



Universitat de Barcelona  
Facultat de Química  
Departament de Química Analítica



Institut de Diagnosi Ambiental i Estudis de l'aigua (IDÆA)  
Departament de Química Ambiental  
Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC)

# Distribució i comportament de contaminants orgànics prioritaris a la conca hidrogràfica del riu Ebre

Alicia Navarro Ortega

Barcelona, Abril de 2009

# CAPÍTOL 3:

## Programa de vigilància ambiental

---



3.1. Introducció	81
3.2.- Compostos estudiats	82
3.2.1- Hidrocarburs aromàtics policíclics	82
3.2.2- Alquilfenols	84
3.2.3.- Plastificants	85
3.2.4.- Pesticides	87
3.3.- Carcinogènesi i toxicitat dels compostos d'estudi	91
3.4.- Campanyes de presa de mostra	94
3.4.1.- Disseny de la xarxa de presa de mostra	94
3.4.2.- Matrius estudiades i temporalitat de la presa de mostra	97
3.5.- Metodologia analítica	99
3.5.1.- Extracció dels anàlits de les matrius aigua i sediment	99
3.5.2.- Detecció i quantificació per GC-MS	101
3.5.3.- Anàlisi del carboni orgànic total	106
3.5.4.- Control de qualitat	106
<b>Article científic 2: Laboratory intercomparison study for the analysis of nonylphenol and octylphenol in river water</b>	109
3.6.- Discussió addicional a l'article	119
3.6.1.- Organització i incidències de les campanyes de presa de mostra	119
3.6.2.- Anàlisi de les mostres d'aigua i sediments de la conca de l'Ebre	121
3.6.3.- Estudi interlaboratori de presa de mostra i metodologia analítica	123



### 3.1. Introducció

Considerant tota la informació continguda en els capítols anteriors referent a la problemàtica de la contaminació ambiental, reflectida en les pressions que s'exerceixen a la conca del riu Ebre, i a la legislació existent, s'imposa la necessitat de realitzar un programa de vigilància ambiental i així establir un coneixement que permeti la presa de decisions relatives a l'ús i l'impacte dels contaminants orgànics, així com per a una millor gestió de la conca.

La vigilància ambiental consta de tres fases ben diferenciades. La primera es realitza sobre el terreny amb un pla de presa de mostra ben definit i unes eines adequades a les necessitats de l'estudi. La presa de mostra és sense dubte l'etapa del procés analític més susceptible d'error. També és la més difícil de portar a terme per qüestions de logística i influència de factors aliens i la menys valorada per la comunitat científica en general. Les mostres han de ser representatives de la zona o matriu que es vol estudiar, de forma que calen uns criteris que garanteixin la seva repetibilitat espacial i temporal, així com la seva conservació el més inalterada possible fins al moment de l'anàlisi. És per tant necessari dissenyar un protocol de presa de mostra que sigui el més sistemàtic possible i que intenti reduir al mínim els errors de la presa de mostra.

El segon pas es dona en el laboratori amb el processament de les mostres i la seva anàlisi, mitjançant mètodes validats que garanteixin la qualitat de les concentracions obtingudes. Aquesta anàlisi consisteix en un tractament de les mostres per a l'extracció dels contaminants objecte d'estudi i la seva posterior quantificació. Si bé existeixen moltes formes d'analitzar contaminants en mostres mediambientals, per a la realització d'aquesta tesi es van utilitzar metodologies existents al grup, adaptant-les per a l'anàlisi multicomponent tant en aigües com en sediments. Com a instrumentació analítica es va utilitzar GC-MS, que ha demostrat ser, al llarg dels anys, una tècnica molt potent per a l'anàlisi de compostos semivolàtils gràcies a la seva simplicitat, robustesa i cost moderat (*Van der Hoff et al., 1999*). Tots els anàlisis investigats aquí poden ser determinats per GC-MS en concentracions molt per sota dels límits legiscats.

La tercera fase de la vigilància ambiental és la interpretació dels resultats obtinguts. La realització de campanyes de presa de mostra dona lloc a una gran quantitat d'informació, la interpretació de la qual és difícil i les correlacions pràcticament impossibles de detectar a simple

vista. Un tractament matemàtic profund de les dades obtingudes es fa imprescindible. En aquest estudi, a part de l'estadística clàssica univariable es va aplicar el mètode quimiomètric d'Anàlisi de Components Principals (PCA, de l'anglès *Principal Component Analysis*) per a treure el màxim partit dels valors obtinguts en les anàlisis de les mostres.

Les primeres dues fases es descriuen en aquest capítol mentre que la interpretació dels resultats obtinguts està inclosa al capítol 4, específicament en els articles científics 5 i 6, juntament amb altres estudis realitzats a la conca de l'Ebre.

## 3.2.- Compostos estudiats

En base a la legislació europea anteriorment mencionada i tenint en compte els estudis realitzats per la CHE, es van incloure 68 compostos orgànics en el programa de vigilància ambiental. Aquests es poden classificar en diferents grups segons les seves característiques químiques i usos (*Pelish et al., 2003; Cambridge Soft Corporation, 2009*), donant lloc als quatre grans grups que es descriuen a continuació.

### 3.2.1- Hidrocarburs aromàtics policíclics

---

Els PAHs són una important família de contaminants orgànics amb una àmplia distribució al medi ambient. Es produeixen per la combustió incompleta de combustibles fòssils (transports, incineradores, indústria, calefaccions i en menor escala tabac i barbacoes) així com per processos diagènics durant la formació d'aquests combustibles. També es generen en petites quantitats de forma natural degut als focs forestals i possiblement per síntesi microbiològica (*Berset et al., 1999*). Només el naftalè té un aplicació en la fabricació de pesticides, polímers, pintures, tints, etc. Tots aquests compostos estan formats per anells aromàtics, característica que fa que siguin poc polars. Molts d'ells tenen propietats carcinògenes i mutagèniques, especialment els que tenen molts anells aromàtics (*Gad, 2005*). Es poden incorporar a l'organisme per ingestió, inhalació o absorció dèrmica. Als sòls s'acumulen a la matèria orgànica i es biodegraden molt lentament, fet que fa que siguin molt ubics (especialment els més pesats). Es poden bioacumular en plantes (*Ratola et al., 2006*) i en certs organismes com ara els musclos (organismes que són un bioindicador excel·lent de la pol·lució) mentre que en

general els peixos i els animals superiors els metabolitzen (*Broman et al., 1990*). Els PAHs estudiats en aquesta tesi són aquells per als que l'EPA recomana el seu control, degut a la seva elevada toxicitat, i que es recullen a la [Taula 3.1](#).

**Taula 3.1: Relació de PAHs objecte d'estudi**

PAH	Abreviació	CAS	Anells benzènics	Descripció
Naftalè	Naf	91-20-3	2	adjuvant* i base sintètica de pesticides i altres productes industrials; producte de combustió
Acenaftilè	Aci	208-96-8	3	producte de combustió
Acenaftè	Ace	83-82-9	3	producte de combustió
Fluorè	Flu	86-73-7	3	producte de combustió
Fenantrè	Fe	85-01-8	3	producte de combustió
Antracè	Ant	120-12-7	3	producte de combustió
Fluorantè	Flut	206-44-00	4	producte de combustió
Pirè	Pir	129-00-0	4	producte de combustió
Benzo(a)antracè	BaA	56-55-3	4	producte de combustió
Crisè	Cri	218-01-9	4	producte de combustió
Benzo(b)fluorantè	BbF	205-99-2	5	producte de combustió
Benzo(k)fluorantè	BkF	207-08-9	5	producte de combustió
Benzo(a)pirè	BaP	50-32-8	5	producte de combustió
Indè(1,2,3-cd)pirè	IcdP	193-39-5	6	producte de combustió
Dibenzo(a,h)antracè	DahA	53-70-3	5	producte de combustió
Benzo(g,h,i)perilè	BghiP	191-24-2	6	producte de combustió

\* Substància que potencia l'efecte d'un pesticida

Font: adaptació de A. Hildebrandt (2009)

Els PAHs poden ser transportats llargues distàncies i s'han mesurat concentracions atmosfèriques a llocs remots, de forma que es consideren contaminants ubics als que tothom hi pot estar exposat. Però el sector amb més risc per aquests compostos, que generalment apareixen com una barreja i no com un únic compost, són els treballadors de certs sectors com la producció de carbó, les refineries de petroli, la incineració de residus o la producció de ferro o acer (*Centers for Disease Control and Prevention, 2005*). De fet les primeres evidències de l'exposició a PAHs es van donar el 1775 quan el cirurgià Sir Percival Pott va observar que el

càncer d'escrot tenia una incidència molt més alta entre els escura-xemeneies que entre la resta de la població. El 1875, von Volkman també va observar una major incidència de càncer de pell en els treballadors d'una indústria de quitrà (*Bostrom et al., 2002*). A part de la relació entre PAHs i càncer de pulmó o pell que s'ha observat en treballadors que pateixen una exposició major que la població general (*Lloyd, 1971; Redmond et al., 1976; Boffetta et al., 1997; Armstrong et al., 2004*), també s'ha vist que aquesta exposició pot afectar el sistema immunitari (*Li et al., 2003*) i reduir el creixement fetal (*Dejmek et al., 2000; Perera et al., 2003*).

Una de les formes de mesurar l'exposició de PAHs en humans és la quantificació dels metabòlits urinaris, quasi sempre en la forma hidroxilada. El pirè es troba generalment a totes les barreges de PAHs, de forma que els nivells d'1-hidroxi-1-pirè en orina s'han utilitzat àmpliament com a indicadors de l'exposició humana a PAHs. S'han trobat nivells més alts en residents de zones industrialitzades en comparació amb zones rurals (*Kanoh et al., 1993; Kuo et al., 2004*). De la mateixa manera l'1-hidroxi-1-pirè presenta nivells més alts en fumadors (*Heudorf et al., 2001; Chuang et al., 2003*) i fins i tot en fills no fumadors de pares fumadors (*Tsai et al., 2003*).

### 3.2.2- Alquilfenols

---

Els APs són productes de degradació dels alquilfenols etoxilats (APEOs, de l'anglès *alkylphenols ethoxylates*), que són surfactants no iònics. També s'utilitzen com a adjuvants de pesticides, ja que són capaços de reduir la tensió superficial de l'aigua i així potenciar el contacte entre el principi actiu del pesticida i l'organisme biològic. Per aquesta raó, un cop al medi poden potenciar la mobilitat i disponibilitat d'altres contaminants. La producció global de APEOs va ser de més de 500.000 el 2002 (*Ying et al., 2002*) i s'utilitzen majoritàriament com a detergents, dispersants i antiespumants (*Petrovic et al., 2002a*). Estan inclosos dins del grup dels disruptors endocrins\* (*Servos, 1999*) i són importants en termes d'impacte ecotoxicològic degut al seu ús massiu i a l'àmplia presència en el medi. Són compostos tòxics, bioacumulables i persistents en el medi aquàtic (*Díaz et al., 2002*), també estan presents en peixos i en fangs de depuradora (*Inoue et al., 2003*). En aquest estudi es van incloure el NP i l'octilfenol (OP, de l'anglès *octylphenol*) (*Taula 3.2*), considerats més persistents, lipofílics i bioacumulables que

---

\* Compostos que imiten o n'agonitzen els efectes d'hormones com els estrògens o els andrògens o interrompen la síntesi i el metabolisme d'aquestes.

els seus precursors. Mentre que el NP es troba com una barreja d'isòmers de 4-NP amb diferent disposició de les branques de la cadena de 9 carbonis, l'OP només s'utilitza en la forma 4-tert-OP.

**Taula 3.2: Relació d'APs objecte d'estudi**

Alquilfenol	Abreviació	CAS	Família	Descripció
4-nonilfenol	NP	84852-15-3	Alquilfenol	degradació dels nonilfenols polietoxilats; barreja d'isòmers; adjuvant de pesticides i altres productes industrials
4-tert-octilfenol	OP	140-66-9	Alquilfenol	degradació dels octilfenols polietoxilats

Font: adaptació de A. Hildebrandt (2009)

La primera evidència que els APs podien ser disruptors endocrins va ser publicada el 1938 (Dodds *et al.*, 1938) però no va ser fins el 1991 (Soto *et al.*, 1991) quan accidentalment es va observar que el NP era capaç d'iniciar la proliferació de cèl·lules tumorals. El NP s'ha trobat a tots els compartiments ambientals. A l'aire en un estudi a la costa de *New York* es van trobar concentracions entre 2.2 i 70 ng m<sup>-3</sup> (Dachs *et al.*, 1999) i a *United Kingdom* els nivells de NP trobats durant un estudi a aigües d'entrada i de sortida de varies EDARs van ser de fins a 330 µg L<sup>-1</sup> (Solé *et al.*, 2000). El fet que els APs es trobin a les EDARs suposa una entrada d'aquests contaminants als rius, on s'han trobat entre 12 i 95 µg L<sup>-1</sup> a aigües d'USA (Ahel *et al.*, 2000) i entre 30 i 13.000 µg kg<sup>-1</sup> de NP i 3 i 670 µg kg<sup>-1</sup> d'OP a sediments del *Nippon* (Isobe *et al.*, 2001), així com concentracions de NP a sòls fertilitzats amb fangs de depuradora de fins a 1.600 µg kg<sup>-1</sup> (Falkenberg *et al.*, 2003). De fet, un estudi de 95 contaminants en 139 rius d'USA portat a terme durant 1999-2000 va revelar que el NP era un dels contaminants més ubics i amb unes concentracions més elevades respecte la resta de substàncies analitzades (Kolpin *et al.*, 2002). De forma que no és d'estranyar que el NP s'hagi detectat fins i tot en carn de porc, pollastre i vedella entre 500 i 670 µg kg<sup>-1</sup> (Ramarathnam *et al.*, 1993a; Ramarathnam *et al.*, 1993b) degut a la neteja de la carn durant el seu processament.

### 3.2.3.- Plastificants

Es van agrupar amb aquest nom el bisfenol A (BPA, de l'anglès *bisphenol A*) i el tri-n-butilfosfat (TBP, de l'anglès *tributhylphosphate*), degut al seu ús comú en la fabricació de plàstics,



a part d'altres utilitats específiques de cadascun d'ells, tot i que químicament no pertanyen a la mateixa família (Taula 3.3). El BPA és un fenol que es troba en contacte continu amb l'home degut a la seva àmplia utilització i també ha sigut reconegut com a disruptor endocrí. El seu principal ús és com a monòmer de la síntesi de plàstics de policarbonat i resines epoxi, però també s'utilitza com a antioxidant de plàstics, en la fabricació de retardants de flama i temps endarrere com a fungicida.

El TBP és una barreja d'isòmers de la família dels organofosforats que s'utilitza en la fabricació de plàstics i resines de vinil, a més de com a dissolvent en moltes formulacions líquides de pesticides, de lubricants i com a antiespumant en la fabricació del formigó. En alguns casos també s'utilitza com a retardant de flama (Andresen et al., 2004). El TBP està considerat com a neurotòxic per l'Organització Mundial de la Salut (World Health Organisation, 1991).

**Taula 3.3: Relació de plastificants objecte d'estudi**

Plastificant	Abreviació	CAS	Família	Descripció
Bisfenol A	BPA	80-05-7	Fenol	Síntesi de plàstics; retardants de flama
Tri-n-butilfosfat	TBF	126-73-8	Organofosforat	Síntesi de plàstics; dissolvent de pesticides

Font: adaptació de A. Hildebrandt (2009)

La literatura existent sobre aquests dos compostos no és molt àmplia. Per al BPA hi ha alguns estudis que conclouen que la rellevància d'aquest compost en la salut humana no està clara (Dekant et al., 2008), degut a la seva feble activitat com a disruptor endocrí. Els estudis trobats estan centrats en efectes sobre animals, com per exemple l'estudi de l'exposició a 1 mg L<sup>-1</sup> de BPA que va provocar en organismes d'aigua dolça i salada un engrandiment de les glàndules sexuals i un augment en la producció d'òcits (Oehlmann et al., 2000) o la feminització dels capgrossos de *Xenopus laevis* quan la dosi de BPA era més gran que 2,24 mg L<sup>-1</sup> (Levy et al., 2004). El TBP apareix en els articles científics més com a part de la metodologia analítica que en estudis sobre el seu comportament com a contaminant. En els pocs articles que l'analitzen s'ha detectat en mostres de deposició atmosfèrica a Sierra Nevada (Aston et al., 1996) i a l'aire i la pols de l'interior de les cases (Carlsson et al., 1997; Marklund et al., 2003).

