



PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS

Anna Llop Piñol

Dipòsit Legal: T.1293-2013

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGENATS

Anna Llop Piñol

TESI DOCTORAL

Dirigida per

Dr. Francesc Borrull i Dra. Eva Pocurull

Departament de Química Analítica i Química Orgànica



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona
2013

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Departament de Química Analítica
i Química Orgànica

El Dr. FRANCESC BORRULL BALLARÍN, Catedràtic del Departament de Química Analítica i Química Orgànica de la Facultat de Química de la Universitat Rovira i Virgili, i

La Dra. EVA POCURULL AIXALÀ, Professora del Departament de Química Analítica i Química Orgànica de la Facultat de Química de la Universitat Rovira i Virgili,

FEM CONSTAR:

Que la present Tesi Doctoral, que porta per títol: "PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGENATS", presentada per ANNA LLOP PIÑOL per optar al grau de Doctor per la Universitat Rovira i Virgili, ha estat realitzada sota la nostra direcció, a l'Àrea de Química Analítica del Departament de Química Analítica i Química Orgànica d'aquesta universitat, i que tots els resultats presentats són fruit d'experiències realitzades per l'esmentada doctoranda.

Tarragona, 30 d'abril de 2013.

Dr. Francesc Borrull Ballarín

Dra. Eva Pocurull Aixalà

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013

I per fi arriba aquell moment tan esperat on només puc mirar enrere i veure que aquells moments d'esforç i patiment però també d'experiències increïbles i inoblidables han donat els seus fruits. I és que això no hauria estat possible sense el gran suport que he rebut per grans persones.

En primer lloc voldria expressar el meu més profund agraïment als meus directors de Tesi, el Dr. Francesc Borrull i la Dra. Eva Pocurull, els quals varen confiar en mi i em van donar l'oportunitat de realitzar aquesta tesi en el seu grup. Mil gràcies per tots els consells rebuts, per la vostra disponibilitat i dedicació, i sobretot per recolzar-me i tenir paciència i empatia en les situacions més complicades. És molt difícil trobar-se amb persones amb tant valor humà.

També voldria agrair l'atenció i consells de les Dres. Rosa M. Marcé, Carme Aguilar, Marta Calull, Sandra Peñalver, i de forma més especial a la Núria Fontanals. També vull donar les gràcies al personal del Departament, que m'han ajudat en tot el que han pogut, Tere, Avelina, Eulàlia, Olga, i Dúnia.

Durant aquests anys he tingut la sort de trobar-me amb companys de laboratori excepcionals, amb els quals he tingut l'oportunitat de poder compartir en el dia a dia al laboratori no només experiències a nivell científic, en les quals he rebut innumerables consells i molt suport, sinó que també, en alguns casos, he tingut l'ocasió d'anar més enllà i crear un vincle més personal. A les companyes que quan vaig arribar ja hi eren i vam coincidir poc temps, l'Alba, la Patri, i en especial la Vanessa, que no només em va ensenyar les normes i el funcionament diari del laboratori, sinó que em va ajudar a integrar-me ràpidament al grup. I també la Rosa, la meva *Rousi*, per la seva professionalitat i amistat. Amb els que vaig realitzar cursos i presentacions del DEA, Toni, Marta Pedrouzo, Antonio i Marta Palomo, i compartirem llargues experiències junts. Els que van anar arribant després, Irene, Jasper, Fernando, Vero, Sílvia M., Igor, Maria, Blanca i Silvia E. Voldria agrair de forma molt especial a la Dominika (*Jesteś boska, piękna i mądra*) per ser com és i pels moments compartits, dels quals me n'emporto un gran record, i també als meus companys de laboratori, la Noelia i el Jordi, per crear un caliu especial al laboratori i amb els que he compartit estones molt agradables i alguna que altra confiança. I als companys que van anar arribant més tard i hem coincidit poquet, molts ànims, Mireia, Paula, Laura V., Montse, Núria G., Pol, etc.

Voldria també agrair la col·laboració del personal tècnic de les plantes de tractament d'aigües de les indústries químiques on he passat tantes hores amb la planta pilot i per facilitar-me tant la feina i ajudar-me en tot el que he necessitat. En especial, gràcies al Josep i al Paco. També agraeixo a la Natàlia, la Marta S. i més especialment a la Laura F. molts dels bons moments viscuts en dites visites.

