el manejo y mantenimiento.

Las principales familias de compuestos orgánicos que pueden ser analizadas mediante la citada técnica incluyen:

1. COMPUESTOS CARBONÍLICOS
2. PACs
3. FENOLES
4. ISOCIANATOS
5. FTALATOS
6. PESTICIDAS: organofosforados, carbamatos, benzimidazoles, triazinas
7. COMPUESTOS FARMACÉUTICOS: fluoroquinolonas, sulfonamidas, estrógenos.

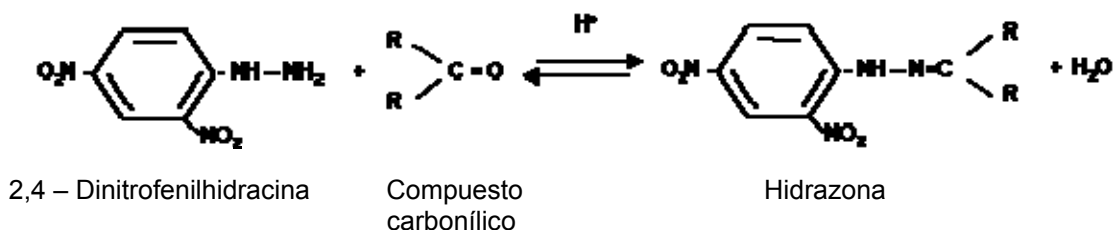
## **2 - COMPUESTOS CARBONILICOS**

Los compuestos carbonílicos se utilizan extensamente como materia prima e intermediario en las industrias de producción química y de plásticos. Debido a su uso a niveles industriales, se localizan en el aire de los lugares de trabajo y como material residuo industrial. También están presentes en lixiviados de vertederos, los cuales pueden contaminar las aguas subterráneas que pueden ser eventualmente utilizadas como aguas de bebida.

Desde 1970, las técnicas analíticas más ampliamente aplicadas para su determinación han sido las cromatográficas acopladas a la derivatización química, destacando

especialmente la derivatización con 2,4-DNPH y posterior análisis mediante cromatografía líquida. La detección se realiza sólo por ultravioleta-visible.

*Hidrazona*: Nombre genérico del derivado obtenido como resultado de la reacción entre un compuesto cuya estructura química contiene al menos un grupo carbonilo y el agente derivatizante 2,4-dinitrofenilhidracina.



Las aplicaciones de HPLC en la determinación de este tipo de compuestos derivatizados se han centrado en los últimos años en la caracterización de sus niveles de concentración en aire de interiores y ambiente (rural o urbano), por el interés de ser directamente emitidos desde la fuente y por estar involucrados en reacciones fotoquímicas (3,4). También se analizan en aguas de bebida por ser considerados posibles subproductos formados durante los procesos de desinfección del agua mediante métodos de ozonización o por contaminación como consecuencia de lixiviados de vertederos (5, 6) o en otros residuos líquidos y suelos (7).

Los métodos más convencionales para el tratamiento de muestras de aire emplean adsorbentes que contienen el propio agente derivatizante y que recuperan los analitos derivatizados tras la elución con el disolvente seleccionado o bien a partir de filtros cargados con muestra, de los que el extracto correspondiente debe ser tratado mediante adición de agente derivatizante (8).

Las muestras acuosas se derivatizan formando la correspondiente hidrazona y se extraen con cloruro de metileno o mediante extracción en fase sólida con cartucho de C18, seguido por la elución con acetonitrilo. Cuando las muestras proceden de suelos, sedimentos y residuos sólidos se extraen con el agente derivatizante en medio tampón de citrato (pH 3) en botella rotativa (30 rpm, 18 h) y los derivados se extraen con diclorometano empleando proporción 1:20 de muestra/DNPH. Los extractos se cambian de disolvente a acetonitrilo y se inyectan en el cromatógrafo para su análisis. Si el formaldehído no va a ser determinado se puede utilizar tampón acetato en lugar del citrato ajustando pH a  $5 \pm 0.1$  (9).

El tiempo entre la recogida de la muestra y su análisis es un parámetro que debe controlarse evitando grandes demoras; así, se recomienda el almacenamiento de las muestras bajo refrigeración a 4°C y su posterior análisis en no más de tres días. Los

aldehídos y cetonas son rápidamente oxidados y tienen que ser derivatizados y extraídos en las 48 horas desde la recolección de la muestra. Los extractos derivatizados en más de 3 días desde su recolección implica pérdidas significativas de los compuestos con más de 7 átomos de carbono, mientras que para los de menor contenido en carbono el análisis debe realizarse en los 7 días siguientes.

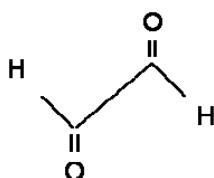
Finalmente, el análisis se lleva a cabo mediante HPLC con detección por ultravioleta operando en fase inversa y en condiciones muy habituales (3, 4, 6, 7):

- Columna de C18 (250x4.60 mm) a t<sup>a</sup> ambiente.
- Volumen de inyección, 20 µL.
- Detector uv/visible (365 nm para mono-carbonílicos y 390 nm para la detección de dicarbonílicos).
- AcN/agua 60/40 programado a 100% AcN en 14 min y manteniendo 4 min.
- Flujo 1 mL/min.

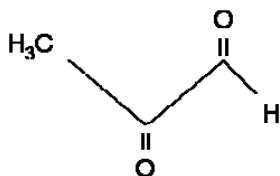
Los compuestos que se determinan incluyen: acetaldehído, acetona, acroleína, benzaldehído, butanal, crotonaldehído, diclohexanona, decanal, 2,5-dimetilbenzaldehído, formaldehído, heptanal, isovaleraldehído, nonanal, octanal, ventanal, propanal, m-toluilaldehído, o-toluilaldehído, p-toluilaldehído.

Otros compuestos dicarbonílicos de interés medioambiental incluyen:

*Glioxal*: Compuesto dicarbonílico alifático de menor cadena, cuya estructura química contiene dos grupos aldehídos. Es soluble en agua y fácilmente biodegradable, no siendo de esperar su bioacumulación.



*Metil glioxal*: Compuesto dicarbonílico alifático, cuya estructura química contiene un grupo aldehído y otro cetona. Es el de menor tamaño de los cetoaldehídos, también llamado piruvaldehído o 2-oxo-propanal.



La rápida y fácil contaminación que pueden sufrir las disoluciones derivatizadas o agente derivatizante supone la principal limitación e inconveniente del método. Así, la 2,4-DNPH rápidamente reacciona con los compuestos carbonílicos y como consecuencia se producen blancos elevados y la necesidad de un control cuidadoso

del material de laboratorio que reduzca estos niveles de fondo. También es importante utilizar reactivos recién preparados y no emplear acetona como disolvente en el laboratorio.

Un trabajo interesante es el realizado por M.C. Prieto y col (10), en el que analizan 24 compuestos carbonílicos (alifáticos carbonílicos, insaturados, dicarbonílicos y aldehídos y cetonas aromáticas) derivatizadas con 2,4-DNPH y 16 PAHs utilizando HPLC acoplada a dos detectores en serie, de fluorescencia molecular y diodos. Aplican elución en gradiente utilizando cuatro disolventes, acetonitrilo, agua, metanol y tetrahidrofurano. El método está basado en la adición de tan sólo 200  $\mu\text{L}$  de DNPH ( $7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y dos gotas de ácido perclórico (2M) a 25 mL de muestra acuosa y dejando derivatizar a  $t^{\text{a}}$  ambiente durante 1 hora. La purificación y recuperación de los compuestos entonces la realizan en cartuchos OASIS HLB y elución con diclorometano/metanol (85:15).

### **3 - PACs**

Los compuestos aromáticos policíclicos (PACs) se encuentran presentes en todos los compartimentos del medio ambiente. Pueden originarse en procesos naturales de combustión, como fuegos y erupciones volcánicas, y fuentes antropogénicas, por la combustión incompleta de la materia orgánica.

Los PACs contienen varios anillos bencénicos fusionados, son compuestos estables y relativamente neutros, insolubles en agua y poco volátiles, excepto los de menor peso molecular, como el naftaleno. Debido a sus propiedades físico-químicas, son compuestos difíciles de degradar, especialmente los de mayor peso molecular, y por ello tienden a acumularse en las diferentes matrices ambientales; esta persistencia se incrementa con el número de anillos de la molécula, y es la base de las numerosas investigaciones llevadas a cabo sobre los mismos en el medio ambiente. Entre los grupos de compuestos más conocidos que forman parte de los PACs y que pueden ser analizados mediante HPLC, se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), sus nitro-derivados (NPAHs) e hidroxi-derivados (OHPAHs).

#### **3.1 - PAHs**

Dependiendo de la fuente que los origine, las muestras ambientales que contienen PAHs pueden ser muy complejas y difíciles de analizar. Además de los 16 PAHs originales y sus isómeros, la sustitución, alquilación e hidrogenación de las moléculas puede contribuir a incrementar la complejidad de las muestras. Además, en las



muestras ambientales los PACs constituyen solo una pequeña fracción de la materia orgánica total. Por todo ello, se hacen necesarias las separaciones extensivas y laboriosas que, de no seguir controles de calidad rigurosos, pueden ocasionar pérdidas de algunos componentes de interés, así como contaminaciones, que reducen los límites de detección de los analitos y la reproducibilidad de los análisis.

