

# protocolo

## de técnicas de muestreo y técnicas analíticas

de contaminantes  
emergentes y prioritarios



**RALACA**

Red Analítica de Latinoamérica y el Caribe



GOBIERNO  
DE ESPAÑA

MINISTERIO  
DE ECONOMÍA  
Y COMPETITIVIDAD

PROGRAMA  
**incenio**  
2010

Consolider

**tragua**

[www.consolider-tragua.com](http://www.consolider-tragua.com)



# protocolo

## de técnicas de muestreo y técnicas analíticas

de contaminantes  
emergentes y prioritarios

*Grupo C2*  
*Universidad de Jaén*

José Robles Molina  
Juan Francisco García Reyes  
Antonio Molina Díaz

*Grupo TC10*  
*Universidad de Almería*

Amadeo Rodríguez Fernández-Alba  
Ana Agüera López  
María José Gómez Ramos  
María Jesús Martínez Bueno  
María Dolores Hernando Guil  
Milagros Mezcuca Peral  
María del Mar Gómez Ramos  
Sonia Herrera López

índice

**protocolo**  
de técnicas de  
muestreo y técnicas  
analíticas  
de contaminantes  
emergentes y prioritarios

índice

1. **Introducción** [4]
  2. **Normativa** [7]
  3. **Toma y tratamiento de la muestra** [9]
  4. **Reactivos** [14]
  5. **Análisis** [16]
  6. **Procedimiento de análisis de contaminantes emergentes** [18]
  7. **Procedimiento de análisis de contaminantes prioritarios** [27]
  8. **Determinación** [38]
  9. **Pruebas de identificación** [40]
  10. **Validación y calidad de los resultados** [42]
- Anexo I. Aplicación del protocolo para la evaluación del contenido de contaminantes emergentes en una planta de tratamiento de aguas residuales en Almería** [44]
- Anexo II. Aplicación del protocolo para la evaluación del contenido de contaminantes prioritarios en una finca regada con agua residual tratada en Granada** [56]
- Anexo III. Referencias** [63]

**introducción**

**protocolo**  
de técnicas de  
muestreo y técnicas  
analíticas  
de contaminantes  
emergentes y prioritarios





El desarrollo y avance de nuestra sociedad, ha traído consigo nuevos problemas de contaminación ambiental. Durante décadas, la atención en la investigación sobre la contaminación del agua ha estado centrada en los agentes contaminantes clasificados como “peligrosos o prioritarios”, en particular, en los contaminantes orgánicos persistentes (COP) contemplados en el ámbito legislativo. Dentro de estas sustancias o grupos de sustancias prioritarias se encuentran metales pesados, pesticidas, retardantes de llama o hidrocarburos aromáticos policíclicos conocidos por ser tóxicos, bioacumulables y persistentes en el medio ambiente. Sin embargo, los hábitos de consumo actuales de nuestra sociedad, están generando una serie de residuos y contaminantes de los que, hasta hace tan solo unos años, no se disponía de información que evidenciara su presencia en el medio ambiente. Tales compuestos pueden representar un nuevo problema medioambiental, bien porque pueden presentar algunas de las características de los COP, o bien como consecuencia de su continua y masiva introducción en el ciclo del agua. Entre estas sustancias, conocidas como “contaminantes emergentes”, no incluidas en marcos regulatorios de control y prevención de contaminación ambiental, se encuentran compuestos biológicamente activos como fármacos, productos de higiene personal, productos de consumo doméstico o de origen agrícola e industrial, que han sido vertidos al medio ambiente sin reparar en las posibles consecuencias. Una característica importante de estos contaminantes es que no necesitan ser persistentes en el medio para causar efectos negativos, ya que sus velocidades de transformación y/o eliminación son compensadas por su continua introducción en el medio ambiente.

La incorporación de los contaminantes tanto prioritarios como emergentes al medio ambiente puede tener lugar mediante diferentes vías, tanto directas, a través de descargas a las aguas superficiales desde las EDAR o la industria, como indirectas (p.ej., filtraciones, empleo de abonos en agricultura, excrementos de animales, uso de piensos en acuicultura, etc.). De forma esquemática se representan en la Figura 1 las posibles rutas de entrada de los contaminantes en el medio ambiente, pudiéndose observar las fuentes de contaminación, la forma de introducción en el medio y cómo podrían aparecer en el agua de bebida.

Hasta la fecha, los procedimientos más utilizados para llevar a cabo la determinación de compuestos orgánicos en matrices ambientales acuosas, aplican métodos de pre-concentración de la muestra, tales como extracción en fase sólida (SPE) o extracción líquido-líquido (LLE), seguidos de la separación y determinación de los analitos mediante cromatografía de líquidos (LC) o cromatografía de gases (GC), en combinación con técnicas de espectrometría de masas (LC-MS o GC-MS). La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) está siendo, por lo general, la técnica más empleada en el análisis de compuestos orgánicos polares y semi-polares en muestras medioambientales. Sin embargo, para la determinación de analitos no polares, volátiles y térmicamente estables, la metodología analítica más utilizada ha sido la cromatografía de gases.

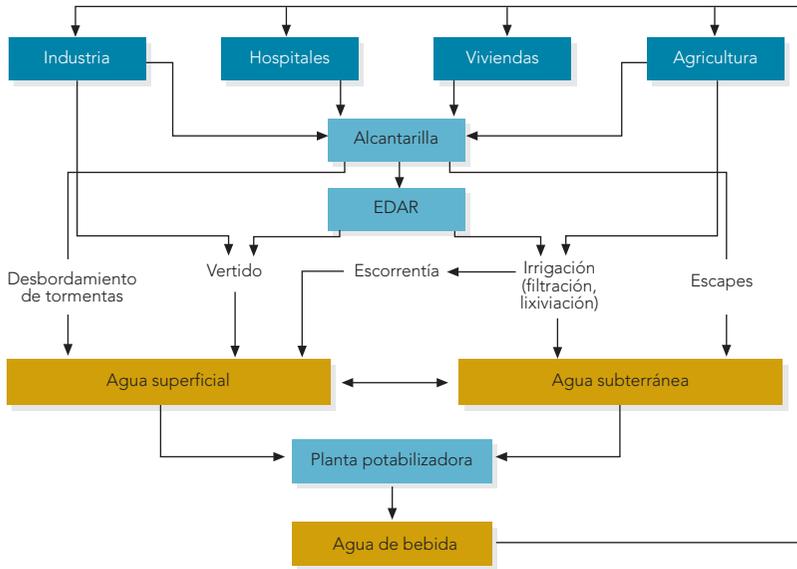


Figura 1. Posibles vías de incorporación de contaminantes al medio ambiente. Ciclo antropogénico del agua con reutilización indirecta de la misma (Ternes, 2006)

No obstante, no existe una técnica de preparación de muestras universal para todo tipo de muestras y ésta dependerá de la naturaleza de los analitos, de la matriz, y del método del análisis final seleccionado. Por lo tanto, la selección y optimización del procedimiento de preparación de muestras será un factor clave en el éxito final del análisis, y la elección de un procedimiento adecuado influirá mucho en la fiabilidad y la precisión del análisis y por tanto en los resultados.

**protocolo**  
de técnicas de  
muestreo y técnicas  
analíticas  
de contaminantes  
emergentes y prioritarios

**normativa**

2



## protocolo de técnicas de muestreo y técnicas analíticas de contaminantes emergentes y prioritarios

La Unión Europea ha llevado a cabo, desde los años 70 y hasta la actualidad, una expansión y reestructuración de su política en materia de agua. Inicialmente la legislación comunitaria referente al agua estuvo enfocada hacia objetivos y niveles de calidad mínimos para ciertos tipos de agua como las de baño, aguas para la cría de moluscos y las destinadas al consumo humano. Más tarde, en los años 90, se trataron de resolver los problemas de contaminación provenientes de aguas residuales urbanas, del sector agrícola y de las grandes instalaciones industriales, mediante la directiva de Aguas Residuales Urbanas (*Directiva 91/271/CEE*). Ésta establecía las medidas a llevar a cabo para la recolección y tratamiento de aguas residuales provenientes de asentamientos urbanos y aglomeraciones (de más de 10.000 habitantes), con la excepción de los de menor tamaño, con el fin de conseguir la mejora de la calidad de las aguas receptoras de aguas residuales tratadas.

Pero es en el año 2000, con la Directiva Marco del Agua (*Directiva 2000/60/EC*), cuando realmente se abre una brecha en la política de aguas europea, no solamente en lo que se refiere a su alcance en cuanto a la protección de la calidad de las aguas, sino en su aplicación e implementación. Establece un nuevo régimen para la prevención y el control de la contaminación química de aguas superficiales y subterráneas, alcanzando a estuarios y aguas costeras. Su objetivo primordial es prevenir el deterioro del agua en términos de calidad ecológica y química, así como promover el uso y consumo sostenible, basándose en una protección del recurso a largo plazo. Se inicia así, dentro de este proceso, la obligación de la Comisión a presentar propuestas específicas, para la identificación de sustancias de preocupación para su clasificación como prioritarias o peligrosas y por tanto, de su control ambiental.

# protocolo

de técnicas de  
muestreo y técnicas  
analíticas

de contaminantes  
emergentes y prioritarios

# 3

toma y tratamiento  
de la muestra



El análisis de este tipo de micro-contaminantes en el medio ambiente requiere de varias etapas. El siguiente esquema (Figura 2) muestra las etapas fundamentales del proceso analítico para el análisis de compuestos orgánicos en muestras acuosas. Minimizar el número de pasos de preparación de la muestra es muy importante y eficaz, no sólo para la reducción de las fuentes de error, sino también para ahorrar tiempo de operación y costes.

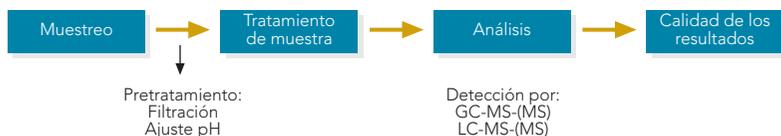


Figura 2. Etapas fundamentales del proceso analítico

### 3.1. Toma y almacenamiento de muestra

El muestreo se podría definir como el proceso de selección de una pequeña porción de material, representativo del medio, la cual será transportada y manipulada posteriormente en el laboratorio. Es tan importante que, en algunos casos, representa la principal contribución al error de todo el proceso analítico, siendo esta etapa una de la más cruciales para obtener datos representativos que permitan la correcta evaluación de la contaminación. Por ello, es conveniente una vez establecido el propósito del análisis, y antes de realizar el muestreo de campo, desarrollar un plan de muestreo.

La muestra deberá ser homogénea, representativa y no modificar las propiedades fisico-químicas o biológicas del agua. Se deben tomar preferentemente muestras integradas, de forma que cada muestra integrada está compuesta por la suma de varias muestras recogidas en distintos puntos en el mismo tiempo, o más o menos seguido, adecuada para grandes extensiones de agua. Sin embargo, las principales dificultades con las que nos enfrentamos a la hora de llevar a cabo la toma de muestras acuosas medioambientales son la falta de representatividad (espacio-temporal) de la matriz y la integridad de la propia muestra hasta su análisis. Además, la baja concentración a la que se encuentran a menudo presentes este tipo de contaminantes, obliga a utilizar elevados factores de pre-concentración y cantidades elevadas de muestra. El volumen de muestra depende fundamentalmente de las sustancias objeto de estudio y de la concentración esperada, siendo los volúmenes más habituales los comprendidos entre 1 y 2 litros, aunque los volúmenes pueden variar dependiendo de la matriz. Para obtener unos resultados representativos se tiene que asegurar la estabilidad de los analitos durante el muestreo y almacenamiento de la muestra. El correcto almacenamiento de las muestras es crucial para asegurarse de que los analitos no se han



transformado antes de realizar el análisis. Debe asegurarse, en la medida de lo posible, que tanto el recipiente como el cierre del envase, no sean capaces de alterar la composición de las muestras, bien por disolución, adsorción o reacción. Las botellas de vidrio ámbar, son las más recomendadas y frecuentemente utilizadas para el muestreo de micro-contaminantes orgánicos en aguas ambientales. Estos envases evitan la posible degradación por radiación UV y deben ser lavadas previamente con agua destilada y la misma agua del muestreo. Sin embargo, para el muestreo de metales en aguas el material de elección para el recipiente es el plástico, ya que evita que éstos se queden adheridos a las paredes del mismo, así como el intercambio de metales que se produciría en una botella de vidrio.

El procedimiento habitual para el almacenamiento de las muestras es conservarlas en la oscuridad y en frío (a unos 4°C) hasta su análisis, aunque también pueden ser congeladas en botellas medio llenas en posición horizontal. La adición de algún tipo de conservantes (que no interfieran en la posterior etapa de análisis), como la azida sódica o el ajuste del pH a 3 con HCl o  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , es otra estrategia habitualmente utilizada para preservar la integridad de las muestras. De esa manera se inhiben eficientemente los procesos microbianos y además en el caso de los metales, se evita su precipitación.

### 3.2. Pre-tratamiento de muestra

El objetivo principal del pre-tratamiento de la muestra es la conservación de ésta, para asegurar sus propiedades químico-físicas, y evitar posibles procesos de degradación de los analitos. A menudo, previo a la etapa de extracción y pre-concentración, es requerido un paso de filtración de las muestras y otro de ajuste del pH, con el objetivo de preservar la muestra. La filtración con filtros de fibra de vidrio con diámetro de poro inferior a  $1\ \mu\text{m}$  o con filtros de teflón (PTFE) de  $0.45\ \mu\text{m}$ , facilita la posterior preparación de la muestra y reduce la actividad microbiana. Por otro lado, el ajuste del pH de las muestras se llevará a cabo de acuerdo con sus propiedades analíticas.

### 3.3. Extracción

La etapa de extracción puede considerarse como otro punto crítico del análisis. En la mayoría de los casos, la falta de automatización hace que sea esta etapa la que consume mayor tiempo, pudiendo superar el 60% del tiempo total del análisis. Además, en muchos casos la extracción lleva asociado un elevado consumo de disolventes orgánicos indeseables debido a su toxicidad. El método de extracción seleccionado dependerá de la naturaleza de los compuestos a analizar, así como de sus propiedades físico-químicas y de los sistemas analíticos disponibles.