Finalment voldria agrair a la meva família tot el suport que m'han donat al llarg d'aquesta etapa. Al meu pare, pel seu interès constant, a la meva mare, per la seva paciència i col·laboració estant disponible quan més l'he necessitat, al David i a l'Èric, als que sempre he tingut un *carinyo* molt especial, i als meus avis Lluís i Pepita, per deixar-me gaudir-los tant durant aquests anys i mostrar-me el seu orgull i amor incondicional. A vosaltres us voldria dedicar de forma especial aquesta Tesi.

I per damunt de tot al Joan, perquè tot i no entendre gaire el que faig, és el que m'ha donat la força interior per seguir endavant i poder acabar el doctorat. Infinites gràcies per estar al meu costat en els bons i no tan bons moments i sobretot per omplir-me de vida i donar-me els nostres petits però a la vegada molt grans trossos, en Biel i l'Aina. Vosaltres sou el més increïble que m'ha passat a la vida. Us estimo per sobre de tot i espero que algun dia us sentiu orgullosos de mi.

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Tractament d'aigües residuals	5
1.1.1. Processos convencionals de tractament d'aigües residuals	10
1.1.2. Bioreactors de Membrana	16
1.2. Presència de contaminants orgànics en aigües residuals	27
1.2.1. Compostos nitrogenats	30
1.2.1.1. Determinació d'amines alifàtiques primàries en aigües mediambientals i llots.....	36
1.2.1.2. Determinació d'N-Nitrosamines en aigües mediambientals i llots	51
1.3. Bibliografia.....	63
2. OBJECTIUS	71
3. PART EXPERIMENTAL, RESULTATS I DISCUSSIÓ	75
3.1. Tractament d'aigües residuals utilitzant bioreactors de membrana	81
3.1.1. Evaluation of the removal of pollutants from petrochemical wastewater using a membrane bioreactor treatment plant.....	87
3.1.2. Comparison of the removal of phthalates and other organic pollutants from industrial wastewaters in membrane bioreactor and conventional activated sludge treatment plants	107
3.1.3. Discussió de Resultats.....	129
3.2. Determinació d'amines alifàtiques primàries i N-Nitrosamines en mostres aquoses	135

3.2.1. Automated determination of aliphatic primary amines in wastewater by simultaneous derivatization and headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography tandem mass spectrometry	141
3.2.2. Fully automated determination of <i>N</i> -Nitrosamines in environmental waters by headspace solid-phase microextraction followed by GC-MS-MS	161
3.2.3. Discussió de Resultats	181
3.3. Determinació d'amines alifàtiques primàries i <i>N</i> -Nitrosamines en llocs.....	189
3.3.1. Pressurised hot water extraction followed by simultaneous derivatization and solid-phase microextraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry of aliphatic primary amines in sewage sludge	193
3.3.2. Automated on-fiber derivatization with headspace SPME-GC-MS-MS for the determination of primary amines in sewage sludge using pressurized hot water extraction.....	211
3.3.3. Pressurised hot water extraction followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of <i>N</i> -Nitrosamines in sewage sludge	227
3.3.4. Discussió de Resultats	245
4. CONCLUSIONS.....	253
ANNEX I. Llistat de publicacions	257

1. INTRODUCCIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013

La determinació de compostos orgànics contaminants en aigües residuals, tant d'origen urbà com industrial, és un tema que ha suscitat un creixent interès, d'una banda des del punt de vista de la problemàtica mediambiental que es deriva de l'abocament d'aquestes aigües al medi aquàtic públic, i d'altra banda, des de la perspectiva de la reutilització de les aigües residuals un cop tractades, per exemple, en processos industrials, agrícoles, de lleure o per a ús de boca.

Diversos estudis han posat de manifest que la majoria dels compostos orgànics contaminants no s'eliminen completament en les plantes de tractament d'aigües convencionals, fet pel que s'han de controlar [1].

