

METODOLOGÍA EN LÍNEA PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLINUCLEARES EN AGUA AL NIVEL DE ULTRATRAZAS

Luz Elena VERA-ÁVILA, Edgar Arturo CÁZARES-IBÁÑEZ,
Rosario COVARRUBIAS-HERRERA y Evangelina CAMACHO-FRÍAS

Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510 D.F., México

(Recibido agosto 2001, aceptado diciembre 2001)

Palabras clave: hidrocarburos aromáticos polinucleares, análisis de agua, preconcentración en línea

RESUMEN

Se desarrolló un método analítico para la determinación de los 16 hidrocarburos aromáticos polinucleares (HAP) de la lista de contaminantes prioritarios de la EPA a niveles de concentración inferiores a las partes por billón (ppb) en agua. Los compuestos fueron extraídos y preconcentrados en una pequeña precolumna empacada con un adsorbente de fase reversa. Posteriormente, la precolumna se acopló en línea con una columna analítica de fase polimérica C18 para la separación cromatográfica de los HAP por elución en gradiente y su detección dual por UV (262 nm) y fluorescencia (excitación: 305-395 nm, emisión: 430-470 nm). Para un análisis completo se requirieron dos muestras de 75 ml de la misma agua a las cuales se añadió 5% ó 25% (v/v) de acetonitrilo antes de la etapa de extracción. Ambas muestras fueron posteriormente procesadas de manera idéntica, cuantificando los HAP más ligeros en la de menor contenido de disolvente orgánico y los HAP más pesados en la muestra complementaria. En el intervalo de concentraciones estudiado las recuperaciones obtenidas fueron $\geq 88\%$ con coeficientes de variación $\leq 15\%$. Los límites de detección en muestras de agua grado reactivo fortificadas estuvieron entre 1.5 y 75 partes por trillón (ppt), dependiendo del analito considerado. El análisis de una muestra de agua de río permitió detectar la presencia de antraceno y fluoranteno a concentraciones de 29 y 26 ppt, respectivamente.

Key words: polynuclear aromatic hydrocarbons, water analysis, on-line trace enrichment

ABSTRACT

An analytical method was developed for the determination of the 16 EPA priority pollutant polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH) at sub-ppb concentration levels in water. The compounds were extracted and preconcentrated in a small precolumn packed with a reversed phase adsorbent. Then, the precolumn was on-line coupled to a polymeric C18 analytical column for the chromatographic PAH separation by gradient-elution and their dual UV (262 nm) and fluorescence detection (excitation: 305-395 nm, emission: 430-470 nm). A complete analysis was performed with two 75-ml samples of the same water, which were identically extracted and processed after the addition of 5% or 25% (v/v) of acetonitrile. The lightest PAH were quantitated in the sample with lowest organic solvent content and the heaviest ones in the complementary sample. Recoveries $\geq 88\%$ with variation coefficients $\leq 15\%$ were obtained for all PAH with this method. The detection limits of the method in spiked reagent water samples were comprised between 1.5 and 75 parts per trillion (ppt), depending on the solute. The analysis of a river water sample indicated the presence of anthracene and fluoranthene at concentrations of 29 and 26 ppt, respectively.

INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos aromáticos polinucleares (HAP) son contaminantes que se encuentran dispersos en el ambiente y provienen tanto de fuentes naturales como de diversas actividades humanas, en particular aquellas que involucran procesos de combustión incompletos donde las temperaturas sobrepasan los 700 °C. Algunas fuentes de contaminación típicas son las centrales térmicas, los humos de combustión de los automóviles, los procesos de refinado del aluminio y los derrames de combustibles fósiles. Los HAP pueden clasificarse en dos grupos con propiedades y efectos diferentes: los de bajo peso molecular, con dos y tres anillos aromáticos, son menos hidrofóbicos (log Kow, coeficiente de reparto octanol-agua, entre 3 y 5) y presentan una alta toxicidad; los de alto peso molecular son fuertemente hidrofóbicos (log Kow > 5.5) y potencialmente mutagénicos y carcinogénicos. A pesar de la baja solubilidad en agua de los HAP, su presencia en este medio está fuertemente regulada en la mayoría de los países debido a los riesgos potenciales para la salud humana. Por ejemplo, en la Unión Europea se ha establecido como norma que la suma de la concentración de 6 HAP [fluoranteno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(ghi)perileno e indeno (cd)pireno] en agua potable debe ser inferior a 0.2 ppb ($\mu\text{g/l}$), con una concentración límite de 20 ppt (ng/l) para benzo(a)pireno. En el caso de aguas superficiales usadas como fuente de abastecimiento para agua potable, el límite establecido para la suma de los 6 HAP es de 1 ppb. Estos límites se encuentran muy por debajo de las capacidades de detección de la instrumentación actual, por lo que el desarrollo de métodos de tratamiento de la muestra que permitan obtener un concentrado analizable es uno de los campos de investigación más activos de la química analítica.

Los métodos tradicionales para la determinación en agua de los 16 HAP incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la EPA (Agencia de Protección Ambiental de EUA), son variaciones del Método 610 (USEPA 1984). Todos ellos se basan en la extracción líquido-líquido (ELL) de la muestra acuosa, seguida por evaporación del extracto orgánico, reconstitución y análisis por cromatografía de gases (CG) con detector de ionización de flama o espectrómetro de masas, o bien por cromatografía de líquidos (CL) con detector UV o de fluorescencia. Estos métodos son muy largos, minuciosos e implican una continua manipulación de la muestra, lo que se traduce en altos riesgos de pérdida de analitos durante el procedimiento. Además, presentan la desventaja de requerir volúmenes relativamente grandes de disolventes orgánicos tóxicos, particularmente disolventes clorados, con el consiguiente problema de generación de desechos.

Actualmente, la extracción en fase sólida (EFS) en sus diversas modalidades se ha convertido en la alternativa de elección para la preparación de muestras ambientales. La EFS fuera de línea se ha empleado para aislar y concentrar los HAP de diversas matrices acuosas, utilizando adsorbentes de fase reversa C18 depositados en discos o en membranas (Hodgeson 1990, Michor *et al.* 1996, Carrera *et al.* 1998) o en cartuchos desechables (Fladung 1995, Messer y Taylor 1995, Kiss *et al.* 1996). Aunque esta técnica representa un avance con respecto a la ELL, aún tiene el inconveniente de requerir volúmenes de muestra relativamente grandes (superiores a 250 ml) y pasos de evaporación del disolvente de elución, para obtener un extracto suficientemente concentrado que permita determinar los HAP a los niveles que exigen las normas de calidad del agua. Esto implica que los tiempos de preparación de muestra son todavía largos (> 100 min) y persisten los riesgos de pérdida de analitos durante las etapas de elución y evaporación. También se han publicado varios métodos para HAP basados en la EFS en línea (Brouwer *et al.* 1994, Vera-Ávila y Covarrubias 1994, Lai y White 1995). En este caso, una pequeña precolumna empacada con el adsorbente es cargada con la muestra y luego se eluye en línea con la columna analítica de un sistema de CL. De esta manera, las etapas de preparación de muestra y análisis se acoplan, conduciendo a resultados más exactos y precisos y a muy altas sensibilidades con volúmenes de muestra más pequeños. Recientemente, se ha descrito el uso de los inmunoabsorbentes para la EFS de HAP, en línea o fuera de línea (Cichna *et al.* 1997, Bouzige *et al.* 1999). Estos adsorbentes están constituidos por anticuerpos específicos contra algún HAP, inmovilizados en un soporte sólido. Su principal ventaja es la altísima selectividad que presentan respecto al compuesto que les dio origen; sin embargo, estos materiales todavía se encuentran en fase experimental y no han sido muy comercializados. Otra modalidad de la EFS que ha sido empleada en la determinación de HAP es la microextracción en fase sólida (MEFS) (Liu *et al.* 1997, Negrao y Alpendurada 1998, Doong *et al.* 2000), en la cual los analitos se adsorben sobre una microfibra que recubre la punta de la aguja de una jeringa, sumergida en la muestra acuosa o colocada en el vapor sobrenadante de ésta. El análisis se realiza por CG ó CL introduciendo la jeringa en el inyector, donde los HAP son desorbidos de la fibra por la temperatura o la fase móvil, respectivamente, y son enviados a la columna para su separación y análisis. Esta técnica de preparación de muestra es sumamente sencilla pero la sensibilidad obtenida es menor que en las otras modalidades de EFS y presenta mayor inexactitud en la cuantificación de los analitos.