### 3.2.4.- Pesticides

D'entre els grups de compostos considerats en aquesta tesi, aquest és el més ampli, de forma que se li dedicarà una atenció especial. Els pesticides són compostos dissenyats per a inhibir o destruir la proliferació d'aquells organismes vius que poden influir negativament en l'activitat humana. L'home els utilitza per a frenar qualsevol expansió anòmala dels organismes que l'envolten, ja siguin animals o vegetals. Aquests compostos simulen biotransmissors, de forma que poden influir directament sobre el biosistema de l'element hostil. Atès que estan destinats a destruir formes de vida, sovint afecten a altres organismes per als que no estaven inicialment destinats, arribant fins i tot a incidir en l'home. A part de la toxicitat aguda que produeixen, alguns pesticides poden ocasionar efectes de disrupció endocrina, activitat cancerígena o teratògena, lesions hepàtiques, cardiovasculars i oculars, entre altres (Igbedi, 1991; Ritter *et al.*, 1995).

Una de les formes de classificació d'aquests compostos es basa en el tipus de grup perniciós al que es dirigeixen: els insecticides serveixen per a controlar plagues d'insectes, els nematocides per al control de nematodes (cucs parasitaris), els herbicides per al control de les anomenades "males herbes", els fungicides per al control de fongs, etc. Els mecanismes d'acció són molt diversos, però la gran majoria d'insecticides actuen directament sobre el sistema nerviós o el metabolisme hormonal animal i els herbicides inhibint la fotosíntesi, la divisió cel·lular o altres processos enzimàtics vegetals. Per altra banda també es poden classificar segons la família química a la qual pertanyen, classificació que permet pronosticar el seu comportament fisicoquímic i la seva activitat biològica. Els grans grups es subdivideixen en petites famílies segons els grups funcionals de les seves estructures. Existeixen multitud de famílies químiques entre els pesticides, aquí enumerarem només aquelles a les que pertanyen els pesticides d'estudi:

~ **Pesticides organoclorats:** s'agrupen sota aquest nom els pesticides que tenen una o més molècules de clor en la seva formulació. Pràcticament tots tenen activitat insecticida. Actuen trastornant les cinètiques iòniques de les bombes de sodi-potasi. Es troben àmpliament distribuïts al medi degut a la seva semivolatilitat, a la tendència per acumular-se en teixits orgànics gràcies al seu caràcter lipofílic i a la seva persistència a la degradació. Un cop es troben

al medi ambient poden ser transportats llargues distàncies i passar per diversos cicles bioquímics sense que es degradin; per altra banda també és coneguda la seva biomagnificació i la seva alta toxicitat (*Vives et al., 2002*). Per això, tot i que la gran majoria ja estan prohibits, encara es podem trobar al medi.

~ **Pesticides polars:** En contraposició als pesticides organoclorats, la resta de famílies de pesticides estudiades s'agrupen en aquesta tesi sota el nom de pesticides polars, ja que presenten una polaritat més elevada que els pesticides organoclorats. Així en el medi es troben preferentment associats a l'aigua i tenen una persistència (vida mitja) molt baixa. Igualment, el seu ús a l'agricultura està molt més estès en l'actualitat per la prohibició dels pesticides organoclorats.

- **Organofosforats:** en la seva majoria són insecticides que inhibeixen la transmissió de l'impuls nerviós degut a la fosforilació de l'enzim acetilcolinesterasa.
- **Triazines:** són herbicides amb una base heterocíclica aromàtica inhibidors de la fotosíntesi. Històricament s'han utilitzat molt en l'agricultura.
- **Dinitroanilines:** inhibeixen el creixement actuant sobre la divisió cel·lular. També poden interferir en la fotosíntesi i en la respiració de les plantes.
- **Amides:** les dues subfamílies més nombroses són les **cloroacetanilides**, que inhibeixen la divisió cel·lular, i les **acetanilides**, que inhibeixen la fotosíntesi.
- **Tiocabamats:** estan formats per una combinació d'estructures de carbamats unides per ponts de disulfur amb una activitat quasi exclusiva contra els fongs. Igual que en el cas dels organofosforats, actuen mitjançant la inhibició de l'enzim acetilcolinesterasa.

Els pesticides estudiats es van escollir en base a la legislació europea discutida a l'apartat 1.3, que considera la seva importància tant des del punt de vista de la seva utilització com per la seva toxicitat i persistència. La llista dels pesticides estudiats es mostra a la [Taula 3.4](#).

Taula 3.4: Relació de pesticides objecte d'estudi

Pesticida	CAS	Família	Descripció
Aldrina	309-00-2	Organoclorat	Insecticida
Dieldrina	60-57-1	Organoclorat	Insecticida
Endrina	72-20-8	Organoclorat	Insecticida
Endrina aldehid	7421-93-4	Organoclorat	Degradació de l'endrina
Isodrina	465-73-6	Organoclorat	Insecticida
2,4'-DDT	789-02-6	Organoclorat	Insecticida, isòmer del DDT
4,4'-DDT	50-29-3	Organoclorat	Insecticida, isòmer del DDT
2,4'-DDE	3424-82-6	Organoclorat	Degradació del DDT
4,4'-DDE	72-55-9	Organoclorat	Degradació del DDT
2,4'-DDD	53-19-0	Organoclorat	Degradació del DDT
4,4'-DDD	72-54-8	Organoclorat	Degradació del DDT
$\alpha$ -endosulfan	959-98-8	Organoclorat	Insecticida, isòmer de l'end.
$\beta$ -endosulfan	33213-65-9	Organoclorat	Insecticida, isòmer de l'end.
Endosulfan-sulfat	1031-07-8	Organoclorat	Degradació de l'endosulfan
Heptaclor	76-44-8	Organoclorat	Insecticida
Heptaclor-endo-epòxid	28044-83-9	Organoclorat	Degradació de l'heptaclor
Heptaclor-exo-epòxid	1024-57-3	Organoclorat	Degradació de l'heptaclor
Hexaclorobenzè	118-74-1	Organoclorat	Insecticida
$\alpha$ -HCH	319-84-6	Organoclorat	Insecticida, isòmer de l'HCH
$\beta$ -HCH	319-85-7	Organoclorat	Insecticida, isòmer de l'HCH
$\gamma$ -HCH	58-89-9	Organoclorat	Insecticida, isòmer de l'HCH
$\delta$ -HCH	319-86-8	Organoclorat	Insecticida, isòmer de l'HCH
Molinat	2212-67-1	Tiocarbamat	Herbicida
Propanil	709-98-8	Acetanilida	Herbicida
Trifluralina	1582-09-8	Dinitroanilina	Herbicida
Alaclor	15972-60-8	Cloroacetanilida	Herbicida
Metolaclor	51218-45-2	Cloroacetanilida	Herbicida
Atrazina	1912-24-9	Triazina	Herbicida
Desetilatraxina	6190-65-4	Triazina	Degradació de l'atraxina
Propazina	139-40-2	Triazina	Herbicida
Simazina	122-34-9	Triazina	Herbicida
Terbutilazina	5915-41-3	Triazina	Herbicida

(segueix)

Pesticida	CAS	Família	Descripció
Terbutrina	886-50-0	Triazina	Herbicida
Azinfos-etil	2642-71-9	Organofosforat	Insecticida
Bromofos-etil	4824-78-6	Organofosforat	Insecticida
Bromofos-metil	2104-96-3	Organofosforat	Insecticida
Clorfenvinòs	470-90-6	Organofosforat	Insecticida
Clorpirifòs	2921-88-2	Organofosforat	Insecticida
Diazinon	333-41-5	Organofosforat	Insecticida
Diclofention	97-17-6	Organofosforat	Insecticida
Dimetoat	60-51-5	Organofosforat	Insecticida
Etion	563-12-2	Organofosforat	Insecticida
Fenclorfos	299-84-3	Organofosforat	Insecticida
Fenitrocion	122-14-5	Organofosforat	Insecticida
Malation	121-75-5	Organofosforat	Insecticida
Ometoat	1113-02-6	Organofosforat	Insecticida
Paration-etil	56-38-2	Organofosforat	Insecticida
Paration-metil	298-00-0	Organofosforat	Insecticida

Font: adaptada de A. Hildebrandt (2009)

L'abús en la utilització de pesticides ha donat lloc a una contaminació dels sòls que al seu torn ha contaminat les aigües subterrànies i les superficials. En conseqüència, la irrigació dels camps, l'abeuratge dels animals així com la seva alimentació i la nostra es veuen involucrats en el cicle de distribució dels pesticides. En molts casos aquests pesticides es degraden ràpidament en el medi ambient però també és cert que els seus productes de degradació poden ser tant o més persistents i tòxics que els seus precursors (*Pehkonen et al., 2002*).

L'home es veu afectat pels trastorns que ocasionen els pesticides i en particular aquells destinats al control d'insectes i rosegadors. Per exemple, el 100% de la població dels USA tenia el 1970 nivells detectables de  $\beta$ -HCH en els teixits adiposos (*Kutz et al., 1992*). Una altra estadística preocupant és que després d'una sola aplicació de DDT per a controlar l'extensió de la malària, els nivells de DDT en sang eren, un any després, set cops majors en la població afectada respecte a una població comparable no exposada (*Dua et al., 1996*). A principis dels anys 80 es va utilitzar heptaclor per a tractar els cultius de pinya a *Hawaii* i les fulles de la pinya es van utilitzar per a alimentar vaques lleteres. La llet produïda estava contaminada amb

heptaclor i part de la població va patir una contaminació severa fins el punt que la llet materna de les dones lactants va presentar nivells d'heptaclor-epoxi (*Takahashi et al., 1982*). Des d'un punt de vista ambiental, són innumerables les notícies sobre toxicitat de pesticides en flora i fauna. El pantà de *Iznájar* a *Andalucía* va ser contaminat el 2005 per l'herbicida terbutilazina per sobre del límit legal per a consum humà, com a conseqüència 250.000 persones es van veure afectades i no van poder consumir aigua de l'aixeta.

### 3.3.- Carcinogènesi i toxicitat dels compostos d'estudi

Com s'ha vist en els apartats anteriors, una de les característiques dels compostos que els fa més perjudicials per a l'home i que és una de les raons de la seva inclusió en aquest estudi és la seva activitat carcinògena, és a dir, la capacitat que tenen determinats compostos per a provocar o afavorir l'aparició del càncer. L'Agència Internacional per a la Recerca del Càncer (IARC, de l'anglès *International Agency for Research of Cancer*) ha establert una classificació dels compostos químics en 5 grups (*IARC, 2008*) segons el seu potencial cancerigen. Fins a l'actualitat ha classificat 935 substàncies en les categories que es descriuen a continuació, on s'indica entre parèntesis la quantitat de substàncies incloses a cadascuna d'elles:

- **Grup 1:** Cancerigen per a humans (105).
- **Grup 2A:** Probablement cancerigen per a humans (66).
- **Grup 2B:** Possiblement cancerigen per a humans (248).
- **Grup 3:** No classificable com a cancerigen per a humans (515).
- **Grup 4:** Probablement no cancerigen per a humans (1).

La [Taula 3.5](#) mostra la classificació de les substàncies d'estudi segons les 5 categories de l'IARC. De les 68 substàncies incloses en aquest estudi, l'IARC ha estudiat el potencial cancerigen de 31. D'elles, 16 no es poden classificar com a cancerígens, entre altres els pesticides polars estudiats i alguns dels PAHs més lleugers, però de les altres 15, n'hi ha 13 que són possiblement cancerígenes per a humans (pesticides organoclorats i alguns dels PAHs). El dibenzo(a,h)antracè és probablement cancerigen i per al benzo(a)pirè està demostrada la seva carcinogènesi.

**Taula 3.5: Classificació dels compostos estudiats segons els grups de l'IARC**

1	2A	2B	3	4
Benzo(a)pirè	Dibenzo(a,h)antracè	Naftalè	Acenaftè	
		Benzo(a)antracè	Fluorè	
		Crisè	Fenantrè	
		Benzo(b)fluorantè	Antracè	
		Benzo(k)fluorantè	Fluorantè	
		Indè(1,2,3-cd)pirè	Pirè	
		4,4'-DDT	Benzo(g,h,i)perilè	
		Heptaclor	Aldrina	
		HCB	Dieldrina	
		$\alpha$ -HCH	Endrina	
		$\beta$ -HCH	Trifluralina	
		$\gamma$ -HCH	Atrazina	
		$\delta$ -HCH	Simazina	
			Malation	
			Paration-etil	
			Paration-metil	

Font: IARC i elaboració pròpia (2008)

Una altra de les característiques a tenir en compte per a poder conèixer el perjudici que aquests compostos poden causar en l'home i la fauna és la seva toxicitat. Hi ha moltes formes de mesurar la toxicitat d'un compost, però potser una de les més utilitzades és la dosi letal (DL). La DL indica els mil·ligrams d'una substància necessaris per kilogram d'un animal per a matar-lo. Ja que la resistència a una substància pot variar d'un individu a un altre, normalment la DL s'expressa com la dosi en la que mor un percentatge concret de la població estudiada. Altres factors que fan variar la DL són l'organisme examinat així com la via d'entrada al cos. Per tal de fer possible la comparació entre la toxicitat dels diferents compostos estudiats es va considerar, per ser una de les mesures més corrents, la DL<sub>50</sub> per via oral en rates, és a dir, la dosi letal mitjana, mesurada en mg kg<sup>-1</sup> de pes de l'animal, que causa la mort per la toxicitat aguda per ingestió a la meitat d'un grup de rates albines adultes joves en un termini de 14 dies. Aquesta mesura permet comparar la toxicitat dels diferents compostos i es recull a la [Taula 3.6](#).

**Taula 3.6: DL<sub>50</sub> per via oral en rates per als compostos objecte d'estudi**

Compost	DL <sub>50</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	Compost	DL <sub>50</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )
Paration-etil	2 / 3,6 / 13 <sup>1</sup>	Fenitrotion	250 / 570 / 800 <sup>1</sup>
Isodrina	7 / 15,5 <sup>2</sup>	Malation	290 / 1.000 / 1.375 <sup>1</sup>
Endrina	7,5 / 17,8 <sup>2</sup>	Propanil	367 / 1.285 / 1.383 / 1.483 <sup>1</sup>
Clorfenvinfòs	9,6 / 10 <sup>1</sup>	Molinat	369 <sup>1</sup>
Etion	13 / 27 / 65 <sup>1</sup>	Fenclofos	625 / 1.250 / 2.630 <sup>1</sup>
Paration-metil	14 / 24 <sup>3</sup>	Atrazina	672 <sup>1</sup>
Heptaclor-exo-epòxid	15 <sup>1</sup>	4,4'-DDE	880 / 1.240 <sup>2</sup>
Ometoat	25 <sup>4</sup>	Alaclor	930 / 1.200 <sup>1</sup>
Dieldrina	38,3 / 46 <sup>1</sup>	Simazina	971 <sup>1</sup>
Aldrina	39 / 60 <sup>1</sup>	Terbutilazina	1.845 / 2.160 <sup>1</sup>
Heptaclor	40 / 100 / 162 <sup>1</sup>	Fluorantè	2.000 <sup>8</sup>
Dimetoat	60 / 250 / 290 / 325 <sup>1</sup>	Terbutrina	2.045 <sup>1</sup>
Diazinon	66 / 300 / 400 <sup>1</sup>	Metolaclor	2.200 <sup>1</sup>
Clorpirifòs	82 / 135 / 145 / 163 <sup>1</sup>	Naftalè	2.200 / 2.400 <sup>9</sup>
4,4'-DDT	87 / 113 / 118 <sup>1</sup>	Trifluralina	>5.000 <sup>7</sup>
γ-HCH	88 / 125 / 230 <sup>5</sup>	Propazina	>5.000 / >7.000 <sup>1</sup>
Bromofos-etil	107 <sup>6</sup>	Acenaftè	10.000 <sup>10</sup>
4,4'-DDD	113 <sup>1</sup>	HCB	>10.000 <sup>5</sup>
Diclofention	172 / 185 <sup>7</sup>		

<sup>1</sup>(Milne, 1995)<sup>4</sup>(FAO, 1996)<sup>7</sup>(Gaines et al., 1986)<sup>9</sup>(Gaines, 1969)<sup>2</sup>(Gaines, 1960)<sup>5</sup>(GTZ, 1995)<sup>8</sup>(Smyth et al., 1962)<sup>10</sup>(Knobloch et al., 1969)<sup>3</sup>(Uzunhisarcikli et al., 2007 )<sup>6</sup>(Muacevic, 1973)

Font: diversos estudis (2007)

Es va trobar la DL<sub>50</sub> per a 37 dels compostos d'estudi i en la major part dels casos més d'un valor. Això es deu a que són valors experimentals i per això diferents estudis poden donar lloc a DLs diferents segons les característiques de la població estudiada. A la Taula 3.6 es van ordenar els compostos segons el DL més baix que es va trobar, donant una idea així de la gradació de la toxicitat dels compostos estudiats. Les mesures de toxicitat es centren bàsicament en els pesticides, que són els compostos susceptibles de crear toxicitat aguda ja que estan dissenyats amb aquest propòsit, i deixen de banda la major part dels PAHs, els isòmers d'un mateix compost i els productes d'ús industrial. Segons la taula es veu com el compost més tòxic és el paration-etil, que té una DL<sub>50</sub> de només 2 mg kg<sup>-1</sup>, seguit de compostos organoclorats com les endrines, per als que l'isodrina és el que presenta més toxicitat i l'aldrina el que menys.