- **Extracción Líquido-líquido (LLE):** La LLE se suele aplicar a la separación de analitos no polares o semipolares en muestras acuosas. Los disolventes más empleados son el n-hexano y el ciclohexano. Se lleva a cabo utilizando un embudo de separación, en el cual se introduce la muestra solvatada y luego se agrega el disolvente inmiscible. El embudo es invertido varias veces para permitir la mezcla de los contenidos. El "grifo" se debe abrir y cerrar brevemente para permitir la ventilación de la presión de vapor formada en el embudo durante la agitación (un exceso de presión puede conducir a derrames). Si se forma una emulsión insoluble, ésta se puede acelerar mediante la adición de unos pocos mililitros de metanol o la adición de algún tipo de sal, como cloruro sódico. La selección del disolvente y el ajuste de la fase acuosa son también fundamentales, ya que el pH, el efecto de la adición de sal y la presencia de reactivos de pares iónicos, tienen mucha importancia en el equilibrio de distribución.
- **Extracción Sólido-líquido (SPE):** La SPE permite la extracción de analitos polares o semipolares. Sus principales objetivos son la limpieza de la muestra, "clean-up", la concentración del analito en ésta, y la posibilidad de cambio de disolvente (por ejemplo de acuoso a orgánico). Inicialmente, los analitos quedan retenidos en la fase sólida. A continuación son extraídos de ésta, con un tampón acuoso o solvente orgánico. A esta etapa se le conoce con el nombre de elución. La SPE es más selectiva, reproducible, con un gasto bajo de disolventes orgánicos en comparación con la LLE y fácilmente automatizable. Muchos factores influyen en la eficiencia del proceso de SPE, pero los dos más importantes son la capacidad del adsorbente y la retención de los analitos en él. Existe un gran número de adsorbentes comerciales, aunque los más usados para extraer contaminantes emergentes de matrices acuosas son los genéricos, concretamente los de sílica enlazada (C-18 o C8) y los poliméricos (Isolute 101<sup>®</sup>, LiChrolut<sup>®</sup> EN, Isolute ENV+<sup>®</sup>, Oasis HLB<sup>®</sup>, StrataX<sup>®</sup>).
- **Microextracción en fase sólida (SPME).** La SPME utiliza una fibra de sílice fundida recubierta de un material adsorbente, normalmente es un recubrimiento polimérico, que se utiliza para la extracción de compuestos orgánicos y/o inorgánicos volátiles derivados del mercurio, arsénico, etc. La fibra se encuentra en el interior de un tubo hueco, de tal forma que ésta puede retraerse y sacarse de su interior, quedando así expuesta a la muestra. Su uso implica dos etapas bien diferenciadas, como se muestra en la figura 7: primero la **etapa de extracción** (retención de los analitos en la fase estacionaria mediante procesos de absorción o adsorción), que puede llevarse a cabo sumergiendo directamente la fibra en el interior de una disolución (*direct immersion*, DI-SPME), o bien, manteniéndola en el espacio en cabeza que está en equilibrio con la disolución (*headspace*-SPME, HS-SPME); y, segundo, la **etapa de desorción**, que se puede hacer térmicamente (en el inyector de un cromatógrafo de gases), o bien utilizando disolventes orgánicos (de forma manual o acoplado con un cromatógrafo de líquidos). Existen varios tipos de fibras disponibles comercialmente, que difieren en el tipo de adsorbente y en su espesor. La elección de la fibra



depende de la naturaleza fisicoquímica de los compuestos a extraer. La mayoría de las fibras puede utilizarse en combinación con cromatografía de gases (desorción térmica) y, en menor número, con cromatografía líquida (desorción con disolventes).

- **Extracción de metales:** Aunque en muchos casos el análisis de metales en muestras de aguas se puede hacer directamente, hay veces que es necesaria una etapa previa de pre-concentración. En este último caso los métodos de extracción más empleados son la extracción líquido-líquido (LLE) y la extracción sobre fases sólidas. La primera normalmente se realiza complejando el metal con un determinado reactivo presente en la fase hidrofóbica, en la segunda la muestra se hace pasar a través de una columna donde se encuentra la fase sólida, que suele ser un agente quelante o una resina de intercambio iónico, donde queda retenido el analito.

### 3.4. Clean-up

El objetivo principal de la etapa de "clean-up", es facilitar el análisis del extracto final obtenido, a través de la eliminación de compuestos interferentes de la matriz o de sólidos en suspensión, antes del análisis de la muestra.

**reactivos**

**protocolo**  
de técnicas de  
muestreo y técnicas  
analíticas  
de contaminantes  
emergentes y prioritarios

**4**



Se deben utilizar reactivos de pureza mínima del 95%, y tomarse además precauciones para evitar la posible contaminación del agua, disolventes, absorbentes, patrones, etc... utilizados. El agua utilizada para el análisis mediante LC-MS e ICP-MS fue generada a partir de un sistema de agua Ultrapura de Millipore Direct-Q™, con una resistencia específica de 18,2 M $\Omega$ -cm.

#### 4.1. Almacenado de soluciones patrón

Las soluciones estándar se deben almacenar en botellas de vidrio en el congelador tomando todas las precauciones convenientes para evitar la contaminación. Los patrones de concentración entre 1-2 mg/ml, si se mantiene a -20 °C, son generalmente estables durante al menos 1 año. Antes de abrir los recipientes, permitir que las disoluciones alcancen el equilibrio con la temperatura ambiente. Debemos también asegurarnos de que las soluciones diluidas se preparan frecuentemente, y de que éstas, no están directamente expuestas a la luz solar o a la luz ultravioleta por períodos prolongados de tiempo.

**análisis**

**protocolo**  
de técnicas de  
muestreo y técnicas  
analíticas  
de contaminantes  
emergentes y prioritarios

5



El análisis de micro-contaminantes orgánicos y metabolitos en muestras acuosas ambientales requiere de su identificación y cuantificación en matrices complejas y, a niveles muy bajos, de ultra traza. Por lo tanto, las técnicas analíticas tienen que ser específicas para la detección de estos analitos y ser lo suficientemente sensibles para permitir alcanzar bajos niveles de cuantificación. El análisis de contaminantes puede ser una tarea difícil ya que muchos son muy polares, tienen bajos pesos moleculares o son sensibles a la temperatura. Por consiguiente, para la correcta cuantificación de este tipo de sustancias en matrices acuosas medio-ambientales, se necesitan técnicas analíticas avanzadas, como la cromatografía gaseosa o líquida y la espectrometría de masas.

Las investigaciones más recientes van dirigidas hacia la necesidad de analizar más y más analitos en un mismo método (métodos multi-analito), entre los que cada vez se están incorporando de forma mayoritaria los micro-contaminantes polares e ionizables. Las metodologías analíticas multi-analito, se están convirtiendo en una de las herramientas más utilizadas y requeridas para conocer de forma fiable y más amplia, la presencia y destino de estos contaminantes en el medio ambiente y en aguas residuales.

Hasta mediados de los 80, la mayoría de los métodos descritos en literatura para el análisis de fármacos, productos de cuidado personal y pesticidas, no polares, volátiles y semivolátiles, estaban basados en técnicas de cromatografía gaseosa (GC) (Ternes, 2001). Sin embargo, el análisis de compuestos muy polares a menudo requería de procesos de derivación, con el propósito de convertir estos compuestos en sustancias análogas menos polares y aumentar la estabilidad térmica y la volatilidad de los analitos. Desde mediados de los años 90, la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) ha empezado a ser un método rutinario y robusto, a raíz del desarrollo de las nuevas técnicas de ionización con "electrospray" (ES) y la ionización química a presión atmosférica (APCI). La elección entre GC y LC, por tanto, está generalmente basada en las propiedades físico-químicas de los analitos de interés.

Respecto a las técnicas para realizar el análisis de los metales, entre las más utilizadas se encuentran la espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotrémica (GFAAS), la espectroscopía de emisión atómica con plasma acoplado por inducción (ICP-AES) y la espectrometría de masas con plasma acoplado por inducción (ICP-MS). La utilización de equipos de ICP-MS permite realizar un análisis multielemental con bajos límites de detección, por lo que en la actualidad su uso está muy extendido para realizar el análisis de metales en muestras acuosas.

# procedimiento de análisis de contaminantes emergentes

**protocolo**  
de técnicas de  
muestreo y técnicas  
analíticas  
de contaminantes  
emergentes y prioritarios





Con el fin de lograr la identificación y cuantificación simultánea de un gran número de compuestos orgánicos, LC-MS/MS y GC-MS fueron las técnicas analíticas seleccionadas para llevar a cabo la evaluación de la contaminación ambiental en diferentes EDAR de España, como parte del programa de investigación (TRAGUA), financiado por el Gobierno español.

El trabajo se centró en el análisis de un grupo de 92 nuevos contaminantes orgánicos, también llamados "contaminantes emergentes", representativos de diferentes familias de sustancias químicas, como productos farmacéuticos, productos de higiene personal y/o pesticidas, así como la determinación de algunos de sus principales metabolitos. El interés de llevar a cabo el análisis de tales sustancias radica en que se trata de sustancias altamente consumidas por la sociedad moderna y que, por lo tanto, pueden ser continuamente introducidas en el medio acuático a través de plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR). Para llevar a cabo el análisis de las muestras de aguas residuales, se aplicaron dos procedimientos distintos: una extracción en fase sólida (SPE) combinada con LC-MS y una extracción líquido-líquido (LLE) combinada con GC-MS.

## 6.1. SPE-LC-MS/MS

El tratamiento de la muestra por SPE se basa en el uso de cartuchos comerciales Oasis<sup>TM</sup> HLB (200 mg, 6 cc) y un sistema automatizado de procesamiento de muestras ASPEC XL. En este caso, antes de la extracción, las muestras eran previamente enriquecidas con 0,1 mg de cada uno de los estándares marcados (<sup>13</sup>C-phenacetin y <sup>13</sup>C-cafeine), y el pH era ajustado a 8 con un 20% NH<sub>4</sub>OH. Inicialmente, los cartuchos eran acondicionados con 6 ml de metanol, seguido de 5 ml de agua MilliQ a pH 8, a un caudal de 1 mL / min. Después de la etapa de acondicionamiento, alícuotas de 200 ml de muestra de efluentes de aguas residuales o 100 ml de influentes, eran pasados a través de los cartuchos, con un caudal de 10 mL / min, para luego lavar con 5 ml de agua desionizada antes de la elución. Los cartuchos eran secados al vacío durante 5 minutos y eluidos con 2 x 4 ml de metanol, a 1 ml / min. Finalmente, los extractos eran analizados por cromatografía de líquidos. Antes del análisis, una dilución 1:1 con ACN/H<sub>2</sub>O (10:90) era aplicada.

Un triple cuadrupolo/trampa lineal de iones 3200 QTRAP MS/MS, equipado con una fuente turbo de iones (AB Sciex Instruments, Foster City, CA), fue el equipo utilizado para el análisis de los analitos polares o semi-polares. Todos los parámetros y condiciones de operación utilizados para el análisis han sido descritos en detalle (Martínez Bueno *et al.*, 2010 y 2007). La optimización de los parámetros del MS (declustering potential (DP), entrance potential (EP), para el ion precursor y collision energy (CE), collision cell exit potential (CXP) para los iones obtenidos) se realizó mediante análisis por inyección en flujo para cada compuesto. La siguiente tabla muestra los valores de los parámetros optimizados y las transiciones SRM seleccionadas.



Tabla 1. Valores de los parámetros optimizados con el método desarrollado por LC-QLIT-MS/MS.

COMPUESTOS	tr (min)	Precursor Ion (m/z)	DP	SRM1	CE1	SRM2	CE2	SRM3	CE3
POSITIVO									
Nicotine	5,1	163,1	40	117,2	34	130,1	27	84,1	27
Cotinine	5,8	177,0	45	80,0	36	98,0	26	-	-
Salbutamol	6,8	240,3	44	148,2	26	222,2	14	166,2	16
Atenolol	6,8	267,4	330	145,2	35	190,2	20	116,1	25
Famotidine	6,8	338,0	25	189,3	24	259,4	15	70,7	40
Terbutaline	6,9	226,3	47	152,2	20	107,1	40	125,2	32
Amoxicilin	7,0	366,2	32	114,2	27	208,0	15	349,1	10
Ranitidine	7,5	315,3	38	176,2	21	130,1	30	224,2	20
Sotalol	7,9	273,3	45	133,2	37	213,2	22	255,2	14
4-MAA	9,1	218,2	35	56,1	30	97,2	16	159,2	17
4-DAA	10,0	232,2	48	113,2	17	111,2	21	98,2	25
4-AA	10,3	204,2	45	56,2	30	159,2	16	94,2	28
1,7-dimethylxanthine	10,4	181,2	50	124,2	25	69,2	43	96,1	32
Acetaminophen	10,9	152,2	40	110,1	20	64,8	45	93,0	35
Metronidazole	12,0	172,1	35	128,1	20	82,1	30	111,1	30
Codeine	12,1	300,3	35	165,2	50	199,2	35	153,2	55
Lincomycin	14,3	407,1	50	126,3	45	359,3	23	-	-
Sulfadiazine	16,6	251,2	40	92,1	35	156,3	17	108,1	30
Nadolol	16,8	310,2	45	254,4	20	236,1	25	201,2	30
Caffeine	17,0	195,1	40	138,2	25	110,2	30	123,1	40
4-AAA	17,2	246,2	46	83,1	40	228,1	18	104,2	28
4-FAA	17,4	232,2	45	214,2	18	104,1	28	83,1	28
Sulfathiazole	17,6	256,2	45	156,0	18	92,2	34	108,4	33
Trimethoprim	17,7	291,3	45	230,2	28	123,2	30	261,2	30
Sulfapyridine	18,1	250,1	47	156,1	21	108,3	34	184,3	20
Norfloracin	18,2	320,0	50	276,4	23	233,3	30	302,3	18
Ofloxacin	18,3	362,3	47	261,3	33	318,3	25	-	-
Ciprofloxacina	18,6	332,3	50	231,2	48	314,3	25	245,1	32
Cefotaxime	19,0	456,1	40	324,1	15	396,1	10	241,3	20
Mepivacaína	19,2	247,4	28	98,1	23	70,1	53	-	-
Tetracycline	19,4	445,3	40	154,2	37	410,2	28	337,1	40
Metoprolol	20,6	268,2	30	116,2	25	159,2	28	133,2	30
Primidone	20,8	219,2	35	91,1	35	162,3	16	119,2	20
Sulfamethazine	20,9	279,0	42	186,2	20	124,1	30	156,1	26