El HPLC con detección ultravioleta proporciona cierta selectividad, aunque carece de sensibilidad. En contraste, la detección por fluorescencia molecular proporciona elevada selectividad y sensibilidad, generalmente sin la necesidad de llevar a cabo etapas preliminares de purificación de la muestra. Esto hace que la detección por fluorescencia sea la más recomendable para el análisis de PAHs mediante HPLC.

En nuestro laboratorio se han desarrollado en detalle la determinación de los 16 PAHs considerados prioritarios en suelos contaminados de diferentes matrices y a muy distintos niveles de concentración. (1, 11, 12,). El análisis mediante HPLC en fase inversa es bastante habitual, con condiciones cromatográficas muy convencionales. Así, suele realizarse con columnas de C18, manteniendo constante la temperatura, trabajando a flujos de 1 ó 1.5 mL.min<sup>-1</sup> con fases móviles operando en modo gradiente de acetonitrilo y agua.

El tratamiento de las muestras de suelos se lleva a cabo habitualmente mediante extracción con ultrasonidos, acelerada con disolventes o microondas. Mientras la extracción por ultrasonidos es adecuada para el análisis de largas series de muestras por su bajo coste, reducido consumo de disolventes y tiempo de tratamiento, la extracción acelerada con disolventes conduce a resultados muy reproducibles y en particular cuando los niveles de concentración de las muestras son bajos. Sin embargo, la principal limitación de esta técnica reside en que es una instrumentación cara, tanto para la adquisición del equipo como en el uso y mantenimiento, sobre todo cuando deben realizarse las extracciones al menos por duplicado y las series de muestras son largas. La extracción por microondas también proporciona resultados analíticos similares, si bien su uso puede estar condicionado según la matriz de la muestra a tratar, ya que pueden producirse algunas explosiones durante el tratamiento de muestras de algunos suelos contaminados, como los procedentes de gaswork (12).

### **3.2 – Hidroxi PAHs**

Los hidroxi derivados policíclicos son considerados bioindicadores de la exposición del ser humano o en animales a hidrocarburos aromáticos policíclicos. Debido a ello, es habitual la determinación de estos derivados en fluidos biológicos para evaluar dicha exposición. El bio-marcador que se ha establecido en la mayor parte de los trabajos

para evaluar la exposición a PAHs ha sido la determinación de 1 OH-Pyr en orina. Sin embargo, muchos autores apuntan a la necesidad de incrementar el número de biomarcadores hidroxilados para asegurar la efectividad de la medida acerca de la exposición a PAHs (13)

El análisis de hidroxilados PAHs en suelos y aguas es poco frecuente, aunque se ha incluido su determinación en trabajos de caracterización de PAHs como productos de degradación (14). El interés en la determinación de estos compuestos reside en la mayor citotoxicidad que presentan frente a sus homólogos PAHs, además de actuar como un receptor de estrógeno y estar involucrados en actividades estrogénicas y antiestrogénicas.

La determinación mediante HPLC/FD se realiza sin derivatización previa y aporta alta sensibilidad al análisis. Sin embargo, dependiendo del isómero a analizar la selectividad de la técnica puede no ser suficiente para su identificación y cuantificación. Un estudio comparativo sobre la aplicación de HPLC/FD Y GC/MS en el análisis de derivados hidroxilados en dos materiales de referencia de muestras biliares de peces (15) mostró resultados similares entre ambos métodos en relación a la precisión y reproducibilidad a largo plazo. HPLC/FD permitió obtener límites de detección más bajos para los compuestos de mayor peso molecular. Además, la mínima preparación de las muestras favoreció la selección de la técnica para algunos compuestos y el incremento de las recuperaciones de derivados de mayor peso molecular; sin embargo, la selectividad del método no fue suficiente para la identificación y cuantificación de 2 OH-nitro fenantreno y 1 OH-fenantreno.

El análisis cromatográfico puede llevarse a cabo en modo isocrático utilizando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo/tampón acetato sódico (pH 4.0) como fase móvil a  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , con columna de C18 y aplicando como longitudes de onda excitación/emisión (nm): 2-hidroxifluoreno (280/334), 9-hidroxi fenantreno (259/386), 1-hidroxi pireno (350/390). (16, 17).

### **3.3 – Nitro PAHs**

En los últimos años, el análisis de nitro derivados de hidrocarburos aromáticos policíclicos se ha centrado principalmente en partículas atmosféricas por ser directamente emitidos desde fuentes de combustión tales como las procedentes del tráfico o por su formación a partir de los PAHs originales tras reacción con radicales hidroxilados o con óxidos de nitrógeno, en condiciones de alta radiación solar, temperaturas y humedad. Considerando que los mono- y dinitro- derivados pueden ser muchas veces más mutagénicos y/o carcinógenos que de los PAHs de los que parten,

es importante su análisis en aire ambiente. Se ha demostrado que los nitro-PAHs predominantes en aire ambiente corresponden a 2-nitro-fluoranteno y 2-nitro-pireno, compuestos que se forman en reacciones iniciadas con radical OH y NO<sub>3</sub> y, sin embargo, el nitro-PAH más abundante en emisiones diésel (1-nitro-pireno) no lo es en aire ambiente. Es, por tanto, muy importante el reconocimiento del isómero específico pues puede indicar la importancia de emisiones directas frente a los procesos de formación atmosférica y es por tanto necesario el empleo de una técnica analítica suficientemente sensible y selectiva para conseguir este propósito (18). Debido a la complejidad de las matrices medioambientales, la efectividad de los métodos analíticos depende en gran medida de la ausencia de interferencias producidas por ejemplo por los PAHs originales. Estos hidrocarburos de los que parten normalmente son mucho más abundantes en la muestra, y son una de las principales dificultades encontradas en las aplicaciones mediante GC con detectores de masas convencionales (19). Una detallada revisión de los métodos de HPLC acoplados a diferentes detectores con aplicación al análisis de nitro-PAHs fue realizada por J. Cvacka et al. (20). En este trabajo, los autores incluyeron una descripción de los protocolos analíticos a seguir durante el tratamiento de las muestras y los potenciales de los distintos detectores para la determinación de nitroderivados, siendo la detección por fluorescencia de las más aplicadas en este tipo de análisis.

Además de su presencia en partículas atmosféricas, estos compuestos tienen una distribución medioambiental generalizada habiéndose encontrado en carbones y tóner de fotocopiadoras, cenizas, emisiones procedentes de plantas de incineración de residuos, aguas residuales y naturales, sedimentos, humo de cigarrillos, entre otros (20). En aguas son raramente determinados, existiendo escasez de metodología analítica. En este sentido, M. Toledo et al. (21) propusieron un método para determinar 5 nitroderivados en muestras acuosas mediante UHPLC/UV.

Así como la aplicación más común del análisis mediante HPLC con detector de fluorescencia es la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos, en el caso de sus nitroderivados la técnica de HPLC/FD es menos utilizada debido a la débil fluorescencia de los compuestos nitro derivados. Es necesaria una etapa previa de derivatización que produzca la reducción del grupo nitro al amino, dando lugar por tanto a amino derivados que son compuestos con elevada fluorescencia. Dicha reacción de reducción puede llevarse a cabo mediante:

- NaBH<sub>4</sub>: El extracto de diclorometano (0.5 mL) se coloca en columna y se añade eluyente (dos fracciones de hexano). Se combinan ambas fracciones y se evaporan y diluyen en 1 mL de metanol. A 1 mL de extracto se añade 0.3 mL de una disolución acuosa de Cl<sub>2</sub>Cu y 50 mg de NaBH<sub>4</sub>. La mezcla resultante se

agita y deja en reposo a temperatura ambiente y en oscuridad durante 1 h. Se añaden 5 mL de agua y los nitros derivados se extraen con tres porciones de 5 mL de benceno. (19, 22).

- NaSH: El filtro es cuarteado y se extrae por ultrasonidos dos veces con benceno/etanol (3:1, v/v) con posterior filtración. El filtrado se lava mediante re-extracción con una disolución de hidróxido sódico (5%), ácido sulfúrico (20%) y agua, evaporando a sequedad. El residuo se disuelve en etanol y se trata con hidrosulfuro sódico a reflujo. El producto de reacción fue extraído con benceno, y la fase de benceno fue concentrada hasta sequedad. Finalmente el residuo se re-disuelve en 0.5 ml de acetonitrilo con ácido ascórbico (10 mM). (23,24).
- Columnas rellenas con polvo de Zn o mezclas de polvo de Zn con SiO<sub>2</sub> o bolas de vidrio tienen vidas limitadas de unos pocos días. El Zn es consumido durante la reacción y se forman pequeñas vías por empaquetamiento, de modo que la eficiencia decrece. Las columnas de Zn trabajan a temperatura ambiente y las eficiencias de reducción son típicamente superiores al 99%. Una cierta cantidad de electrolito o tampón son necesarios para facilitar la reacción en la fase móvil (25, 26).
- Columnas de reducción catalítica. El empaquetamiento no es consumido durante la reacción y estas columnas tienen una vida larga, casi siempre indefinida. La reacción catalítica se desarrolla mejor cuando se mantienen a temperaturas elevadas (60-80 °C) y los metales nobles son los principales soportes para desarrollar este tipo de reducción catalítica. Pt-Rh sobre alúmina ha mostrado mayor actividad y capacidad de reducción que el denominado catalítico de tres vías (27). El uso de Pt en soportes de alúmina también han sido estudiados (28).