L'heptaclor-exo-epòxid, producte de degradació de l'heptaclor, presenta una toxicitat major que aquest últim com passa en molts casos amb els productes de degradació. En el cas dels DDTs, el 4,4'-DDT és el congènere amb una toxicitat més elevada (113 mg kg<sup>-1</sup>). Cal destacar l'HCB, també pesticida organoclorat però amb una toxicitat molt baixa, ja que la seva DL és més gran de 10.000 mg kg<sup>-1</sup>. Pel que fa als pesticides polars, a part del paration-etil, altres com el clorfenvinfòs, l'etion, el paration-metil o l'ometoat presenten toxicitat molt elevada entre 9,6 i 65 mg kg<sup>-1</sup>. Per altra banda, la família de les triazines, àmpliament utilitzada en l'agricultura espanyola, presenta una toxicitat molt més baixa, sent l'atrazina el compost més tòxic d'aquesta família, amb una DL<sub>50</sub> de 672 mg kg<sup>-1</sup>.

## 3.4.- Campanyes de presa de mostra

### 3.4.1.- Disseny de la xarxa de presa de mostra

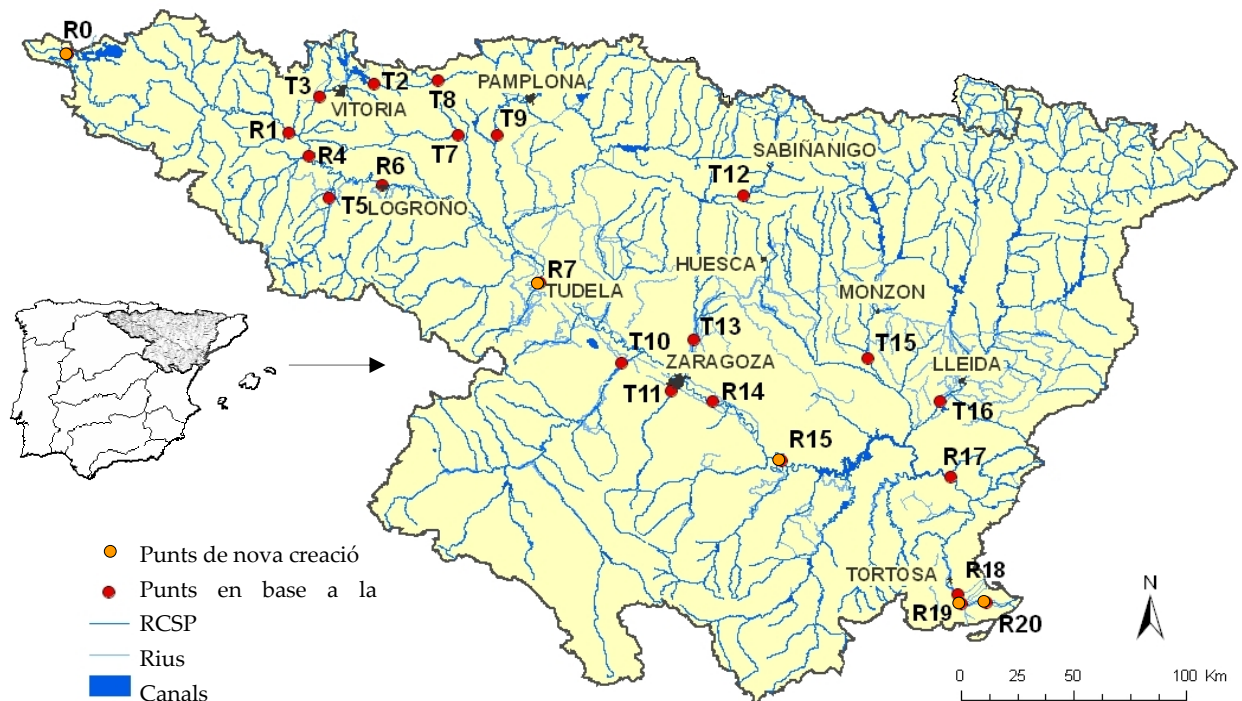
En aquest estudi es van incloure 23 punts de presa de mostra repartits al llarg de tota la conca de l'Ebre. D'aquests punts, 11 estan situats en el curs del riu Ebre i els altres 12 es troben en algun dels seus afluents. Aquesta xarxa es va dissenyar en base a la RCSP de la CHE, que actualment inclou 18 punts de presa de mostra (URS, 2003). Es van incloure aquests 18 punts, ja que estan situats a zones de risc per ser potencials focus d'emissió de substàncies perilloses ja sigui degut a impactes urbans, agrícoles o industrials. A més a més d'aquesta manera es va poder fer una comparació entre les dades històriques existents així com una intercomparació dels valors obtinguts de les campanyes de la CHE i les d'aquest estudi en sediments dels anys 2004-2006.

Pel que fa a la identificació dels punts de presa de mostra, els codis segons la CHE segueixen l'ordre cronològic en el que aquests punts es van afegir a la RCSP. Aquesta nomenclatura resulta confusa a més de no donar cap informació de la situació dels punts. Per això es va adoptar una altra que divideix els punts entre els que estan situats al riu Ebre (R, de l'anglès *river*) i els que estan situats a algun dels seus afluents (T, de l'anglès *tributary*) seguit d'un número correlatiu seguint la direcció de l'Ebre, és a dir de nord-oest a sud-est. Per a la numeració dels punts situats als afluents es va considerar el punt en que l'afluent desemboca al

riu Ebre. Després d'una primera campanya realitzada per a la CHE, inclosa en l'apartat d'anàlisi de dades històriques (apartat 4.2 i article científic 3), i en la que ja s'havia adoptat la nova nomenclatura, es van afegir diversos punts per tal de millorar la RCSP en zones on hi havia una manca de control:

- ~ **Naixement de l'Ebre:** inicialment seleccionat per a actuar com a blanc.
- ~ **Delta de l'Ebre:** dos punts, un a Amposta i l'altre a Deltebre.
- ~ **Zones que quedaven poc caracteritzades:** Tudela i Sástago.

Per tal de no modificar la nomenclatura establerta, aquests nous punts es van numerar seguint el mateix esquema, fet que va generar la repetició d'alguns números però amb una lletra diferent, de forma que no dona peu a confusió, però sí a que la xarxa tingui 23 punts i la numeració vagi del 0 al 20. El llistat dels punts de presa de mostra així com la seva situació i la correspondència amb la nomenclatura de la RCSP de la CHE es descriu a la [Taula 3.7](#) i la [Figura 3.1](#). Així mateix l'annex A recull una descripció detallada de tots els punts de presa de mostra.



Font: M. Terrado (2009)

**Figura 3.1:** Mapa de situació dels punts de presa de mostra

Taula 3.7: Descripció dels punts de presa de mostra

Descripció del punt de presa de mostra	AquaTerra			RCSP		
	Codi	Lat.	Long.	Codi*	Lat.	Long.
Ebre a <i>Reinosa (Cantabria)</i>	<b>R0</b>	42.999N	4.153O	-		
Ebre a <i>Miranda de Ebro (Burgos)</i>	<b>R1</b>	42.684N	2.951O	SP7.1	42.690N	2.954O
<i>Zadorra a Audinaka (Araba)</i>	<b>T2</b>	42.884N	2.486O	<u>SP18</u>	42.874N	2.442O
<i>Zadorra a Villodas (Araba)</i>	<b>T3</b>	42.833N	2.783O	SP8	42.836N	2.782O
Ebre a <i>Haro (La Rioja)</i>	<b>R4</b>	42.589N	2.842O	SP11	42.591N	2.839O
<i>Najerilla a Nájera (La Rioja)</i>	<b>T5</b>	42.418N	2.733O	SP17	42.425N	2.729O
Ebre a <i>Logroño (La Rioja)</i>	<b>R6</b>	42.470N	2.444O	<u>SP12</u>	42.471N	2.378O
<i>Ega a Estella (Navarra)</i>	<b>T7</b>	42.669N	2.031O	<u>SP13</u>	42.634N	1.993O
Ebre a <i>Tudela (Navarra)</i>	<b>R7</b>	42.067N	1.601O	-		
<i>Araquil a Alsasua (Navarra)</i>	<b>T8</b>	42.895N	2.135O	SP10	42.897N	2.134O
<i>Arga a Puente la Reina (Navarra)</i>	<b>T9</b>	42.671N	1.819O	SP6	42.672N	1.817O
<i>Jalón a Grisén (Zaragoza)</i>	<b>T10</b>	41.734N	1.175O	<u>SP16</u>	41.747N	1.144O
<i>Huerva a Zaragoza (Zaragoza)</i>	<b>T11</b>	41.614N	0.915O	SP15	41.616N	0.914O
<i>Gállego a Caldearenas (Huesca)</i>	<b>T12</b>	42.402N	0.499O	SP1	42.404N	0.498O
<i>Gállego a San Mateo de Gállego (Z.)</i>	<b>T13</b>	41.823N	0.785O	SP14	41.820N	0.788O
Ebre a <i>Presa de Pina (Zaragoza)</i>	<b>R14</b>	41.567N	0.691O	SP2	41.570N	0.688O
Ebre a <i>Sástago (Zaragoza)</i>	<b>R15</b>	41.320N	0.340O	-		
<i>Cinca a Alcolea de Cinca (Huesca)</i>	<b>T15</b>	41.725N	0.136E	<u>SP5.1</u>	41.854N	0.135E
Segre a <i>Torres de Segre (Lleida)</i>	<b>T16</b>	41.536N	0.512E	SP4	41.538N	0.513E
Ebre a <i>Flix (Tarragona)</i>	<b>R17</b>	41.229N	0.552E	SP3	41.230N	0.552E
Ebre a <i>Campredó (Tarragona)</i>	<b>R18</b>	40.750N	0.568E	<u>SP9</u>	40.777N	0.534E
Ebre a <i>Amposta (Tarragona)</i>	<b>R19</b>	40.715N	0.581E	-		
Ebre a <i>Deltebre (Tarragona)</i>	<b>R20</b>	40.714N	0.714E	-		

\* Codi RCSP subratllat: aquells punts de presa de mostra en els que la variació en les coordenades és molt gran

Font: URS i elaboració pròpia (2004)

### 3.4.2.- Matrius estudiades i temporalitat de la presa de mostra

Dins del marc del projecte AquaTerra es van realitzar 6 campanyes de presa de mostra a la conca hidrogràfica del riu Ebre entre els anys 2004 i 2006. Cada any es va portar a terme una campanya al juny i una a l'octubre/novembre. En les campanyes del juny es van agafar únicament mostres d'aigua mentre que a les campanyes d'octubre/novembre es van recollir tant aigües com sediments. Aquesta diferenciació entre les dues matrius estudiades es deu a que els sediments presenten una major estabilitat, per això tradicionalment s'ha considerat que no és necessària la seva caracterització tant freqüentment com en el cas de les aigües. En tots els punts de presa de mostra es va buscar un punt que fos fàcilment accessible i que garantís la repetibilitat del punt de presa de mostra durant totes les campanyes. Preferentment les mostres es recollien des d'un pont, utilitzant dragues per a les dues matrius.

~ **Aigua:** Per a agafar aquestes mostres es va utilitzar una draga d'acer inoxidable que conté una ampolla de vidre ambre de 2,5 L prèviament rentada amb aigua desionitzada i amb aigua de qualitat cromatogràfica. La draga també té un mecanisme que permet l'obertura de l'ampolla a la profunditat desitjada del corrent d'aigua (Figura 3.2). Les mostres es van agafar al centre del corrent i aproximadament 1 metre per sota de la superfície per recollir una mostra el més homogènia possible i evitar agafar partícules que poguessin surar a la superfície de l'aigua. Un cop aconseguida la mostra, l'aigua es va transvasar a ampolles de polietilè tereftalat (PET) ambre de 0,5 L d'un sòl ús, que prèviament es netejaven amb una fracció de la pròpia mostra. En aquells punts en que la profunditat no era suficient per a la utilització de la draga la mostra es va recollir des de la riba directament amb l'ampolla de PET en qualsevol punt on l'aigua no estigués estancada. La utilització de material de color ambre és una precaució per a evitar la fotodegradació de les mostres.

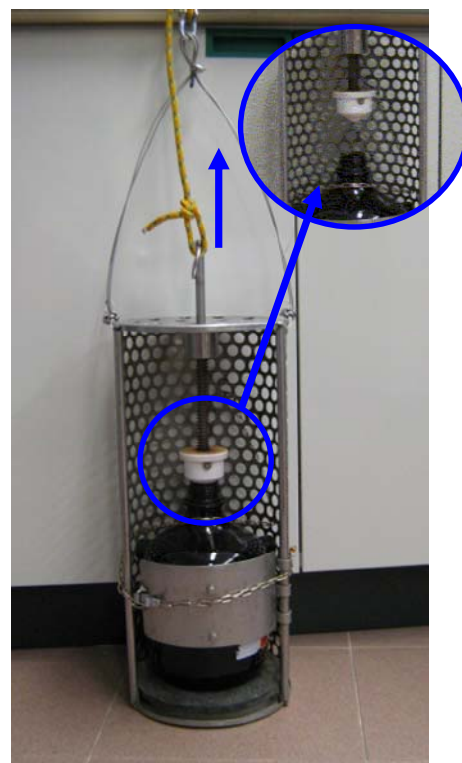


Figura 3.2: Draga per aigua i detall del seu funcionament

~ **Sediments:** En aquest cas es va utilitzar una draga *Van Veen* d'acer inoxidable que té un mecanisme de doble pala. La draga es llença oberta a l'aigua i amb el contacte amb la superfície dels sediments es tanca, agafant per arrossegament la fracció superficial de la capa de sediments (Figura 3.3). Els sediments no es troben repartits al llarg de tot el llit del riu sinó que en molts casos s'acumulen més a les vores que al centre del riu, ja que les ribes són les zones on el corrent és més suau. Per tant en cada punt de presa de mostra els sediments es van recollir des del pont escollit, però en el punt adequat segons la situació dels sediments. En aquells punts on no va ser possible recollir sediments des del pont perquè el llit del riu estava cimentat es van agafar des de la riba, en alguns casos en petits embarcadors (*Miranda de Ebro* o *Amposta*) i en altres entrant dins de l'aigua i recollint el sediment amb la draga o directament amb les mans, depenent de la profunditat. En el punt de presa de mostra R18 (Campredó, aigües avall de la ciutat de Tortosa) no es van poder recollir mostres de sediment en cap de les campanyes. Aquest és un dels pocs punts on no hi ha pont i la riba està molt modificada amb grans blocs de pedra que s'endinsen a l'aigua i que fan impossible arribar a la zona de sediments amb els mitjans dels que es disposava. Un cop agafats els sediments, aquests es van traspasar des de la draga a pots de vidre de 250 mL, prèviament rentats i posats a la mufla a 380 °C durant una nit, i es van protegir de la radiació amb paper d'alumini.



**Figura 3.3:** Draga *Van Veen* per sediments i detall del seu funcionament

Els dos tipus de mostres es van conservar refrigerats durant el trasllat al laboratori en neveres portàtils plenes de gel. Durant la presa de mostra es van fer mesures *in situ* de diversos paràmetres fisicoquímics de les aigües recollides mitjançant una sonda integrada multiparamètrica YSI 556MPS (Yellow Springs, Ohio, USA) amb la que es va mesurar la temperatura, la conductivitat, el pH i l'oxigen dissolt. Així mateix en tots els punts de presa de mostra es va enregistrar la temperatura de l'aire i la climatologia així com les possibles incidències. Totes aquestes dades es recullen a [Taula B1](#) de l'annex.

### 3.5.- Metodologia analítica

Les metodologies emprades en aquesta tesi per a les dues matrius analitzades, aigua i sediments, i tant pel que fa al processament de les mostres com a la determinació per GC-MS són una adaptació amb lleugeres modificacions de tres metodologies que es van optimitzar, en el marc del projecte AquaTerra per a les matrius d'aigües subterrànies (Hildebrandt *et al.*, 2007) i de sòls (Hildebrandt *et al.*, 2007; Hildebrandt *et al.*, 2009).

#### 3.5.1.- Extracció dels anàlits de les matrius aigua i sediment

Els protocols detallats per a l'extracció dels anàlits queden recollits a l'apartat de dades experimentals dels articles científics 5 i 6 d'avaluació dels resultats obtinguts per a les mostres d'aigua i sediments respectivament (capítol 4). Per això en aquest apartat es descriuen breument els fonaments de la metodologia emprada.