COMPUESTOS	tr (min)	Precursor Ion (m/z)	DP	SRM1	CE1	SRM2	CE2	SRM3	CE3
POSITIVO									
Azithromycin	21,0	749,6	65	83,1	84	158,2	51	591,4	42
Antipyrine	21,2	189,2	48	77,1	51	104,1	32	106,2	40
Omeprazole	22,2	346,3	35	198,2	15	151,2	25	136,2	35
Venlafaxine	23,0	278,4	50	58,1	45	260,4	15	121,3	38
Propranolol	24,4	260,0	35	116,2	23	183,2	23	155,2	30
Ifosfamide	24,5	261,1	60	91,9	33	154,3	29	182,2	21
Sulfamethoxazole	24,8	254,2	47	108,2	30	156,1	21	147,2	22
Cyclophosphamide									
monohydrate	24,9	261,1	55	140,1	29	120,1	31	233,2	16
Erythromycin	25,1	734,6	58	158,3	40	576,5	28	316,1	25
Carbamazepine									
10,11-epoxide	25,2	253,2	75	180,2	40	236,2	11	210,2	20
Lanzoprazole	25,7	370,0	45	252,2	15	119,2	27	205,4	25
Citalopram									
hydrobromide	25,9	325,3	42	109,1	30	262,1	25	234,1	35
Paroxetine	26,9	330,0	70	192,2	25	151,2	30	123,2	30
Clarithromycin	28,1	784,4	45	158,4	35	590,4	18	558,4	25
Amitriptyline									
hydrochloride	28,5	278,4	30	233,1	22	91,2	35	117,0	30
Carbamazepine	28,6	327,2	50	194,3	25	192,1	28	-	-
Fluoxetine	28,8	310,3	30	44,2	25	148,2	10	-	-
Simazine	28,9	202,2	45	124,2	23	132,0	26	104,1	34
Ketorolac	30,0	256,3	70	105,1	25	178,1	34	-	-
Clomipramine									
hydrochloride	30,1	315,2	40	58,1	60	86,1	27	242,1	27
Clotrimazole	30,4	344,9	30	277,3	15	165,0	43	241,2	40
Propyphenazone	30,9	231,3	55	189,2	22	201,2	30	-	-
Methylprednisolone	31,1	475,3	40	457,2	9	321,1	17	339,3	16
Loratadine	31,4	383,1	50	337,3	29	267,2	40	259,4	40
Isoproturon	32,3	207,3	45	72,1	35	134,2	29	165,1	19
Atrazine	32,5	216,1	45	174,1	24	104,1	40	132,1	31
Ketoprofen	33,0	255,2	47	209,2	16	105,1	33	177,2	22
Naproxen	33,3	231,2	35	185,3	20	170,1	32	-	-
Diazepam	35,4	285,2	50	154,2	35	193,2	40	222,3	35
Biphenylol	35,6	171,2	40	153,2	23	152,0	37	127,2	45
Indomethacine	37,4	358,2	50	139,1	25	174,3	15	-	-
Fenofibric acid	37,6	319,1	65	233,1	22	139,1	42	121,0	40



## protocolo de técnicas de muestreo y técnicas analíticas de contaminantes emergentes y prioritarios

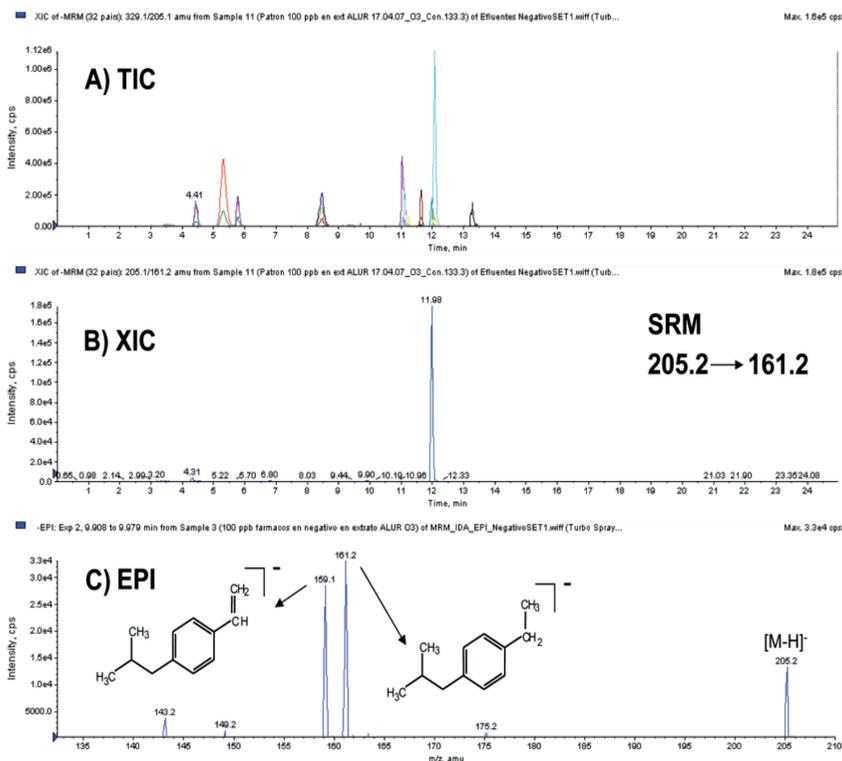
COMPUESTOS	tr (min)	Precursor Ion (m/z)	DP	SRM1	CE1	SRM2	CE2	SRM3	CE3
POSITIVO									
Tamoxifen	38,1	372,2	50	72,1	42	129,0	35	91,1	35
Mefenamic acid	40,4	242,2	36	180,2	53	224,2	34	209,2	20
Chlorfenvinphos	40,5	359,1	55	155,2	15	127,1	21	205,1	24
Mevastatin	41,2	391,3	55	229,3	20	185,2	25	159,3	30
Chlorpyriphos methyl	43,4	322,1	43	125,1	21	290,1	19	109,1	30
Simvastatin	45,1	419,1	45	199,1	15	285,3	15	243,1	15
Fenofibrate	46,5	361,2	60	139,1	35	233,1	25	121,1	40
NEGATIVO									
Salicylic acid	3,1	137,1	28	93,0	25	65,0	45	-	-
Furosemide	11,1	329,1	35	205,1	30	285,1	20	126,2	45
Clofibrac acid	11,3	213,0	30	127,1	25	85,0	17	-	-
Paravastatin	11,6	423,1	43	100,8	47	321,1	22	143,0	32
Benzafibrate	11,8	360,1	30	274,2	30	154,1	40	85,0	35
Hydrochlorothiazide	12,0	296,0	56	205,0	29	269,1	25	126,0	41
Bisphenol A	14,0	227,1	60	133,0	35	211,2	40	92,8	40
Diclofenac	14,1	294,0	25	250,0	15	214,1	28	-	-
Fenoprofen	14,5	241,1	17	197,1	13	93,1	48	-	-
Diuron	14,7	231,1	50	186,1	23	149,8	33	122,1	46
Ibuprofen	15,6	205,1	30	161,2	10	-	-	-	-
Chlorophene	16,0	217,0	61	181,2	27	153,0	30	101,0	43
Gefibrozil	16,5	249,2	35	121,0	25	127,1	15	-	-

DP: declustering potential (V); CE: collision energy (eV); EP: entrance potencial, 5V; CXP: collision cell exit potencial, 2,5 V; SRM 1: quantitation; SRM 2-3: confirmation

Cada análisis se llevó a cabo en los modos de trabajo positivo y negativo. Los análisis fueron realizados en modo "selection reaction monitoring" (SRM). Así mismo, fue necesario desarrollar un experimento adicional para llevar a cabo la correcta identificación del compuesto ibuprofeno, para el cual era necesario obtener una mayor información estructural con el fin de lograr su adecuada confirmación. Para este caso, se tuvo que trabajar en el modo de operación "enhanced product ion (EPI)" que permite la obtención de iones producto (ver figura 3).



Figure 3. (A) Total ion chromatogram (TIC) en SRM, (B) extracted ion chromatogram (XIC) para el ibuprofen, y (C) espectro en modo EPI del ibuprofen, obtenido utilizando un sistema LC-QLIT-MS/MS.



Por otra parte, un sistema de tiempo de vuelo acoplado a un detector de espectrometría de masas LC-ESI-TOF MS (MSD-TOF, Agilent Technologies, Santa Clara, CA), en ambos modos de ionización (positiva y negativa), fue también utilizado para confirmar los compuestos polares o semi-polares detectados y llevar a cabo la identificación de otros nuevos contaminantes, inicialmente no incluidos en el método, mediante análisis retrospectivos. Todos los parámetros y condiciones de operación utilizados para el análisis han sido descritos en detalle (Martínez Bueno et al., 2007). Un segundo spray ortogonal con una solución de referencia era utilizado para llevar a cabo una calibración continua de las masas de referencia:  $m/z$  121.0509 y 922.0098 (análisis en modo positivo), o  $m/z$  119.036 y 966.000 (en modo negativo). Los espectros de masas se adquirieron en el rango de  $m/z$  de 50-1000, a una velocidad de barrido de



1 s/espectro. Los datos de los espectros de masas registrados eran procesados mediante el software de Applied Biosystems/MDS-Sciex analista QS software (Frankfurt, Alemania) y la aplicación del software para masa exacta de Agilent MSDTOF. Todas las posibles composiciones elementales de los iones fragmento eran calculados con una desviación máxima de 5 ppm a partir de la masa exacta medida.

La separación de los analitos, en ambos sistemas cromatográficos, se realizó con un HPLC (serie 1100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipado con una columna C-18 analíticas, 250 mm x 3,0 mm de diámetro y 5 micras (ZORBAX SB, Agilent Technologies). Para el análisis en modo positivo, los compuestos fueron analizados empleando acetonitrilo (AcN) y agua MilliQ al 0,1% de ácido fórmico (pH 3,5), y AcN y agua MilliQ fueron las fases móviles utilizadas para el análisis en modo negativo. Para el análisis en modo positivo, el método de cromatografía comenzaba con un 10% de AcN, y se mantenía constante durante 2 min. Después, un gradiente lineal aumentaba la proporción de AcN hasta el 100% en 40 min, tras lo cual la composición se mantenía durante 10 min, todo ello a un flujo de 0,2 mL/min. Por otro lado, los compuestos analizados en forma negativa eran separados utilizando AcN y agua MilliQ (pH 6,5) con un flujo de 0,3 mL/min. El gradiente comenzaba con un 30% de AcN hasta llegar al 100%, en 7 minutos, tras lo cual la composición se mantenía durante 8 minutos. El volumen de inyección fue de 20 µl en ambos modos.

## 6.2. LLE-GC-MS

Los compuestos no polares eran extraídos de las muestras de aguas residuales por LLE. En este caso, 500 ml de muestras (no filtradas) eran ajustadas a pH 3 con HCl 2N y extraídas en dos etapas, utilizando n-hexano (100/50 ml). En la primera etapa, las fases inmiscibles eran agitadas durante 3 minutos, seguida de una segunda etapa de agitación de 2 minutos. Para facilitar la extracción, eran añadidos 5 g de cloruro de sodio. La fase orgánica era recogida y pasada a través de sulfato de sodio anhidro para eliminar los restos de agua, para después ser evaporadas usando un Büchi Syncore Polyvap System (Flawil, Suiza) hasta un volumen final de 3 ml, antes de su análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Un cromatógrafo de gases Agilent 7890 series combinado con un detector de masas Agilent 5975 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) fue el equipo utilizado para la determinación de compuestos lipofílicos o no-polares en aguas residuales. Las muestras eran analizadas en el modo de trabajo SIM "selection ion monitoring". Todas las condiciones operativas utilizadas para el análisis pueden verse en la siguiente publicación (Gómez *et al.*, 2009). Los analitos fueron separados en una columna capilar Agilent HP-5MSi (5% biphenyl/95% dimetilsiloxano), 15 m x 0,25 mm, 0,25 mm espesor de la película. Un limitador desactivado de sílice fundida (0,171 m x 0,120 mm de diámetro x 0,1 m espesor de la película) se colocó en la línea de transferencia, que esta-



ba conectado a la columna capilar a través de un dispositivo QuickSwap. Este dispositivo es una conexión de purgado en forma de T, que se coloca entre el extremo de la columna de GC y la entrada de la línea de transferencia de MSD. Las condiciones de operación de entrada fueron: volumen de inyección 10  $\mu\text{l}$ . El programa de temperatura se fijó en 79 ° C durante 0,25 min, programada desde 300 ° C a 710 ° C min<sup>-1</sup>, y se mantuvo a esta temperatura durante 2 min. El flujo del gas portador helio se mantuvo a una presión constante de 17,296 psi, mientras que la temperatura del horno era programada de 70 °C a 280 °C. El programa de temperatura del horno fue de 70 ° C durante 1 min, programada desde 150 ° C a 50 ° C min<sup>-1</sup>, y luego a 200 ° C a 6 ° C min<sup>-1</sup> y, finalmente, desde 280 ° C a 16 ° C min<sup>-1</sup>, durante 5 min. Los espectros de masas por impacto electrónico (EI) se obtuvieron a 70 eV, monitorizando un rango de masas desde 50 a 400 m/z. La fuente de iones y el analizador de cuadrupolo se mantuvieron a temperaturas fijas de 230 y 150 ° C, respectivamente. La siguiente tabla (Tabla 2) muestra los iones usados para la identificación y cuantificación de los compuestos de interés en modo de funcionamiento SIM.