Independientemente del adsorbente o la modalidad de EFS usada para concentrar los HAP de la muestra, el principal problema que presentan estos compuestos es

su fuerte tendencia a adsorberse sobre la superficie de cualquier material que se encuentre en contacto con sus disoluciones acuosas. Esta tendencia es tanto más intensa cuanto más hidrofóbico es el compuesto, por ello las pérdidas mayores por adsorción en filtros y recipientes se presentan en los HAP más pesados. Para atenuar este problema, en varios trabajos se ha buscado aumentar la solubilidad de los HAP en el agua por adición de un disolvente orgánico o de un surfactante no iónico a concentración superior a su concentración micelar crítica. Sin embargo, el modificador orgánico afecta el proceso subsecuente de EFS, por lo que se requiere una cuidadosa optimización y control de su concentración en la muestra a extraer para obtener recuperaciones aceptables de todos los analitos, independientemente de su hidrofobicidad. En general, estos problemas han llevado a mayores complicaciones de los procedimientos y del montaje experimental utilizado en el método.

En un trabajo previo (Vera-Ávila y Covarrubias 1994) se ha propuesto un sistema de EFS en línea en dos etapas, para la determinación de 10 HAP en agua, logrando buenas recuperaciones para todos ellos. El objetivo del presente estudio fue optimizar el sistema antes propuesto para obtener un método exacto, preciso y robusto que permitiera determinar los 16 HAP de la lista de contaminantes prioritarios en concentraciones inferiores a la ppb y mostrar su aplicabilidad en diversas muestras de agua.

MATERIALES Y MÉTODOS

Equipo

La **figura 1** muestra el diagrama del arreglo experimental utilizado, que está compuesto por dos secciones unidas mediante una válvula de conmutación Rheodyne 7000 (V_c , en la **Fig. 1**). La sección de análisis está constituida por un sistema de bombeo Varian Modelo 5000 (P_1) con capacidad para gradiente de elución binario, un inyector manual Rheodyne 7125 (i) con un rizo de 24.7 μ l calibrado *in situ* (Vera-Ávila y Covarrubias 1994), una columna analítica (C) y dos detectores en serie: un UV de longitud de onda variable de Thermo Separations Modelo 3200 (UV) operado a 262 nm y un detector de fluorescencia de filtros Gilson Modelo 121 (F) con filtro de excitación de 305-395 nm y filtro de emisión de 430-470 nm; cada detector está conectado a un integrador/graficador Hewlett-Packard 3396 Serie II (I/G). La sección de preparación de muestra, intercalada entre el inyector y la columna analítica, consta de una bomba isocrática Beckman 210 A (P_2), una válvula de purga (V_p) y la precolumna de extracción y concentración (P_c) colocada en la posición correspondiente al rizo de la válvula de conmutación. Con el fin de eliminar posibles pérdidas de HAP por adsorción

en las tuberías de la bomba P_2 , ésta fue modificada reemplazando el tubo de entrada de Teflon® por un tubo de acero inoxidable (1/8 " D.E.).

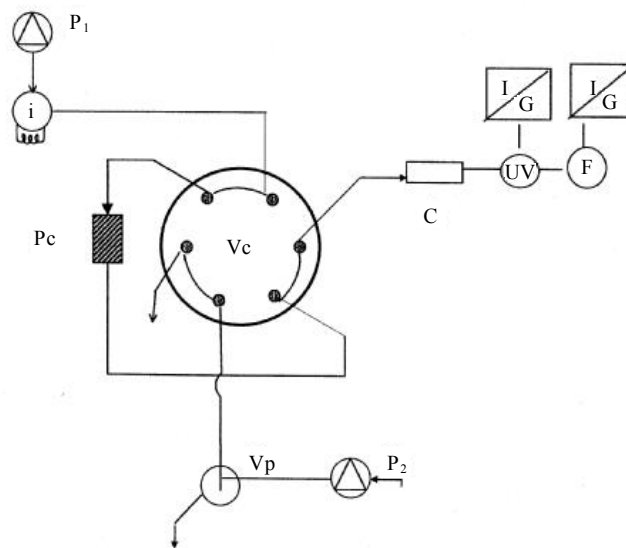


Fig. 1. Diagrama del montaje experimental. P_1 : cromatógrafo para gradiente binario, P_2 : bomba isocrática, V_c : válvula de conmutación, V_p : válvula de purga, i: inyector, P_c : precolumna, C: columna analítica, I/G: integrador-graficador, UV: detector ultravioleta-visible, F: detector de fluorescencia

Columnas y fases móviles

La precolumna de acero inoxidable (20 x 2 mm D.I.) de Upchurch Scientific fue empacada en el laboratorio a 210 bar, con una suspensión de la fase reversa Spherisorb ODS-2 de 5 μ m (Phase Separations) en una mezcla tetracloruro de carbono – etanol 50:50 (v/v), utilizando un sistema para empacado de columnas Haskel Modelo 29426. La columna analítica (125 x 3.2 mm D.I.) Envirosep-pp de Phenomenex, empacada con una fase reversa polimérica C18 de 5 μ m, fue adquirida comercialmente. La separación cromatográfica de los analitos se realizó a un flujo de 0.5 ml/min mediante un gradiente de elución binario. Las fases móviles débil (fase A) y fuerte (fase B) fueron acetonitrilo-agua 10:90 (v/v) y acetonitrilo puro, respectivamente. El programa de gradiente empleado fue: fase B, 0 min = 25 %, 8 min = 25 %, 10 min = 50 %, 14 min = 50 %, 28 min = 100 % y 50 min = 100 %.

Disolventes, reactivos y disoluciones

El acetonitrilo fue grado HPLC de Prolabo. El agua empleada para la preparación de fases móviles y de muestras sintéticas fortificadas fue grado reactivo, tipo I, obtenida de un desionizador Nanopure de Barnstead Thermolyne. Los 16 HAP, cuyos nombres y abreviaturas se muestran en la **tabla I**, fueron adquiridos de Chem

Service con una pureza certificada mínima de 97 %, excepto el acenaftileno (especificación del proveedor: 89 % Acenaftileno y 11 % acenafteno). Se prepararon disoluciones patrón individuales a concentración entre 100 y 200 partes por millón (ppm, mg/l) para cada HAP, pesando la cantidad adecuada y disolviéndola en acetonitrilo. Las mezclas estándar de trabajo se prepararon también en acetonitrilo a partir de las disoluciones patrón. Estas mezclas se utilizaron para fortificar las muestras de agua y también en inyección directa, como referencia para calcular la recuperación de los solutos en las muestras analizadas.