La derivatización mediante borohidruro sódico es muy asequible económicamente frente a otros como los que emplean columnas de Pt, es relativamente rápida y fácil de realizar sin el empleo de disolventes orgánicos muy tóxicos como benceno o con olor desagradable como el hidrosulfuro sódico(29).

En cuanto a las condiciones de medida de excitación y emisión de los amino derivados obtenidos tras la reducción, una recopilación para 35 amino PAHs se incluye en la tabla (20).

Compuesto	$\lambda_{\text{excitación}} \text{ (nm)}$	$\lambda_{\text{emisión}} \text{ (nm)}$
2-aminobifenil	227	394
3-aminobifenil	232	399
4-aminobifenil	285	367
2,2'-diaminobifenil	228	372
1-aminonaftaleno	243	429
1-amino-2-metilnaftaleno	244	414
2-aminonaftaleno	234	403
1,3-diaminonaftaleno	247	420
1,5-diaminonaftaleno	231	390
1,8-diaminonaftaleno	229	417
1,3,6,8-tetraaminonaftaleno	264	417
1-aminofluoreno	285	370
2-aminofluoreno	285	370
2,7-diaminofluoreno	292	387
2-amino-9-fluorenona	290	365
3-amino-9-fluorenona	245	407
2,7-diamino-9-fluorenona	232	387
2-aminoantraceno	260	495
9-aminoantraceno	263	505
9-metil-10-aminoantraceno	267	534
9,10-diaminoantraceno	264	495
9-aminofenantreno	247	430
1-metil-9-aminofenantreno	254	440
1-aminopireno	360	430
4-metil-3-aminopireno	355	420
1,3-diaminopireno	395	445
1,6-diaminopireno	369	442
1,8-diaminopireno	395	454
1,3,6-triaminopireno	396	460
1,3,6,8-tetraaminopireno	397	465
3-aminofluoranteno	300	530
8-aminofluoranteno	300	550
6-aminocriseno	273	437
6-aminobenzo(a)pireno	420	475
3-aminoperileno	227	540

Tabla 1 - Condiciones de medida mediante fluorescencia para 35 aminoderivados de PAHs (20).

#### 4 - FENOLES

Los compuestos que incluyen un anillo aromático C6 con grupo hidroxilo en su molécula se denominan fenoles. Sus derivados y polímeros se han utilizado extensamente en plásticos, resinas, industria de la lana, construcción, fabricación automovilística, abrasivos, plastificadores, productos de limpieza, aplicaciones de detergentes, etc., constituyendo una amplísima familia de compuestos, entre los que destacan los cloro-fenoles, por su persistencia medioambiental y toxicidad, y los nitrofenoles. Los 11 compuestos fenólicos considerados prioritarios por la EPA incluyen: fenol, 4 nitro-fenol, 2,4-nitro-fenol, 2-cloro-fenol, 2-nitro-fenol, 2,4-dimetil-fenol,

2 metil-4,6 dinitro-fenol, 4 cloro 3 metil-fenol, 2,4 dicloro-fenol, 2,4, 6 tricloro-fenol y penta-cloro-fenol.

También tienen origen biogénico como productos secundarios, no estando bien conocidas sus funciones, aunque algunas incluyen agentes de coloración y otras son potencialmente protectoras. Se han dividido al menos en 10 grupos dependiendo de su estructura básica: fenoles, ácidos fenólicos, ácidos hidroxicianímicos, naftoquinonas, xantonas, estilbenos, antraquinonas, flavonoides y ligninas.

Frecuentemente se utiliza HPLC para su determinación pues no se necesita derivatización, a diferencia de CG. La metodología suele requerir etapa de preconcentración para llegar a los niveles de concentración que establece la legislación. La técnica convencional es la SPE y más recientemente se viene aplicando la SPME.

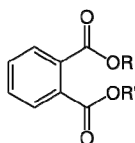
Los nitro-fenoles presentan toxicidad en plantas, animales y ser humano y su emisión puede producirse directamente a través de procesos de combustión en vehículos y por formación por reacciones fotoquímicas. Se ha encontrado que los niveles que se encuentran en distintos compartimentos son mayores de lo que debería esperarse según su emisión directa y parece ser consecuencia de la formación fotoquímica de estos compuestos en la atmósfera y la posterior re-distribución en el suelo y agua por procesos de deposición, en particular supone alrededor de un tercio de los niveles que se miden en medioambiente (30). Otras fuentes incluyen biodegradación de insecticidas organofosforados, como paratión y metil-paratión y el uso de nitrofenoles como herbicidas, plásticos, explosivos, detergentes y antioxidantes (31).

El análisis puede llevarse a cabo mediante HPLC con detección por ultravioleta sin derivatización previa y en modo isocrático (32). También puede llevarse a cabo en modo gradiente con fase móvil con A: 0.5 g.L<sup>-1</sup> KCl aq con 1% ácido acético y como B, metanol, a 1 mL.min<sup>-1</sup> y de 0' 25 % metanol, 25' 50% metanol, 30' 100% metanol (5'), t<sup>a</sup> columna 65°C y con detección a 280 nm, excepto para el pentaclorofenol, a 302 nm (33).

En otro trabajo se analizan 11 compuestos fenólicos en aguas con columna de C8, a 45 °C, modo gradiente de 30% agua (1% ácido acético) y metanol, a 100% en 20 minutos y con detección a 280 nm (34).

## 5 - FTALATOS ESTERES

Los ftalatos son los ésteres del ácido ftálico y tienen la siguiente estructura:



Donde R' y R'' son grupos alquil, alquencil o aril. Estas sustancias son utilizadas como plastificantes de polímeros sintéticos como el cloruro de polivinilo y el acetato de celulosa. Los ftalatos alifáticos de menor peso son utilizados en la fabricación de barnices e insecticidas.

Son líquidos incoloros, con baja volatilidad, insolubles en agua y solubles en aceites minerales. Hexano y la mayor parte de los disolventes orgánicos permiten la solubilidad de estos compuestos en plasma, saliva y fluidos biológicos.

Muchos ftalatos se encuentran a nivel traza en aguas residuales, suelos y residuos peligrosos, a menudo descargados en los líquidos almacenados en los containers de plástico o PVC. Los más utilizados son DEHP (dietil hexil ftalato), DIDP (di isodecil ftalato), DINP (di iso nonil ftalato), siendo el primero el más utilizado por su bajo coste (8).

La toxicidad de ftalatos es muy baja, provocando síntomas de somnolencia y disnea en test con animales sólo a elevadas dosis. Su carcinogénesis está aún bajo discusión y su transporte y comportamiento medioambiental en suelos y aguas no están bien investigados. En general, los estudios toxicológicos apuntan a los efectos que puede tener en el sistema reproductor de animales, efectos nocivos en gestaciones como acortar el periodo del mismo, o en niños pequeños que son más vulnerables por la menor madurez de su organismo.

El gran uso de estos compuestos ha provocado su distribución ubicua, encontrándose en agua de lluvia, filtración y aguas subterráneas, así como en suelos, océanos y sedimentos. Los informes sobre biodegradación son contradictorios. G. Xu et al (35), realizaron un estudio sobre la degradación de dibutil ftalato (DBP) y dietilhexil ftalato (DEHP), encontrando que en las velocidades de degradación tenían influencia del tipo de población microbiana presente en el suelo, pH del suelo y contenido en materia orgánica.

Se analizan por GC, LC después de la extracción y concentración de las muestras. Las muestras acuosas pueden ser analizadas directamente por HPLC. Los ftalatos pueden ser extraídos desde una muestra acuosa de 1 L por extracción repetida con cloruro de metileno: tienen mucha solubilidad en cloruro de metileno. Cuando se aplica

extracción en fase sólida, la desorción se realiza con cloruro de metileno. Las muestras de suelo pueden tratarse con soxhlet y utilizando el mismo disolvente. Sin embargo, A. Garrido Frenich et al (36) encontraron recuperaciones nulas cuando ensayaron con cloruro metileno la extracción de DEHP (dietilhexil ftalato), seleccionando hexano/acetona por su menor toxicidad y con rendimientos próximos al 100%.

Existe una escasez de documentación en cuanto a métodos bien validados y adecuados para el análisis de ésteres ftalatos. Así, son muy comunes los errores debidos a problemas con los blancos ya que su carácter de ubicuidad hace que puedan encontrarse en materiales de tubos, pipetas, septum de viales, disolventes y adsorbentes cromatográficos.

Además no existen materiales de referencia adecuados para estos compuestos, lo que dificulta el aseguramiento de la veracidad y exactitud de las concentraciones obtenidas cuando se aplican los métodos a muestras reales de composición desconocida.

E. Cortazar et al (37) contrastaron resultados entre dos técnicas: MAE y ASE, procediendo a la re-extracción de los sedimentos para asegurar la máxima eficacia de extracción y aplicaron CG/MS y HPLC/DAD (225 nm). El análisis por líquidos se realizó con columna de 150 x 4.60 mm (4  $\mu\text{m}$ ), flujo de 1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , 0' 55% MeOH, 5' 55% MeOH, 11' 85%, 15' 100% MeOH (7').