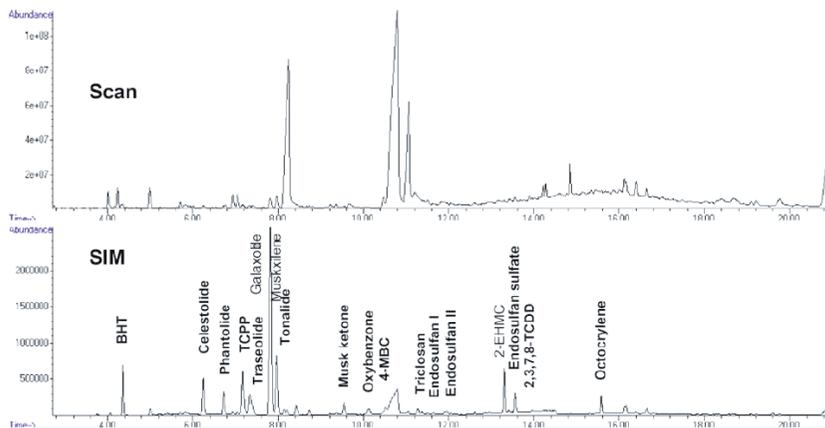
**Tabla 2. Tiempos de retención (min) y los iones de las masas utilizados para la identificación y cuantificación de los compuestos de interés seleccionados.**

Compound	Rt (min)	Iones de cuantificación e identificación (m/z) (A.R %)
BHT	4.359	205 (100), 220 (26), 177 (10)
Celestolide	6.243	229 (100), 244 (44), 173 (22)
Phantolide	6.711	229 (100), 244 (24), 230 (17)
TCPP	7.151	125 (100), 157 (38), 277 (37)
Traseolide	7.785	215 (100), 258 (18), 173 (17)
Galaxolide	7.938	243 (100), 258 (31), 213 (30)
Musk xylene	7.947	282 (100), 283 (14), 297 (9)
Tonalide	7.968	243 (100), 258 (29), 244 (19)
Musk ketone	9.528	279 (100), 294 (27), 280 (20)
4-MBC	10.499	254 (100), 211 (48), 239 (31)
Benzophenone-3	10.065	227 (100), 151 (84), 228 (66)
Triclosan	11.050	288 (100), 290 (95), 218 (82)
Endosulfan $\alpha$	11.308	241 (100), 195 (92), 207 (84)
Endosulfan $\beta$	12.582	195 (100), 237 (85), 207 (82)
2-EHMC	11.890	178 (100), 161 (52), 290 (9)
Endosulfan sulfate	13.392	272 (100), 274 (84), 387 (66)
2,3,7,8-TCDD	13.532	322 (100), 320 (79), 324 (48)
Octocrylene	15.571	249 (100), 204 (96), 232 (84)
BHT	4.359	205 (100), 220 (26), 177 (10)

**BHT:** butylated hydroxytoluene; **TCPP:** Tris(2-chloroisopropyl) phosphate; **4-MBC:** 4-methylbenzylidene camphor; **2-EHMC:** 2-ethylhexyl methoxycinnamate; **2,3,7,8-TCDD:** 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **Negrita:** Iones de cuantificación. **A.R %:** Abundancia relative



Figura 4. Cromatogramas obtenidos mediante GC-MS en modo SIM/Scan, a partir de una muestra de aguas residuales fortificada a una concentración de 50 ng/L





**protocolo**  
de técnicas de  
muestreo y técnicas  
analíticas  
de contaminantes  
emergentes y prioritarios

**procedimiento de  
análisis de contaminantes  
prioritarios**



En este caso se escogieron las técnicas analíticas GC-MS/MS e ICP-MS para evaluar la contaminación por sustancias prioritarias de diferentes tipos de aguas recogidas en una finca regada con agua residual tratada en Granada, como parte del programa de investigación TRAGUA. Estas técnicas proporcionan los requerimientos necesarios para la identificación inequívoca y cuantificación de un número elevado de compuestos orgánicos, y metales, respectivamente.

## 7.1. Compuestos orgánicos

Se desarrolló un método multiresiduo para analizar 57 contaminantes orgánicos, de los cuales 13 eran hidrocarburos aromáticos policíclicos y el resto pesticidas o sustancias relacionadas con la producción y degradación de los mismos. La importancia de la medida de estos compuestos radica en que la mayoría están incluidos en la lista de sustancias prioritarias establecida por la Directiva 2008/105/CE del Parlamento europeo, relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas. En dicha directiva se considera necesaria la mejora de los conocimientos y datos disponibles sobre el origen de las sustancias prioritarias y las vías de contaminación, para lo que es necesario el desarrollo de metodologías analíticas que permitan analizar este tipo de contaminantes en matrices acuosas de distinta naturaleza, como el agua de río o agua residual. Para llevar a cabo el análisis de las muestras se desarrollaron y evaluaron 3 métodos de tratamiento de muestra distintos como son la LLE, SPE y microextracción por fase sólida en espacio de cabeza (HS-SPME), para su posterior análisis por GC-MS/MS

### 7.1.1. LLE

La muestra sin filtrar se acidifica con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1M hasta pH 3 y se le añaden 250 mg de NaCl. Una alícuota de 200 ml de agua se carga en un embudo de decantación de 250 ml, se añaden 25 ml de n-hexano y se agita vigorosamente durante 3 minutos. Se separan las fases y la acuosa se vuelve a extraer dos veces más con 25 ml de n-hexano. Se juntan las fases orgánicas y se secan con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. A continuación el extracto se evapora hasta casi sequedad en un rotavapor (Büchi Rotavapor R200) equipado con un baño de agua (Büchi B-490) y un controlador del vacío (Büchi V800). Finalmente el residuo se reconstituye con n-hexano hasta un volumen final de 1 ml (preconcentración 200:1). A continuación se muestra un esquema del procedimiento en la figura 5.



Figura 5. Esquema del procedimiento de extracción líquido-líquido previo análisis del multiresudio de sustancias prioritarias por GC-MS/MS.



### 7.1.2. SPE

La muestra filtrada se somete al proceso de extracción con cartuchos Bond Elut C18 (6mL, 500 mg). El primer paso de la extracción es el acondicionamiento de la fase sólida dejando pasar a vacío primero 6 mL de MeOH, después 6 mL de una mezcla AcEt-diclorometano (1:1), posteriormente se vuelven a pasar 6 mL de MeOH y finalmente 6 mL de agua ultrapura. A continuación se cargan 200 mL de muestra una velocidad de 3-5 mL/min. Una vez que pasa todo el volumen de muestra, se lavan los cartuchos con 3 mL de agua ultrapura y se secan a vacío durante 5 minutos. Seguidamente, se eluyen los compuestos retenidos en la fase sólida con dos alícuotas de 4 mL de la mezcla AcEt-diclorometano (1:1). A continuación, se evapora el disolvente hasta casi sequedad, utilizando un Turbo Vap LV, que utiliza una corriente de Nitrógeno a una presión de 5 psi junto con un baño de agua a 27 C. El extracto final se reconstituye con n-hexano hasta un volumen final de 1 mL, por lo que la preconcentración que se consigue es de 200:1. A continuación se muestra la figura 6 con el esquema del procedimiento.

Figura 6. Esquema del procedimiento de extracción por fase sólida previo al análisis del multiresudio de sustancias prioritarias por GC-MS/MS.

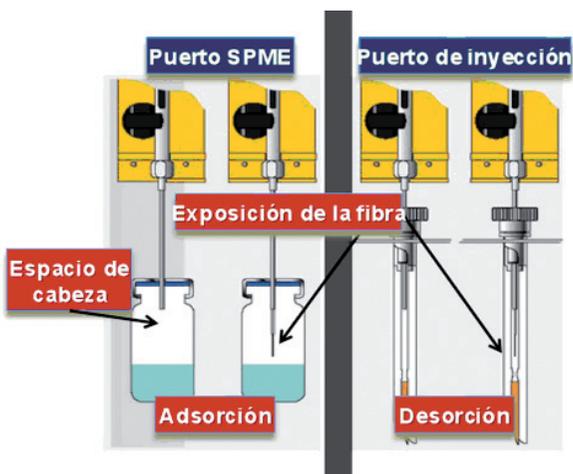




### 7.1.3. HS-SPME

En un vial de vidrio de espacio de cabeza de 20 mL se introducen 10 mL de muestra al 10% de MeOH, 1 g de NaCl y un imán para agitarla. A continuación se calienta la muestra hasta 80 °C (temperatura de incubación) y se introduce la fibra (Poliacrilato) en el vial de forma automática, dejándose transcurrir 50 minutos (tiempo de incubación) para conseguir el equilibrio termodinámico entre las fases presentes y adsorción de los analitos en la fibra. En estas condiciones, la cantidad de cada compuesto en el volumen de espacio de cabeza es proporcional a su concentración en la matriz. Pasado ese tiempo de incubación, los analitos son desorbidos en el inyector del cromatógrafo de gases a una temperatura de 280 °C. En la siguiente figura (figura 7) se muestra un esquema del proceso de extracción con la fibra polimérica.

Figura 7. Proceso de adsorción y desorción de los analitos por microextracción por fase sólida (fibra polimérica).



### 7.1.4. Análisis por GC-MS/MS

Se utilizó un Cromatógrafo de gases (Varian CP-3800), equipado con control de flujo electrónico (EFC), un inyector capilar universal 1079 en el que se utiliza un liner fritado (Restek) y un automuestreador (Combipal autosampler, CTC Analytics). La temperatura del inyector se mantiene durante 2 minutos a 280 °C, después sube hasta 325 °C a una velocidad de 40 °Cmin<sup>-1</sup>, manteniéndose en este valor durante 10 minutos. La separación de los analitos se lleva a cabo utilizando una columna capilar Varian FactorFour VF-5-ms (30m x 0.25mm



i.d. x 0.25  $\mu\text{m}$ ) y He como gas portador a un flujo de 1.0 mLmin<sup>-1</sup>. La rampa de temperatura utilizada comienza a 70 °C durante 2 minutos, después sube hasta 180 °C a una velocidad de 10 °C min<sup>-1</sup>, a continuación sube hasta los 260 °C a 6 °C min<sup>-1</sup> y por último se alcanzan 300 °C a una velocidad de 4 °C min<sup>-1</sup>, para un tiempo total de análisis de 43 minutos. El cromatógrafo de gases está acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Varian 300-MS) equipado con una fuente de ionización que opera en modo de impacto electrónico (EI, 70eV) con una corriente de filamento de 50  $\mu\text{A}$  y el voltaje del multiplicador se mantiene en máximo EDR. Las temperaturas de la línea de transferencia, fuente de iones y manifold son 280, 250 y 40 °C, respectivamente. Se establece un tiempo de retardo para el encendido del detector de 6.4 minutos para evitar daños en la instrumentación. El espectrómetro de masas se autocalibra cuando sea necesario con Perfluorotributylamine (PFT-BA). Se utiliza Ar como gas de colisión. El modo de trabajo del espectrómetro es MRM (multiple reaction monitoring) para lo que se hizo una optimización previa de las condiciones necesarias para el correcto análisis de cada analito (ver tabla 3). El control del instrumento, adquisición y evaluación de los datos se lleva a cabo utilizando el software Varian MS Workstation (versión 6.9).

**Tabla 3. Compuestos analizados y condiciones experimentales optimizadas para el método MRM.**

$t_R$ (min)	Window (min)	Compounds	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Q, q1, q2	Dwell time (s)	Collision Energy (ev)	Ratio Q/q (%)
7.048	6.50-9.20	1,3,5-TCB	181.8	146.8	Q	0.042	20	
			181.8	108.8	q1	0.042	30	99.3
			181.8	110.9	q2	0.042	25	54.4
7.834	6.50-9.20	1,2,4-TCB	181.8	108.8	Q	0.042	30	
			181.8	146.8	q1	0.042	20	99.7
			181.8	110.9	q2	0.042	25	59.8
8.313	6.50-9.20	Hexachlorobutadiene	224.9	189.8	Q	0.042	20	
			224.9	154.9	q1	0.042	25	36.1
			224.9	152.7	q2	0.042	45	9.7
8.372	6.50-9.20	1,2,3-TCB	181.8	108.8	Q	0.042	30	
			181.8	146.8	q1	0.042	20	98.7
			181.8	110.9	q2	0.042	25	61.4
8.560	6.50-9.20	Isoproturon	161.1	146.1	Q	0.042	10	
			161.1	128.0	q1	0.042	20	49.1
			161.1	91.0	q2	0.042	30	15.3
8.723	6.50-9.20	Chlorlitoluron	167.0	132.0	Q	0.042	10	
			167.0	77.0	q1	0.042	30	33.4
			167.0	104.0	q2	0.042	20	11.8



## protocolo de técnicas de muestreo y técnicas analíticas de contaminantes emergentes y prioritarios

$t_R$ (min)	Window (min)	Compounds	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Q, q1, q2	Dwell time (s)	Collision Energy (ev)	Ratio Q/q (%)
9.795	9.20-10.50	Diuron	186.9	123.9	Q	0.167	20	
			186.9	158.8	q1	0.167	10	68.8
			186.9	96.8	q2	0.167	35	14.0
11.909	10.50-12.20	Acenaphthylene	152.0	152.1	Q	0.100	10	
			152.0	151.1	q1	0.100	15	43.5
12.595	12.20-14.00	Pentaclorobenzene	249.8	214.8	Q	0.100	20	
			249.8	142.0	q1	0.100	40	80.5
			249.8	107.8	q2	0.100	50	39.4
13.682	12.20-14.00	Fluorene	166.0	165.1	Q	0.100	10	
			166.0	166.0	q1	0.100	10	66.6
14.597	14.00-15.10	Trifluralin	306.1	264.0	Q	0.083	10	
			306.1	206.0	q1	0.083	15	23.8
			306.1	159.8	q2	0.083	25	19.3
14.715	14.00-15.10	Atrazin desethyl	172.0	105.0	Q	0.083	10	
			187.0	172.1	q1	0.083	10	84.3
			172.0	94.0	q2	0.083	15	82.4
15.528	15.10-16.00	Alfa-HCH	218.9	182.8	Q	0.083	10	
			218.9	146.9	q1	0.083	25	41.1
			218.9	108.8	q2	0.083	35	22.8
15.612	15.10-16.00	Hexaclorobenzene	283.8	248.7	Q	0.083	20	
			283.8	213.0	q1	0.083	30	84.2
			283.8	178.7	q2	0.083	50	34.6
16.340	16.00-17.40	Simazin	201.0	173.0	Q	0.033	10	
			201.0	186.1	q1	0.033	10	52.4
			201.0	138.0	q2	0.033	15	43.2
16.504	16.00-17.40	Atrazin	215.1	57.9	Q	0.033	10	
			215.1	200.1	q1	0.033	10	59.6
			215.1	138.1	q2	0.033	15	20.6
16.633	16.00-17.40	Propazine	229.0	58.0	Q	0.033	15	
			229.0	214.1	q1	0.033	10	55.8
			229.0	187.0	q2	0.033	10	48.9
16.785	16.00-17.40	Beta-HCH	218.9	182.8	Q	0.033	10	
			218.9	144.8	q1	0.033	25	40.3
			218.9	108.9	q2	0.033	35	26.0
16.949	16.00-17.40	Ganma-HCH	218.9	182.8	Q	0.033	10	
			218.9	144.8	q1	0.033	25	40.6
			218.9	108.9	q2	0.033	35	24.1