Mediante pruebas preliminares, con disoluciones individuales de los HAP inyectadas en el cromatógrafo, se determinó el orden de elución de los compuestos y el modo de detección a utilizar para cada uno de ellos (**Tabla I**). Los HAP detectados con alta sensibilidad por fluorescencia (ANT, FLT, B(a)P, B(b)F, B(k)F, DBA, B(ghi)P e I(cd)P) también dieron respuesta en el UV a 262 nm, pero con mucho menor intensidad. Por el contrario, el conjunto constituido por NAF, ACE, ACI, FLU, FEN y CRI no dio ninguna señal en el detector de fluorescencia con los filtros de excitación y emisión usados. El PIR y el B(a)A dieron respuestas parecidas en ambos detectores; sin embargo, para B(a)A se optó por la detección en fluorescencia debido a que eluye muy cercano al CRI, el cual no interfiere en este modo de detección, en cambio para PIR se eligió la detección UV por la menor interferencia del pico vecino, FLT, cuya señal en UV fue muy pequeña. Por otra parte, en estos ensayos se observó que las diferencias de respuesta para una misma concentración, entre los HAP detectados por fluorescencia y los detectados por UV, fueron en general muy grandes e incluso dentro del gru-

po de compuestos reconocidos por un mismo detector, las respuestas fueron considerablemente diferentes. Para evitar problemas de saturación de los detectores, las mezclas estándar de trabajo fueron preparadas ajustando apropiadamente la concentración de cada HAP de acuerdo con su modo de detección y su respuesta relativa en ese detector.

Operaciones fuera de línea

El método propuesto fue diseñado considerando que las muestras se colectan en frascos de vidrio ámbar con capacidad de 75 ml, los cuales se llenan hasta el inicio de la rosca con el agua a analizar. Esto significa que el volumen de muestra podría variar entre 73 y 77 ml, aproximadamente; sin embargo, el protocolo desarrollado puede aceptar estas variaciones sin requerir de ninguna modificación. No obstante, para la cuantificación de los analitos se necesita conocer el volumen exacto de muestra por lo que deberá marcarse el nivel del líquido en el frasco para determinar posteriormente dicho volumen.

Para un análisis completo se requieren dos frascos con la misma muestra. En efecto, debido a la gran diferencia de hidrofobicidad entre los 16 HAP, éstos se dividieron para su análisis en dos grupos, el de los HAP ligeros y el de los HAP pesados (tal como se indica en la **Tabla I**), y se diseñaron condiciones diferentes para el tratamiento de cada grupo. El procedimiento optimizado para la preparación previa de la muestra (fuera de línea) es el siguiente:

1. En un sistema de filtración (Millipore, Modelo OM027) con una membrana de Nylon 66 de poro 0.4 µm, filtrar la muestra ayudándose de una varilla de vidrio y usando un vacío suave. Recibir el filtrado en un matraz Kitazato de vidrio de 125 ml. Antes de usarse, la mem-

TABLA I. CLASIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE LOS HAP

Orden*	Compuesto	Abreviatura	Clasificación	Detección**
1	Naftaleno	NAF	HAP ligero	UV
2	Acenafteno	ACE	HAP ligero	UV
3	Acenaftileno	ACI	HAP ligero	UV
4	Fluoreno	FLU	HAP ligero	UV
5	Fenantreno	FEN	HAP ligero***	UV
6	Antraceno	ANT	HAP ligero***	F
7	Fluoranteno	FLT	HAP ligero***	F
8	Pireno	PIR	HAP ligero***	UV
9	Benzo(a)antraceno	B(a)A	HAP pesado	F
10	Criseno	CRI	HAP pesado	UV
11	Benzo(a)pireno	B(a)P	HAP pesado	F
12	Benzo(b)fluoranteno	B(b)F	HAP pesado	F
13	Benzo(k)fluoranteno	B(k)F	HAP pesado	F
14	Dibenzo(ah)antraceno	DBA	HAP pesado	F
15	Benzo(ghi)perileno	B(ghi)P	HAP pesado	F
16	Indeno(cd)pireno	I(cd)P	HAP pesado	F

*Orden de elución en el cromatograma. ** UV a 262 nm; F=fluorescencia, excitación: 305-395 nm, emisión: 430-470 nm. ***Compuestos frontera

brana de nylon debe ser acondicionada para lo cual se sumerge por 1 a 2 horas en acetonitrilo, luego se coloca en el embudo de filtración y se lava con acetonitrilo fresco y agua grado reactivo, desechando estos disolventes.

2. Para los HAP ligeros, una vez filtrada la muestra agregar 5 ml de acetonitrilo al frasco de muestreo, tapar y agitar vigorosamente. Pasar este disolvente por la misma membrana de nylon y recogerlo en el mismo matraz que la muestra. Repetir esta operación con 20 ml de agua grado reactivo. El volumen final de líquido en el matraz Kitazato será de ~100 ml (volumen inicial de muestra + 25 ml).
3. Para los HAP pesados, agregar 5 x 5 ml de acetonitrilo al frasco de muestreo, tapar y agitar vigorosamente a cada vez. Pasar cada porción por la misma membrana y recogerla en el mismo matraz que la muestra. El volumen final en el matraz será de ~100 ml.
4. Retirar el matraz del sistema de filtración, taparlo con papel aluminio y agitar suavemente para homogeneizar la mezcla. El matraz con la muestra filtrada y el o los disolventes añadidos se emplea directamente como reservorio de la bomba P₂ en los pasos 5 y 6 de las operaciones en línea descritas posteriormente.

Operaciones en línea

Una vez preparada la disolución de carga, se procede a realizar en línea la extracción, preconcentración y análisis de los HAP utilizando el arreglo experimental de la **figura 1**. Las soluciones empleadas en la bomba P₂ durante el procedimiento son:

- a. disolvente de regeneración: acetonitrilo.
- b. disolución de acondicionamiento: mezcla acetonitrilo-agua 5:95 (v/v) en el ensayo de HAP ligeros o 25:75

(v/v) en el de HAP pesados.

- c. disolución de carga: la muestra filtrada y preparada para HAP ligeros o para HAP pesados.
- d. disolvente de enjuague: agua grado reactivo.

En la bomba P₁ sólo se utilizan las fases móviles A y B. La fase móvil inicial, empleada para equilibrar el sistema, está constituida por fase A 75 % y fase B 25 % (v/v); el programa del gradiente de elución para la separación de los HAP fue descrito anteriormente. La **tabla II** muestra los tiempos y condiciones experimentales usados en cada paso de las operaciones en línea descritas a continuación.

1. Mediante la bomba P₁, enviar la fase móvil inicial hacia la columna analítica para equilibrarla. Simultáneamente, llenar las líneas de la bomba P₂ con el disolvente de regeneración.
2. Regenerar la precolumna.
3. Llenar las líneas de la bomba P₂ con el disolvente de acondicionamiento.
4. Acondicionar la precolumna.
5. Llenar las líneas de la bomba P₂ con la disolución de carga.
6. Cargar la precolumna con 25 ml exactos de esta disolución.
7. Llenar las líneas de la bomba P₂ con la disolución de enjuague.
8. Enjuagar la precolumna.
9. Rotar la válvula de conmutación y correr el programa de gradiente en la bomba P₁ para analizar la muestra.
10. Con la bomba P₁, enviar la fase móvil inicial para equilibrar la precolumna y la columna analítica acopladas en línea. Cargar el rizo del inyector con la mezcla estándar de HAP que se utilizará como refe-

TABLA II. TIEMPOS Y CONDICIONES DEL PROCEDIMIENTO EN LÍNEA

Tiempo (min)	Paso	Válvulas			P ₁		P ₂	
		Vp	Vc	i	Flujo (ml/min)	fase móvil	Flujo (ml/min)	disolución
0.0	1	A	L	L/I	0.5	inicial	5.0	a
1.0	2	C	L	L/I	0.5	inicial	2.0	a
6.0	3	A	L	L/I	0.5	inicial	5.0	b
7.0	4	C	L	L/I	0.5	inicial	2.0	b
17.0	5	A	L	L/I	0.5	inicial	5.0	c
19.0	6	C	L	L/I	0.5	inicial	2.0	c
31.5	7	A	L	L/I	0.5	inicial	5.0	d
32.5	8	C	L	L/I	0.5	inicial	0.5	d
33.5	9	A/C	I	L/I	0.5	gradiente	0.0	-
83.5	10	A/C	I	L	0.5	inicial	0.0	-
113.5	11	A/C	I	I	0.5	gradiente	0.0	-
163.5	Repetir pasos 1-9 para el análisis de la carga complementaria							
247.0	Fin o nuevo ciclo para análisis de otra muestra							

P₁: bomba binaria, P₂: bomba isocrática, Vp: válvula de purga, Vc: válvula de conmutación, i: inyector, A: abierta, C: cerrada, L: posición de carga, I: posición de inyección, a: disolvente de regeneración, b: disolución de acondicionamiento, c: disolución de carga, d: disolvente de enjuague

rencia para la cuantificación.