~ **Aigua:** Es va optar per l'anàlisi de la fase dissolta ja que la poca càrrega de matèria en suspensió de les aigües hagués suposat el tractament de molts litres d'aigua per a poder obtenir una mostra analitzable de partícules en suspensió; per aquesta raó el primer pas del pretractament va ser la filtració a través de discs de niló de 0,45 µm amb una bomba de buit. En tots els casos les mostres es van processar en un termini màxim d'una setmana, evitant així la seva degradació. La metodologia emprada va ser l'extracció en fase sòlida (SPE, de l'anglès *solid phase extraction*). Abans de l'extracció es va afegir la barreja de patrons de recuperació a 200 mL de mostra per a obtenir una concentració final de 0,2 µg L<sup>-1</sup>. Per a cada mostra es van fer dues preconcentracions, una de les quals es va eluir i l'altra es va guardar per a poder utilitzar-la en



cas de sorgir algun problema. Les mostres es van preconcentrar utilitzant cartutxos OASIS HLB 60 mg (3 cm<sup>3</sup>) (Waters, Milford, USA) Els cartutxos es van acondicionar per gravetat amb 5 mL de diclorometà:acetat d'etil (1:1), 5 mL d'hexà: diclorometà (1:1), 1 mL de metanol i 1 mL d'aigua. Seguidament les mostres es van preconcentrar utilitzant un sistema d'extracció Baker SPE-12G (J.T. Baker, Phillipsburg, USA) que permet l'extracció de 12 mostres simultàniament. Després els cartutxos es van assecar al buit durant 20 min per a eliminar l'aigua i es van eluir immediatament amb el sistema automatitzat ASPEC XL (Gilson, Middleton, USA) que, tot i que només permet l'elució de les mostres d'una en una, té una gran reproductibilitat, necessària en aquest punt de l'extracció L'elució es va fer amb 5 mL d'hexà:diclorometà(1:1) i 3 mL de diclorometà:acetat d'etil (1:1). Els extractes es van evaporar i reconstituir en un vial per a cromatografia de gasos ambre a un volum de 250 µL d'hexà, on es va afegir el patró intern a 160 µg L<sup>-1</sup>. Les recuperacions obtingudes amb aquesta metodologia van ser de 46 a 113% per als PAHs, de 43 a 136% per a pesticides clorats, de 59 a 127% per a pesticides clorats i de 56 a 111% per a APs i plastificants.

~ **Sediments:** L'anàlisi dels contaminants es va fer a partir de la mostra seca, de forma que el primer pas del pretractament va ser l'eliminació de l'aigua present en aquesta. La forma més fàcil i ràpida és la liofilització, que elimina l'aigua passant-la de l'estat sòlid al gasós. Per tant cal congelar les mostres un cop aquestes estan al laboratori. Quan es recullen els sediments aquests estan barrejats amb una certa quantitat d'aigua que en estar en repòs durant uns dies es separa dels sediments. Abans de congelar les mostres a -20 °C cal eliminar aquesta aigua per a evitar que els pots de vidre es trenquin. Aquest procés es va realitzar amb pipetes *Pasteur* i a la vegada es va aprofitar per a eliminar qualsevol altre material aliè als sediments que es pogués identificar a la superfície. En molts casos eren algues, en altres plantes o petits nematodes que en quedar a la fase aquosa es podien retirar fàcilment amb la pipeta. Els sediments es van liofilitzar durant 48 hores a -40 °C i amb un buit de 10<sup>-2</sup> mbar amb una liofilitzadora LyoAlfa 6 (Telstar, Terrassa, España). Un cop les mostres estaven liofilitzades va ser necessària una homogeneïtzació, que es va fer primerament triturant les mostres amb un morter de ceràmica (Haldenwanger, Waldkraiburg, Deutschland) i després tamisant-les amb tamisos de llum de malla de 500 i 120 µm. L'extracció dels anàlits es va realitzar amb un gram de la fracció més fina (<120 µm) al que prèviament se li va afegir la barreja de patrons de recuperació a una

concentració de 50 µg kg<sup>-1</sup>-pes sec. Aquesta extracció es va fer mitjançant l'extracció amb líquids pressuritzats (PLE, de l'anglès *pressurised liquid extraction*) amb el sistema automatitzat ASE 200 (*Accelerated Solvent Extractor*) de Dionex (*Sunnyvale, USA*). Aquest sistema accelera l'extracció sòlid-líquid tradicional utilitzant dissolvents a elevades temperatures i pressions. La pressió s'aplica a la cel·la d'extracció on hi ha la mostra per a mantenir el dissolvent calent en estat líquid durant l'extracció. És un mètode amb una gran capacitat extractiva i per això, a més a més dels contaminants presents a la mostra, extreu molts components de la mateixa matriu, per tant es fa absolutament necessària una purificació de l'extracte. Aquesta es pot portar a terme afegint un adsorbent a dins la cel·la d'extracció, com per exemple el Florisil (*Merk, Darmstadt, Deutschland*), de forma que la purificació es realitza en el mateix pas que l'extracció, reduint tant el temps d'anàlisi de cada mostra com la quantitat de dissolvent utilitzat. Com a dissolvent d'extracció es va utilitzar una barreja d'hexà:diclorometà (1:1). La temperatura es va ajustar a 100 °C i la pressió a 1500 psi (1 psi = 6894,76 Pa). Les extraccions es van realitzar amb cel·les de 22 mL que es van omplir seguint el següent esquema: 2 g de Florisil, 5 g de Florisil barrejats amb el gram de sediment i Hydromatrix (*Varian, Palo Alto, USA*) fins a omplir totalment la cel·la. Els extractes es van evaporar fins a quasi sequedat amb un TurboVap LV de Caliper LifeSciences (*Hopkinton, USA*) i es van reconstituir en un vial per a cromatografia de gasos ambre a un volum de 250 µL d'hexà, on es va afegir el patró intern a 160 µg L<sup>-1</sup>. Les recuperacions obtingudes amb aquesta metodologia van ser de 47 a 114% per als PAHs, de 71 a 131% per a pesticides clorats, de 38 a 144% per a pesticides clorats i de 57 a 94% per a APs i plastificants.

### **3.5.2.- Detecció i quantificació per GC-MS**

La detecció dels anàlits es va fer per GC-MS, i les condicions s'indiquen als articles científics 5 i 6. Atès que la quantitat d'anàlits era molt elevada es van classificar en tres grups: 1) pesticides polars, APs i plastificants; 2) pesticides organoclorats i 3) PAHs. Per a cada grup es va utilitzar un procediment de GC-MS que tenia per tant un programa de temperatures del forn adequat als compostos així com un programa de monitorització selectiva d'ions (SIM, de l'anglès *selected ion monitoring*) amb els ions i les finestres cromatogràfiques corresponents. Cada extracte es va injectar tres vegades al cromatògraf per a poder analitzar els 3 grups per separat,



evitant així la detecció simultània d'un nombre elevat d'ions a l'espectròmetre de masses que en reduiria molt la sensibilitat. En tots els casos es va utilitzar un GC Trace 2000 de Thermo Electron (San Jose, CA USA) acoblat a un MS també de Thermo Electron, que operava en mode d'impacte electrònic amb una energia d'ionització de 70 eV.

Per a la separació cromatogràfica es va utilitzar una columna capil·lar HP-5MS de 30 m de llargada x 0,25 mm de diàmetre intern i amb 0,25 µm d'espessor de pel·lícula de J&W Scientific (Folsom, USA). Es van injectar 2 µL en mode *splitless*. La rampa de temperatures per als PAHs va ser: de 60 °C (durant 1 min) fins a 175 °C a 6 °C min<sup>-1</sup> (durant 4 min) fins a 235 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> i finalment fins a 300 °C a 8 °C min<sup>-1</sup>, mantenint la temperatura final durant 5 min. Per als altres dos grups de compostos la rampa de temperatures va ser: de 60 °C (durant 1 min) fins a 130 °C a 10 °C min<sup>-1</sup>, fins a 220 °C a 3 °C min<sup>-1</sup> i finalment fins a 300 °C a 10 °C min<sup>-1</sup> (durant 5 min). Les temperatures de l'injector, la línia de transferència i la font d'ions van ser de 280 °C, 250 °C i 200 °C respectivament. Com a gas portador es va utilitzar heli a un flux de 1,2 mL min<sup>-1</sup>.

Les [Taulas 3.8, 3.9 i 3.10](#) mostren els compostos de cada un dels grups ordenats segons el temps de retenció així com les finestres cromatogràfiques i els ions de quantificació ( $mz_1$ ) i els d'identificació ( $mz_2$  i  $mz_3$ ) de cada compost. Per a la identificació dels compostos marcats (deuterats o carboni 13) només es va utilitzar un segon ió d'identificació per tal d'alleujar la quantitat d'ions de cada finestra. Ja que actualment hi ha al mercat molts compostos marcats, se'n van triar 13 com patrons de recuperació i 2 com patrons interns, tots ells representatius de les diferents famílies estudiades. Les finestres es van dissenyar tenint en compte que a cadascuna d'elles hi hagués com a mínim un patró de recuperació amb el que es van quantificar tots els compostos de la finestra. L'única excepció va ser la quantificació de l'OP, el NP i el BPA que es va fer amb el NP-D8, tot i estar situats en finestres diferents. A més a més, per al NP s'indica un interval i no un únic temps de retenció perquè és un compost isomèric format per sis pics cromatogràfics que es van quantificar conjuntament. Cal tenir en compte que els temps de retenció podien variar entre injeccions degut al manteniment de l'equip de GC-MS que podia implicar un canvi de precolumna o un tall en la columna. Els temps que es mostren aquí corresponen a una de les injeccions, però permeten indicar l'ordre d'elució així com la separació entre els pics cromatogràfics.

Taula 3.8: Pesticides polars, APs i plastificants ordenats segons el temps de retenció a GC-MS

			Temps retenció	mz <sub>1</sub>	mz <sub>2</sub>	mz <sub>3</sub>
1a finestra	1	Molinat	15.08	126	83	187
	2	Ometoat	16.65	110	156	79
	3	Octilfenol	16.96	135	107	206
	4	Tributilfosfat	18.35	99	155	211
		<b>Atrazina-desetil-D6</b>	18.51	175	177	
	5	Atrazina-desetil	18.65	172	174	145
	6	Trifluralina	19.45	306	264	248
2a finestra	7	Nonilfenol	20.20-21.60	149	135	121
	8	Dimetoat	20.62	87	93	125
	9	Simazina	21.02	201	186	173
		<b>Atrazina-D5</b>	21.26	205	220	
	10	Atrazina	21.38	200	215	173
	11	Propazina	21.68	214	172	229
		<b>Terbutilazina-D5*</b>	22.12	219	178	
	12	Terbutilazina	22.23	214	173	229
	13	Diazinon	23.16	137	179	152
3a finestra		<b>Nonilfenol-D8</b>	24.77	113	228	
	14	Propanil	25.06	161	163	217
	15	Diclofention	25.13	223	279	97
	16	Paration-metil	25.60	109	125	263
		<b>Alaclor-D13</b>	25.86	156	124	
	17	Alaclor	26.15	160	188	146
	18	Fenclorfos	26.47	285	287	125
	19	Terbutrina	27.26	226	185	170
	20	Fenitrocion	27.35	125	109	277
	4a finestra	21	Malation	28.23	127	125
22		Metolaclor	28.30	162	238	146
		<b>Paration-etil-D10</b>	28.46	99	115	
23		Clorpirifòs	28.67	197	199	314
24		Paration-etil	28.68	109	291	139
25		Bromofos-metil	29.54	331	329	125
26		Clorfenvinfòs	31.20	267	269	323
27		Bromofos-etil	32.23	97	303	359
28		Bisfenol A	33.85	213	119	228
29		Etion	37.10	97	231	153
	30	Azinfos-etil	42.93	132	160	104

En negreta: patrons de recuperació, \* Patró intern, afegit just abans de la injecció

Taula 3.9: Pesticides organoclorats ordenats segons el temps de retenció a GC-MS

			Temps retenció	mz <sub>1</sub>	mz <sub>2</sub>	mz <sub>3</sub>
1 <sup>a</sup> finestra	31	$\alpha$ -HCH	23.03	181	183	219
		<b>Hexaclorobenzè-<sup>13</sup>C6</b>	23.48	292	148	
	32	Hexaclorobenzè	23.48	284	286	282
	33	$\beta$ -HCH	24.64	181	183	219
	34	$\gamma$ -HCH	25.04	181	183	219
		<b>Antracè-D10*</b>	25.77	188	184	
	35	$\delta$ -HCH	26.50	181	183	219
	36	Heptaclor	29.50	100	272	274
37	Aldrina	31.59	91	263	101	
2a finestra	38	Isodrina	33.33	193	195	263
	39	Heptaclor-exo-epòxid	34.07	81	353	355
	40	Heptaclor-endo-epòxid	34.34	81	183	185
	41	2,4-DDE	35.99	246	248	176
	42	$\alpha$ -endosulfan	36.24	195	241	277
	43	Dieldrina	37.83	79	263	108
		<b>4,4-DDE-D8</b>	37.93	254	256	
	44	4,4-DDE	37.93	246	248	176
45	2,4-DDD	38.38	235	237	165	
3a finestra	46	Endrina	38.98	81	263	281
	47	$\beta$ -endosulfan	39.43	195	159	241
	48	4,4-DDD	39.98	235	237	165
	49	2,4-DDT	40.12	235	237	165
	50	Endrina aldehyd	40.27	67	250	345
	51	Endosulfan sulfat	41.20	272	274	229
		<b>4,4-DDT-<sup>13</sup>C12</b>	41.40	247	249	
52	4,4-DDT	41.41	235	237	165	

En negreta: patrons de recuperació, \* Patró intern, afegit just abans de la injecció

Taula 3.10: PAHs ordenats segons el temps de retenció a GC-MS

			Temps retenció	mz <sub>1</sub>	mz <sub>2</sub>	mz <sub>3</sub>
1a fin.		<b>Naftalè-D8</b>	12.22	136	108	134
	53	Naftalè	12.29	128	127	129
2a finestra	54	Acenaftilè	18.22	152	76	151
		<b>Acenaftè-D10</b>	18.83	164	162	
	55	Acenaftè	18.95	154	152	76
	56	Fluorè	20.98	166	165	82
3a finestra		<b>Fenantre-D10</b>	26.33	188	184	
	57	Fenantre	26.47	178	152	89
		<b>Antracè-D10*</b>	26.66	188	184	
	58	Antracè	26.78	178	152	89
	59	Fluorantè	35.16	202	200	101
	60	Pirè	36.73	202	200	101
4a finestra	61	Benzo(a)antracè	45.97	228	226	114
		<b>Crisè-D12</b>	46.05	240	236	
	62	Crisè	46.19	228	226	114
	63	Benzo(b)fluorantè	50.98	252	250	126
	64	Benzo(k)fluorantè	51.07	252	250	126
5a finestra	65	Benzo(a)pirè	52.04	252	250	126
		<b>Perilè-D12</b>	52.24	264	260	
	66	Indè(1,2,3-cd)pirè	56.10	276	138	
	67	Dibenzo(a,h)antracè	56.26	278	276	139
	68	Benzo(g,h,i)perilè	57.13	276	274	138

En negreta: patrons de recuperació, \* Patró intern, afegit just abans de la injecció

Per a la quantificació es va realitzar una recta patró de sis punts per a cada compost amb les següents concentracions: 10 µg L<sup>-1</sup>, 30 µg L<sup>-1</sup>, 100 µg L<sup>-1</sup>, 250 µg L<sup>-1</sup>, 400 µg L<sup>-1</sup> i 600 µg L<sup>-1</sup>. Es va realitzar una quantificació utilitzant el patró de recuperació. Els patrons de recuperació utilitzats van ser naftalè-D8, acenaftè-D10, fenantre-D10, crisè-D12 i perilè-D12 per a la quantificació dels PAHs, 4n-NP-D8 per a la quantificació dels APs i BPA, HCB-<sup>13</sup>C6, 4,4-DDE-D8 i 4,4-DDT-<sup>13</sup>C12 per a la quantificació dels pesticides organoclorats i atrazina-desetil-D6, atrazina-D5, alaclor-D13 i paration-etil-D10 per a la quantificació dels pesticides polars i el TBP.

### 3.5.3.- Anàlisi del carboni orgànic total

---

El carboni orgànic total (COT) és un paràmetre que indica la quantitat de matèria orgànica present a una mostra. Aquest paràmetre s'obté analitzant el diòxid de carboni generat per combustió d'una mostra a la que se li han eliminat prèviament els compostos inorgànics carbonatats (Doménech, 1993). És per tant un indicador útil de la capacitat d'acumulació dels compostos orgànics més lipofílics.