$t_R$ (min)	Window		Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Q, q1, q2	Dwell time (s)	Collision Energy (ev)	Ratio Q/q (%)
	(min)	Compounds						
17.125	16.00-17.40	Terbutilazine	214.1	132.0	Q	0.033	10	
			214.1	119.0	q1	0.033	10	57.1
			214.1	136.1	q2	0.033	10	45.5
17.312	16.00-17.40	Diazinon	304.0	179.1	Q	0.033	15	
			179.0	137.0	q1	0.033	15	88.8
			179.0	122.0	q2	0.033	25	79.5
17.665	17.40-18.20	Phenantrene	178.0	178.1	Q	0.250	10	
			178.0	152.1	q1	0.250	15	24.9
17.960	17.40-18.20	Anthracene	178.0	178.1	Q	0.250	10	
			178.0	152.1	q1	0.250	15	17.9
18.593	18.20-19.50	Delta-HCH	218.9	182.8	Q	0.167	10	
			218.9	144.8	q1	0.167	25	29.9
			218.9	108.9	q2	0.167	35	20.8
20.093	19.50-20.80	Alachlor	188.1	160.0	Q	0.050	10	
			188.1	130.9	q1	0.050	20	61.4
			188.1	132.0	q2	0.050	15	55.2
20.113	19.50-20.80	Parathion methyl	263.0	109.11	Q	0.050	10	
			263.0	127.1	q1	0.050	10	14.0
			263.0	246.0	q2	0.050	5	14.0
20.357	19.50-20.80	Heptachlor	272.0	237.0	Q	0.050	15	
			272.0	272.1	q1	0.050	5	78.5
			272.0	143.0	q2	0.050	35	11.3
20.549	19.50-20.80	Ametryn	227.0	58.0	Q	0.050	10	
			227.0	185.0	q1	0.050	10	73.7
			227.0	212.1	q2	0.050	10	51.6
21.236	20.80-21.50	Terbutrin	241.1	185.1	Q	0.167	10	
			241.1	170.0	q1	0.167	15	96.2
			241.1	111.2	q2	0.167	25	18.0
21.875	21.50-22.70	Chloropyrifos ethyl	314.0	258.0	Q	0.056	15	
			314.0	314.0	q1	0.056	10	55.3
			314.0	286.0	q2	0.056	5	52.9
21.917	21.50-22.70	Aldrin	262.8	192.7	Q	0.056	30	
			262.8	190.8	q1	0.056	35	68.2
			262.8	228.0	q2	0.056	20	58.0
22.263	21.50-22.70	Parathion ethyl	291.0	109.0	Q	0.056	10	
			291.0	81.0	q1	0.056	30	46.9
			291.0	142.0	q2	0.056	5	24.7



protocolo de técnicas de muestreo y técnicas analíticas  
de contaminantes emergentes y prioritarios

$t_R$ (min)	Window (min)	Compounds	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Q, q1, q2	Dwell time (s)	Collision Energy (ev)	Ratio Q/q (%)
23.140	22.70-24.50	Isodrin	262.8	192.7	Q	0.056	30	
			262.8	190.8	q1	0.056	30	68.2
			262.8	228.0	q2	0.056	20	54.2
23.286	22.70-24.50	Chlorfenvinfos A	323.0	267.0	Q	0.056	10	
			323.0	159.0	q1	0.056	10	40.6
			323.0	295.0	q2	0.056	30	30.4
23.705	22.70-24.50	Chlorfenvinfos B	323.0	267.0	Q	0.056	10	
			323.0	159.0	q1	0.056	10	38.6
			323.0	295.0	q2	0.056	30	29.9
24.089	22.70-24.50	Procimydone	283.0	95.5	Q	0.056	10	
			283.0	67.0	q1	0.056	20	39.7
			283.0	255.1	q2	0.056	10	18.6
24.975	24.50-26.40	Pyrene	202.1	202.0	Q	0.037	10	
			202.1	201.2	q1	0.037	10	46.8
24.984	24.50-26.40	Alfa-endosulfan	338.8	160.1	Q	0.037	15	
			338.8	194.9	q1	0.037	10	79.9
			338.8	230.9	q2	0.037	10	48.5
25.860	24.50-26.40	4,4'-DDE	318.0	246.0	Q	0.037	15	
			318.0	248.0	q1	0.037	10	74.7
			318.0	283.0	q2	0.037	10	21.4
26.006	24.50-26.40	Dieldrin	262.8	192.7	Q	0.037	30	
			262.8	190.8	q1	0.037	35	67.7
			262.8	227.9	q2	0.037	15	50.3
26.152	24.50-26.40	Oxyfluorfen	361.0	300.0	Q	0.037	10	
			361.0	317.0	q1	0.037	10	50.1
			361.0	252.0	q2	0.037	15	27.7
26.755	26.40-28.85	Endrin	262.8	192.7	Q	0.033	35	
			262.8	190.8	q1	0.033	35	64.5
			262.8	228.0	q2	0.033	20	56.1
27.198	26.40-28.85	Beta-endosulfan	338.8	160.0	Q	0.033	10	
			338.8	266.7	q1	0.033	15	89.7
			338.8	230.8	q2	0.033	10	50.4
27.339	26.40-28.85	Ethion	231.0	129.0	Q	0.033	25	
			231.0	157.0	q1	0.033	15	33.6
			231.0	185.0	q2	0.033	10	32.9
28.526	26.40-28.85	Endosulfan sulfate	386.8	252.9	Q	0.033	10	
			386.8	288.9	q1	0.033	10	88.7
			386.8	205.7	q2	0.033	35	44.8



$t_R$ (min)	Window		Precursor	Product	Q, q1, q2	Dwell time (s)	Collision Energy (ev)	Ratio Q/q (%)
	(min)	Compounds	ion (m/z)	ion (m/z)				
28.646	26.40-28.85	4,4'-DDT	235.0	164.9	Q	0.033	25	
			235.0	200.0	q1	0.033	10	27.9
			235.0	199.0	q2	0.033	15	26.6
30.030	28.85-30.70	Iprodion	314.0	245.0	Q	0.062	10	
			314.0	271.0	q1	0.062	10	59.4
			314.0	55.9	q2	0.062	20	46.6
30.320	28.85-30.70	Benzo(a)anthracene	228.0	228.0	Q	0.062	10	
			228.0	226.0	q1	0.062	25	36.1
30.466	28.85-30.70	Chrysene	228.0	228.0	Q	0.062	10	
			228.0	226.0	q1	0.062	25	36.4
30.507	28.85-30.70	Metoxychlor	227.0	169.0	Q	0.062	25	
			227.0	212.1	q1	0.062	10	59.7
			227.0	184.0	q2	0.062	15	44.6
34.698	30.70-37.50	Benzo(b)fluoranthene	252.0	252.0	Q	0.250	10	
			252.0	250.0	q1	0.250	30	27.5
34.810	30.70-37.50	Benzo(k)fluoranthene	252.0	252.0	Q	0.250	10	
			252.0	250.0	q1	0.250	30	27.5
35.987	30.70-37.50	Benzo(a)pyrene	252.0	252.0	Q	0.250	10	
			252.0	250.0	q1	0.250	30	28.0
38.378	37.50-39.50	Deltamentrin	252.9	93.0	Q	0.167	20	
			252.9	174.0	q1	0.167	10	78.1
			252.9	90.9	q2	0.167	25	60.8
40.367	39.50-43.33	Indene(1,2,3-cd)pyrene	276.0	276.0	Q	0.125	10	
			276.0	274.0	q1	0.125	40	22.6
40.520	39.50-43.33	Dibenzo(a,h)anthrazene	278.0	278.0	Q	0.125	10	
			278.0	250.0	q1	0.125	45	2.9
41.326	39.50-43.33	Benzo(g,h,i)perylene	276.0	276.0	Q	0.125	10	
			276.0	274.0	q1	0.125	40	23.5

Los 3 métodos de extracción se desarrollaron de forma satisfactoria, obteniéndose buenos porcentajes de recuperación para la mayoría de compuestos. A continuación se muestra una tabla (tabla 4) donde se comparan las distintas condiciones de los métodos de extracción desarrollados.



Tabla 4. Estudio comparativo de los 3 procedimientos de extracción para el análisis de 57 contaminantes por GC-MS/MS

PARÁMETRO	LLE	SPE	HS-SPME
Número de compuestos analizables	57	57	49
Tiempo de tratamiento			
+ tiempo de análisis por muestra	~ 73 min	~ 53 min	~ 60 min
Consumo de disolvente por muestra	76 mL n-hexano	12 mL MeOH 14 mL EtAc+DCM (1:1)	1 mL MeOH
LODs-LOQs	0.03 – 5.10 ng L <sup>-1</sup>	0.03 – 5.00 ng L <sup>-1</sup>	0.10 – 150.00 ng L <sup>-1</sup>
Recuperación	70-110 %	70-120%	83-119%
Precisión (RSD)	3 -15 %	1-10 %	7-20%
Rango lineal	1-500 ng/L	1-500 ng/L	1-500 ng/L
Linealidad (r <sup>2</sup> )	Al menos 0.999 para la mayoría de compuestos	Al menos 0.999 para la mayoría de compuestos	Al menos 0.99 para la mayoría de compuestos

Teniendo en cuenta este estudio comparativo se puede concluir de forma general que la HS-SPME es el procedimiento menos nocivo para el medioambiente, la SPE permite una mayor frecuencia de muestreo y la LLE da lugar a los límites de detección más bajos.

## 7.2. Metales

Se seleccionaron para el análisis Ni, Hg, Pb y Cd por estar incluidos en la lista de sustancias prioritarias y Zn, Cr y Cu por estar definidos como sustancias preferentes por el Real Decreto 60/2011, de 21 de Enero, sobre las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas. Para la puesta a punto del método analítico se analizó una muestra de agua residual (un material de referencia certificado) que contenía los elementos a medir, y los resultados fueron satisfactorios, observándose además la ausencia de efecto matriz al emplear patrón interno. Las muestras recibidas no son sometidas a ningún tratamiento previo al análisis, simplemente se filtran a vacío, para evitar que se obstruya el capilar del instrumento. Para preparar la recta de calibrado se usa una disolución multipatrón conteniendo todos los elementos necesarios. A las muestras se les realiza una dilución 1+1 antes de proceder a su medida. Todas las disoluciones, tanto patrones como muestras, están preparadas en un 3% de HNO<sub>3</sub> "sub-boiling" y agua Milli-q, empleando 10 µg l<sup>-1</sup> de In como patrón interno y 5 µg ml<sup>-1</sup> de Au para evitar el efecto memoria causado por el Hg.



Para el análisis de las muestras se utiliza un espectrómetro de masas con un plasma acoplado por inducción (ICP-MS, Agilent Technologies 7500 Series), que está equipado con el software Agilent 7500 ICP-MS ChemStation, un nebulizador Babington, una doble cámara de pulverización refrigerada ( $2^{\circ}$  C) de cuarzo Peltier tipo Scott y un automuestreador Agilent I-AS. Se optimiza diariamente la sensibilidad (Li, Y, y Tl), nivel de óxidos (Ce) y los iones doble cargados (Ce) con una solución de tuning que contiene  $10 \mu\text{g/L}$  de Li, Y, Tl y Ce al 3% de  $\text{HNO}_3$  (v/v), se siguieron los criterios especificados en el manual del fabricante para la optimización de las condiciones de trabajo, estableciéndose los siguientes valores: RF power, 1500 W; flujo del gas del plasma,  $15 \text{ L min}^{-1}$ ; flujo del gas nebulizador,  $1 \text{ L min}^{-1}$ ; flujo de gas auxiliar,  $0.9 \text{ L min}^{-1}$ ; velocidad de aspiración de la muestra,  $0.25 \text{ mL min}^{-1}$ .

# determinación

## protocolo de técnicas de muestreo y técnicas analíticas de contaminantes emergentes y prioritarios





Como se ha comentado anteriormente, LC-MS/MS y GC-MS(MS) son las técnicas analíticas más utilizadas, habitualmente, para la determinación de contaminantes orgánicos (emergentes y prioritarios) en muestras acuosas medioambientales, e ICP-MS para el análisis de metales. Los detectores deben estar correctamente ajustados, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las variaciones en la sensibilidad del detector se deben comprobar periódicamente mediante la verificación de la linealidad de las curvas de calibración con soluciones estándar.

# pruebas de identificación

**protocolo**  
de técnicas de  
muestreo y técnicas  
analíticas  
de contaminantes  
emergentes y prioritarios





Los criterios de identificación y confirmación para el análisis de contaminantes ambientales están definidos en la Decisión de la Comisión Europea 2002/657/EC (*Commission Decision (2002/657/EC)*). Esta directiva se definió originalmente para la determinación de contaminantes orgánicos en muestras alimentarias, y se ha expandido a otras matrices, incluyendo muestras ambientales. Esta decisión se basa en la utilización de puntos de identificación (IP), los cuales se obtienen de acuerdo con los criterios de calidad para la identificación y confirmación espectrométrica.

De acuerdo con estas directrices de la UE, para confirmar la presencia de un compuesto en el medio ambiente utilizando LC(GC)-QqQ-MS/MS y en modo SRM, se deben usar dos transiciones, la adquisición de éstas al tiempo de retención correcto y tener en cuenta la relación SRM2/SRM1. En modo de trabajo EPI, el criterio de confirmación aplicado en este caso debe ser la presencia de al menos una transición característica en el tiempo de retención correcto y una buena concordancia entre el espectro de referencia de la biblioteca y el espectro obtenido en las muestras (valor superior al 70%). Por otro lado, cuando se utilizan instrumentos TOF-MS, se pueden obtener fácilmente los IPs requeridos (3 IPs), porque tiene la característica de generar espectros de iones producto en "full-scan" con masa exacta.

En GC-MS la forma más sencilla de confirmar la identidad de un analito en una muestra, es la comparación de su tiempo de retención y de su espectro de masas, obtenido con ionización por impacto electrónico (EI) y en el rango completo de masas "full-scan", con los proporcionados por el estándar analítico correspondiente en las mismas condiciones. La concordancia de los tiempos de retención en una ventana del 2% y una concordancia entre espectros, igual o superior al 80% son considerados criterios de identificación inequívocos. Sin embargo, la complejidad de las matrices ambientales y la baja concentración de los contaminantes en las mismas, hacen que estos criterios no sean efectivos en muchos casos, y sea necesario aplicar conjuntamente otros métodos más selectivos y sensibles que garanticen la obtención de resultados fiables. Algunos de estos métodos empleados en GC-MS incluyen el uso de técnicas de selección de iones (SIM), ionización química (CI) o espectrometría de masas en tándem (MS/MS). La utilización del modo SIM proporciona métodos altamente selectivos que permiten obtener incrementos de sensibilidad de varios órdenes de magnitud. En la actualidad, considerando el criterio de IPs, se requieren 3 ó 4 iones diagnósticos para la correcta confirmación de los contaminantes. La variación de las abundancias relativas debe estar dentro de los rangos establecidos por la Decisión.