En otro trabajo (38), se aplicaron condiciones similares para su análisis, empleando una columna de 150 x 4.6 mm de C18, 0' 50% MeOH hasta 95 %MeOH en 30' (10'), flujo de 1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , 10  $\mu\text{L}$  de inyección y 35  $^{\circ}\text{C}$  t<sup>a</sup> columna. La detección se realizó a 254 nm tras seleccionar entre 220 y 350 nm.

T. Wu et al (39) compararon el análisis de 12 ftalatos mediante UPLC y HPLC aplicando las siguientes condiciones experimentales:

- **UPLC:** inyección de 2  $\mu\text{L}$ , columna de 50 x 2.1 mm (1.7  $\mu\text{m}$  tamaño partícula), termostato a 45  $^{\circ}\text{C}$ . Fase móvil a 0.4  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , modo gradiente según 0' 50 % MeOH, 1.5' 78% MeOH 2.5' 78% MeOH, 3.5' 100% MeOH(1'). 7 min de análisis. Detec. UV a 225 nm.
- **HPLC:** inyección de 10  $\mu\text{L}$ , columna de 250 x 4.6 mm (5  $\mu\text{m}$  tamaño partícula), 25  $^{\circ}\text{C}$ . Fase móvil a 1.0  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , modo gradiente según 0' 70% MeOH, 5' 85%, 9' 100% (4'). Re-equilibración en 4'. Tiempo análisis, de 18 min.



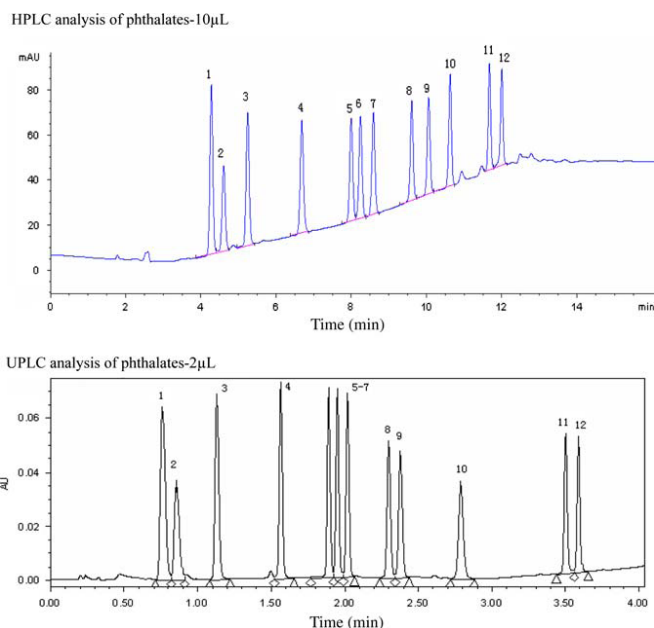


Figura 1 – Cromatogramas registrados en condiciones de HPLC convencional y micro HPLC (UPLC) recogidos del trabajo de T. Wu et al (39) que muestra la considerable reducción en el tiempo de análisis conseguido en el segundo caso.

Los ftalatos en posición o- y p- exhiben una fuerte fluorescencia en ácido sulfúrico, mientras que no se observa fluorescencia en los de posición p-. Las longitudes de excitación se encuentran a 270 y 308 nm, mientras que las de emisión corresponden a 360 nm en el caso de o-ftalatos y 380 nm en los p-ftalatos. La fluorescencia de los orto- se debe al anhídrido ftálico.

## 6 - ISOCIANATOS

Los de menor peso molecular tienden a volatilizarse a temperatura ambiente, mientras que los de mayor peso molecular no se volatilizan tan fácilmente, pero pueden llegar al aire ambiente si se esparcen como aerosol o se calienta el material durante su producción. La característica común de estos compuestos es la presencia de dos grupos  $-N=C=O$  unidos a grupos de carácter aromático o alifático. Para reducir el riesgo asociado a los más volátiles, se han sustituidos los compuestos monómeros en muchas formulaciones por agrupaciones de 3 o más monómeros que incrementan el peso molecular y reducen su volatilidad respecto al monómero como tal.

Los isocianatos forman un grupo de compuestos ampliamente utilizados en la producción de poliuretanos y éstos son utilizados en muchos tipos de productos, como espuma rígida y flexible, pinturas, pegamentos, accesorios automóviles, fibras elásticas.

En la producción de poliuretano los diisocianatos se hacen reaccionar con poli-oles. Esta reacción no es térmicamente estable, lo que significa que los isocianatos se regenerarán y emitirán en el entorno ambiental una vez los poliuretanos sean calentados.

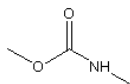
La exposición de isocianatos en aire puede generar riesgo de un progresivo deterioro del sistema respiratorio. Se ha encontrado que el 5-10 % de los trabajadores expuestos a isocianatos desarrollará asma ocupacional, y para los más altamente expuestos la prevalencia es aún mayor. También son irritantes de mucosas, piel y ojos. Los muestreos en aire normalmente involucran una rápida derivatización aprovechando su rápida reactividad. De los más utilizados están los "impinger", los cuales presentan limitaciones y para medidas de exposición personal como tamaño y largos periodos de muestreo (8h).

Un muestreador tipo "denuder" tiene la ventaja de no contener disolvente y además tener la capacidad de separar la fase gaseosa de la fase particulada. Es posible debido a las diferentes proporciones de difusión: la fase gaseosa, que tiene difusión muy rápida, se retendrá en las paredes del tubo donde los isocianatos serán derivatizados; mientras que las partículas difunden más lentamente, pasando a través del tubo si el flujo es laminar. El material particulado puede recogerse en un filtro impregnado de agente derivatizante conectado al denuder.

Un agente derivatizante muy específico y con elevadas sensibilidades para la detección por ultravioleta y fluorescencia ha sido utilizado por S. Werlich et al (40), Se trata de 4-metoxi-6-(4-metoxi-1-naftil)-1,3,5-triazina-2-(1-piperazine) (MMNTP), el cual posee propiedades espectroscópicas por el grupo metoxinaftaleno, su polaridad se incrementa por el grupo metoxy y la piperizine representa el grupo reactivo para la derivatización selectiva de los di-isocianatos. El principal inconveniente del método se encuentra en que la preparación del agente derivatizante es muy laboriosa y complicada.

## **7 - PESTICIDAS**

La mayor parte de los pesticidas no exhiben fluorescencia, por lo que la aplicación de HPLC/FD es muy limitada. Se requiere una derivatización post-columna en muchas aplicaciones.



## 7.1 Carbamatos

Los pesticidas carbamatos se han utilizado ampliamente como sustitutos de los organoclorados y organofosforados debido a su menor persistencia medioambiental y alta efectividad para controlar plagas, enfermedades y malezas. Sin embargo, también muestran alta toxicidad aguda y son sospechosos de producir efectos mutagénicos, carcinogénicos y endocrinológicos.

Existe pues un interés en desarrollar métodos simples de análisis para estos compuestos normalmente a niveles traza en matrices medioambientales, especialmente suelos.

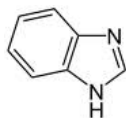
A.M. García Campaña y J.F. Huertas-Pérez (41) incluyeron en su trabajo una extensa revisión de los principales agentes derivatizantes utilizados en la determinación de carbamatos mediante el método de HPLC/FD. Así, la hidrólisis post-columna de *n*-metil carbamatos a metilamina y la subsecuente derivatización con *o*-ftalaldehído es la base del método habiendo sido aceptado como protocolo estándar por diversas organizaciones oficiales, como EPA y AOAC. F. Koc et al. (42) llevaron a cabo la determinación de residuos de aldicarb, propoxur, carbofuran, carbaryl y metiocarb mediante HPLC/FD y derivatización post-columna. En particular, después de realizar purificación con florisil, se producía la hidrólisis del carbamato a metilamina (100 °C, medio básico) y entonces se mezclaba con *o*-ftalaldehído y tiofluor, generando finalmente como producto el isoindole con propiedades fluorescentes. No indicaron condiciones experimentales de medida por fluorescencia.

Otros métodos aplican la fotooxidación de carbamatos a metilamina para reaccionar con el reactivo  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  o hidrolizan el carbamato a alcohol para derivatizarlo mediante reacción con un reactivo clorado (41).

Un trabajo interesante es el desarrollado por L. Fu et al (43) quienes investigaron la idoneidad de micro-extracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) para la determinación de carbaril y triazofos en muestras de suelo. Iniciaron el método pesando 1 g de suelo y añadiendo 10 mL de metanol en un vial cónico. Tras agitar 30 min a 250 rpm y filtrar el sobrenadante (extracto de metanol), 1 mL de extracto se sometió a una posterior micro-extracción dispersiva líquido-líquido: 5 mL de agua desionizada+ 1 mL extracto metanol (disolvente dispersivo)+50  $\mu\text{L}$  de tetracloroetano (disolvente de extracción) se mezclaron en un tubo de centrifuga, se agitó suavemente y se centrifugó a 3500 rpm (3 min), formando gotas finas dispersivas de la fase de extracción en el fondo cónico del tubo de centrifugación. Se recogieron los 50  $\mu\text{L}$  de

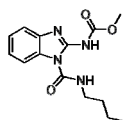
extractante y se concentró para pasar de tetracloroetano a metanol como disolvente final y proceder a la inyección de la muestra.