El COT es va analitzar tant a les mostres d'aigua com a les de sediments. Abans de procedir a la determinació del COT cal realitzar un pretractament de les mostres per a eliminar el carboni inorgànic. Per a les aigües s'afegeix àcid clorhídric al 7% a 20 mL de mostra fins aconseguir un pH de 2-3. El pretractament per a l'anàlisi del COT en sediments és més llarg. Aquest consisteix en afegir àcid clorhídric al 7% a aproximadament 1 g de mostra liofilitzada i tamisada (<120 µm). En el moment del contacte s'alliberen carbonats en forma gasosa, però es deixa reaccionar durant una nit per a eliminar la major part de carboni inorgànic. L'endemà es centrifuga i s'elimina el sobrenedant, i seguidament es fan rentats amb aigua destil·lada, agitant amb un vòrtex i centrifugant per a eliminar l'àcid que hagi pogut quedar sense reaccionar, fins que la mostra es troba a pH neutre. Tot el procés des de l'addició de l'àcid es fa durant tres dies seguits, assegurant així la total eliminació del carboni inorgànic.

Les mesures de COT es van realitzar al Servei de Microanàlisi Elemental del Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC) en el cas dels sediments i als laboratoris d'Aigües de Barcelona (AGBAR) en el cas de les aigües.

### 3.5.4.- Control de qualitat

---

Com a mesures per al control de qualitat dels mètodes analítics utilitzats es van portar a terme diverses accions. En primer lloc per a cada campanya, juntament amb l'extracció de les mostres, es va realitzar l'extracció d'un blanc, tant pel que fa a aigües com a sediments. En el cas de les aigües aquest blanc va consistir en aigua de qualitat cromatogràfica que es va guardar en una ampolla de PET abans de començar la presa de mostra i es va portar durant tota la campanya. D'aquesta forma l'aigua va estar en contacte amb l'ampolla durant el mateix temps que les mostres i va patir les mateixes condicions, controlant així la possible contaminació

deguda al material de les ampolles. Per als sediments, el blanc va consistir en l'extracte obtingut de l'adsorbent i el material de rebliment de les cel·les d'extracció en les mateixes condicions que les aplicades en l'extracció dels anàlits a les mostres. En aquells casos en els que es van trobar els compostos d'estudi en els blancs, la concentració obtinguda es va restar de l'obtinguda a les mostres. Considerant tots els blancs realitzats durant les 6 campanyes de presa de mostra, només el 4% dels anàlits es van detectar en aigües mentre que en sediments el percentatge va ser de 16,7%. Els compostos que van donar més resultats positius en els blancs van ser el TBP i els APs en aigües i aquests mateixos, juntament amb alguns PAHs en sediments. En qualsevol cas, les concentracions obtingudes van ser molt baixes, en relació amb les concentracions presents a les mostres.

La quantificació dels anàlits es va fer amb el patró de recuperació corresponent, corregint d'aquesta manera les possibles pèrdues durant el processament de les mostres. D'altra banda es va calcular la recuperació dels diversos patrons de recuperació per a aigües i sediments com a control de la metodologia analítica així com la recuperació dels dos patrons interns com a control del bon funcionament de l'equip de GC-MS. En el cas dels patrons interns la recuperació va ser molt bona, en tots els casos entre 80 i 122% de forma que es pot concloure que l'anàlisi cromatogràfica funcionava correctament. Pel que fa als patrons de recuperació hi havia més disparitat perquè s'anàlitzava una gran quantitat de mostres amb un pretractament consistent en moltes etapes. Es van acceptar percentatges de recuperació entre 50 i 135%. Cal tenir en compte que es tracta d'un mètode multiresidual amb una única extracció amb el que és difícil aconseguir bones recuperacions per a tots els compostos i cal arribar a un compromís. A més a més, encara que el mètode no sigui tan eficient com caldria esperar per a la recuperació, el fet de fer la quantificació sempre en base al patró de recuperació corregeix les pèrdues que hi pugui haver durant l'extracció de la mostra. Els límits de detecció (LD) obtinguts per a les matrius d'aigua i sediments es recullen a la [Taula 3.11](#).

Com a tercer punt del control de qualitat es va participar en un estudi interlaboratori organitzat pel *Joint Research Centre* de la Comissió Europea (*Ispira, Italia*) per a l'anàlisi de PAHs i APs en mostres d'aigua de riu, que combinava tant la presa de mostra com la seva posterior anàlisi. La presa de mostra es va portar a terme al riu *Po* al seu pas per la ciutat de *Ferrara (Italia)*. Per a l'anàlisi es va utilitzar el mètode utilitzat en el marc d'aquesta tesi. Les dades

obtingudes per tots els laboratoris participants per als APs es van publicar a l'article científic 2, reproduït a continuació. Pel que fa als codis utilitzats per a la nomenclatura dels laboratoris, el nostre es correspon amb el laboratori número 2.

**Taula 3.11: Límits de detecció per a aigües i sediments per als 68 compostos estudiats**

Compost	LD		Compost	LD	
	Aigua ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Sediment ( $\text{ng g}^{-1}$ )		Aigua ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Sediment ( $\text{ng g}^{-1}$ )
Molinat	0,003	0,60	$\delta$ -HCH	0,007	1,42
Ometoat	-	-	Heptaclor	0,004	0,80
Octilfenol	0,006	1,11	Aldrina	0,009	1,88
Tributilfosfat	0,004	0,74	Isodrina	0,004	0,89
Atrazina-desetil	0,010	1,9	Heptaclor-exo-epòxid	0,008	1,54
Trifluralina	0,008	1,57	Heptaclor-endo-epòxid	0,012	2,34
Nonilfenol	0,098	19,57	2,4-DDE	0,009	0,19
Dimetoat	0,015	2,93	$\alpha$ -endosulfan	0,013	2,54
Simazina	0,008	1,56	Dieldrina	0,002	0,48
Atrazina	0,004	0,75	4,4-DDE	0,001	0,24
Propazina	0,003	0,66	2,4-DDD	0,001	0,20
Terbutilazina	0,001	0,25	Endrina	0,015	2,94
Diazinon	0,003	0,60	$\beta$ -endosulfan	0,013	2,63
Propanil	0,006	1,14	4,4-DDD	0,001	0,25
Diclofention	0,003	0,57	2,4-DDT	0,004	0,78
Paration-metil	0,008	1,62	Endrina aldehid	0,027	5,34
Alaclor	0,002	0,39	Endosulfan sulfat	0,010	1,92
Fenclorfos	0,003	0,51	4,4-DDT	0,002	0,39
Terbutrina	0,005	1,00	Naftalè	0,0001	0,03
Fenitrotion	0,005	0,97	Acenaftilè	0,0001	0,03
Malation	0,003	0,54	Acenaftè	0,0003	0,05
Metolaclor	0,002	0,39	Fluorè	0,0003	0,06
Clorpirifòs	0,007	1,46	Fenantrè	0,0002	0,03
Paration-etil	0,009	1,71	Antracè	0,0002	0,04
Bromofos-metil	0,008	1,68	Fluorantè	0,0002	0,04
Clorfenvinfòs	0,020	3,97	Pirè	0,0002	0,05
Bromofos-etil	0,006	1,14	Benzo(a)antracè	0,0004	0,09
Bisfenol A	0,282	56,33	Crisè	0,0004	0,08
Etion	0,007	1,33	Benzo(b)fluorantè	0,0003	0,05
Azinfos-etil	0,008	1,51	Benzo(k)fluorantè	0,0003	0,06
$\alpha$ -HCH	0,003	0,55	Benzo(a)pirè	0,0003	0,07
Hexaclorobenzè	0,005	0,97	Indè(1,2,3-cd)pirè	0,0004	0,07
$\beta$ -HCH	0,034	6,76	Dibenzo(a,h)antracè	0,0011	0,23
$\gamma$ -HCH	0,003	0,63	Benzo(g,h,i)perilè	0,0003	0,06

## **Article científic 2**

---

### *Laboratory intercomparison study for the analysis of nonylphenol and octylphenol in river water*

R. Loos, J. Wollgast, J. Castro-Jiménez, G. Mariani, T. Huber, G. Locoro, G. Hanke, G. Umlauf, G. Bidoglio, P. Hohenblum, W. Moche, S. Weiss, H. Schmid, F. Leiendecker, T. Ternes, A. Navarro Ortega, A. Hildebrandt, D. Barceló, P. Lepom, I. Dimitrova, O. Nitcheva, S. Polesello, S. Valsecchi, S. Boutrup, O. Sortkjaer, R. de Boer i J. Staeb

**Trends in Analytical Chemistry, 27 (2008), 89-95**





# Laboratory intercomparison study for the analysis of nonylphenol and octylphenol in river water

R. Loos, J. Wollgast, J. Castro-Jiménez, G. Mariani, T. Huber, G. Locoro, G. Hanke, G. Umlauf, G. Bidoglio, P. Hohenblum, W. Moche, S. Weiss, H. Schmid, F. Leiendecker, T. Ternes, A. Navarro Ortega, A. Hildebrandt, D. Barceló, P. Lepom, I. Dimitrova, O. Nitcheva, S. Polesello, S. Valsecchi, S. Boutrup, O. Sortkjaer, R. de Boer, J. Staeb

In support of the implementation of the European Union (EU) Water Framework Directive (WFD), the European Commission (EC) Joint Research Centre (JRC) organized a laboratory and sampling intercomparison study for the chemical monitoring of polyaromatic hydrocarbons (PAHs), polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), and nonylphenol and octylphenol (NP/OP), priority substances of the WFD, in river water. EU Member State laboratories were invited to analyze a standard solution with unknown concentration levels and a river-water extract, as well as a real water sample from the River Po (Italy). For the standard solution and the river-water extract, good agreement was achieved for five laboratories. Triple-quadrupole liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS<sup>2</sup>) and gas chromatography with MS (GC-MS) with or without derivatization proved to be comparable methods for the analysis of NP and OP. Fluorescence detection can also be used to analyze NP and OP, but it is less specific. The results of the River Po water sample showed that some laboratories have problems in analyzing NP at concentration levels below 100 ng/L due to contamination of laboratory blanks. Plastics materials should not be used during extraction and sample preparation.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Laboratory intercomparison; Nonylphenol; Octylphenol; Priority substance; Proficiency testing; Quality assurance; Quality control; QA/QC; Sampling intercomparison; Water Framework Directive

R. Loos\*, J. Wollgast, J. Castro-Jiménez, G. Mariani, T. Huber, G. Locoro,  
G. Hanke, G. Umlauf, G. Bidoglio

IES, Institute for Environment and Sustainability, Joint Research Centre (JRC) of  
the European Commission, Via E. Fermi, 21020 Ispra, Italy

P. Hohenblum, W. Moche, S. Weiss  
UBA, Austrian Environment Agency, Vienna, Austria

H. Schmid, F. Leiendecker, T. Ternes  
BFG, Federal Institute of Hydrology, Koblenz, Germany

A. Navarro Ortega, A. Hildebrandt, D. Barceló  
CSIC, Department of Environmental Chemistry, IIQAB, Barcelona, Spain

P. Lepom  
UBA, German Environment Agency, Berlin, Germany

I. Dimitrova, O. Nitcheva  
Institute for Water Problems, Bulgaria

S. Polesello, S. Valsecchi  
IRSA, Institute for Water Research, CNR, Italy

S. Boutrup, O. Sortkjaer  
NERI, Denmark

R. de Boer, J. Staeb  
RIZA, Netherlands

\*Corresponding author.  
Tel.: +39 0332 786407;  
Fax: +39 0332 786351;  
E-mail: Robert.Loos@jrc.it

## 1. Introduction: WFD and the chemical-monitoring exercise

The European Union (EU) Water Framework Directive (WFD) [1] sets up environmental objectives to achieve “good water status” for all European waters by 2015, and establishes a clear framework to enable these objectives to be attained, in particular through characterization of European river basins, development of river-basin-management plans, analysis of the main pressures and impacts, and establishment of monitoring programmes for a wide range of priority pollutants [2]. The comparability of monitoring results is of major importance for the usefulness and the acceptance of these monitoring requirements. EU Member States need to develop and to implement a quality-assurance/quality control (QA/QC) system to ensure that all monitoring results meet the desired levels of accuracy. Among these measures, participation in proficiency testing (PT) schemes plays an important role for ensuring the comparability of measurement data, and checking laboratory performance [3,4].

In support of the implementation of the WFD, the Institute for Environment and Sustainability (IES) of the European Commission (EC) Joint Research Centre (JRC) (Ispra, Italy) therefore organized a chemical-monitoring (and sampling) workshop in Ferrara (Italy) at the Po River in October 2006. Eight laboratories from seven EU Member States (Austria, Germany, Spain, Denmark, Bulgaria, The Netherlands and Italy) participated at this chemical-monitoring exercise (CME); they were invited to take samples from the Po River according to their national protocols and to analyze them for polyaromatic hydrocarbons (PAHs), polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), and nonylphenol and octylphenol (NP/OP), priority substances [2] of the WFD [1]. In addition, the JRC distributed to all laboratories a standard solution of the target compounds with an unknown concentration of NP/OP and a river-water extract. This exercise was a follow-up of the discussions within the EU Chemical Monitoring Activity (CMA) expert group, which produced the technical guidance document for chemical monitoring of surface waters [5] for the implementation of the WFD (Chair: Peter Lepom, UBA, Germany). The proposed environmental quality standard (EQS) of the WFD for NP in surface waters is 0.3 µg/L, and for OP 0.1 µg/L (0.01 µg/L for OP in marine waters), laid down in the proposed WFD Priority Substances Directive [6], which sets harmonized and ambitious quality standards for 41 (groups of) chemicals. It also reviews the selection of priority hazardous substances and repeals several daughter Directives.

PAHs, PBDEs, and NP/OP were chosen as target analytes for this exercise because these substances are relatively difficult to analyze in water samples.

Few reliable water-concentration data are available for these chemicals. A review of NP-concentration levels in fresh and estuarine waters, sediments and biota is available [7]. Other “challenging” compounds of the WFD are chloroalkanes, di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), endosulfan, and tributyltin compounds.

## 2. Proficiency testing schemes for water analysis

PT for (organic) contaminants in water is rare. Interlaboratory studies in aqueous matrix have been recently performed for pesticides [4,8,9], PAHs [4], non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) [10], and perfluorinated contaminants (PFOS and PFOA) [11]. These activities have been supported by the EC (DG-RTD). For NP and OP, no interlaboratory comparison study for water samples has been published so far. “Quasimeme” [12] introduced alkylphenols (APs) in their 2007 programme for marine waters. “Aquacheck” has introduced PT schemes for all priority substances of the WFD [13]. These recent activities make it clear that PT can be considered an important “trend” in analytical chemistry today.

## 3. Alkylphenols and alkylphenol ethoxylates

NPs are degradation products of the non-ionic surfactants, NP polyethoxylates (NPEOs), which are widely used worldwide in agricultural, industrial, and domestic applications; industrial uses include the manufacture of plastics, textiles, paper, and agricultural chemical products. Commercial NPEOs are complex mixtures of ethoxy homologues and alkyl isomers. Among the AP ethoxylates (APEOs), the NPEOs are by far the most commonly used isomers; 80% of the APEO surfactants used are NPEOs, while the remaining 20% are almost entirely OP isomers (OPEOs). However, technical OP is a single isomer, 4-*tert*-OP.

NPs and NPEOs enter the aquatic environment primarily via the effluents of industrial and municipal wastewater-treatment plants (WWTPs), but also by direct discharge such as through pesticide application. Effluent from WWTPs is one of the major sources of NPs, due to the incomplete removal and degradation of these compounds [14]. APEOs are degraded in the aquatic environment to more recalcitrant metabolites, APs (mainly NP), and AP carboxylates (APECs; mainly NPECs). An overview on the biodegradation of APEOs can be found in [15–17]. NP is biodegradable with half-lives in water between several days and weeks [18]. Because of the poor degradability and toxicity of their metabolites, APEOs have been replaced in household applications in most western countries, mainly by alco-



hol ethoxylates. In 2003, the EU restricted the use of NP and NPEOs for several industrial applications [19].

#### 4. Analytical methods for the analysis of NP/OP

NP/OP are usually analyzed by single-quadrupole LC-MS [20,21], triple-quadrupole LC-MS<sup>2</sup> [22–24], or GC-MS with derivatization [25,26], or without derivatization [7,27].

In this interlaboratory study, all laboratories used different analytical methods, triple-quadrupole LC-MS<sup>2</sup>, low-resolution GC-MS without derivatization and one laboratory GC-MS with derivatization (Lab 4), and LC-fluorescence (Lab 6). Seven laboratories (including the JRC) reported analytical results for NP/OP. However, Lab 7 did not analyze the standard solution and the river-water extract. Also, Lab 3 apparently had analytical problems and was the only “outlier”. The Po River water samples were filtered in some laboratories, whereas, in the others, they were processed directly.