11. Rotar la válvula de inyección y correr el programa de gradiente en la bomba P₁ para analizar el estándar.

Repetir los pasos 1-9, usando en los pasos 5 y 6 la muestra complementaria; es decir, si inicialmente se cargó la muestra preparada para HAP ligeros, cargar ahora la muestra para HAP pesados o viceversa.

En los pasos 3, 5 y 7, la bomba P₂ debe pararse momentáneamente para transferir el tubo de entrada a la siguiente disolución a emplear; posteriormente, se abre la válvula de purga y se arranca la bomba P₂ para llenar las tuberías con la nueva disolución a un flujo rápido. El estándar inyectado y analizado en los pasos 10 y 11 sirve como referencia tanto para el análisis de la muestra preparada para HAP ligeros como para la de HAP pesados.

Según se observa en la **tabla II**, el tiempo total para un análisis completo (HAP ligeros, HAP pesados y estándar inyectado) es de aproximadamente 4 horas. Sin embargo, la EFS de las dos muestras HAP ligeros y HAP pesados, sólo requiere 67 min en total y este proceso se realiza mientras se equilibra la columna analítica a las condiciones iniciales para la siguiente corrida cromatográfica (entre el paso 1 y 8). Así, en este procedimiento en línea, el tiempo de análisis está determinado exclusivamente por las corridas cromatográficas y su respectivo equilibrio de columna. Es interesante mencionar que todo el conjunto de operaciones en línea puede ser automatizado para análisis de rutina; en este caso, la **tabla II** permite programar las diferentes actividades en el sistema electrónico de comando. En el comercio existen diversos sistemas para la automatización de la EFS.

El protocolo presentado lleva incluido un paso de regeneración de la precolumna antes de cada análisis. Así mismo, la columna analítica es regenerada en cada corrida por la fase móvil fuerte que circula a través de ella al final del gradiente. De esta manera se eliminan prácticamente todos los riesgos de contaminación cruzada en análisis secuenciales de muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Optimización de las condiciones experimentales

Los 16 HAP en estudio son un grupo de compuestos difíciles de separar tanto por cromatografía de gases como por cromatografía de líquidos, aunque se considera que esta última técnica es una mejor opción (Bouzige *et al.* 1999). La columna Envirosep-pp, utilizada en este trabajo, está especialmente diseñada para la separación de HAP y con el gradiente propuesto permite lograr una resolución adecuada de los 16 compuestos, como se muestra en la **figura 2**. El cromatograma fue obtenido por inyección de una mezcla estándar a concentraciones relativamente elevadas de los HAP, condición en la cual los 16 compuestos se alcanzan a detectar por UV a 262

nm. Sin embargo, combinando la detección por UV y por fluorescencia es posible alcanzar límites de detección en inyección directa muy bajos para todos los solutos (entre 1 y 50 ppb, dependiendo del soluto considerado).

Uno de los principales problemas cuando se trabaja

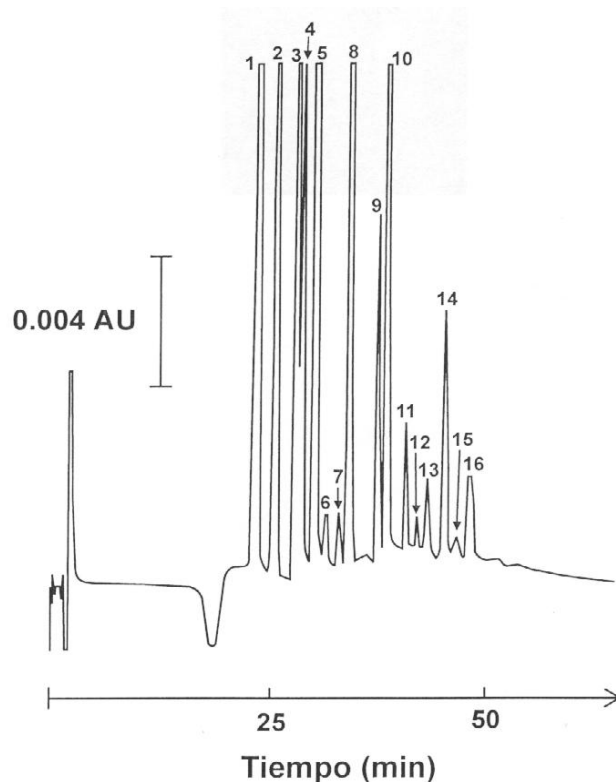


Fig. 2. Cromatograma UV obtenido de la inyección de una mezcla estándar de HAP. Solutos-concentración: (1) NAF-1609 ppb, (2) ACE-950 ppb, (3) ACI-1826 ppb, (4) FLU-341 ppb, (5) FEN-555 ppb, (6) ANT-186 ppb, (7) FLT-149 ppb, (8) PIR-182 ppb, (9) B(a)A-333 ppb, (10) CRI-421 ppb, (11) B(a)P-86.4 ppb, (12) B(b)F-107 ppb, (13) B(k)F-83.2 ppb, (14) DBA-1049 ppb, (15) B(ghi)P-86.4 ppb y (16) In(cd)P-86.4 ppb

con compuestos muy hidrofóbicos como los HAP, es su fuerte tendencia a escapar de la disolución acuosa, adsorbiéndose sobre la superficie de cualquier material que esté en contacto con ella. Para recuperar los analitos adsorbidos, es necesario incluir en el protocolo operaciones de enjuagado del frasco de muestreo y de la membrana de filtración con un disolvente orgánico, el cual se agrega posteriormente a la muestra a analizar. El volumen de este disolvente debe ser lo más pequeño posible para no afectar significativamente las operaciones subsecuentes de extracción y análisis, ya que la retención de los analitos en las precolumnas de fase reversa utilizadas para la EFS disminuye a medida que aumenta el contenido de disolvente orgánico en la muestra acuosa. En el caso de los HAP estudiados el problema radica

TABLA III. LINEALIDAD Y EXACTITUD MULTINIVEL DEL MÉTODO (CANTIDAD RECUPERADA VS CANTIDAD ANALIZADA TEÓRICAMENTE)*

Compuesto	n	Ordenada (ng)	Pendiente	Intervalo (ppb)
AF	5	0.8 ± 1.8	0.92 ± 0.07	0.161 - 2.412
ACE	5	-1.3 ± 3.7	1.08 ± 0.09	0.190 - 4.744
ACI	5	-1.5 ± 5.8	1.09 ± 0.14	0.183 - 4.565
FLU	5	-0.2 ± 0.8	1.04 ± 0.10	0.034 - 0.853
FEN	5	0.0 ± 0.6	1.00 ± 0.05	0.056 - 1.387
ANT	5	-0.1 ± 0.2	0.99 ± 0.02	0.019 - 0.928
FLT	5	-0.2 ± 0.5	1.05 ± 0.07	0.015 - 0.747
PIR	5	-0.4 ± 2.6	1.05 ± 0.16	0.054 - 1.813
B(a)A	8	-0.2 ± 0.3	1.06 ± 0.02	0.033 - 1.664
CRI	8	-0.1 ± 0.5	1.02 ± 0.03	0.042 - 2.107
B(a)P	8	-0.1 ± 0.2	1.01 ± 0.04	0.009 - 0.432
B(b)F	8	-0.1 ± 0.1	1.00 ± 0.03	0.011 - 0.533
B(k)F	8	-0.1 ± 0.1	1.02 ± 0.04	0.008 - 0.416
DBA	8	-0.5 ± 3.2	0.93 ± 0.07	0.105 - 5.248
B(ghi)P	8	-0.2 ± 0.2	0.94 ± 0.04	0.009 - 0.864
I(cd)P	8	-0.4 ± 0.7	0.88 ± 0.04	0.041 - 2.048