El análisis lo llevaron a cabo utilizando metanol/agua (70:30 v:v) a un flujo de 0.8 mL.min<sup>-1</sup> y aplicando como longitudes de onda de excitación 274 y de emisión 335 nm, con un volumen de inyección de 20 µL.



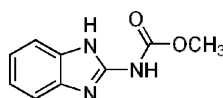
## 7.2 Benzimidazoles

Los fungicidas benzimidazoles son pesticidas sistémicos, ampliamente utilizados en agricultura para tratamientos pre y post-cosechas para controlar una amplia variedad de patógenos. Estas sustancias son aplicadas directamente al suelo o pulverizadas en aire, quedando a disposición del entorno medioambiental. Rápidamente penetran en la planta por raíces y hojas y pueden entrar directamente en las aguas naturales mediante filtraciones desde el suelo agrícola. La mayor parte de estos compuestos persisten en el medio ambiente después de su aplicación; algunos incluso permanecen durante muchos años. Algunos de los compuestos de la familia benzimidazol son:



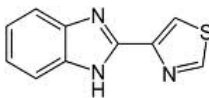
- Benomilo (BN),

es el más ampliamente utilizado de los carbamatos benzimidazol. Es aplicado directamente al suelo para controlar una gran variedad de enfermedades en frutas. Rápidamente se degrada a carbendazim, su principal producto de degradación



- Carbendazim (MBC).

Tiene actividad de curación y protección frente a una amplia variedad de enfermedades por hongos. Es tóxico para humanos, animales y plantas y muy persistente en agua, aguas residuales, suelos, cereales y alimentos.



- Tiabendazol (TBZ),

se utiliza para controlar enfermedades en frutas y verduras como podredumbre, plagas, manchas. También se usa en medicina como agente quelante de metales.

- Fuberidazol (FB),

es el benzimidazol más utilizado en agricultura.

Su análisis suele llevarse a cabo mediante HPLC con ultravioleta, fluorescencia o detección de masas. En todas estas técnicas, el benomilo es rápidamente convertido en MBC, y es determinado como tal. Existen también trabajos sobre la determinación de ensayos con biosensores para detectar niveles traza de once de los 14 principales residuos de carbamatos benzimidazoles (44).

Los procedimientos de extracción y cleanup incluyen SPE, líquido-líquido y otras más recientes como extracción en punto de nube (CPE), membrana líquida on line (SLM) y membrana microporosa (LLE), así como extracción con fluidos supercríticos (SFE).

Una nueva técnica es la microextracción en fase sólida (SPME) en la que se establece simultáneamente la extracción y pre-concentración de los analitos desde la muestra. Esta técnica requiere un primer paso de partición de los analitos entre la muestra y la fibra con sílice fundida y una segunda etapa de desorción.

Debido a la inestabilidad térmica de los benzimidazoles, no pueden ser analizados por CG a menos que se derivaticen en compuestos térmicamente estables; por ello es más utilizada el HPLC para el análisis de estos compuestos. Sin embargo, los métodos basados en HPLC a menudo requieren una etapa de preparación de muestra más exhaustiva, en particular cuando los niveles de concentración de los benzimidazoles son muy bajos (44).

Se agregan gotas de HCl 4 N hasta pH 3 y se esperan 30 minutos para conseguir llevar a cabo una hidrólisis ácida y asegurar la conversión de benomyl a carbendazim. Se toman porciones analíticas de unos 30 g y se añaden 5g de bicarbonato sódico, 60 mL de acetato de etilo y 30 g de sulfato sódico anhidro.

#### Análisis por HPLC

Columna C18 (15 cm x 3.9 mm), a 30 °C

Modo isocrático MeOH/agua 45:55, 1.0 mL.min<sup>-1</sup>

	Exc (nm)	Em (nm)	tr
Carbendazim (MBC)	280	320	3.5
Benomilo (BN)	280	320	3.5
Tiabendazol (TBZ)	300	350	5.3
Fuberidazol (FB)	300	350	5.9

### Extracción fase sólida

Cartuchos de C18 se acondicionaron con 6 mL de metanol y 6 mL de agua. Las muestras de agua se hacen pasar a través del cartucho y secan éste con aire después de retener los compuestos de interés. Eluyen los fungicidas con 5 mL de metanol e inyectan 20  $\mu$ L de este extracto.

### Microextracción en fase sólida

A las muestras acuosas se añaden NaCl hasta alcanzar 15%, entonces se calientan y agitan a una velocidad constante de 600 rpm durante la extracción. Se sumerge la fibra de SPME en la muestra acuosa durante 40' a 60°. Los compuestos se desorben en viales de 200  $\mu$ L con 50  $\mu$ L de metanol, durante 10 min.

Tras cada análisis, la fibra se lavó con agua Milli-Q para evitar daños debidos al uso de sal. Se sumergió en metanol durante 15 min y se secó antes de la siguiente extracción.

## 7.3 Triazinas

Los herbicidas triazinas forman parte de los plaguicidas que más ampliamente se han utilizado en el sector agrícola, siendo de los más utilizados la simazina y atrazina. Estas sustancias normalmente poseen una relativamente alta solubilidad en aguas que provocan su movilidad en suelos e incrementa el proceso de contaminación, mientras su adsorción en suelos es baja y se distribuyen más fácilmente a través de la cadena alimenticia. El interés en su determinación analítica medioambiental se debe a que son potencialmente cancerígenos, producen defectos en pájaros e interrumpen funciones hormonales por ser considerados disruptores hormonales.

I. Baranowska y col. (45) realizaron un estudio sobre la distribución de atrazina y simazina en la cadena trófica suelo-planta-carne y suelo-raíz planta-hojas planta. La extracción de los suelos se llevó a cabo mediante soxhlet, agitación, ultrasonidos y microondas. Curiosamente las recuperaciones más elevadas las consiguieron aplicando las técnicas de agitación y soxhlet, con muy bajos rendimientos cuando se aplicó ultrasonidos. Para el análisis cromatográfico emplearon metanol-agua (1:1) como fase móvil en modo isocrático, a 0.8 mL.min<sup>-1</sup> y midiendo a 222 nm.

V. Trajkovska y col. (46) determinaron simazina, atrazina y propazina en aguas utilizando una columna Lichrosorb RP 18 (Agilent, 200\*4.6 mm, 5  $\mu$ m), fase móvil acetonitrilo-agua (70:30) en condiciones isocráticas, flujo de 1.0 mL.min<sup>-1</sup> y 220 nm.

H. Katsumata y col. (47) utilizaron una columna Chromospher de C18 (150\*4.5 mm, 5 µm), con fase móvil acetonitrilo-agua (15/85) y flujo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, la detección fue también a 220 nm.

## **8 - COMPUESTOS FARMACEUTICOS**

En la actualidad muchos trabajos se enfocan a la determinación de residuos de antibióticos veterinarios y otros compuestos farmacéuticos en análisis medioambiental debido a su continuado uso y el consiguiente problema tóxico que genera su acumulación medioambiental y porque son emitidos en grandes cantidades desde las plantas de tratamiento de aguas residuales por su carencia en efectividad para eliminarlos. Así, se han considerado estas plantas de tratamiento de los principales responsables de la presencia de compuestos farmacéuticos en el medioambiente. Los hospitales son también considerados de las principales fuentes en el medio acuático, junto con el uso veterinario en el tratamiento de infecciones de animales y/o como agente profiláctico que supone la acumulación de heces y orina en los fertilizantes de uso agrícola. Además, se utilizan en piscifactorías lo que genera contaminaciones por acumulaciones en los sedimentos y transporte a acuíferos.

Las clases de compuestos de origen farmacéutico sobre los que más estudios se han llevado a cabo incluyen los antibióticos, compuestos esteroides, analgésicos/no esteroides y drogas anti-inflamatorias.

Respecto al análisis de este tipo de compuestos, T. V. Morales y col. (48) realizaron una completa revisión de la bibliografía de las dos últimas décadas en relación al uso de diferentes tipos de métodos espectroscópicos basados en la técnica de luminiscencia. En particular, se centraron en aplicaciones medioambientales empleando sistemas estacionarios y sistemas dinámicos, cuando se acoplan como detectores a técnicas como HPLC, electroforesis y análisis de inyección en flujo. HPLC-FD se utilizó en la determinación de dos drogas anti-inflamatorias ibuprofeno y naproxeno, en muestras de efluentes y antibióticos, en concreto fluoroquinolonas, sin etapa previa de derivatización. También se ha empleado en el análisis de compuesto no fluorescentes, como tetraciclinas después de la reacción de complejación con Mg(II).

### **7.1 Antibióticos**

Los antibióticos se han detectado en diversos compartimentos del medio acuático, como aguas residuales, superficiales, profundas e incluso agua de bebida. Se

consideran pseudo-persistentes debido a su continua entrada en el medioambiente. Se caracterizan porque son pobremente adsorbidos en el cuerpo humano, siendo excretados prácticamente sin transformación o metabolizados. El interés medioambiental que implican radica en que los bajos niveles de antibióticos pueden favorecer la proliferación de bacterias resistentes.

Una detallada recopilación de los métodos analíticos más recientes en la determinación de antibióticos en muestras medioambientales ha sido realizado por M. Seifrtová et al (49).