# validación y calidad de los resultados

**protocolo**  
de técnicas de  
muestreo y técnicas  
analíticas  
de contaminantes  
emergentes y prioritarios

# 10



Como ya se ha mencionado a lo largo de esta memoria, el análisis de compuestos orgánicos en aguas medioambientales requiere el desarrollo de métodos analíticos muy sensibles y selectivos, como consecuencia de los bajos niveles de concentración de los contaminantes en estas matrices complejas. En este contexto, la confirmación de los resultados analíticos es un aspecto crucial para garantizar la validez de los mismos. Un requisito para caracterizar la eficiencia de los métodos de análisis y asegurar la calidad de los resultados es disponer de métodos convenientemente validados que cumplan ciertos requisitos en aspectos tales como la sensibilidad, selectividad/especificidad, linealidad, precisión y exactitud. Además es necesario establecer procedimientos u operaciones de control (ej. blancos, muestras fortificadas, etc...), que garanticen que los resultados que obtenemos, cumplen con tales requisitos propios de la calidad.

La única forma de garantizar estos dos puntos es la aplicación sistemática y rigurosa de un sistema de calidad a los resultados. Este sistema de calidad debe afectar a todas las etapas del proceso analítico y debe disponer de controles que evalúen su correcto funcionamiento.

La validación es un proceso que pretende demostrar experimentalmente que un método es apropiado para el propósito para el que fue desarrollado y que genera resultados de calidad verificable. Diferentes organismos de carácter internacional, como la US EPA (US Environmental Protection Agency), EURACHEM (European Analytical Chemistry) la IUPAC (Union of Pure and Applied Chemistry) y otros han desarrollado directrices generales para la validación de métodos. Los criterios generales fijados por las diferentes directrices son similares y proporcionan la base para asegurar la confiabilidad de los métodos validados. De forma general el estudio de validación de un método de análisis debe incluir información sobre:

- Exactitud y precisión (en términos de repetitividad y reproducibilidad)
- Rango lineal de trabajo
- Límite de detección y cuantificación del método
- Recuperación de los analitos
- Utilización de estándares instrumentales y estándares internos o "surrogate"
- Especificidad (posibles efectos matriz)
- Empleo de blancos instrumentales

# anexo I

## protocolo de técnicas de muestreo y técnicas analíticas de contaminantes emergentes y prioritarios





## Aplicación del protocolo para la evaluación del contenido de contaminantes emergentes en una planta de tratamiento de aguas residuales en Almería

### TOMA DE LA MUESTRA

Las muestras de aguas residuales utilizadas en este estudio se obtuvieron de una planta de tratamiento de aguas residuales situada en el sureste de España (Almería). Esta EDAR, se caracteriza por estar situada en una zona con una importante actividad agrícola y por su proximidad a un hospital que emite aguas residuales a la red de alcantarillado urbana sin llevar a cabo tratamiento de las mismas. La planta depuradora aplica inicialmente un tratamiento primario para la eliminación del material en suspensión, un tratamiento biológico de lodos activados y finalmente un proceso de aclaración. La toma de muestras se llevó a cabo de forma integrada, es decir, las muestras eran representativas de 1-día de trabajo en la EDAR. Para ello, se utilizó un dispositivo automático, el cual tomaba 0.5 L de agua (efluente e influente) cada 3 horas, durante todo un día. Las muestras eran recogidas en botellas de vidrio ámbar (pre-lavadas) y enviadas al laboratorio. Una vez allí, se filtraban a través de un filtro de 0,7 $\mu$ m de fibra de vidrio y eran congeladas hasta su análisis.

### COMPUESTOS ANALIZADOS

Para la caracterización de las aguas residuales, fueron seleccionados un grupo de contaminantes representativos de diferentes categorías, en base a algunos de los siguientes criterios:

- Literatura científica disponible sobre su presencia en aguas residuales,
- Datos de uso de compuestos de origen industrial y agrícola del Ministerio de Agricultura, Medio Rural y Medio Marino (MARM) (<http://www.marm.es/es/>) y la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos ([http://echa.europa.eu/home\\_es.asp](http://echa.europa.eu/home_es.asp)),
- Datos de consumo de fármacos y productos de cuidado personal del Ministerio de Sanidad, política social e igualdad. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios (AEMPS) <http://www.aemps.es/profHumana/observatorio/informes.htm>.

La siguiente tabla (Tabla 5) incluye todos los compuestos seleccionados para su análisis en aguas residuales, tanto por GC como por LC, así como la eficacia de los métodos de extracción y la sensibilidad de los métodos de análisis desarrollados, en términos de límites de cuan-



## protocolo de técnicas de muestreo y técnicas analíticas de contaminantes emergentes y prioritarios

tificación y detección. Es de destacar, que se trata de un grupo de compuestos muy heterogéneos, en cuanto a sus propiedades físico-químicas, cubriéndose un amplio rango de polaridades ( $1 < \log K_{OW} < 4$ ), lo que en consecuencia limita, en algunos casos, la extracción y análisis de forma conjunta.

Tabla 5. Compuestos seleccionados para su análisis en aguas residuales, tanto por GC como por LC.

COMPUESTOS	MÉTODO ANALÍTICO	INFLUENTE		EFLUENTE		R% (RSD%) n=3
		MQL (ng/L)	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)	MDL (ng/L)	
<b>Analgesicos/anti-inflamatorios</b>						
Acetaminofeno	LC (+)	65,4	19,6	32,7	9,8	34 (12)
Indometacina	LC (+)	6,4	2,0	3,2	1,0	81 (12)
Codeína	LC (+)	20,4	6,2	10,2	3,1	120 (23)
Acid mefenámico	LC (+)	6,0	1,8	3,0	0,9	67 (13)
Ketorolaco	LC (+)	7,0	2,0	3,5	1,0	83 (2)
Naproxeno	LC (+)	48,2	14,4	24,1	7,2	98 (3)
Ibuprofeno	LC (-)	7,4	2,2	3,7	1,1	116 (3)
Fenoprofeno	LC (-)	7,3	2,2	3,7	1,1	105 (12)
Ketoprofeno	LC (+)	210,8	63,2	105,4	31,6	100 (12)
Propifenazona	LC (+)	8,9	2,7	4,5	1,3	91 (7)
Diclofenaco	LC (-)	2,4	0,7	1,2	0,4	120 (14)
<b>Antibióticos</b>						
Metronidazol	LC (+)	33,4	10,0	16,7	5,0	25 (14)
Sulfamethoxazol	LC (+)	30,2	9,0	15,1	4,5	57 (2)
Trimetoprim	LC (+)	57,6	17,2	28,8	8,6	104 (13)
Ciprofloxacina	LC (+)	20,6	6,2	10,3	3,1	70 (13)
Cefotaxima	LC (+)	113,6	34,0	56,8	17,0	23 (11)
Ofloxacina	LC (+)	66,4	20,0	33,2	10,0	102 (5)
Eritromicina	LC (+)	197,8	59,4	98,9	29,7	107 (8)
Lincomicina	LC (+)	12,4	3,7	6,2	1,9	87 (25)
Sulfadiazina	LC (+)	24,8	7,5	12,4	3,7	67 (9)
Sulfatiazol	LC (+)	50,4	15,1	25,2	7,6	84 (17)
Sulfapiridina	LC (+)	49,3	14,8	24,6	7,4	79 (2)
Norfloxacina	LC (+)	30,3	9,1	15,1	4,5	55 (20)
Tetraciclina	LC (+)	235,3	70,6	117,6	35,3	15 (15)
Sulfametazina	LC (+)	12,3	3,7	6,1	1,8	67 (21)
Azitromicina	LC (+)	47,1	14,1	23,5	7,1	78 (13)
Claritromicina	LC (+)	19,4	5,8	9,7	2,9	80 (16)



COMPUESTOS	MÉTODO ANALÍTICO	INFLUENTE		EFLUENTE		R% (RSD%) n=3
		MQL (ng/L)	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)	MDL (ng/L)	
<b>Reguladores lipídicos</b>						
Fenofibrato	LC (+)	9,0	2,8	4,5	1,4	25 (3)
Bezafibrato	LC (+)	16,6	5,0	8,3	2,5	85 (7)
Gemfibrozil	LC (-)	0,3	0,1	0,2	0,1	114 (1)
Pravastatin	LC (+)	162,4	48,7	81,2	24,4	82 (14)
Mevastatin	LC (+)	31,9	11,8	15,9	5,9	40 (46)
Simvastatin	LC (+)	12,2	3,7	6,1	1,8	77 (22)
<b>β-bloqueantes</b>						
Atenolol	LC (+)	11,8	3,6	5,9	1,8	83 (11)
Propranolol	LC (+)	8,8	2,6	4,4	1,3	95 (9)
Sotalol	LC (+)	23,4	7,0	11,7	3,5	111 (14)
Metoprolol	LC (+)	27,4	8,2	13,7	4,1	100 (5)
Nadolol	LC (+)	24,7	7,4	12,4	3,7	55 (29)
<b>Antidepresivos/ Antiepilépticos</b>						
Fluoxetina	LC (+)	5,8	1,8	2,9	0,9	47 (13)
Paroxetina	LC (+)	29,0	8,6	14,5	4,3	45 (18)
Venlafaxina	LC (+)	25,2	7,6	12,6	3,8	89 (21)
Citalopram	LC (+)	8,7	2,6	4,4	1,3	72 (10)
Amitriptilina	LC (+)	10,9	3,3	5,4	1,6	58 (22)
Clomipramina	LC (+)	5,0	1,5	2,5	0,8	32 (21)
Diazepam	LC (+)	6,4	2,0	3,2	1,0	106 (8)
Primidona	LC (+)	202,2	60,7	101,1	30,3	73 (2)
Carbamazepina	LC (+)	2,4	0,8	1,2	0,5	88 (2)
<b>Corticosteroides</b>						
Methylprednisolona	LC (+)	71,4	21,4	35,7	10,7	95 (5)
<b>Diuréticos</b>						
Furosemida	LC (-)	331,9	99,6	165,9	49,8	83 (6)
Hidroclorotiazida	LC (-)	5,0	1,5	2,5	0,8	96 (9)
<b>Protectores ulcerosos</b>						
Ranitidina	LC (+)	306,8	92,0	153,4	46,0	109 (8)
Omeprazol	LC (+)	12,4	3,8	6,2	1,9	74 (6)
Famotidina	LC (+)	57,4	17,2	28,7	8,6	47 (41)
Lansoprazol	LC (+)	37,3	11,2	18,7	5,6	45 (20)
Loratadina	LC (+)	1,8	0,5	0,9	0,3	55 (21)



## protocolo de técnicas de muestreo y técnicas analíticas de contaminantes emergentes y prioritarios

COMPUESTOS	MÉTODO ANALÍTICO	INFLUENTE		EFLUENTE		R% (RSD%) n=3
		MQL (ng/L)	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)	MDL (ng/L)	
<b>Broncodilatadores</b>						
Salbutamol	LC (+)	7,2	2,2	3,6	1,1	59 (4)
Terbutalina	LC (+)	5,4	1,6	2,7	0,8	39 (15)
<b>Anestésicos</b>						
Mepivacaina	LC (+)	3,8	1,2	1,9	0,6	91 (6)
<b>Agentes antineoplásicos</b>						
Ciclofosfamida	LC (+)	19,4	5,8	9,7	2,9	79 (7)
Iofosfamida	LC (+)	9,9	3,0	5,0	1,5	77 (9)
<b>Pesticidas</b>						
Clorpirifos metil	LC (+)	50,8	15,2	25,4	7,6	16 (7)
Endosulfan sulfato	GC	313,0	103,0	117,0	35,0	94 (19)
<b>Desinfectantes</b>						
Bifenilol	LC (+)	952,4	285,7	500,0	150,0	53 (9)
Cloropheno	LC (-)	3,3	1,0	1,6	0,5	104 (9)
Triclosan	GC	393,0	133,0	147,0	44,0	97 (13)
<b>Antioxidantes</b>						
BHT	GC	57,0	18,0	53,0	16,0	48 (8)
<b>Retardantes de llama</b>						
TCPP	GC	433,0	130,0	120,0	36,0	118 (14)
<b>Fragancias sintéticas</b>						
Celestolida	GC	24,0	7,0	23,0	7,0	70 (7)
Galaxolida	GC	145,0	43,0	57,0	17,0	117 (19)
Phantolida	GC	103,0	31,0	57,0	17,0	71 (7)
Tonalida	GC	61,0	20,0	53,0	16,0	85 (11)
Traseolida	GC	85,0	26,0	60,0	18,0	73 (4)
Musk ketona	GC	112,0	35,0	70,0	21,0	79 (2)
Musk xylene	GC	35,0	17,0	3,0	1,0	74 (3)
<b>Filtros UV</b>						
4-metilbenzilideno camfor	GC	110,0	33,0	100,0	30,0	71 (3)
Benzofenona-3	GC	113,0	36,0	80,0	24,0	105 (15)
2-EHMC	GC	88,0	25,0	33,0	10,0	52 (8)
Octocrileno	GC	83,0	19,0	37,0	11,0	74 (7)
<b>Estimulantes</b>						
Nicotina	LC (+)	143,8	43,2	71,9	21,6	86 (16)
Cafeína	LC (+)	29,4	8,8	14,7	4,4	100 (16)