* Coeficientes de correlación (r) superiores a 0.995; intervalos de confianza de la ordenada al origen y la pendiente para un nivel de significación $\alpha=0.05$

en que, si se utiliza un cantidad muy pequeña de disolvente orgánico para enjuagar el material, los compuestos más voluminosos no alcanzan a desorberse completamente, comprometiendo la exactitud y precisión del método; por el contrario, si la muestra contiene una mayor proporción de disolvente orgánico, entonces es necesario reducir drásticamente el volumen de carga en la precolumna para evitar la fuga de los analitos más ligeros, lo que compromete la sensibilidad del método. Ante esta disyuntiva, se optó por dividir a los 16 HAP en dos grupos: el de los HAP ligeros, que pudieron recuperarse convenientemente usando sólo 5 ml de acetonitrilo para el enjuague, y el de los HAP pesados, que requirieron hasta 25 ml de este disolvente para desorberse de los recipientes y filtros y permanecer en la fase líquida.

Algunos compuestos como FEN, ANT, FLT y PIR, que fueron clasificados y tratados como HAP ligeros, de hecho son compuestos frontera pues se comprobó que también se recuperan aceptablemente si se tratan según el procedimiento para HAP pesados.

Para optimizar las condiciones de EFS se prepararon muestras de agua grado reactivo con un contenido de 5% o 25% de acetonitrilo y se fortificaron con una mezcla estándar de HAP. Usando el montaje de la **figura 1** y el procedimiento descrito en la parte experimental para las operaciones en línea, se cargaron en la precolumna volúmenes crecientes de las muestras (10, 25 y 50 ml) y para cada volumen se determinó la recuperación de los analitos. Las concentraciones de HAP en las muestras fortificadas fueron ajustadas de modo que, para los diferentes volúmenes ensayados, la cantidad teóricamente cargada de cada soluto en la precolumna fuera constante. Las ecuaciones utilizadas para calcular el porcentaje

de recuperación (% R) fueron:

$$Q_m = (A_m \times Q_s) / A_s \quad (1)$$

$$\% R = (Q_m \times 100) / Q_t \quad (2)$$

donde para cada HAP, A_m es el área del pico del soluto en el cromatograma de la muestra analizada, A_s es el área del pico del mismo soluto en el cromatograma del estándar inyectado, Q_m es la cantidad recuperada de soluto en la muestra analizada, Q_t es la cantidad de soluto teóricamente cargada en la precolumna (concentración del soluto en la disolución de carga x volumen cargado) y Q_s es la cantidad de soluto inyectada (concentración del soluto en el estándar x volumen del rizo del inyector). En los experimentos con 10 y 25 ml de muestra cargados, se recuperaron totalmente los HAP ligeros (en la muestra con 5 % de acetonitrilo) y los HAP pesados (en la muestra con 25 % de acetonitrilo). Por el contrario, con 50 ml de carga, la recuperación de los solutos, en particular los primeros de cada grupo, disminuyó drásticamente. Así, en la muestra con 5 % de acetonitrilo, la recuperación de NAF fue de 63 % y en la muestra con 25 % del mismo disolvente, la recuperación de B(a)A fue de 60 %. Por lo tanto, se concluyó que un volumen de carga de 25 ml era el más apropiado para una recuperación óptima y una buena sensibilidad del método.

Certificación del método analítico

Los resultados de la evaluación del método desarrollado se resumen en las **tablas III, IV y V**. El estudio de linealidad y exactitud multinivel del método se realizó con muestras de agua grado reactivo fortificadas con los 16

TABLA IV. PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO (n=4) A CONCENTRACIONES DE HAP CERCANAS A LOS LÍMITES DE DETECCIÓN

Compuesto	Concentración (ppt)	R* (%)	CV* (%)
AF	161	129	3
ACE	190	101	5
ACI	183	94	10
FLU	34.1	99	6
FEN	55.5	100	5
ANT	37.1	94	10
FLT	14.9	85	3
PIR	36.3	77	3
B(a)A	33.3	100	19
CRI	42.1	92	19
B(a)P	8.64	107	4
B(b)F	10.7	84	6
B(k)F	8.32	77	7
DBA	105	72	10
B(ghi)	8.64	94	9
I(cd)P	41.1	82	12

* R = recuperación promedio, CV = coeficiente de variación

HAP a varios niveles de concentración; para cada nivel se determinó la cantidad recuperada de los solutos y se relacionó con la cantidad teóricamente analizada. En la **tabla III** se reportan las ordenadas al origen y las pendientes de las rectas de regresión obtenidas por el método de mínimos cuadrados, junto con sus intervalos de confianza respectivos; también se indican los intervalos de concentración estudiados para cada soluto, los cuales se encuentran comprendidos entre las partes por trillón y las partes por billón. Dado que los coeficientes de correlación (r) calculados fueron superiores a 0.995 para to-

TABLA V. LÍMITES DE CUANTIFICACION (LCM) Y DE DETECCIÓN DEL METODO (LDM) PARA CADA HAP. COMPARACION CON LOS LDM DEL METODO EPA 610

Compuesto	LCM (ppt)	LDM (ppt)	LDM (EPA 610) (ppt)
AF	65	29	1800
ACE	103	47	1800
ACI	165	75	2300
FLU	22	10	210
FEN	26	12	640
ANT	35	16	660
FLT	3	2	210
PIR	11	5	270
B(a)A	62	28	13
CRI	73	33	150
B(a)P	3	2	23
B(b)F	5	2	18
B(k)F	5	2	17
DBA	74	34	30
B(ghi)P	7	3	76
I(cd)P	41	18	43

dos los HAP y las ordenadas al origen de las rectas de regresión fueron estadísticamente iguales a cero, se puede considerar que el método no presenta errores sistemáticos y es lineal en el intervalo estudiado de concentraciones. Por otra parte, las pendientes, que representan la fracción de soluto recuperado, se situaron entre 0.88 y 1.09, mostrando que la exactitud del método es muy satisfactoria dados los bajos niveles de concentración de los HAP en las muestras analizadas. Con el fin de conocer las capacidades de este método en condiciones límite, se realizó un estudio adicional de precisión y exactitud con muestras fortificadas a concentraciones cercanas a los límites de detección. La **tabla IV** muestra que, a estos niveles de ultratrazas, la precisión del método medida por el coeficiente de variación es $\leq 19\%$ mientras que la exactitud, evaluada por el porcentaje de recuperación, se encuentra entre 72% y 129% . Es interesante mencionar que la NPS (National Pesticide Survey de EUA) y la EPA establecen como valor aceptable una recuperación entre 70% y 130% , con un coeficiente de variación máximo de 30% , para muestras ambientales fortificadas a niveles de ppb (Barceló 1993). En este trabajo se obtuvo esa recuperación para concentraciones a niveles de ppt, es decir mil veces menores.