In addition, different extraction techniques were used for the Po River water sample (Table 1). Five laboratories used solid-phase extraction (SPE), and one laboratory

liquid-liquid extraction (LLE). The SPE materials used were Oasis HLB (Waters), C18 and Envichrom P (Supelco). Lab 5 used dichloromethane (DCM) for the LLE of 2.3 L water. Elution of the SPE cartridges was also performed with different solvents (i.e. ethylacetate (EA), DCM/EA (1:1), methanol/methyl-tert-butylether (MeOH/MTBE), acetone, and DCM) (Table 1).

Two laboratories analyzed the suspended particle matter (SPM) material collected. One of the laboratories used Soxhlet extraction with acetone/hexane (2:1), whereas the other used Randall extraction with hot MeOH. Lab 4 obtained the SPM material by on-site sampling using a high-volume flow-trough centrifuge (4150 L water), and Lab 6 by filtration of 11.82 L water. The SPM content of the Po River water was ~45 mg/L.

LC separation of the analytes was performed by reversed phase LC (RP-LC) using gradient elution with water-acetonitrile or water-methanol. The ions or transitions monitored by the different laboratories using GC-MS or LC-MS<sup>2</sup> are shown in Table 1. The internal standard used by most laboratories was 4n-NP (d8), which is available from different suppliers.

Table 1. Comparison of methods for nonylphenol and octylphenol

	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 4	Lab 5	Lab 6	Lab 6	Lab 7
Sample volume [L]	0.4	0.2	0.5	4150	2.3	1.0	11.82	1.0
Filtration	no	yes	no	n.a.	no	yes	yes	no
Extraction	SPE	SPE	SPE	Centrifuge	LLE	SPE	Filtration	SPE
SPE cartridge/solvent	HLB 200	HLB 60	C18	Soxhlet	DCM	C18	Randall extraction	Envichrom P
SPE elution	EA	DCM/EA	MeOH + MTBE	SPM <sup>1</sup>	n.a.	Acetone	SPM <sup>2</sup>	DCM
Analytical method	LC-MS (tq)	GC-MS	LC-MS (tq)	GC-MS (it)	GC-MS	LC-fluor	LC-fluor	GC-MS
LC solvents	H <sub>2</sub> O-acet.	n.a.	H <sub>2</sub> O-acet.	n.a.	n.a.	H <sub>2</sub> O-MeOH	H <sub>2</sub> O-MeOH	n.a.
Column	C18	DB-5	C18	ZB-5	DB-5	Phenylhexyl	Phenylhexyl	DB-1
Length	2.1 × 150 mm	30 m	2.1 × 100 mm	30 m	30 m	4.6 × 250 mm	4.6 × 250 mm	60 m
Derivatization	n.a.	no	n.a.	MSTFA	No	No	No	No
Ions or wavelength monitored	219 > 133 227 > 112 205 > 106 205 > 133	149 (for NP) 135 (for OP) 121 107	219 > 133 219 > 106 225 > 112 205 > 133	207 > 179 221 > 179 235 > 179 278 > 179 292 > 179	135	230 nm exc. 302 nm em.	230 nm exc. 302 nm em.	135 107 57 220 77
Internal standard	4n-NP d8	4n-NP d8	4n-NP d6	4-Bromophenol	4n-NP d8	No	No	Atrazine d5

acet., acetonitrile; DCM, Dichloromethane; EA, Ethyl acetate; EnvichromP, Supelco; em., Emission; exc., Excitation; fluor, Fluorescence; HLB, Oasis HLB cartridge (Waters) (200 mg or 60 mg); it, ion trap; LLE, Liquid-liquid extraction; MSTFA, Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide; n.a., not applicable; SPE, Solid-phase extraction; MeOH, Methanol; MTBE, Methyl-tert-butyl ether; SPM, Suspended particle matter; tq, triple quadrupole.

<sup>1</sup>Freeze drying, extraction with acetone/hexane (2:1), silica clean-up.

<sup>2</sup>Randall extraction with hot MeOH, silica clean-up.

## 5. Test materials distributed and River Po water sampling

For the standard solution distributed by the JRC to all laboratories, technical NP (CAS No. 84852-15-3; Aldrich, No. 29,085-8), and 4-OP (CAS No. 1806-26-4; mentioned in the priority list of the WFD, Aldrich, No. 38,444-5) were used. These compounds were dissolved in methanol and further diluted to a concentration of 200 ng/mL NP and 200 ng/mL 4-OP (n-OP) – in methanol for the LC-MS laboratories and in hexane for GC-MS measurements.

The river-water extract came from the River Seveso, a small river in the North of Milan with industrial impact (coordinates N 45.5380, E 9.1822). Sampling date was 4 October 2006 (11 h). A volume of 15 L of this river water was extracted by SPE using 15 C18 cartridges (Isolute C18, 500 mg, 6 mL, International Sorbent Technology (IST), Cambridge, UK), using an AutoTrace SPE workstation (Caliper Life Sciences). Elution was performed with 6 mL EA (for each cartridge). The eluates were merged and evaporated to 15 mL. Each laboratory obtained 1 mL of this extract, corresponding to a 1-L water sample of the River Seveso.

The River Po water sample was taken by all participants simultaneously (at the same time; 11 October 2006; 11 h) from a quay, using their own sampling techniques, material, and bottles, in Pontelagoscuro, Ferrara, Italy (coordinates N 44.8894; E 11.6051).

## 6. Octylphenol and nonylphenol isomers

During the CME field trial, it was realized that two different OP isomers exist: linear 4n-OP with CAS No. 1806-26-4; and, branched *para-tert*-octylphenol (4-*tert*-OP) with CAS No. 140-66-9, which is the OP used technically. There are two different OP standards commercially available: 4-OP; and, 4-*tert*-OP. 4-OP is the linear isomer, which is not used technically, so it should not be present in the environment. The isomer released to the environment is 4-*tert*-OP [28], so this is the isomer that should be monitored.

With LC, 4-*tert*-OP elutes earlier than 4n-OP (and before branched 4-NP) and shows the characteristic mass transition  $205 > 133$ , whereas 4n-OP has the MS-MS transition  $205 > 106$  with cleavage of the alkyl chain at the  $\beta$  position (Fig. 4). 4n-NP also has the corresponding transition  $219 > 106$  [29]. This indicates that the 4-OP standard is a linear isomer form of OP.

Technically used NP comprises a number of 211 possible differently branched nonyl-chain isomers; it comprises mainly (~90%) *para*-substituted 4-NP (CAS No. 84852-15-3). It is estimated that, in biologically and

environmentally relevant matrices, there are approximately 50–80 isomers present [30,31]. Chromatographic separation of all isomers is impossible (at present); it might become feasible in the future with two-dimensional GC [30,32], so (for now) the sum of the different NP isomers needs to be analyzed. In future, characterization and analysis of individual NP isomers might become important, because of the differences in estrogenic and bioaccumulation potential among the isomers [30–33].

## 7. Interlaboratory results

### 7.1. Standard solution and river-water extract

For the NP/OP standard solution and the river-water extract, relatively good agreement was achieved for the analysis of NP by five laboratories. However, Lab 3 reported much lower NP concentrations for both the standard and the extract; this Lab was considered an “outlier”. The reason for this could not be clarified (whether it was a problem with the standard or the instrument). The relative standard deviation (RSD) of the NP results from the different laboratories was calculated, and was 23–29% (excluding Lab 3). The laboratories were using different chromatographic detection systems. From these results, it is obvious that NP (and OP) are being well analyzed by LC-MS<sup>2</sup>, LC-fluorescence and GC-MS (with and without derivatization). However, fluorescence detection does not have the selectivity to distinguish NP from n-OP, which partially coelute on the RP Phenylhexyl column used (see Fig. 1, Lab 6).

The standard solution contained 200 ng/mL NP and 4n-OP, respectively; the NP concentration in the river-water extract was approximately 600 ng/mL, which corresponded to 600 ng/L in the river water (River Seveso). In this river-water extract, some *tert*-OP was also found by five laboratories (Fig. 2).

For the river-water extract, the matrix effect was studied by LC-MS<sup>2</sup> with the standard-addition method; no ion suppression was measurable for NP in this extract (by the JRC).

Comparing the NP results of the different laboratories with the river-water extract, it appears that Lab 2 reported the highest concentration level (957 ng/L; Fig. 2); this might be explained by the fact that they used GC-MS detection without derivatization. The ion  $m/z$  149 that Lab 2 monitored to quantify NP is not very specific (also characteristic for phthalates) and could lead to false-positive findings in matrix-rich samples, such as this river-water extract.

The ISO method for “selected alkylphenols in water samples” [34] uses GC-MS determination (after LLE with toluene) and detection of NP without derivatization



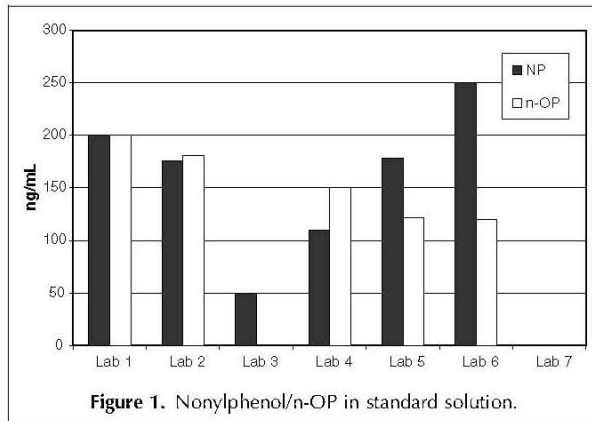


Figure 1. Nonylphenol/n-OP in standard solution.

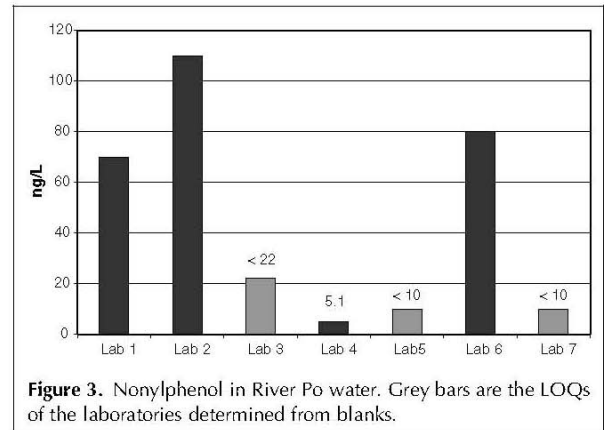


Figure 3. Nonylphenol in River Po water. Grey bars are the LOQs of the laboratories determined from blanks.

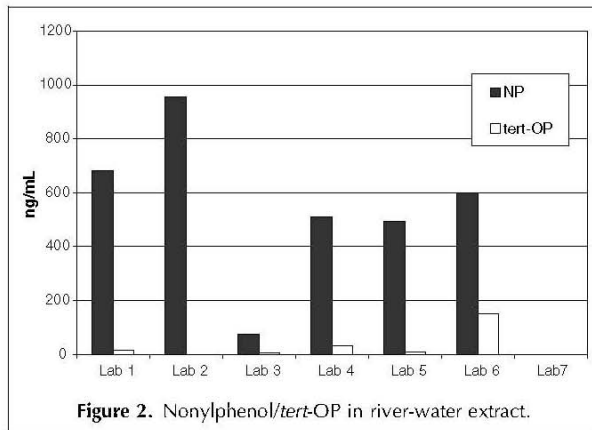


Figure 2. Nonylphenol/tert-OP in river-water extract.

matrix interferences. ISO is therefore currently developing a new method for APs using GC-MS after derivatization [35].

### 7.2. River Po water

The analysis of NP/OP in the River Po water was difficult due to the very low concentration levels. Three laboratories reported a positive result for NP: 70 ng/L (Lab 1); 110 ng/L (Lab 2); and, 80 ng/L (Lab 6), respectively. Three other laboratories reported NP levels below the LOQ (10 ng/L, 10 ng/L and 22 ng/L). One laboratory (Lab 4) reported an NP concentration level of 5.1 ng/L in the River Po water sample. This laboratory was using “centrifuge large water SPM sampling”; it was analyzing only the SPM and not the dissolved water phase (Table 2 and Fig. 3).

These results suggest that the three laboratories with the positive NP result measured NP contamination in laboratory blanks. At first glance, it appears that the NP result of Lab 4 (5.1 ng/L) is the most exact one, since the use of a larger amount of SPM material results generally

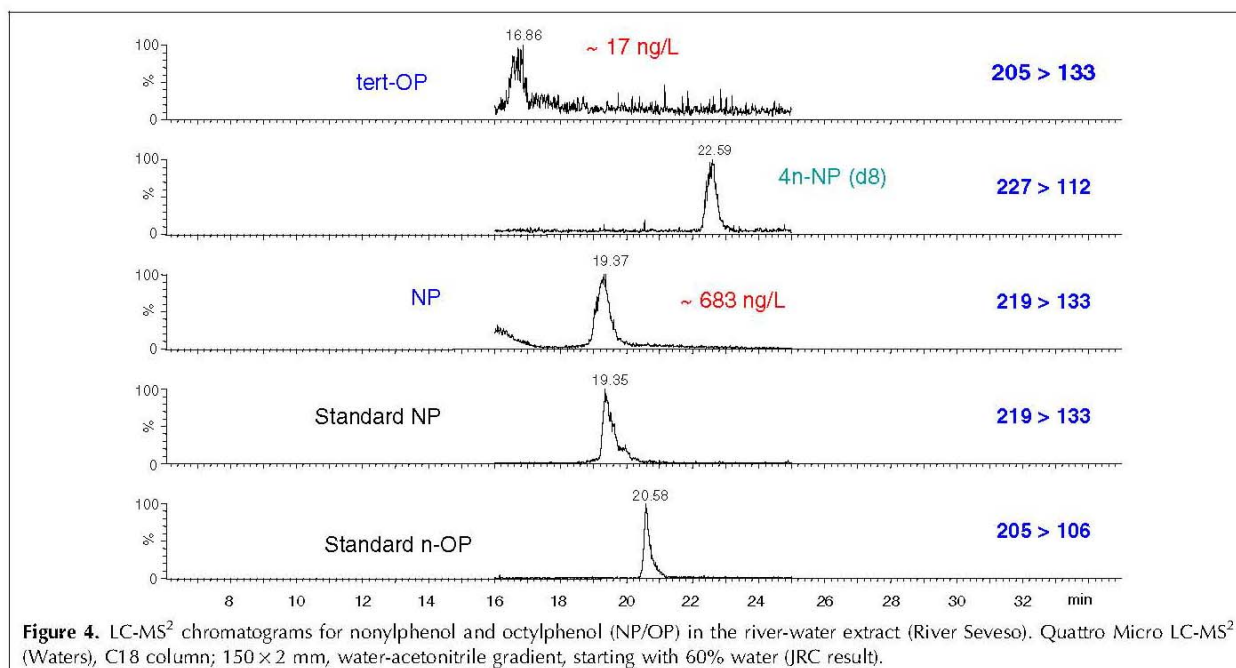
using ions  $m/z$  135 and 107 [34]. A round-robin test organized by ISO with this method was not very successful (unpublished results), because the use of such low masses for quantification can lead to problems with

Table 2. Nonylphenol (NP) and octylphenol (OP) in the standard solution, the river-water extract (River Seveso), and the River Po water sample

NP/OP in standard solution [ng/mL]	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 4	Lab 5	Lab 6	Lab 7
NP	200	176	50	110	178	250	
n-OP	200	181		150	122	120	
<b>NP/OP in river-water extract [ng/mL]</b>							
NP	683	957	74	510	495	600	
tert-OP	17		6.6	33	9	150	
n-OP		<0.44		<10			
<b>NP/OP in River Po (whole water) [ng/L]</b>							
NP	70	110	<22	5.1*	<10	80 <sup>1</sup>	<10
tert-OP	<5			1.5*	<5	<50	
n-OP		<1		<0.5*			

<sup>1</sup>Dissolved water concentration: <50 ng/L (LOQ).

\*Suspended particulate material (SPM) measurement.



**Figure 4.** LC-MS<sup>2</sup> chromatograms for nonylphenol and octylphenol (NP/OP) in the river-water extract (River Seveso). Quattro Micro LC-MS<sup>2</sup> (Waters), C18 column; 150 × 2 mm, water-acetonitrile gradient, starting with 60% water (JRC result).

in lower blank levels. However, an NP SPM concentration of 5 ng/L would imply a dissolved water concentration of ~40 ng/L, since it is known that most NP (~80%; depending on the SPM content) is present in the dissolved water phase [36–39]. From this, it can also be concluded that Lab 4 most probably had some problems with NP blank contamination during their SPM analysis. Apparently, not all laboratories were doing blank subtraction, which should be a standard routine (done by Lab 5).