COMPUESTOS	MÉTODO ANALÍTICO	INFLUENTE		EFLUENTE		R% (RSD%) n=3
		MQL (ng/L)	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)	MDL (ng/L)	
<b>Metabolitos</b>						
Cotina	LC (+)	21,3	6,4	10,7	3,2	107 (12)
Paraxantina	LC (+)	109,4	32,8	54,7	16,4	35 (0)
Carbamazepina 10,11-epoxido	LC (+)	35,2	10,6	17,6	5,3	127 (12)
Ácido clofibríco	LC (-)	12,2	3,7	6,1	1,8	75 (7)
Ácido fenofibríco	LC (+)	15,2	4,6	7,6	2,3	70 (11)
Ácido salicílico	LC (-)	35,7	10,7	17,9	5,4	17 (29)
4-MAA	LC (+)	9,6	3,0	4,8	1,5	101 (7)
4-AAA	LC (+)	199,6	59,8	99,8	29,9	94 (11)
4-FAA	LC (+)	67,0	20,0	33,5	10,0	90 (12)
4-DAA	LC (+)	16,2	4,8	8,1	2,4	77 (5)
4-AA	LC (+)	76,0	22,8	38,0	11,4	112 (7)
Antipirina	LC (+)	33,0	10,0	16,5	5,0	114 (8)
Ácido nicotínico	LC (+)	730	500	550	400	I.D
Trigonelina	LC (+)	800	600	540	260	I.D
<b>Drogas de abuso y metabolitos</b>						
Nicotina	LC (+)	250	200	200	150	I.D
<i>Cotina</i>	LC (+)	210	180	200	170	I.D
Cafeína	LC (+)	200	200	200	200	I.D
<i>Paraxantina</i>	LC (+)	550	550	450	450	I.D
Cocaína	LC (+)	10	3	3	1	I.D
<i>Benzoilecgonina</i>	LC (+)	20	10	10	5	I.D
Morfina	LC (+)	60	30	50	20	I.D
<i>Acetylmorfina</i>	LC (+)	75	40	65	40	I.D
<i>Etilmorfina</i>	LC (+)	100	55	85	50	I.D
Ephedrina	LC (+)	50	50	50	50	I.D
<i>Fenilefrina</i>	LC (+)	500	500	500	500	I.D
Amfetamina	LC (+)	500	500	500	500	I.D
<i>Methamfetamina</i>	LC (+)	700	700	700	700	I.D
<i>Etilamfetamina</i>	LC (+)	50	50	50	50	I.D
MDA	LC (+)	400	400	400	400	I.D
MDEA	LC (+)	50	20	50	20	I.D
MDMA	LC (+)	680	680	600	600	I.D
Metadona	LC (+)	10	5	10	5	I.D
EDDP	LC (+)	40	30	30	20	I.D
Ketamina	LC (+)	50	30	50	30	I.D
Codeína	LC (+)	40	20	40	20	I.D
Heroína	LC (+)	90	50	80	40	I.D

**MQL:** límite de cuantificación del método (SPE); **MDL:** límite de detección del método (SPE); **R%:** Recuperaciones; **I.D:** Inyección directa; **Cursiva:** metabolito.



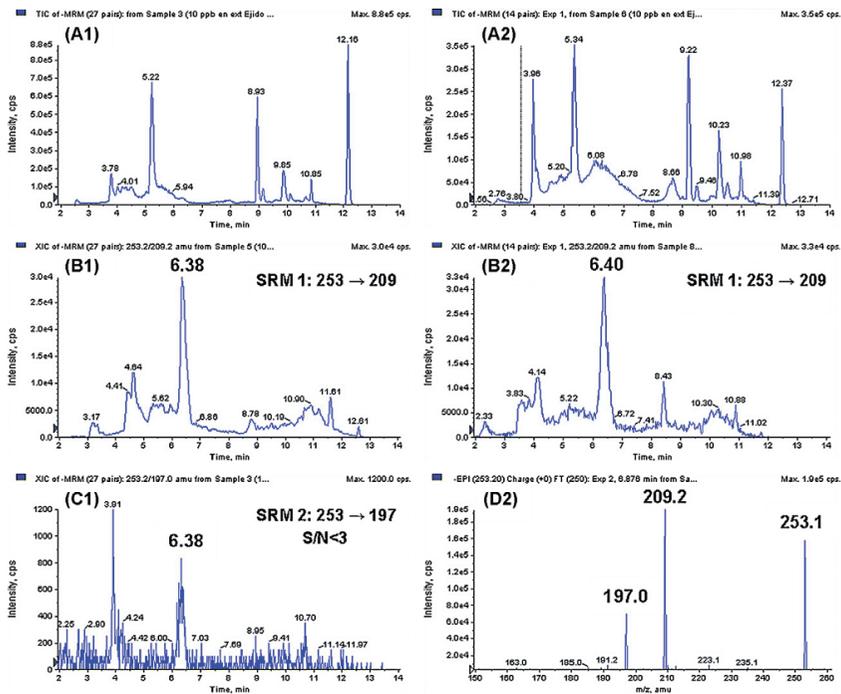
Comparando los dos modos de operación del sistema QqQLIT, se pudo comprobar que el modo SRM proporcionaba excelentes resultados en cuanto a la sensibilidad y selectividad para el análisis cuantitativo de fármacos y drogas de abuso en aguas residuales, pero no era posible realizar la confirmación de aquellos contaminantes que no presentan una segunda transición (caso del ibuprofeno), o cuando no era posible detectar esta segunda transición a bajas concentraciones de analito (caso de la amfetamina y algunos de sus metabolitos). En esos casos, el modo EPI permitió obtener límites de cuantificación de hasta un orden de magnitud inferior. Como se muestra en la siguiente figura (Figura 8), el método SRM no proporcionó una adecuada identificación del compuesto ketoprofen en una muestra de agua residual, debido a la baja intensidad de SRM2, sin embargo, fue posible su confirmación en la misma muestra mediante la aplicación del modo EPI.

Por otra parte, el sistema TOF-MS permitió, además de confirmar compuestos problemáticos con una sola transición o una relación  $SRM2/SRM1 < 0.3$ , llevar a cabo la identificación de otros nuevos contaminantes, mediante análisis retrospectivos. La Figura 9 muestra un ejemplo de identificación de un nuevo compuesto 4-AAA por LC-TOF-MS, inicialmente no incluido en el método de análisis, a través del análisis retrospectivo de una muestra de agua residual.

Por último, el sistema GC-MS permitió la detección de compuestos no polares en muestras de aguas residuales, extraídos mediante LLE. La siguiente figura (Figura 10) muestra la identificación de cinco compuestos de interés en una muestra de agua residual, en modo SIM y un ejemplo del espectro obtenido en SIM para el compuesto octocryleno.



Figura 8. Determinación de ketoprofeno en una muestra de efluente de aguas residuales mediante dos modos de funcionamiento del LC-QTRAP-MS/MS (SRM y EPI) (Martínez-Bueno et al. 2009).



(A) TIC; (B y C) XIC; (D) Espectro de masas del ketoprofeno obtenido mediante el modo EPI



Figura 9. Pasos seguidos en la identificación del compuesto 4-AAA por LC-TOF-MS en una muestra de agua residual: (A) selección del ion (XIC) objetivo de una cierta  $m/z$  ( $\pm 0,02$  uma), (B) obtención de los espectros de masas (C) verificación de la masa exacta y la composición elemental de la molécula y los fragmentos de iones (Martinez-Bueno et al. 2007).

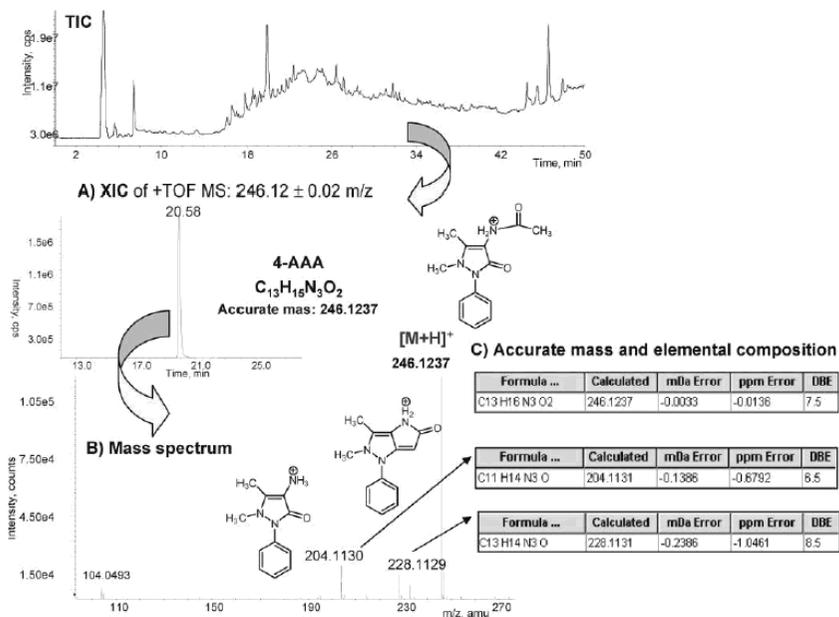
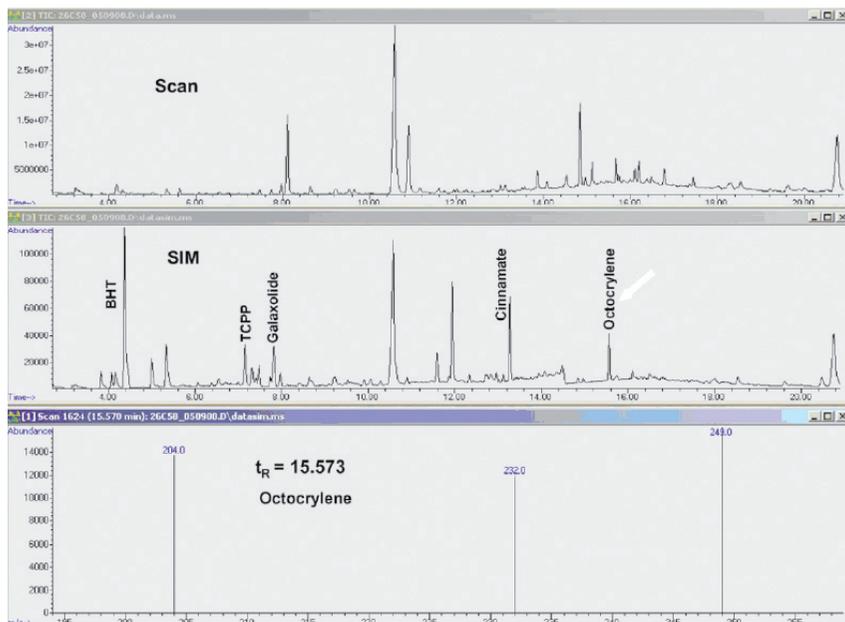




Figura 10. Ejemplo de identificación de 5 compuestos en una muestra de agua residual, mediante GC-MS. Cromatograma en modo SIM y espectro obtenido en SIM para el compuesto octocryleno (Gómez et al. 2009).





## RESULTADOS ANALÍTICOS

Las siguientes tablas (Tabla 6 y 7) recogen los rangos y valores medios de concentración detectados mediante LC-MS y GC-MS, respectivamente, para algunos de los compuestos estudiados en 20 muestras recogidas en cinco EDAR diferentes.

Tabla 6. Resultados obtenidos mediante LC-MS

Compound	positive samples	range (ng L)	mean (ng/L)
paraxanthine	11	131-80875	15001
biphenylol	11	2504-18900	7662
4-aaa	14	2109-25030	7260
caffeine	15	262-24658	5753
ofloxacin	14	217-13426	4422
Hydrochlorothiazide	17	872-14857	3683
4-FAA	14	40-10114	3386
ibuprofen	15	42-10639	2567
gemfibrozil	17	2-28571	2337
4-AA	11	131-9286	2098
naproxen	14	359-4200	1840
atenolol	16	275-4850	1720
ketDrolac	14	13-4070	1289
chlorophene	8	14-2850	1279
nicotine	8	92-7522	1201
paroxethine	1	-	1141
4-MAA	15	9-9253	1051
furosemide	15	155-2957	1050
codeine	15	297-4826	1039
ciprofloxacin	15	40-3353	923
diclofenac	18	6-5922	826
ranitidine	12	144-2722	684
ketoprofen	15	225-954	553
erythromycin	15	106-973	519
indomethacine	16	30-3819	405
flouxethine	10	19-929	398
trimethoprim	14	99-1264	331
antipyrine	11	11-2760	311
sulfamethoxazole	15	91-794	275
omeprazole	11	8-922	247
benzafibrate	18	61-484	233
fenofibric acid	15	14-349	186



Compound	positive samples	range (ng L)	mean (ng/L)
chlorfenvinphos	4	67-238	163
metronidazole	14	41-331	160
diuron	19	2-759	136
mefenamic acid	15	1-554	138
carbamazepine	16	69-273	136
4DAA	1	–	122
Cefotaxime	2	9-151	80
isoproteron	2	47-105	76
metoprolol	7	18-154	61
carbamazepine epoxide	8	13-110	52
acetaminophen	6	11-164	59
propranolol	15	16-100	44
sotalol	10	12-155	36
clofibric acid	16	7-81	27
fenofibrate	1	–	23
simazine	4	9-28	16
diazepam	13	3-87	16
mepivacaine	13	2-40	15
salbutamol	14	5-60	15
terbutaline	7	5-30	15
fenoprophen	1	–	11
atrazine	1	–	9

*Tabla 7. Resultados obtenidos mediante GC-MS*

Compounds	Concentration range (ng/l)	Mean concentration (ng/l)	Frequency(%)
BHT	44–579	216	100
Celestolide	11–30	23	20
Phantolide	13–16	14	15
TCPP	303–2784	920	100
Traseolide	20–22	20	15
Galaxolide	1259–8697	4120	100
Muskxylene	59–203	104	25
Tonalide	56–981	365	100
Musketone	34–218	107	90
4-MBC	42–326	104	50
Benzophenone-3	42–260	93	80
Triclosan	60–719	209	95
2-EHMC	16–177	55	65
Octocrylene	15–70	42	40

# anexo II

## protocolo de técnicas de muestreo y técnicas analíticas de contaminantes emergentes y prioritarios





## Aplicación del protocolo para la evaluación del contenido en contaminantes prioritarios en una finca regada con agua residual tratada en Granada

### TOMA DE LA MUESTRA

Se tomaron muestras de agua superficial y de agua subterránea. Entre las muestras de agua superficial se incluyen muestras de agua de ríos (R). Se trata de muestras de agua tomadas antes de cualquier núcleo urbano, otras afectadas con efluentes de cortijadas próximas al cauce y a lo largo del cauce del Genil, antes de la ciudad de Granada, donde ya ha recibido vertidos de aguas residuales urbanas tratadas y no tratadas, aguas abajo de ambas EDAR de la ciudad, y en el extremo noroeste del acuífero. Las muestras de agua subterránea (S) fueron tomadas en la mayoría de los casos durante bombeo, con la excepción de las muestras de los sondeos de la finca en estudio que se tomaron con tomamuestras. Todas ellas son muestras procedentes del acuífero detrítico (A) de la Vega de Granada. Las muestras fueron tomadas en envases estériles de un litro de vidrio ámbar para el análisis de los compuestos orgánicos y de plástico para el análisis de metales, conservadas en nevera portátil con hielo como máximo tres horas antes de ser congeladas y conservadas en este estado hasta su entrega en el laboratorio.