Los límites de detección del método (LDM) se estimaron a partir de los resultados reportados en la **tabla IV**, utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{LDM} = t_{(n-1, \alpha=0.99)} \times \text{DE} \quad (3)$$

donde, DE es la desviación estándar de las determinaciones expresada en unidades de concentración y $t_{(n-1, \alpha=0.99)}$ es el valor de la "t" de Student para un nivel de confianza del 99% y (n-1) grados de libertad, siendo n el número de réplicas. El límite de cuantificación del método (LCM) se definió como la concentración correspondiente a diez veces la desviación estándar. En la **tabla V** se reportan los valores de LDM y LCM para los 16 HAP y se comparan con los límites de detección reportados en el método 610 de la EPA (USEPA 1984). Como puede observarse, el método propuesto en este trabajo permite alcanzar límites de detección para los HAP ligeros considerablemente menores que los del método oficial. Para los HAP pesados se obtienen también límites de detección menores que los del método EPA, con excepción del B(a)A y el DBA, aunque en este caso las diferencias entre los valores dados por ambos métodos son menos notorias. Otra característica interesante de comparar es el volumen de muestra requerido para el análisis de los 16 HAP; el método EPA está diseñado para trabajar con un litro de muestra mientras que en el método propuesto sólo se necesitan 150 ml (2 frascos con 75 ml de la muestra cada uno). Lo anterior se traduce en menores costos y mayor facilidad para el transporte de muestras, lo que representa una gran ventaja cuando las

muestras son colectadas en sitios remotos o de difícil acceso.

Aplicación del método

El método se aplicó para un estudio de estabilidad de los HAP en medio acuoso y para la determinación de HAP en una muestra de agua de río.

La estabilidad de los HAP en solución se determinó en dos medios diferentes, agua grado reactivo y agua potable. Dos muestras de 75 ml de cada tipo de agua se fortificaron con una mezcla estándar de HAP a las concentraciones indicadas en la **tabla VI**, luego se filtraron y prepararon de acuerdo con el procedimiento indicado en la parte experimental (operaciones fuera de línea). Las muestras con el acetonitrilo añadido se dejaron expuestas a la luz y a la temperatura ambiente por 24 horas. Transcurrido este tiempo se continuó con el procedimiento de extracción y análisis en línea para evaluar y comparar la estabilidad de los compuestos en los dos tipos de agua. Los resultados obtenidos, descritos en la **tabla VI**, muestran que la mayoría de los HAP permanecieron estables por 24 horas en el agua grado reactivo, a la que se había adicionado acetonitrilo (práctica común para la preservación de muestras) en las proporciones establecidas en el método; únicamente se observaron algunas pérdidas estadísticamente significativas para ANT, B(k)F, B(ghi)P e I(cd)P. Por el contrario, en el agua potable todos los HAP, con excepción de FLU (HAP ligero

analizado en la muestra con 5 % de acetonitrilo) y B(a)P (HAP pesado analizado en la muestra con 25 % de acetonitrilo), se degradaron notablemente e incluso algunos de ellos desaparecieron totalmente. Es evidente que en este caso el cloro residual presente en el medio contrarrestó en buena medida el efecto protector del acetonitrilo. Por lo tanto, se podría esperar que en ausencia de disolvente orgánico todos los HAP, con la posible excepción del fluoreno, serían completamente degradados por el cloro. De aquí se concluye que la potabilización del agua por cloración es un método eficaz para eliminar los HAP de este medio, aún a niveles de concentración del orden de las ppt.

El método desarrollado se aplicó también para el análisis de una muestra de agua superficial proveniente de una zona expuesta a la contaminación por HAP. La muestra fue colectada en el Río Seco, al nivel de la ciudad de Paraíso en la zona petrolera de Tabasco, y conservada de acuerdo con las normas establecidas para este tipo de muestras (USEPA 1984). Los cromatogramas obtenidos del análisis de la muestra blanco y la misma muestra fortificada con una mezcla estándar de HAP a las concentraciones usadas en el estudio precedente (ver **Tabla VI**) se presentan en las **figuras 3 a 6**. Las **figuras 3 y 4** corresponden a los cromatogramas UV de la muestra preparada para HAP ligeros y HAP pesados, respectivamente. Aunque los cromatogramas de la muestra blanco presentan algunos pequeños picos que sobresalen del ruido de fondo y que eluyen en la misma zona que los HAP, la comparación cuidadosa con los cromatogramas de la muestra fortificada en las dos figuras lleva a la conclusión de que ninguno de los HAP que dan respuesta en UV está inequívocamente presente en la muestra colectada del agua de río. En todo caso, si estuvieran presentes, sus concentraciones serían muy inferiores a las indicadas en la **tabla VI** para estos HAP. Cabe mencionar que en la muestra fortificada preparada para HAP ligeros se alcanzan a distinguir los HAP pesados B(a)A y CRI, los cuales sólo se recuperan parcialmente en este análisis. De la misma manera, en la muestra fortificada preparada para HAP pesados se alcanza a distinguir el pico de FLU, HAP ligero que sólo se recupera parcialmente en este análisis, y los picos de los solutos frontera FEN y PIR, cuya recuperación es satisfactoria por cualquiera de los dos métodos de preparación de la muestra. Las **figuras 5 y 6** corresponden a los cromatogramas de fluorescencia de la muestra preparada para HAP ligeros y HAP pesados, respectivamente. Es importante indicar que ninguno de los HAP que dan señal en fluorescencia eluye antes de los 25 min; por lo tanto, en los cromatogramas de la muestra blanco los únicos picos de interés son los dos que se observan al final del conjunto de señales ya que sus tiempos de retención concuerdan exactamente con los del antraceno y el fluoranteno. Estos dos HAP son compuestos frontera y el hecho de que

TABLA VI. ESTABILIDAD DE HAP EN AGUA GRADO REACTIVO Y AGUA POTABLE FORTIFICADAS*. RECUPERACIÓN DESPUÉS DE 24 h A TEMPERATURA AMBIENTE

Compuesto	Concentración** (ppt)	Agua reactivo R (%)	Agua potable R (%)
AF	322	95	62
ACE	379	106	n.d.***
ACI	365	102	n.d.
FLU	68.2	114	102
FEN	111	94	55
ANT	74.2	73	21
FLT	59.7	107	55
PIR	72.5	91	n.d.
B(a)A	133	115	31
CRI*	168	-	-
B(a)P	34.6	99	109
B(b)F	42.6	94	74
B(k)F	33.3	82	n.d.
DBA	420	96	68
B(ghi)P	34.6	66	26
I(cd)P	164	60	45

* Muestras con acetonitrilo al 5 % v/v (HAP ligeros: de NAF a PIR) ó al 25 % v/v (HAP pesados: de B(a)A a I(cd)P)

** Concentración a la que fueron fortificadas las muestras

*** n.d.= no detectado (degradación total). *CRI no fue determinado en este estudio

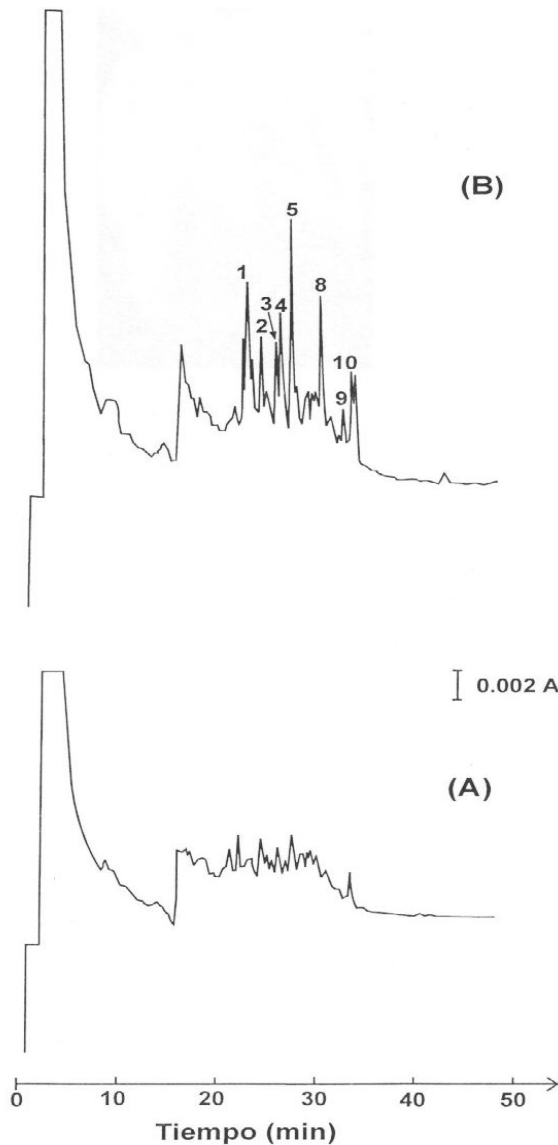


Fig. 3. Cromatogramas UV obtenidos del análisis de una muestra de agua de Río Seco, Tab., tratada por el procedimiento para HAP ligeros. (A) muestra blanco y (B) muestra fortificada con los HAP a las concentraciones mencionadas en la **tabla VI**. Identidad de picos en la muestra fortificada como en la **figura 2**