The results for the analysis of River Po water showed that the analysis of NP in water samples at low concentrations (<100 ng/L) is difficult due to laboratory-blank problems. Apparently, Labs 1, 2 and 6 reported an NP result which most probably came from blank contamination. NP can be present in laboratory air, septa of LC or GC vials, or plastic SPE cartridges, which is unknown to most laboratories and was reported only recently in the literature [40]. In the JRC laboratory, it was observed that a LC-MS vial with fresh MeOH left in the autosampler of the instrument can absorb NP from the laboratory air in weeks.

## 8. Conclusions

During this interlaboratory study on NP and OP, it was discovered that two different OP standards exist (i.e. 4n-OP and the technical *tert*-OP). Different analytical methods are well suited to the analysis of NP/OP: LC-MS; LC-MS<sup>2</sup>; GC-MS with or without derivati-

zation; triple-quadrupole GC-MS<sup>2</sup>; and, LC with fluorescence detection. SPE is well suited to the extraction of NP/OP from water; it can be performed with different sorbents (cartridges) and eluting solvents; also, LLE is still used.

The internal standard used by most laboratories was 4n-NP (d8). Analysis of NP at concentrations <100 ng/L is difficult, due to contamination of laboratory blanks. Any plastics material, such as SPE cartridges, should be avoided. Big rivers (e.g., River Po) usually have low NP levels, but, in smaller streams affected by industry, the EQS of 0.3 µg/L might be exceeded.

Laboratories are able to analyze OP and NP at concentration levels ≥ 100 ng/L (one-third of the EQS), but care should be taken to avoid contamination of laboratory blanks. Environmental OP levels are generally much lower.

In support of the WED monitoring, there is an urgent need to coordinate and to organize similar interlaboratory trials for water samples on the EU scale so as to improve the QA/QC activities of chemical-monitoring programmes.

## Acknowledgements

Without the effort of the participating laboratories, this article would not have been possible. Susanne Boutrup, Stefano Polesello and Joan Staeb have given very helpful comments on the manuscript. Stefano Polesello is especially thanked for the help with the OP standards.



Moreover, we would like to thank the “Servizio Risorse Idriche e Tutela Ambientale della Provincia di Ferrara” (Silvano Bencivelli, Paola Magri), Lars Håkanson, Graziella Leroy and Madeleine Rizzi.

## References

- [1] European Commission, Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy, Off. J. Eur. Commun. L 327, 22 Dec. 2000.
- [2] European Commission, Decision No 2455/2001/EC of the European Parliament and of the Council of 20 November 2001 establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC, Off. J. Eur. Commun. L 331/1, 15 Dec. 2001.
- [3] P. Quevauviller, Trends Anal. Chem. 26 (2007) 52.
- [4] M. Ricci, O. Bercaru, F. Ulberth, R. Morabito, C. Brunori, I. Ipolyi, C. Pellegrino, A. Sahuquillo, Trends Anal. Chem. 26 (2007) 818.
- [5] European Commission, Circa homepage, 2007 (<http://circa.europa.eu/Public/irc/env/wfd/library>).
- [6] European Commission, 2006 ([http://ec.europa.eu/environment/water/water-dangersub/surface\\_water.htm](http://ec.europa.eu/environment/water/water-dangersub/surface_water.htm)).
- [7] M. Vitali, F. Ensabella, D. Stella, M. Guidotti, Chemosphere 57 (2004) 1637.
- [8] K. El Mrabet, M. Poitevin, J. Vial, V. Pichon, S. Amarouche, G. Hervouet, B. Lalere, J. Chromatogr., A 1134 (2006) 151.
- [9] M. Peschka, T.P. Knepper, <http://www.attempto-projects.de/aquaterra/>.
- [10] M. Farré, M. Petrovic, E. Martinez, P. Osvald, R. Loos, E. Heath, H. Budzinski, F. De Alencastro, J. Müller, T. Knepper, G. Fink, T. Ternes, E. Zucatto, P. Kormali, O. Gans, J.B. Quintana, F. Pastori, A. Gentili, D. Barceló, in the frame of NORMAN project (<http://norman.ineris.fr>), Talanta, submitted for publication.
- [11] S. van Leeuwen, A. Kärman, B. van Bavel, J. de Boer, G. Lindstrom, Environ. Sci. Technol. 40 (2006) 7854.
- [12] <http://www.quasimeme.org/>.
- [13] <http://www.aquacheck.net/>.
- [14] T.P. Knepper, D. Barceló, P. de Voogt, (Editors), Comprehensive Analytical Chemistry, Volume XL, Analysis and Fate of Surfactants in the Aquatic Environment, Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands, 2003.
- [15] A. Di Corcia, A. Costantino, C. Crescenzi, E. Marinoni, R. Samperi, Environ. Sci. Technol. 32 (1998) 2401.
- [16] A. Di Corcia, R. Cavallo, C. Crescenzi, M. Nazzari, Environ. Sci. Technol. 34 (2000) 3914.
- [17] N. Jonkers, T.P. Knepper, P. de Voogt, Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 335.
- [18] European Commission, European Chemicals Bureau, 4-Nonylphenol (branched) and nonylphenol: European Union risk assessment report, EUR 20387 EN, 2002 (<http://ecbjrcit/existing-chemicals/>).
- [19] European Commission, Off. J. Eur. Commun. L 178 (17 July) (2003).
- [20] R. Céspedes, S. Lacorte, D. Raldúa, A. Ginebreda, D. Barceló, B. Piña, Chemosphere 61 (2005) 1710.
- [21] P.L. Ferguson, C.R. Iden, B.J. Brownawell, Anal. Chem. 72 (2000) 4322.
- [22] A. Jahnke, J. Gandrass, W. Ruck, 2004, J. Chromatogr., A 1035 (2004) 115.
- [23] N. Jonkers, T.P. Knepper, P. de Voogt, Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 335.
- [24] I. Schmitz-Afonso, J.E. Loyo-Rosales, M. de la Paz Aviles, B.A. Rattner, C.P. Rice, J. Chromatogr., A 1010 (2003) 25.
- [25] R. Liu, J.L. Zhou, A. Wilding, J. Chromatogr., A 1022 (2004) 179.
- [26] H.M. Kuch, K. Ballschmiter, Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 3201.
- [27] A. Díaz, F. Ventura, M.T. Galceran, Anal. Chem. 74 (2002) 3869.
- [28] OSPAR Commission, 2003, ([http://www.ospar.org/documents/dbase/publications/-p00273\\_BD%20on%20octylphenol%20\\_2006%20version.pdf](http://www.ospar.org/documents/dbase/publications/-p00273_BD%20on%20octylphenol%20_2006%20version.pdf)).
- [29] R. Loos, G. Hanke, G. Umlauf, S.J. Eisenreich, Chemosphere 66 (2007) 690.
- [30] K. Guenther, E. Kleist, B. Thiele, Anal. Bioanal. Chem. 384 (2006) 542.
- [31] K. Guenther, V. Heinke, B. Thiele, E. Kleist, H. Prast, T. Raecker, Environ. Sci. Technol. 37 (2003) 2624.
- [32] T. Ieda, Y. Horii, G. Petrick, N. Yamashita, N. Ochiai, K. Kannan, Environ. Sci. Technol. 39 (2005) 7202.
- [33] H. Zhang, S. Zuehlke, K. Guenther, M. Spiteller, Chemosphere 66 (2007) 594.
- [34] International Organization for Standardization, ISO 18857-1, 2005, Water quality - Determination of selected alkylphenols - Part 1: Method for non-filtered samples using liquid extraction and gas chromatography with mass selective detection, ISO, Geneva, Switzerland, 2005.
- [35] International Organization for Standardization, ISO/CD 18857-2, under development, Water quality - Determination of selected alkylphenols - Part 2: Determination of alkylphenols, alkylphenol ethoxylates and bisphenol A - Method for non-filtered samples using solid-phase extraction and gas chromatography with mass selective detection after derivation, ISO, Geneva, Switzerland, 2007.
- [36] T. Isobe, H. Nishiyama, A. Nakashima, H. Takada, Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 1041.
- [37] Z. Li, D. Li, J.-R. Oh, J.-G. Je, Chemosphere 56 (2004) 611.
- [38] L. Patrolecco, S. Capri, S. de Angelis, R. Pagnotta, S. Polesello, S. Valsecchi, Water, Air, Soil Pollut. 172 (2006) 151.
- [39] Z. Xie, S. Lakaschus, R. Ebinghaus, A. Caba, W. Ruck, Environ. Pollut. 142 (2006) 170.
- [40] Z. Xie, J. Selzer, R. Ebinghaus, A. Caba, W. Ruck, Anal. Chim. Acta 565 (2006) 198.





## 3.6.- Discussió addicional a l'article

### 3.6.1.- Organització i incidències de les campanyes de presa de mostra

L'organització d'una campanya de presa de mostra és un procés llarg i complicat en el que s'han de tenir en compte molts factors, alguns dels quals no es poden controlar, com ara la meteorologia. Conseqüentment requereix una preparació prèvia exhaustiva per a intentar tenir sota control la major part de les variables. Un cop dissenyada la campanya, el més complicat és portar-la a la pràctica per primer cop, mentre que les successives preses de mostra són molt més senzilles i sistemàtiques.

En la vigilància ambiental que aquí es considera es va partir de l'existent RCSP de la que es disposava de la localització (riu i població) així com de les coordenades Universal Transversal de Mercator (UTM) de tots els punts. Per a localitzar els punts que teníem sobre el paper es va realitzar una fitxa per a cadascun d'ells (Annex A) que inclou la situació aproximada en un mapa de carreteres. A partir de les fitxes amb tota la informació i un aparell de sistema de posició global (GPS, de l'anglès *global position system*) es va intentar trobar la localització exacta dels punts de presa de mostra. En aquest procés es van donar diversos problemes que van fer modificar la localització dels punts, tal i com s'indica a la [Taula 3.6](#) amb les coordenades corresponents a la RCSP i les definitives per al projecte AquaTerra. En la major part dels punts les coordenades coincidien amb una variació mínima atribuïble a la precisió de l'aparell GPS emprat o a la modificació en el punt del pont escollit per a recollir la mostra. Hi ha 6 casos, però, en els que aquesta diferència va ser molt més gran degut bàsicament a:

- El punt de la RCSP no coincidia amb l'aigua: T2/SP18, R6/SP12, T19/SP16.
- El punt es trobava en una propietat privada: T7/SP13.
- Va ser impossible accedir degut a la manca d'un pont (en les campanyes de la RCSP també disposaven d'una barca) i a les dificultats per arribar a la riba degut a la vegetació de ribera: T15/SP5.1, R18/SP9.

En tots aquests casos es va agafar la mostra en el punt més proper al qual es podia tenir un bon accés al riu, ja que és important agafar la mostra sempre al mateix lloc per a tenir una bona repetibilitat. A part d'aquest primer mostreig, més llarg i complicat que la resta, durant els

altres 5 hi va haver certes incidències remarcables que poden incidir en els resultats analítics posteriors a més d'impedir en alguns casos la recollida de la mostra:

~ **Meteorològiques:** la calor excessiva afecta al procés de presa de mostra, ja que les mostres s'han de conservar a temperatures baixes per a evitar la seva degradació. En casos de calor extrema com la presa de mostra del juny de 2006 en la que es va arribar a temperatures de 39 °C i era molt difícil de mantenir les mostres a temperatures properes a 4 °C. En l'extrem oposat, la nevada generalitzada a tot el nord d'*Espanya* del novembre de 2005 va impedir que es poguessin recollir dues mostres (R0 i T12) ja que la carretera estava impracticable. La mostra R0 es va poder agafar un mes més tard però no així la T12. La pluja i el vent també dificulten considerablement la presa de mostra, ja que les cordes rellisquen quan estan mullades i les dragues oscil·len molt amb el vent.

~ **De procediment:** les dragues no sempre funcionen a la perfecció, tot i que tant la d'aigua com la de sediments estan basades en procediments mecànics senzills.

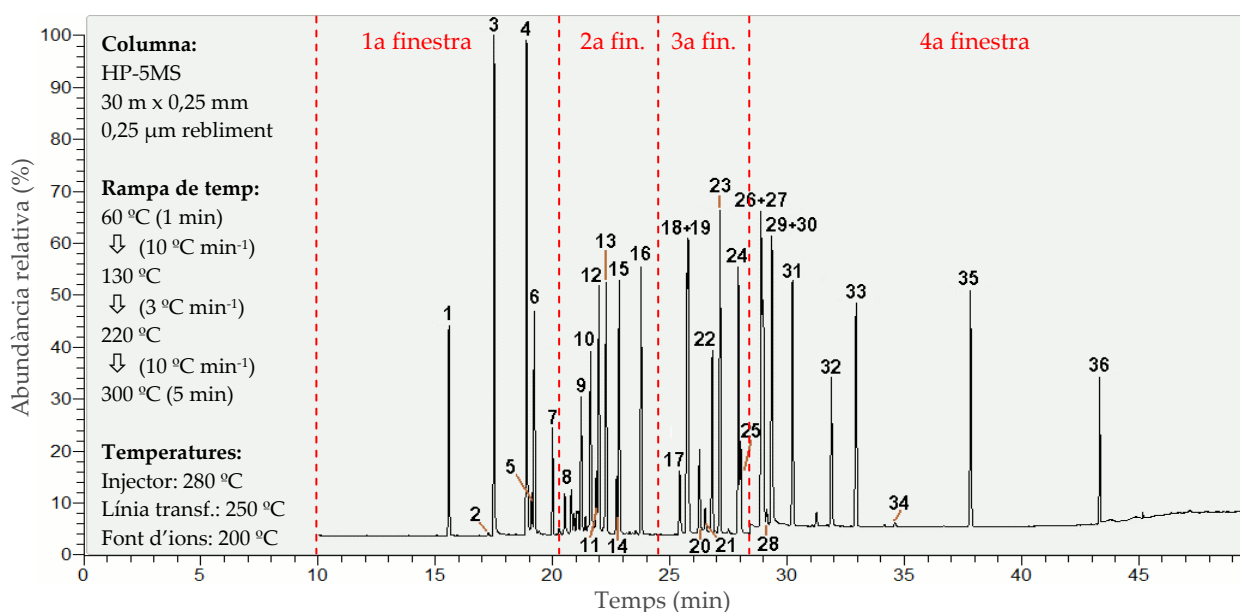
- Pel que fa a la draga d'aigua, en els casos en els que hi ha molt corrent aquesta rellisca a sobre de la superfície enlloc d'enfonsar-se. Això va passar repetidament en els punts T15 i T16, en el primer dels punts aquest fenomen va provocar que la draga es quedés travada amb unes pedres en una de les campanyes i va resultar difícil i perillós poder recuperar-la. Per altra banda és comú perdre alguna ampolla de vidre de les que van dins de la draga, de forma que cal portar-ne sempre de recanvi.
- Al contrari del que passa amb l'aigua, que sempre que n'hi ha se'n pot agafar, amb els sediments es poden donar molts fenòmens que impedeixen recollir la mostra. En molts casos és difícil trobar un bancal de sediments i s'ha d'anar provant diverses vegades, en altres casos si les pedres del fons es queden enganxades la draga no tanca bé, de forma que els sediments s'escapen. Per altra banda si hi ha algues és fàcil que la draga les agafi i costi treure de l'aigua. Un cop la draga està plena i fora de l'aigua poden aparèixer sediments amb molts residus. A més en molts casos cal tornar a tirar la draga per a poder agafar una quantitat més gran.

~ **D'estat físic:** una campanya de presa de mostra al llarg d'un riu com l'Ebre implica fer una mitjana de 2.000 km en aproximadament una setmana. Per altra banda les dragues s'han de llançar moltes vegades al riu, ja sigui perquè no s'aconsegueix la mostra o perquè quan s'organitza un mostreig sempre es recullen mostres per a molts estudis diferents (en cada campanya es podien arribar a recollir 100 mostres d'aigua i 50 de sediments/sòls). Les dragues són molt pesades (12 kg la d'aigua i 3,5 kg la de sediments) i a més s'han d'aixecar molts metres a pols, depenent de l'alçada del pont. Considerant tots aquests factors és lògic pensar que el cansament es va acumulant, fet que també dificulta la presa de mostra.