### COMPUESTOS ANALIZADOS

Para la caracterización de las distintas aguas que se muestrearon, fueron seleccionados un grupo de 64 contaminantes entre los que se incluyó la mayoría de los descritos como sustancias prioritarias según la Directiva 2008/105/CE del parlamento europeo. Además se incluyeron otros analitos como la terbutilazina, Ni, Cu y Cr que se han definido como sustancias prioritarias a nivel estatal.

En la tabla 8 se recogen los compuestos orgánicos analizados por GC-MS/MS y los parámetros analíticos y de validación conseguidos cuando se aplica la LLE.



Tabla 8. Parámetros analíticos y valores de recuperación al aplicar la LLE seguida del análisis por GC-MS/MS.

COMPUESTOS	Linealidad	LOQ (ng L <sup>-1</sup> )	%Recup (15 ng L <sup>-1</sup> )	RSD (%)	%Recup (150 ng L <sup>-1</sup> )	RSD (%)
1,3,5, TCB	0.999	0.21	77.31	8.08	42.95	15.56
1,2,4, TCB	0.999	0.33	88.18	9.88	45.76	9.50
Hexachloro-1,3-butadiene	0.999	0.13	51.97	15.27	31.57	18.97
1,2,3, TCB	0.999	0.30	76.05	10.89	52.5	9.90
Isoproturon	0.993	0.83	41.99	8.52	29.82	13.84
Chlorotoluron	0.998	0.37	54.85	7.25	20.02	17.45
Diuron	0.998	0.16	54.03	12.59	17.49	21.05
Acenaphthylene	0.999	0.15	101.96	4.06	88.22	6.70
Pentachlorobenzene	0.999	0.11	105.35	7.13	72.91	9.24
Fluorene	0.999	0.21	123.36	2.97	79.39	12.80
Trifluralin	0.999	0.13	102.61	4.58	82.73	1.01
Atrazine desethyl	0.998	0.93	52.11	17.01	44.43	19.58
α-HCH	0.999	0.21	106.96	5.84	92.99	5.17
Hexachlorobenzene	0.999	0.15	96.53	3.06	73.88	12.40
Simazine	0.999	2.36	—	—	25.20	15.44
Atrazine	0.997	0.80	74.47	6.10	53.85	9.71
Propazine	0.998	0.46	120.13	3.02	82.10	7.25
β-HCH	0.999	0.75	164.13	7.80	112.72	14.78
δ-HCH	0.999	0.32	94.94	10.76	101.23	12.28
Terbutylazine	0.999	0.95	138.99	3.82	88.81	9.21
Diazinon	0.998	0.26	111.98	5.24	90.47	10.36
Phenanthrene	0.998	0.33	108.11	5.79	74.87	14.10
Anthracene	0.998	0.44	140.66	3.68	84.25	7.93
γ-HCH	0.997	0.45	133.75	3.71	93.65	12.99
Alachlor	0.998	1.11	136.60	2.69	92.67	12.16
Parathion methyl	0.998	1.17	101.71	3.66	102.44	10.11
Heptachlor	0.998	0.17	115.00	5.70	67.10	11.62
Ametryn	0.997	2.45	47.21	19.35	33.46	11.56
Terbutryn	0.997	0.71	104.18	5.10	89.08	15.41
Chlorpyrifos ethyl	0.998	0.15	104.59	16.37	73.83	18.08
Aldrin	0.998	0.84	102.12	7.32	62.09	17.80
Parathion ethyl	0.999	1.03	112.39	5.10	100.90	8.40
Isodrin	0.998	2.17	103.94	5.21	73.01	12.47
Chlorfenvinphos A	0.999	1.20	154.25	8.70	68.80	8.38
Chlorfenvinphos B	0.999	0.17	100.12	5.69	96.63	9.38
Procymidone	0.998	0.21	125.35	4.96	84.40	9.10



COMPUESTOS	Linealidad	LOQ (ng L <sup>-1</sup> )	%Recup (15 ng L <sup>-1</sup> )	RSD (%)	%Recup (150 ng L <sup>-1</sup> )	RSD (%)
Pyrene	0.997	0.12	43.01	20.21	70.85	13.40
α-Endosulfan	0.999	2.55	175.13	7.52	85.57	8.67
4,4'-DDE	0.999	0.20	103.71	6.93	69.44	19.19
Dieldrin	0.996	0.97	88.75	8.21	76.32	7.07
Oxyfluorfen	0.999	0.69	142.31	7.39	90.11	18.00
Endrin	0.998	2.25	98.91	13.66	81.06	11.57
β-Endosulfan	0.998	2.50	119.78	8.81	75.55	9.88
Ethion	0.999	0.24	74.48	4.83	66.60	22.55
Endosulfan sulfate	0.998	2.40	111.29	5.98	69.23	18.17
4,4'-DDT	0.999	0.16	93.87	9.32	69.44	18.45
Iprodione	0.998	1.68	51.67	13.89	56.51	7.68
Benzo(a)anthracene	0.999	0.18	85.29	7.43	62.18	16.24
Chrysene	0.999	0.19	98.91	6.13	86.51	13.46
Metoxychlor	0.998	0.23	94.19	1.42	78.86	17.56
Benzo(k)fluoranthene	0.998	0.16	63.01	7.09	63.74	14.57
Benzo(b)fluoranthene	0.999	0.17	61.61	7.37	64.44	20.42
Benzo(a)pyrene	0.999	0.18	71.29	7.42	57.55	15.41
Deltamethrin	0.998	0.80	—	—	32.13	22.36
Indene(1,2,3-cd)pyrene	0.998	0.14	75.66	4.77	53.96	11.58
Dibenzo(a,h)anthracene	0.999	0.15	76.76	4.09	54.54	11.89
Benzo(ghi)perylene	0.998	0.15	132.44	1.63	52.14	6.84

El método ofrece suficiente sensibilidad para la detección de las sustancias prioritarias a los niveles establecidos en la legislación. Además los valores de recuperación para la mayoría de compuestos se encuentran entre 70% y 120%. Los otros dos métodos de extracción también demostraron ser válidos para este tipo de análisis como se mostró anteriormente en la tabla 4.

## RESULTADOS ANALÍTICOS

Los métodos desarrollados se utilizaron para evaluar muestras de distinto origen (rio, acequia, acuífero) recogidas en la finca objeto de estudio. Los resultados aparecen en la tabla 9.





Analito/ Tratamiento de muestra	Muestras											
	A1	A2	R1	R2	R3	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
Terbutryn/LLE	< LOQ	< LOQ			< LOQ					1.7		
Terbutryn/SPE	< LOQ	< LOQ										
Terbutryn/HS-SPME												
Chloropyrifos/LLE	28.7	24.4	216.4	45.7	22.2	17.2	7.9	7.5	23.7	32.4	23.0	13.2
Chloropyrifos/SPE	14.7	10.1	8.4	19.7	3.6	2.5	1.4	1.9	1.6	4.1	3.6	3.4
Chloropyrifos/HS-SPME	5.0	3.6	1.9	6.0	0.7	1.2	0.7	0.8	1.7		0.8	
Parathion ethyl/LLE			< LOQ									
Parathion ethyl/SPE												
Parathion ethyl/SPME-HS												
Chlorfenvinfos B/LLE												
Chlorfenvinfos B/SPE		2.8	< LOQ									
Chlorfenvinfos B/HS-SPME												

(A) muestra de acuífero; (R) muestra de río; (S) muestra subterránea.

Teniendo en cuenta los límites de detección, el porcentaje de recuperación, la precisión de los distintos métodos y las bajas concentraciones encontradas, se puede concluir que se obtienen resultados coincidentes con los tres tratamientos de muestra desarrollados. Como ejemplo de este hecho se presenta en la figura 11 el cromatograma de las tres transiciones utilizadas para la identificación de Diazinon, un insecticida organofosforado ampliamente utilizado y detectado en muestras de agua (J. C. Moltó et al, 1991). Así mismo se muestra en la figura 12 el cromatograma de las tres transiciones seleccionadas para identificar a la sustancia prioritaria clorpirifos, que también es un insecticida organofosforado que aparece de forma frecuente en muestras de agua (E. Pitarch et al. 2007).

Figura 11. Positivo de Diazinon en una muestra de agua residual tratada mediante a) LLE b) SPE y c) HS-SPME.

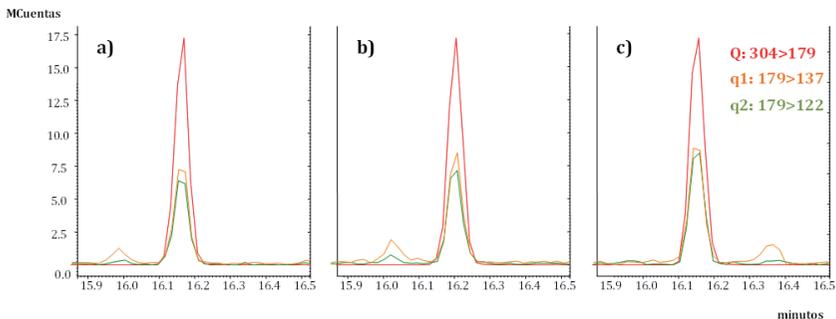
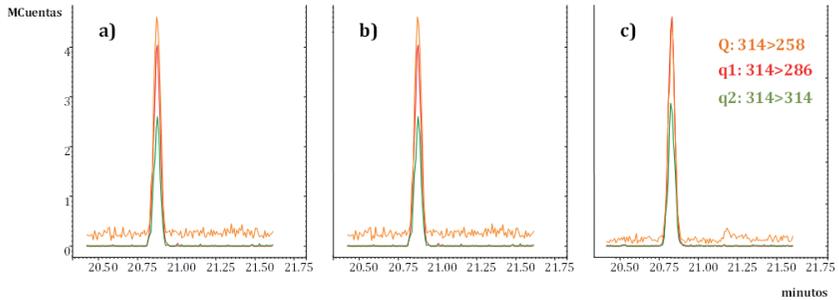




Figura 12. Positivo de Clorpirifos en una muestra de agua residual tratada mediante a) LLE b) SPE y c) HS-SPME.



En general las concentraciones de los contaminantes encontrados en las muestras son bajas del orden de  $\text{ng L}^{-1}$  en el caso de los orgánicos y la concentración de los metales cuyo análisis dio positivo está siempre por debajo de los límites establecidos por la legislación.

# protocolo

de técnicas de  
muestreo y técnicas  
analíticas

de contaminantes  
emergentes y prioritarios



## anexo III. referencias



**Commission Decision (2002/657/EC)** of 12th August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities L221, Brussels, Belgium, 8-36.

**Directiva 91/271/CE del Consejo** de 21 de Mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas (91/271/CE). Diario oficial de las Comunidades Europeas L135/40.

**Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo** de 23 de Octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. Diario oficial de las comunidades europeas L327/1.

**Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo** de 16 de Diciembre de 2008, relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican y derogan ulteriormente las Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE y 86/280/CEE del Consejo y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE. Diario oficial de la Unión Europea L348/84.

**Gómez M.J., Malato O., Ferrer I., Agüera A., Fernández-Alba A.**, 2007a. Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry to evaluate pharmaceuticals in effluents. A pilot monitoring study. *J. Environ. Monit.* 9, 718-729.

**Gómez M.J., Martínez Bueno M.J., Lacorte S., Fernández-Alba A.R., Agüera A.**, 2007b. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere* 66, 993-1002.

**Gómez M.J., Agüera A., Mezcua M., Hurtado J., Mocholí F., Fernández-Alba A.R.**, 2007c. Simultaneous analysis of neutral and acidic pharmaceuticals as well as related compounds by gas chromatography-tandem mass spectrometry in wastewater. *Talanta* 73, 314-320.

**Gómez, M.J., Gómez-Ramos, M.M., Malato, O., Mezcua, M., Fernández-Alba, A.R.**, 2010. Rapid automated screening, identification and quantification of organic micro-contaminants and their main transformation products in wastewater and river waters using liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry with an accurate-mass database. *Journal of Chromatography A* 1217, 7038-7054.

**Martinez-Bueno M.J., Agüera, A., Gómez, M.J., Hernando, M.D., García-Reyes J.F., y Fernández-Alba, A.R.**, 2007. Application of liquid chromatography /quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry to the determination of pharmaceuticals and related contaminants in wastewater. *Analytical Chemistry*, 79, 9372-9384.



- Martínez-Bueno M.J., Agüera, A., Hernando, M.D., Gómez, M.J., y Fernández-Alba, A.R.,** 2009. Evaluation of various liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry operation modes applied to the analysis of organic pollutants in wastewater. *Journal of Chromatography A*, 1216, 5995–6002.
- Martínez Bueno, M.J., Hernando, M.D., Herrera, S., Gómez, M.J., Fernández-Alba, A.R., Bustamante, I., García-Calvo, E.,** 2010. Pilot survey of chemical contaminants from industrial and human activities in river waters of Spain. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 90, 321-343.
- Martínez Bueno, M.J., Uclés, S., Hernando, M.D., Dávoli E., y Fernández-Alba A.R.,** 2011. Evaluation of selected ubiquitous contaminants in the aquatic environment and their transformation products. A pilot study of their removal from a sewage treatment plant. *Water Research*, 45, 2331-2341.
- Moltó, J.C., Picó, Y., Font, T., Mañes, J.,** 1991. Determination of triazines and organophosphorous pesticides in water samples using solid-phase extraction. *JCA*, 555(1991)137-145.
- Real Decreto 60/2011,** de 21 de Enero, sobre las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas. *Boletín oficial del Estado* N° 19, Sec. I, pág. 6854.
- Pitarch, E., Medina, C. Portolés, T., López, F.J., Hernández, F.,** 2006. Determination of priority organic micro-pollutants in water by gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Analytica chimica acta*. 583 (2007) 246-258.
- Ternes, T.A.,** 2001. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 419-434.
- Ternes, T.A, Joss A.,** 2006. *Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrance*. IWA Publishing, London, England.

**editor**

Consolider Tragua

**diseño y maquetación**

base 12 diseño y comunicación

**ISBN**

978-84-695-4039-8

entidades participantes



Universidad de Jaén



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

instituto  
**imdea**  
agua

# protocolo

## de técnicas de muestreo y técnicas analíticas

de contaminantes  
emergentes y prioritarios



[www.consolider-tragua.com](http://www.consolider-tragua.com)