sus picos estén claramente presentes en la muestra blanco preparada para HAP ligeros y en la de HAP pesados comprueba su identidad. Además, ANT y FLT prácticamente no dan señal en UV a 262 nm, por lo tanto, el que no se observen picos en la zona donde eluyen estos compuestos (entre FEN y PIR) en los cromatogramas de UV (**Figs. 3 y 4**) es una confirmación adicional de su identidad. Por otra parte, las **figuras 5 y 6** también comprueban que ninguno de los otros HAP que dan respuesta en fluorescencia está presente en la muestra colectada del agua de río.

La determinación de ANT y FLT en la muestra de

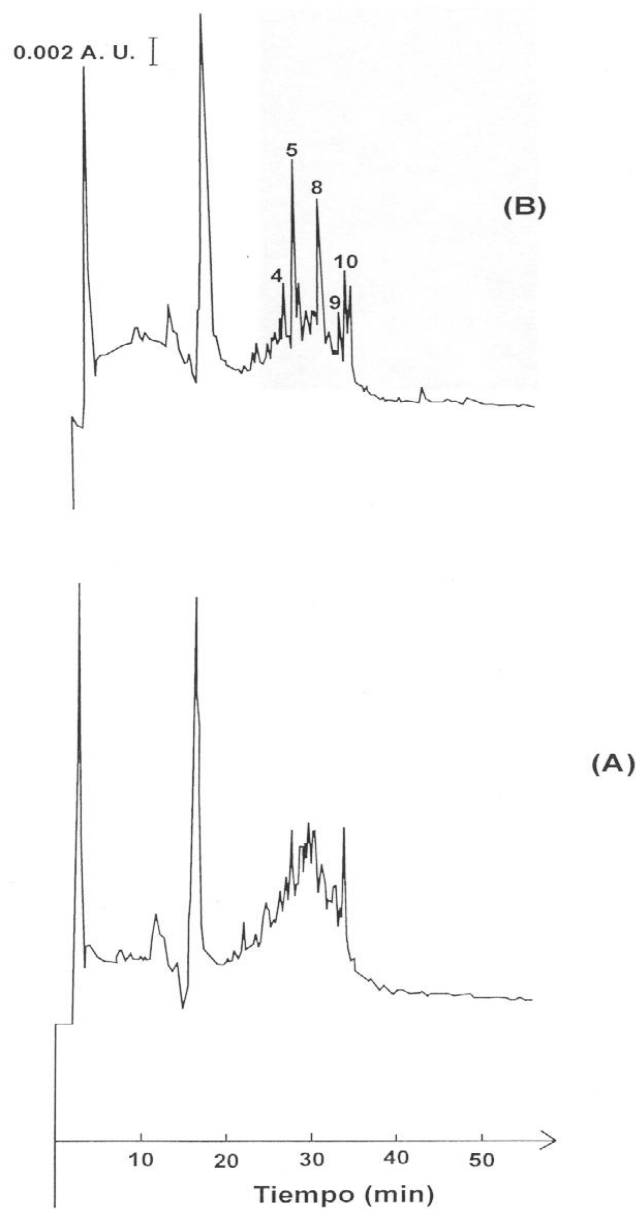


Fig. 4. Cromatogramas UV obtenidos del análisis de una muestra de agua de Río Seco, Tab., tratada por el procedimiento para HAP pesados. (A) muestra blanco y (B) muestra fortificada con los HAP a las concentraciones mencionadas en la **tabla VI**. Identidad de picos en la muestra fortificada como en la **figura 2**

agua de río se realizó por el método de adiciones patrón para evitar errores por efecto de matriz. Utilizando los reportes de áreas de pico de los cromatogramas de la **figura 5** se efectuó el cálculo por medio de la siguiente ecuación:

$$Cb_i = [Ab_i \times Qad_i \times (Vb + 25)] / [(Af_i - Ab_i) \times (Vf + 25) \times Vb] \quad (4)$$

donde, Cb_i es la concentración del soluto de interés (ANT o FLT) en la muestra blanco (agua de río), Ab_i es el área

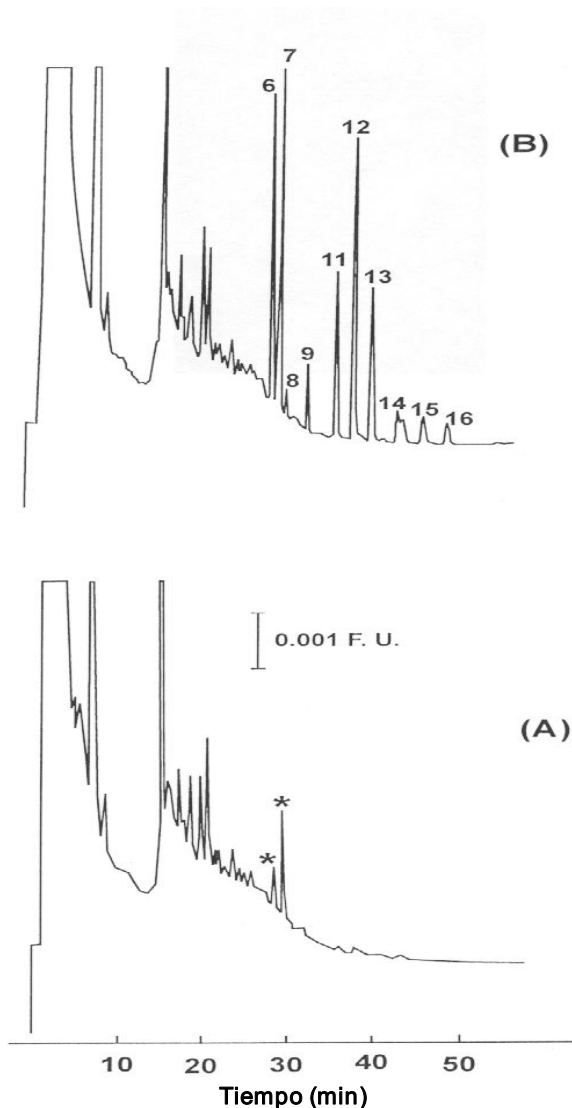


Fig. 5. Cromatogramas de fluorescencia obtenidos del análisis de una muestra de agua de Río Seco, Tab., tratada por el procedimiento para HAP ligeros. (A) muestra blanco y (B) muestra fortificada con los HAP a las concentraciones reportadas en la **tabla VI**. Los picos con (*) en el blanco fueron identificados como ANT y FLT. Identidad de picos en la muestra fortificada como en la **figura 2**