Las principales familias de compuestos incluyen:

- Quinolonas (Qs) y fluoroquinolonas (FQs)
- Tetraciclinas (TCs)
- Macrolide (MLs)
- Sulfonamidas (SAs)
- Trimezoprim (TMP)

De ellas, el análisis cromatográfico con detección por ultravioleta permite la determinación de fluoroquinolonas, tetraciclinas y sulfonamidas, mientras que la detección por fluorescencia permite la determinación directa en las fluoroquinolonas y con derivatización previa de tetraciclinas y sulfamidas.

#### 8.1.1 *Fluoroquinolonas*

Estos compuestos son altamente fluorescentes, pudiendo realizarse su determinación a longitudes de onda de excitación de 278 nm y emisión de 450 nm, aunque otros estudios utilizan diferentes longitudes de onda. También se ha utilizado el de ultravioleta a 275 nm o 255 nm dependiendo del grupo de compuestos estudiado.

#### 8.1.2 *Tetraciclinas*

Algunos autores han realizando la detección mediante UV a 360 nm o a 280 nm. La longitud de onda de 280 nm se utilizó en la detección en estudios de multirresiduos, aunque no fue tan sensible y específico como la detección por masas. La detección por fluorescencia puede utilizarse si se lleva a cabo la derivatización previa.

#### 7.1.3 *Sulfonamidas*



Pertencen a la familia de drogas con estructura química de amida sulfanílica y que son de los antibióticos más ampliamente administrados en animales como agente preventivo y terapéutico para enfermedades por infecciones bacterianas.

Debido a su persistencia en medio ambiente y su relativa alta movilidad, pueden introducirse en lagos, transportarse a acuíferos y aguas superficiales, de modo que es de gran importancia desarrollar un método efectivo para el análisis a nivel trazas de sulfonamidas. Destacan sulfatiazol, sulfametacina, sulfadiazina y sulfacloropiridacina.

No son compuestos fluorescentes pero pueden fácilmente derivatizarse con fluorescamina y medirse a longitudes de onda de excitación de 405 nm y emisión a 485nm. Se ha utilizado detección por ultravioleta a 260 nm o a 272 nm, ajustando el pH de la fase acuosa con ácido fosfórico. En cuanto a la separación cromatográfica, se ha utilizado columnas de C18 con fases móviles metanol o acetonitrilo.

Debido a las relativamente bajas concentraciones de la mayor parte de sulfonamidas y la complejidad en las muestras medioambientales, las etapas de preconcentración y purificación se enfocan principalmente en la extracción de fase sólida basadas en diferentes tipos de adsorbentes.

L. Sun et al. (50) aplican un método modificado de extracción en fase sólida utilizando micro-partículas metálicas que evitan el inconveniente de los largos periodos de tiempo necesarios durante el tratamiento de muestra porque se requieren pasar grandes volúmenes de agua a través de cartuchos en fase sólida. En particular, se separan el adsorbente magnético con un imán. Las sulfonamidas se adsorben en el adsorbente hemi-micelar/magnético en el que se han cargado positivamente cationes de bromuro de octadecil trimetil amonio en la superficie de nano-partículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ ). Estudian sulfametoxazol, sulfametoxidiazina, sulfadimetoxina y sulfaquinoxalina en muestras de aguas medioambientales.

Experimentalmente el procedimiento parece sencillo: 10 mL de suspensión de nano partículas de magnetita y 100 mg de bromuro de octadecil trimetil amonio se añaden en 500 mL de muestras de aguas y se ajusta el pH a 9.0 CON NaOH (1 M). Se agita la mezcla durante 15 minutos y seguidamente se separan las parejas bromuro de octadecil trimetil amonio/ nano partículas de magnetita con un imán desde el fondo del vaso recipiente y el sobrenadante se desecha. Las partículas aisladas se lavan con metanol (3 x 2 mL) para desorber los analitos de interés en baño de ultrasonidos. El eluato se seca con una corriente de nitrógeno a 50°C y se redisuelve en 0.5 mL de metanol para análisis.

El análisis se realizó mediante HPLC/UV, con columna de C18 (25x4.6 mm, d.i. 5  $\mu\text{m}$ ), flujo 1 mL.min<sup>-1</sup>, 35°C y 10  $\mu\text{L}$  de inyección. Fase móvil: A - metanol/agua con 1% ácido

acético (10:89:1) y B – metanol, modo gradiente: 0' - 18% B, 24' – 43%, 25' – 18% (5').  
Detección a 270 nm.

Familia	Compuesto determinado	Columna cromatog	Fase móvil	Detec. (nm)
<b>FLUOROQUINOLONAS</b>	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14	Polarity dC <sub>18</sub> (150*3, 3 µm)	Grad. A – ác fórmico (pH 2.5), B AcN	DAD –275 ó 255
1 Ac. Nadilíxico	1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16	Intertsil C <sub>8</sub> (250*4.6, 5 µm)	Grad. A-oxálico (pH 4)+AcN (89:11), B-AcN	FD – 248/297 361/507
2 Ac. Oxolínico				
3 Cinoxacin				
4 Ciprofloxacín				
5 Danofloxacín				
6 Difloxacín				
7 Enoxacin				
8 Enrofloxacín				
9 Fleroxacín				
10 Flumequina				
11 Lomefloxacín				
12 Marbofloxacín				
13 Moxifloxacín				
14 Norfloxacín				
15 Ofloxacín				
16 Sarafloxacín				
	4, 14, 15	Zorbax SB-C <sub>8</sub> (150*2.1, 3.5 µm)	AcN/MeOH/fórmico/agu a (6/12/0.5/81.5)	FD – 278/450
	2, 4, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15,	ID YMC-Pack Pro C18 (250*4.6, 3 µm)	Grad.,A- 50 mM fórmico, B- MeOH	FD - 278/320
<b>SULFONAMIDAS</b>				
1 Sulfacoropiridacina	1, 2, 4, 7, 9, 14,	LiChrospher 100 RP C <sub>18</sub> (250*4, 5 µm)	Grad. A-10mM tampon AcAc, pH3.4 B- AcN	FD 405/485 (pre-derivat.)
2 Sulfadiacina				
3 Sulfadimetoxina				
4 Sulfadimidina				
5 Sulfameracina	2, 13, 12, 6, 8	Diamonsil C18 (250*4.6, 5 µm)	Grad. A- agua (pH3.4, fosfórico)B-AcN/agua(75/25)	UV-260
6 Sulfametacina				
7 Sulfametizol				
8 Sulfametoxazol				
9 Sulfametoxidiacina	2, 3, 5, 6, 10, 11, 13, 14	Supelcosil C18 (250*4.6, 5 µm), 35°C	Grad. A- 0.5%AcOH aq, B- AcN	UV-272
10 Sulfametoxipiracina				
11 Sulfanilamida				
12 Sulfapiridina				
13 Sulfatiazol				
14 Sultaquinoxalina				

Tabla 2 - Métodos cromatográficos para la determinación de las principales fluoroquinonas y sulfonamidas que pueden ser realizados mediante detectores por fluorescencia y ultravioleta-visible. Datos extraídos de M. Seifrtová et al (Anal. Chim. Acta, (2009), 649, 158-179).

## 8.2 Estrógenos

Los estrógenos pertenecen a la familia de las denominadas hormonas esteroides, considerados “disruptores” endocrinos por incluirse en el grupo de sustancias químicas capaces de sustituir a las hormonas naturales y provocar trastornos en los procesos normales de reproducción y desarrollo. Las consecuencias en las poblaciones silvestres son defectos congénitos, anomalías sexuales y fallos de reproducción. Un gran número de sustancias químicas artificiales que se han vertido al medio ambiente, así como algunas naturales, tienen potencial para alterar el sistema endocrino de animales y seres humanos. Entre ellas se encuentran las sustancias persistentes, bioacumulativas y organohalogenadas que incluyen algunos plaguicidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas) y las sustancias químicas industriales. Las hormonas sintéticas son generalmente más estables en agua que las naturales y tienen mayor potencia.

Las hormonas naturales más importantes son la  $17\beta$ -estradiol y la estrona, mientras que la sintética corresponde a la  $17\alpha$ -etinilestradiol. En cuanto a las principales dificultades analíticas que se encuentran en este tipo de análisis están los niveles bajos de los compuestos ( $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en matrices complejas, las concentraciones que pueden fluctuar en tiempo y en el espacio y por los patrones de calibrado y materiales de referencia que no son fácilmente disponibles.

Una revisión de los métodos cromatográficos aplicados a la determinación de disruptores estrogénicos en muestras ambientales fue realizada por K. Kozłowska-Tylingo y col. (51). En ella, apunta que las separaciones en HPLC normalmente se llevan a cabo con las clásicas columnas de sílice modificada con C18 operando ( $250\times 4.6$  mm,  $5\ \mu\text{m}$ ) en fase inversa, con fase móvil de acetonitrilo-agua y en modo gradiente, debido a las diferentes polaridades de los analitos. Típicamente se inicia en 20-50% de fase orgánica para terminar en 100%, empleando algunas veces trietilamina como modificador para mejorar la desprotonación de los derivados estrogénicos ácidos. En cuanto al tipo de detección, se emplean tanto por diodos como por fluorescencia, con etapa previa de preparación de la muestra y sin necesidad de derivatización previa como sucede cuando se aplica CG/MS.