### **3.6.2.- Anàlisi de les mostres d'aigua i sediments de la conca de l'Ebre**

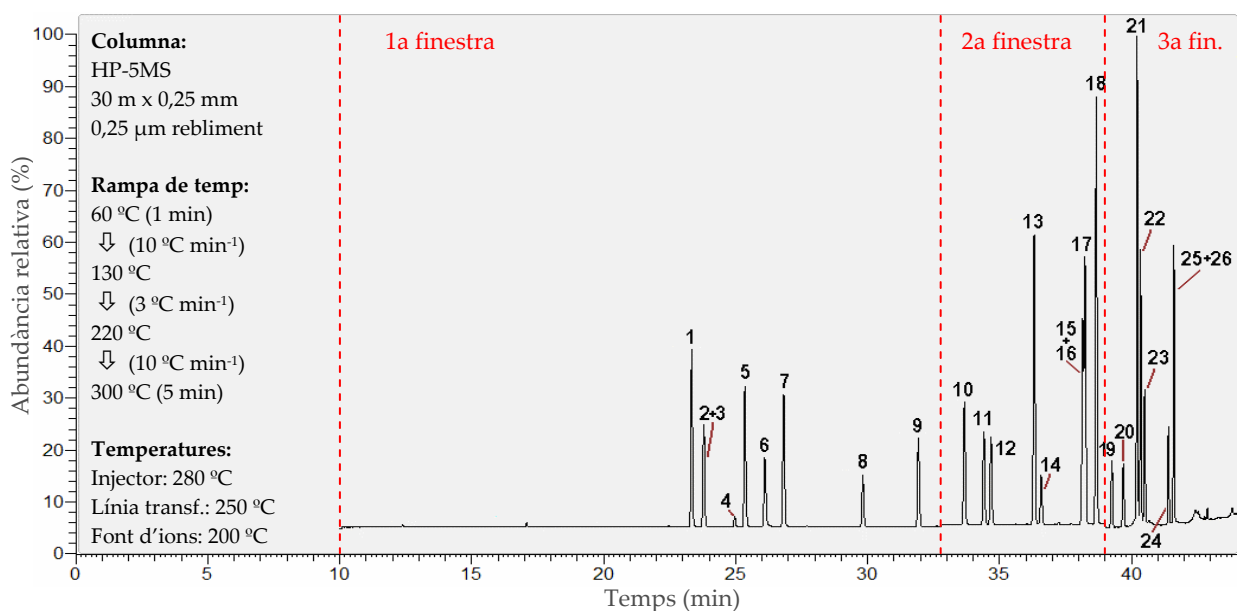
La utilització de SPE per al tractament de les mostres d'aigua i de PLE per als sediments va permetre en tots els casos l'extracció simultània dels 68 compostos d'estudi, establint així una metodologia multiresidual per a compostos prioritari en ambdues matrius. La major dificultat que plantegen aquests protocols és la seva aplicació per a la determinació simultània de diverses famílies de compostos quan aquestes presenten diferents paràmetres fisicoquímics (solubilitat, polaritat, volatilitat...). Per tant es va arribar a un compromís que potenciava una recuperació acceptable per a tots els compostos en detriment del que eren les condicions òptimes per a cadascun d'ells. En aquest punt va adquirir una gran importància la selecció d'un gran nombre i diversitat de patrons de recuperació, amb els que es van poder corregir les pèrdues dels anàlits durant la manipulació de la mostra.

L'optimització de la metodologia de GC-MS en la que es van separar els 68 compostos en tres separacions de GC-MS diferents es mostra amb els respectius cromatogrames, la seva divisió en les diferents finestres i la identificació de cadascun dels pics a les [Figures 3.4, 3.5 i 3.6](#). Els criteris d'identificació dels anàlits es van basar en la comparació de l'espectre de masses en SIM de l'anàlit amb el seu respectiu patró utilitzant 3 m/z i les seves intensitats relatives, acceptant com a màxim una variació del 20% en les intensitats relatives de les 3m/z entre la mostra i el patró.



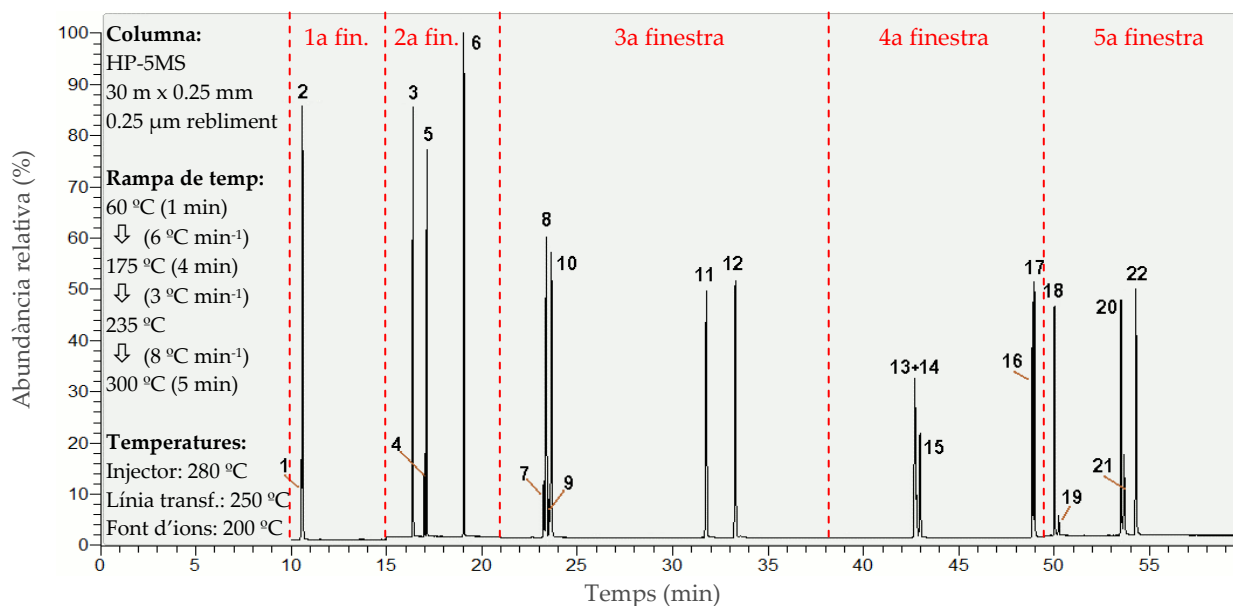
1: molinat; 2: ometoat; 3: OP; 4: TBP; 5: atrazina-desetil-D6; 6: atrazina-desetil; 7: trifluralina; 8: NP; 9: dimetoat; 10: simazina; 11: atrazina-D5; 12: atrazina; 13: propazina; 14: terbutilazina-D5; 15: terbutilazina; 16: diazinon; 17: NP-D8; 18: propanil; 19: diclofention; 20: paration-metil; 21: alaclor-D13; 22: alaclor; 23: fenclorfos; 24: terbutrina; 25: fenitroton; 26: malation; 27: metolaclor; 28: paration-etil-D10; 29: clorpirifòs; 30: paration-etil; 31: bromofos-metil; 32: clorfenvinfòs; 33: bromofos-etil; 34: BPA; 35: etion; 36: azinfos-etil

**Figura 3.4:** Cromatograma de GC-MS d'un patró de pesticides polars, APs i plastificants a 600 µg L<sup>-1</sup>



1: α-HCH; 2: HCB-<sup>13</sup>C6; 3: HCB; 4: β-HCH; 5: γ-HCH; 6: antracè-D10; 7: δ-HCH; 8: heptaclor; 9: aldrina; 10: isodrina; 11: heptaclor-exo-epòxid; 12: heptaclor-endo-epòxid; 13: 2,4'-DDE; 14: α-endosulfan; 15: dieldrina; 16: 4,4'-DDE-D8; 17: 4,4'-DDE; 18: 2,4'-DDD; 19: endrina; 20: β-endosulfan; 21: 4,4'-DDD; 22: 2,4'-DDT; 23: endrina aldehyd; 24: endosulfan-sulfat; 25: 4,4'-DDT-<sup>13</sup>C12; 26: 4,4'-DDT

**Figura 3.5:** Cromatograma de GC-MS d'un patró de pesticides organoclorats a 600 µg L<sup>-1</sup>



1: naftalè-D8; 2: naftalè; 3: acenaftilè; 4: acenaftè-D10; 5: acenaftè; 6: fluorè; 7: fenantrè-D10; 8: fenantrè; 9: antracè-D10; 10: antracè; 11: fluorantè; 12: pirè; 13: benzo(a)antracè; 14: crisè-D12; 15: crisè; 16: benzo(b)fluorantè; 17: benzo(k)fluorantè; 18: benzo(a)pirè; 19: perilè-D12; 20: indè(1,2,3-cd)pirè; 21: dibenzo(a,h)antracè; 22: benzo(g,h,i)perilè

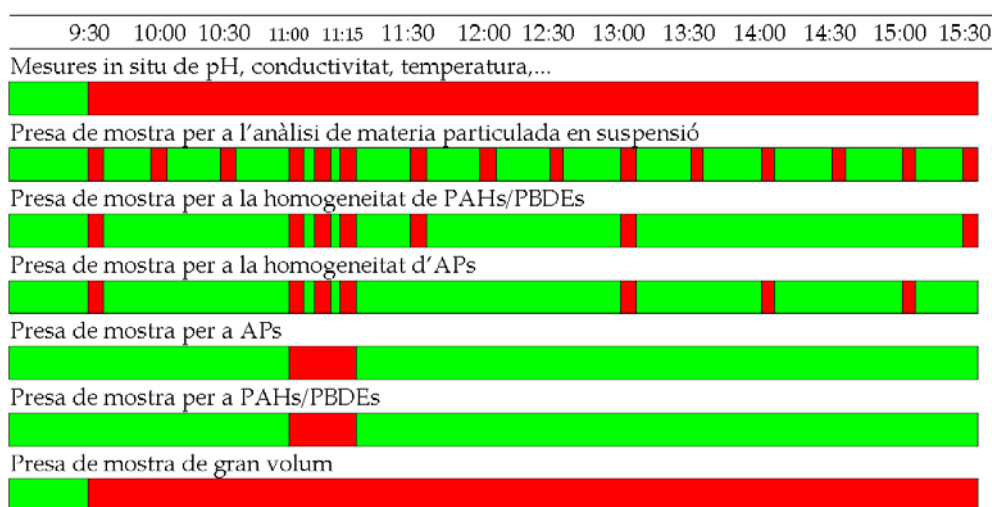
**Figura 3.6: Cromatograma de GC-MS d'un patró de PAHs a 600 µg L<sup>-1</sup>**

Els 3 grups de compostos es van analitzar tant a les mostres d'aigua com a les de sediments durant les dues primeres campanyes. Després de comprovar les concentracions obtingudes per a les campanyes del 2004 es va observar, com era d'esperar, que a les mostres d'aigua els pesticides organoclorats no es detectaven mai i els PAHs apareixien a una fracció molt petita de les mostres i sempre al nivell dels límits de detecció, de manera que aquest dos grups només es van analitzar a les mostres de sediments a la resta de campanyes.

### **3.6.3.- Estudi interlaboratori de presa de mostra i metodologia analítica**

L'estudi d'interlaboratori es va dissenyar per a comparar tant la metodologia de presa de mostra com la seva posterior anàlisi. Aquest va constar primerament d'unes sessions teòriques així com d'un intercanvi d'informació sobre les diferents tècniques de mostreig per a la posterior aplicació a les aigües del riu *Po* al seu pas per *Ferrara (Italia)*. La recollida de les mostres es va portar a terme l'11 d'octubre de 2006 seguint una planificació molt estructurada per a poder coordinar les diverses activitats que calia portar a terme simultàniament o de forma seqüencial. Els paràmetres bàsics de qualitat de l'aigua com ara el pH, la conductivitat o la temperatura es van mesurar de forma contínua i les mostres per a l'anàlisi de matèria

particulada en suspensió es van recollir cada 30 minuts i més freqüentment al voltant de les 11:00. Els 8 laboratoris participants a l'estudi van realitzar la presa de mostra per a la posterior anàlisi exactament a les 11:00 i amb una durada màxima de 5 minuts. Així mateix la presa de mostra de gran volum per a l'anàlisi dels contaminants presents a la matèria particulada es va portar a terme entre les 9:30 i les 15:30. La [Figura 3.7](#) mostra un esquema de la presa de mostra on les barres vermelles indiquen els diferents moments en els que es va recollir aigua. Per altra banda la [Figura 3.8](#) mostra el moment en que es va realitzar la presa de mostra simultània per a l'anàlisi dels compostos d'estudi.



Font: JRC (2007)

**Figura 3.7:** Esquema de la presa de mostra de l'interlaboratori al riu Po (Itàlia)



**Figura 3.8:** Fotografia del moment de presa de mostra de cadascun dels equips participants a l'estudi interlaboratori

Els organitzadors de l'interlaboratori van optar per fer una anàlisi més detallada dels APs, que es recull a la publicació 2, anteriorment reproduïda, degut a la gran ubiqüitat d'aquests compostos al medi i a que la quantitat de dades que existeixen sobre aquesta família de compostos en la literatura és molt menor que per a l'altra família considerada a l'exercici. A més, en el cas dels PAHs les concentracions detectades en les mostres d'aigua es trobaven majoritàriament per sota de límit de detecció, fet que impossibilitava la comparació entre els diversos laboratoris.

En aquest estudi interlaboratori es van analitzar tres tipus de mostres:

~ **Solució estàndard:** les concentracions obtingudes tant per al NP com per l'OP van ser satisfactòries amb només una subestimació del 12% i del 9,5% respectivament.

~ **Extracte d'aigua de riu:** la concentració real d'aquesta mostra no era coneguda ja que es tractava d'una mostra real d'aigua del riu Po amb la que es va fer una única extracció en fase sòlida de la que cada equip va rebre una fracció de l'extracte. A partir dels valors obtinguts dels diferents laboratoris els organitzadors van arribar a la conclusió que la concentració aproximada de NP era de  $600 \text{ ng mL}^{-1}$ , però val a dir que la variabilitat en les concentracions obtingudes pels diferents laboratoris va ser molt gran. En relació amb aquesta concentració de "referència" la que es va obtenir en el nostre cas estava sobreestimada en un 50% però donada la gran dispersió de resultats, no es poden treure conclusions fonamentades. A més de no disposar de la concentració real, per tractar-se d'un extracte d'aigua de riu, no es va realitzar cap tractament estadístic, per tant resulta molt difícil calcular l'error comès per cadascun dels laboratoris participants.

~ **Mostra d'aigua de riu recollida durant l'interlaboratori:** els resultats obtinguts d'aquesta mostra van ser molt variables, fet que es podria relacionar amb la diversitat tant de metodologies d'anàlisi com de mostreig utilitzats per cada equip. Els organitzadors van considerar com a més aproximat el resultat del laboratori 4, de  $5,1 \text{ ng L}^{-1}$ , obtingut d'una mostra corresponent a 4.150 L d'aigua. Cal tenir en compte, però, que en aquesta mostra es va analitzar la matèria particulada i no la fase dissolta com la resta de laboratoris. En base a aproximacions teòriques es va calcular que la concentració corresponent a la fase dissolta era de  $40 \text{ ng L}^{-1}$ , molt per sota de les concentracions que van obtenir tots els laboratoris analitzant directament la fase



dissolta. En el nostre cas particular, cal indicar que les concentracions de NP al riu Po són molt properes al LD de la nostra metodologia (90 ng L<sup>-1</sup>), que està dissenyada per a mostres molt més contaminades com les de la conca de l'Ebre, en les que les concentracions són entre un i dos ordres de magnitud superiors. Al ser el primer cop que vam analitzar una mostra del riu Po desconeixíem els nivells que es podien trobar i per tant es va aplicar la mateixa metodologia que a les mostres de la conca de l'Ebre en la que s'extreuen 200 mL. Això va donar lloc a una concentració a l'extracte molt baixa, propera al LD. Per altra banda cal considerar que agafar un volum tant gran de mostra com el del laboratori 4 és del tot inviable en un mostreig que implica 23 punts.

A més a més de les consideracions individuals de cada tipus de mostra, hi va haver un altre factor que va influir negativament en la qualitat de les concentracions obtingudes. Per a l'anàlisi de les mostres de l'interlaboratori es va haver d'utilitzar l'equip de GC-MS MD800 (Thermo-Quest, Manchester, UK), un equip amb unes prestacions molt inferiors a les de l'equip que s'utilitzava habitualment, un GC-MS de Thermo Electron (San José, USA), el qual estava fora de servei quan s'havien de fer les anàlisis. Durant la quantificació de les mostres es va observar una gran deriva tant en els patrons de recuperació com en el patró intern que donava lloc a una disminució del senyal a mesura que s'avançava en la seqüència cromatogràfica, per aquesta raó les dades de les primeres mostres injectades tenen una qualitat superior que els de les últimes. El primer que es va injectar van ser els patrons, seguits de les solucions estàndards, els extractes d'aigua de riu i finalment les mostres recollides al Po.

Es poden extreure diverses conclusions de l'estudi de la metodologia dels APs, extrapolables a la resta de compostos d'estudi. En primer lloc, és necessari que el procediment i condicions de la presa de mostra siguin consistents amb les característiques de la zona de mostreig, així com que la presa de mostra sigui sistemàtica per a poder extreure conclusions a partir dels resultats de les diferents campanyes i punts de presa de mostra obtinguts. Per altra banda la utilització de patrons de recuperació i de patrons interns és fonamental per a la correcció de les recuperacions, així com per a detectar problemes importants en la metodologia o instrumentació utilitzada.