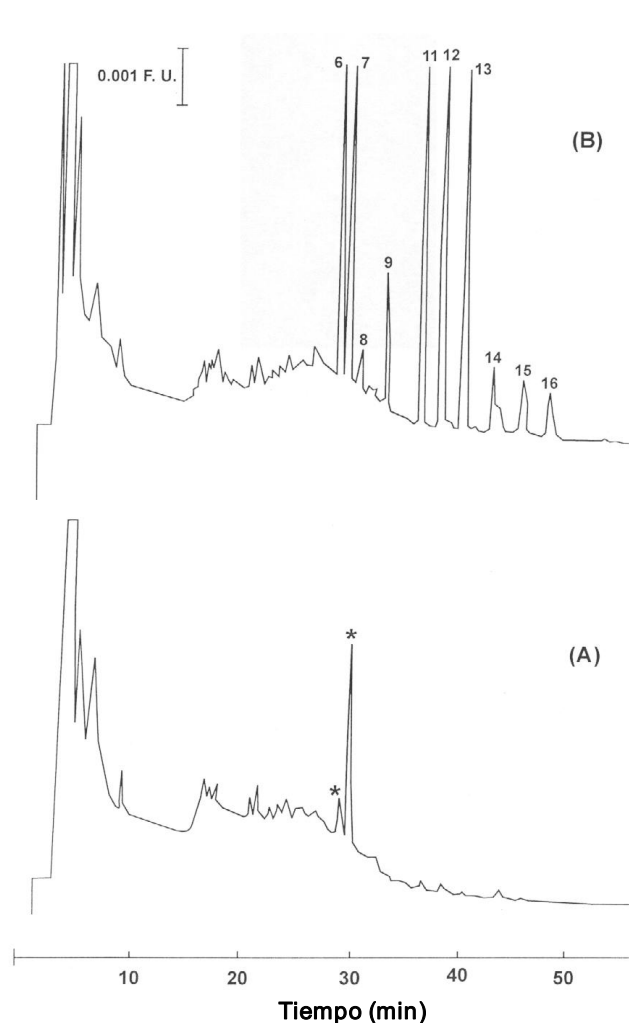


Fig. 6. Cromatogramas de fluorescencia obtenidos del análisis de una muestra de agua de Río Seco, Tab., tratada por el procedimiento para HAP pesados. (A) muestra blanco y (B) muestra fortificada con los HAP a las concentraciones reportadas en la **tabla VI**. Los picos con (*) en el blanco fueron identificados como ANT y FLT. Identidad de picos en la muestra fortificada como en la **figura 2**

del pico del soluto en la muestra blanco, A_{f_i} es el área del pico del soluto en la muestra fortificada, Q_{ad_i} es la cantidad de soluto que se adicionó en la muestra fortificada (concentración del soluto en el estándar x alícuota adicionada), V_b es el volumen de la muestra blanco (75 ml), V_f es el volumen de la muestra fortificada (75 ml) y el número 25 corresponde a los ml de agua+acetonitrilo que se añadieron a la muestra durante su preparación.

El contenido de los HAP presentes en la muestra de agua de Río Seco fue el siguiente (valor promedio de dos determinaciones en la misma muestra):

Antraceno 29 ppt

Fluoranteno 26 ppt

Estos valores son mucho más bajos que los que establecen las normas europeas (mencionadas en la Introducción) para aguas superficiales. Así, mediante este ejemplo, se demuestra que el método desarrollado permite determinar concentraciones de HAP notablemente inferiores a los límites máximos establecidos en las más estrictas normas reguladoras de calidad del agua. Por ello, se propone este método como una herramienta útil y confiable para el monitoreo ambiental.

CONCLUSIONES

Se desarrolló y certificó un método analítico para determinar con buena precisión y exactitud los 16 HAP de la lista de contaminantes prioritarios de la EPA a muy bajos niveles de concentración en muestras de agua. El método está basado en el acoplamiento en línea de la EFS con la cromatografía de líquidos, lo que permite simplificar la preparación de muestra reduciendo al mínimo su manipulación. Con respecto a los métodos oficiales basados en la extracción líquido-líquido, el método propuesto presenta varias ventajas: se requiere un menor volumen de muestra para el análisis, se reduce el consumo de disolventes orgánicos durante la etapa de preparación de muestra, es un proceso más limpio, seguro y económico y, además, es automatizable. Comparado con métodos similares (basados en la EFS en línea) previamente reportados, el presente método provee los procedimientos necesarios para evitar pérdidas de analitos desde las primeras etapas del proceso de preparación de muestra, con menos problemas operativos y un montaje experimental muy simple, por lo que resulta más sencillo y robusto y conduce a resultados más confiables. La efectividad del método se demostró mediante su aplicación al seguimiento y determinación de estos contaminantes en aguas superficiales y tratadas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero otorgado a este trabajo por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT) a través del proyecto 28355-U.

REFERENCIAS

- Barcelo D. (1993). Environmental Protection Agency and other methods for the determination of priority pesticides and their transformation products in water. *J. Chromatogr.* **643**, 117-143.
- Bouzige M., Pichon V. y Hennion M.C. (1999). Class-selective immunosorbent for trace level determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in complex sample matrices, used in off-line procedure or on-line coupled with liquid chromatography/fluorescence and diode array detections in series. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 1916-1925.
- Brouwer E.R., Hermans A.N.J., Lingeman H. y Brinkman U.A.Th. (1994). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface water by column liquid chromatography with fluorescence detection, using on-line micelle mediated sample preparation. *J. Chromatogr.* **669**, 45-57.
- Carrera G, Ferrández P., Vilanova R. y Grimalt J.O. (1998). Analysis of trace polycyclic aromatic hydrocarbons and organo chlorine compounds in atmospheric residues by solid-phase disk extraction. *J. Chromatogr. A.* **823**, 189-196.
- Cichna M., Knopp D. y Niessner R. (1997). Immunoaffinity chromatography of polycyclic aromatic hydrocarbons in columns prepared by the sol-gel method. *Anal. Chim. Acta* **339**, 241-250.
- Doong R., Chang S. y Sun Y. (2000). Solid-phase microextraction for determining the distribution of sixteen US Environmental Protection Agency polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *J. Chromatogr. A.* **879**, 177-188.
- Fladung N.C. (1995). Optimization of automated solid-phase extraction for quantitation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous media by high performance liquid chromatography-UV detection. *J. Chromatogr. A.* **692**, 21-26.
- Hodgeson J.W. (1990). *EPA Method 550.1*. En: *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons*. US Environmental Protection Agency, Cincinnati, pp. 143-165.
- Kiss G., Varga-Puchony Z. y Hlavay J. (1996). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in precipitation using solid-phase extraction and column liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* **725**, 261-272.
- Lai F. y White L. (1995). Automated precolumn concentration and high performance liquid chromatographic analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons in water using a single pump and a single valve. *J. Chromatogr. A.* **692**, 11-20.
- Liu Y., Lee M.L., Hageman K.J., Yang Y. y Hawthorne S.B. (1997). Solid-phase microextraction of PAHs from aqueous samples using fibers coated with HPLC chemically bonded silica stationary phases. *Anal. Chem.* **69**, 5001-5005.
- Messer D.C. y Taylor L.T. (1995). Method development for the quantitation of trace polyaromatic hydrocarbons from water via solid-phase extraction with supercritical fluid elution. *J. Chromatogr. Sci.* **33**, 290-296.
- Michor G., Carron J., Bruce S. y Cancilla D.A. (1996). Analysis of 23 polynuclear aromatic hydrocarbons from natural water at sub-ng/l level using solid-phase disk extraction and mass-selective detection. *J. Chromatogr. A.* **732**, 85-99.
- Negrao M.R. y Alpendurada M.F. (1998). Solvent-free method for the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in waste water by solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J. Chromatogr. A.* **823**, 211-218.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) (1984). Method 610-Polynuclear aromatic hydrocarbons. *Fed. Regist.* **49**, No. 209, 112-120.
- Vera-Ávila L.E. y Covarrubias R. (1994). On-line trace enrichment and HPLC determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **56**, 33-47.