A. Peñalver y col. (52) optimizaron un método para determinar compuestos estrogénicos en aguas empleando micro-extracción en fase sólida. En particular, determinaron bisferol A,  $\beta$ -estradiol,  $\alpha$ -estradiol,  $17\alpha$ -etinilestradiol, estrona, dietilestilbestrol, mestranol, 4-nonilfenol, 4-tert-octilfenol y 4 tert-butilfenol, empleando como fase móvil ( $1\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) una mezcla de agua con ácido acético (1%) y  $0.5\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de

KCl como fase A y acetonitrilo como fase B. Emplearon una columna LiChrospher 100 RP-18 (250\*4.6mm, 5  $\mu$ m) y todos los compuestos se detectaron a 280 nm.

T. Nekvapil y col (53) realizaron un estudio sobre la caracterización de estrógenos en dos ríos con incrementos graduales en los niveles de concentración a su paso por la ciudad y en las aguas residuales de la planta de tratamiento. La caracterización la llevaron a cabo utilizando extracción en fase sólida para el tratamiento de la muestra y HPLC-UV para el análisis, mediante una columna de C18 (150\*3.0 mm, 3.5  $\mu$ m), con fase acetonitrilo-agua (55-45) y a un flujo de 0.5 mL.min<sup>-1</sup>. La detección fue realizada a 205 y 220 nm.

### **8.3 – Otros compuestos farmacéuticos**

J. Rodríguez-Flores et al. (54) realizaron un estudio sobre la determinación analítica basada en HPLC con detector de diodos de diez antidepresivos y tres anticancerígenos en muestras medioambientales (agua y suelo). Este tipo de compuestos son ampliamente utilizados en países industrializados y pueden ser también contaminantes medioambientales.

En particular, los compuestos analizados incluyen clomipramina, citalopram, fluvoxamina, letrozol, imipramina, fluoxetina, paroxetina, trazodona y anatrozol. El análisis lo realizaron utilizando un método convencional mediante extracción en fase sólida y HPLC/DAD, empleando una columna de C18 (150\*4.6, 5 $\mu$ m), modo isocrático acetonitrilo/tampón fosfato 70 mM (35:65) y a 1.5 mL.min<sup>-1</sup>. La medida se llevó a cabo a 230 nm.

## **9 – LÍNEAS DE EVOLUCIÓN**

La tendencia actual en desarrollo analítico apunta a la miniaturización y simplificación de los protocolos necesarios durante la etapa de tratamiento de muestra en contraste con los previamente establecidos durante décadas. Así, la reducción de la cantidad de muestra, volumen de disolvente y tiempo utilizado son parámetros clave para la optimización de la etapa de tratamiento de muestras y simplificación la manipulación de las mismas. Estos aspectos afectan sobre todo a la disminución de costes asociados al consumo de disolventes y tiempo involucrados en la etapa de tratamiento. Son, por tanto, de particular interés y su optimización supone significativas mejoras para el análisis de lotes con gran número de muestras, que suelen ser habituales en los proyectos de investigación sobre control y caracterización de contaminantes medioambientales.

Además, los datos analíticos deben aportar la suficiente fiabilidad para evitar falsas conclusiones de implicación medioambiental, por lo que es necesario también facilitar la evidencia de validación de la metodología presentada. Uno de los aspectos analíticos más delicados en la determinación de compuestos orgánicos en medio ambiente continua siendo la falta de comparabilidad entre los resultados aportados por diferentes laboratorios. Distintos factores influyen en estas discrepancias, como alta complejidad de la matriz de la muestra, niveles traza de los contaminantes o la necesidad de tratamientos de muestra laboriosos y prolongados. Sin embargo, existe un creciente interés en desarrollar métodos analíticos y dar validez a los datos analíticos generados estableciendo con rigor parámetros de robustez, realización de series de ensayos comparativos mediante distintas técnicas de tratamiento aplicadas a muestras reales y estudios en el tiempo sobre reproducibilidad intermedia.

Otro punto de interés reside en el creciente interés en la utilización de disolventes no tóxicos que generen residuos contaminantes y riesgos durante la exposición a los mismos. Este punto implica cambios sustanciales en la metodología analítica, como:

- Durante la etapa de tratamiento: en algunos casos se requiere el uso de ciertas técnicas de extracción con elevadas eficiencias de recuperación, que permitan utilizar disolventes no tóxicos que normalmente llevan implícitas bajas recuperaciones. En este caso, la extracción con fluidos supercríticos actualmente presenta un interés creciente dado que permite trabajar con dióxido de carbono como agente extractante.
- Durante el análisis cromatográfico, por su uso como componente de la fase móvil con propiedades normalmente menos favorables para la óptima resolución de los picos cromatográficos que las que poseen los disolventes habitualmente utilizados como el acetonitrilo. Se vienen utilizando flujos de 1 mL.min<sup>-1</sup> y columnas de 4.6 mm de diámetro interno. En muchos casos las columnas con partículas de 3 µm de tamaño resultan en elevadas presiones y problemas de análisis. Por este motivo, se necesitan flujos más bajos y, sobre todo, cuando se emplean columnas de 50 cm. En general, cada disolvente tiene sus condiciones de P y flujos de operación, así 0.5 mL.min<sup>-1</sup> de acetonitrilo puede compararse con 0.3 mL.min<sup>-1</sup> de metanol cuando se quieren mantener las condiciones de presión.

## 10 - BIBLIOGRAFIA

- 1 S. García Alonso, R.M. Pérez Pastor, M.L. Sevillano Castaño, F.J. García Frutos (2010). Evaluación analítica de 4 métodos de determinación de PAHs mediante HPLC en un fuel de tipo II. *Informe Técnico Ciemat 1210*.
- 2 H. Yan, B. Liu, J. Du, K. Ho Row (2010). Simultaneous determination of four phthalate esters in bottled water using ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by GC-FID detection. *Analyst*, 135, 2585-2590.
- 3 S. García Alonso, R.M. Pérez Pastor (1998). Use of C<sub>18</sub> and silica-gel coated Sep-Pak cartridges for the determination of carbonyls in air by liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*. 367, 93-99.
- 4 S. García Alonso, R. Pérez (2006). Determination of glyoxal and methylglyoxal in atmospheric particulate matter by 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatisation. *Toxicological and Environmental Chemistry*. 88(3), 445-452.
- 5 M. Vogel, A. Büldt, U. karst. (2000). Hydrazine reagents as derivatizing agents in environmental analysis – a critical review. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 366, 781-191.
- 6 USEPA (1992) Determination of carbonyl compounds in drinking water by dinitrophenylhydrazine derivatization and high performance liquid chromatography. *Method 554. EPA/600/4-88/039. Methods for the Determination of Organic Compounds in Drinking Water Supplement II*.
- 7 A. Vairavamurthy, J.M. Roberts, L. Newman (1992). Methods for Determination of Low Molecular Weight Carbonyl Compounds in the Atmosphere: A Review. *Atmospheric Environment*. 26A(11), 1965-1993.
- 8 Pradiot Patnaik. (2010). *Handbook of environmental análisis chemical pollutants in air, water, soil and soil wastes*, (2<sup>nd</sup> ed). Boca Raton, Florida: CRC Press Taylor & Francis Group.
- 9 USEPA. (1996) *Determination of carbonyl compounds by high performance liquid chromatography (HPLC)*. EPA 8315 Cincinnati, Ohio.
- 10 M.C.Prieto, M. Piñeiro Iglesias, P. López Mahía, S. Muniategui Lorenzo, D. Prada Rodríguez. (2010). Simultaneous determination of carbonyl compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate matter by liquid chromatography—diode array detection—fluorescence detection. *Talanta*. 80, 2083-2092.
- 11 S. García Alonso, R. Pérez, M.L. Sevillano, O Escolano, F.J. García Frutos (2007). Método optimizado para la determinación de PAHs en un suelo contaminado. *Informe Técnico Ciemat 1100*.
- 12 S. García Alonso, R. Pérez, M.L. Sevillano, O Escolano, F.J. García Frutos (2007). Influencia del tamaño de partícula de un suelo contaminado en las incertidumbres asociadas al método de determinación de PAHs. *Informe Técnico Ciemat 1104*.
- 13 A. Toriba, K. Hayakawa (2007). Biomarkers of Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and related compounds. *Journal of Health Science*. 53(6), 631-638.

- 14 K. Li, L.A. Woodward, A. E. Kart, Q.X. Li (2000). Immunochemical detection of polycyclic aromatic hydrocarbons and 1-hydroxypyrene in water and sediment samples. *Analytica Chimica Acta*. 419, 1-8.
- 15 G. Jonson, J. Beber, D. Wells and F. Ariese (2003). The application of HPLC-F and GC-MS to the analysis of selected hydroxy polycyclic hydrocarbons in two certified fish bile reference materials. *Journal of Environmental Monitoring*. 5, 513-520.
- 16 N. Kishikawa, S. Morita, M. Wada, Y. Ohba, K. Nakashima and N. Kuroda (2004). Determination of Hydroxylated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Airborne Particulates by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Analytical Sciences*. 20(1), 129-132.
- 17 A.I. Barrado, S. García, R.M. Pérez and O. Pindado (2007). Measurements of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric aerosols from an urban site of Madrid (Spain) *Nucleation and Atmospheric Aerosols*. 17<sup>th</sup> international conference. Galway, Ireland, 517-521
- 18 B. Zielinska, S. Samy (2006). Analysis of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 386, 883-890.
- 19 X. Jinhui, F.S.C. Lee (2001). Análisis of nitrated polynuclear aromatic hydrocarbons. *Chemosphere*. 42, 245-250.
- 20 J. Cvacka, J. Barek, A.G. Fogg, J.C. Moreira, J. Zima (1998). High-performance liquid chromatography of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analyst*. 123, 9R-18R.
- 21 M. Toledo, F.M. Lanças, E. Carrilho (2007). Solid-phase extraction of nitro-PAH from aquatic samples and its separation by reverse-phase capillary liquid chromatography. *Journal of Brazilian Chemistry Society*. 18(5), 1004-1010.
- 22 X. Jinhui, F.S.C. Lee (2000). Quantification of nitrated polynuclear aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate matter. *Analytica Chimica Acta*. 416(1), 111-115.
- 23 K. Hayakawa\*, N.T. Kazuhiko Akutsu, T. Murahashi, H. Kakimoto, R. Kizu, A. Toriba (2002) Comparison of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulates collected in downtown and suburban Kanazawa, Japan. *Atmospheric Environment*. 36, 5535-5541.
- 24 N. Tang, M. Tabata, V. F. Mishukov, V. Sergineko, A. Toriba, R. Kizu, K. Hayakawa (2002). Comparison of Atmospheric Nitropolycyclic Aromatic Hydrocarbons in Vladivostok, Kanazawa and Toyama. *Journal of Health Science*. 48(1), 30-36.
- 25 W.A. MacCrehan, W.E. May, S.D. Yang, B.A. Benner (1988). Determination of nitro-polynuclear aromatic hydrocarbons in air and diesel particulate matter using liquid chromatography with electrochemical and fluorescence detection. *Analytical Chemistry*. 60 (3), 194-199.
- 26 K.W. Sigvardson, J.W. Birks (1984). Detection of Nitro Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Liquid Chromatography by Zinc Reduction and Peroxyoxalate Chemiluminescence. *Journal of Chromatography*. 316, 507-518.

- 27 B.S. Tejada, R.B. Zweidinger and J.E. Sigsby (1986). Fluorescence detection and identification of nitro derivatives of polynuclear aromatic hydrocarbons by on-column catalytic reduction to aromatic amines. *Analytical Chemistry*. 58, 1827-1834.
- 28 A.Hartung, J. Kraft, J. Schulze, H. Kiess, K.H. Lies (1984). The identification of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel particulate extracts and their potential formation as artifacts during particulate collection. *Chromatographia*. 19, 269-273.
- 29 A.I. Barrado Olmedo, S. García Alonso, R. Pérez Pastor, O. Pindado Jiménez (2009). Measurements of Hydroxy and Nitro PAHs in atmospheric urban aerosols. *European Aerosol Conference*. Karlsruhe, Abstract T113A15.
- 30 M.A.J. Harrison, S. Barra, D. Borghesi, D. Vione, D. Arsene, R.I. Olariu (2005). Nitrated phenols in the atmosphere: a review. *Atmospheric Environment*. 39, 231-248.
- 31 O. Delhomme, S. Morville, M. Mollet (2010). Seasonal and diurnal variations of atmospheric concentrations of phenols and nitrophenols measured in the Strasbourg area, France. *Atmospheric Pollution Research*. 1, 16-22.
- 32 R. Belloli, B. Barletta, E. Bolzacchini, S. Meinardib, M. Orlandib, B. Rindone (1999). Determination of toxic nitrophenols in the atmosphere by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 846 (1-2), 277-281.
- 33 A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé (2002). Solid-phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography to determine phenolic compounds in water. *Journal of Chromatography A*. 953, 79-87.
- 34 B. O. Opeolu, O. S. Fatoki, J. Odendaal (2010). Development of a solid-phase extraction method followed by HPLC-UV detection for the determination of phenols in water *International Journal of the Physical Sciences*. 5(5), 576-581.
- 35 G. Xu, F. Li, Q. Wang (2008). Occurrence and degradation characteristics of dibutyl phthalate (DBP) and di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in typical agricultural soils of China. *Science of Total Environment*. 393, 333-340.
- 36 A. Garrido Frenich, M.N. Barco Bonilla, J.C. López Martínez, J.L. Martínez Vidal, R. Romero-González (2009). Determination of di-(2-ethylhexyl)phthalate in environmental samples by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Separation Science*. 32(9), 1383-1389.
- 37 E. Cortazar, L. Bartolomé, A. Delgado, N. Etxebarria, L.A. Fernández, A. Usobiaga, O. Zuloaga (2005). Optimisation of microwave-assisted extraction for the determination of nonylphenols and phthalate esters in sediment samples and comparison with pressurised solvent extraction. *Analytica Chimica Acta*. 534, 247-252.
- 38 D. De Orsi, L. Gagliardi, R. Porrà, S. Berri, P. Chimenti, A. Granese, I. Carpani, D. Tonelli (2006). An environmentally friendly reversed-phase liquid chromatography method for phthalates determination in nail cosmetics. *Analytica Chimica Acta*. 555, 238-241.
- 39 T. Wu, C. Wang, X. Wang, H. Xiao, Q. Ma (2008). Comparison of UPLC and HPLC for Analysis of 12 Phthalates. *Chromatographia*. 68 (9/10), 803-806.



- 40 S. Werlich, H. Stockhorst, U. Witting, N. Binding (2004). MMNTP—a new tailor-made modular derivatization agent for the selective determination of isocyanates and diisocyanates. *Analyst*, 129, 364-370.
- 41 J. F. Huertas-Pérez, A. M. García-Campaña (2008). Determination of N-methylcarbamate pesticides in water and vegetable samples by HPLC with post-column chemiluminescence detection using the luminal reaction. *Analytica Chimica Acta*. 630, 194-204.
- 42 F. Koc, Y. Yigit, Y. Kursad Das, Y. Gurel, C. Yarali (2008). Determination of Aldicarb, Propoxur, Carbofuran, Carbaryl and Methiocarb Residues in Honey by HPLC with Post-column Derivatization and Fluorescence Detection after Elution from a Florisil Column. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2008, 16 (3), 39-45.
- 43 L. Fu, X. Liu, J. X. Zhao, H. Wang, C. Huang, X. Wang (2009). Determination of two pesticides in soils by dispersive liquid-liquid microextraction combined with LC-fluorescence detection. *Chromatographia*. 70(11-12), 1697-1701.
- 44 J. Keegan, M. Whelan, M. Danaher, S. Crooks, R. Sayers, A. Anastasio, C. Elliott, D. Brandon, A. Furey, R. O'Kennedy (2009). Benzimidazole carbamate residues in milk: Detection by Surface Plasmon Resonance-biosensor, using a modified QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method for extraction. *Analytica Chimica Acta*. 654(2), 111-119.
- 45 I. Baranowska, H. Barchanska, E. Pacak (2006). Procedures of trophic chain samples preparation for determination of triazines by HPLC and metals by ICP-AES methods. *Environmental Pollution*. 143, 206-211.
- 46 V. Trajkovska, S. Petrovska-Jovanovic, M. Cvetkovski (2001). Development and optimization of a method for the determination of simazine, atrazine and propazine using solid-phase extraction and HPLC/GC *Journal of Serbian Chemical Society*. 66(3), 199-204.
- 47 H. Katsumata, S. Kaneco, T. Suzuki, K. Ohta (2006). Determination of atrazine and simazine in water samples by high-performance liquid chromatography after preconcentration with heat-treated diatomaceous earth. *Analytica Chimica Acta*. 577, 214-219.
- 48 T. Vega Morales, S. Montesdeoca Esponda, J.J. Santana Rodriguez, S. Efremova Aaron, J.J. Aaron (2010). Of pollutants in the environment. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. 29 (1), 1-42.
- 49 M. Seifrtová, L. Nováková, C. Lino, A. Pena, P. Solich (2009). An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. *Analytica Chimica Acta*. 649, 158-179.
- 50 L. Sun, L. Chen, X. Sun, X. Du, Y. Yue, D. He, H. Xu, Q. Zeng, H. Wang and L. Ding (2009). Analysis of sulfonamides in environmental water samples based on magnetic mixed hemimicelles solid-phase extraction coupled with HPLC–UV detection. *Chemosphere*. 77 1306-1312.
- 51 K. Kozłowska-Tylingo, J. Namiesnik, T. Górecki (2010). Determination of estrogenic endocrine disruptors in environmental samples—a review of chromatographic methods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 40, 194-201.

- 52 A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé (2002). Method based on solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography with UV and electrochemical detection to determine estrogenic compounds in water samples. *Journal of Chromatography A*. 964 (1-2), 153-160.
- 53 T. Nekvapil, I. Borkovcová, M. Smutná, Z. Svobodová (2009). Estrogenic Profile of the Svatka and Svitava Rivers in the Brno Area. *Acta Veterinaria Brno*. 78, 313-317.
- 54 J. Rodríguez-Flores, A.M. Contento-Salcedo, L. Muñoz-Fernández. 2011. American Journal of Analytical Chemistry, 2, 18-26