Les autoritats governamentals a nivell mundial estan imposant cada cop normatives més severes pel que fa als límits de vessament de les aigües tractades i, per tant, hi ha un estudi constant sobre les millores a desenvolupar en els processos de tractament de les aigües. Això ha fet necessaris, en primer lloc, desenvolupar nous estudis de processos de tractament que permetin complir amb les normatives vigents i, en segon lloc, desenvolupar mètodes analítics altament sensibles per tal de poder determinar aquests compostos contaminants a baixes concentracions.

Tenint en compte aquesta problemàtica, darrerament s'han estat estudiant noves tecnologies de tractament d'aigües residuals que s'adaptin a les necessitats del medi, i s'ha observat que la tecnologia dels bioreactors de membrana (BRM) és una alternativa a considerar.

Els BRM són una modificació dels processos de tractament convencionals, on es realitza una substitució dels dipòsits de sedimentació secundaris per unes unitats de micro o d'ultrafiltració per membrana, que s'acoblen al reactor de depuració biològica i que ofereixen grans avantatges en comparació amb els processos convencionals, com són, per exemple, la compactació del procés i l'obtenció d'una aigua tractada amb una qualitat superior a l'obtinguda amb els processos de tractament convencionals.

Per tal de controlar l'eficàcia en l'eliminació dels compostos contaminants, tant en les plantes de tractament convencionals com en les que utilitzen BRM, és necessari el desenvolupament de nous mètodes, generalment cromatogràfics, que utilitzin tècniques de preconcentració, i que permetin identificar aquests compostos i arribar a quantificar-los a molt baixes concentracions.

En aquest sentit, cal posar de manifest que s'ha iniciat amb aquesta Tesi Doctoral una nova línia en el grup de recerca, en la qual una part important ha estat la posta en funcionament d'una planta pilot amb bioreactors de membranes pel tractament de diversos tipus d'aigües residuals industrials i l'avaluació de l'eficàcia d'aquesta

planta per tractar els diversos tipus d'aigües. Així mateix, s'ha dut a terme el desenvolupament de mètodes analítics adients per a la determinació de diverses famílies de contaminants orgànics en aigües i també en llocs provinents de plantes de tractament d'aigües, amb la seva corresponent aplicació posterior en mostres de diferents plantes de tractament de la zona, tant industrials com urbanes. Per tant, l'objectiu d'aquest capítol ha estat la realització d'un estudi bibliogràfic dels desenvolupaments en el camp de l'anàlisi dels contaminants orgànics en mostres aquoses i en llocs activats provinents de plantes de tractament d'aigües residuals, fent un especial esment a les famílies de compostos nitrogenats, que són els compostos que s'han estudiat de forma més específica en aquesta Tesi Doctoral. També s'ha considerat apropiat fer una breu introducció dels diversos processos de tractament d'aigües residuals, principalment els processos convencionals i els que utilitzen bioreactors de membrana.

1.1. Tractament d'aigües residuals

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013

L'aigua és el recurs natural indispensable per a la vida i el suport directe i indirecte de tots els sistemes ecològics. La intervenció de l'home en el cicle hidrològic i la modificació del seu règim natural produeix impactes de diferent tipologia que afecten tant a la pròpia qualitat del recurs com al seu entorn mediambiental.

Una part dels problemes ambientals relacionats amb l'aigua tenen el seu origen en el deteriorament de la seva qualitat, provocat per l'acció humana en el procés d'ús, contaminació i abocament del recurs.

Es consideren aigües residuals totes aquelles procedents de les activitats humanes que es desenvolupen en molts àmbits diversos, com ara: nuclis urbans, processos industrials, activitats mineres, agrícoles i ramaderes, entre d'altres. També es poden incloure les aigües pluvials quan són afectades per dita activitat.

Degut a la utilització massiva de l'aigua i a la seva contaminació desmesurada, les autoritats governamentals exigeixen que aquestes aigües siguin tractades, abans de la seva reutilització i/o abocament.

Les normes de qualitat de les aigües estan correctament basades en un o dos criteris: qualitat de les aigües superficials o normes de limitació de vessaments. Les normes de qualitat de les aigües superficials inclouen l'establiment de qualitat d'aigües dels receptors, mentre que les normes de vessaments estableixen la qualitat de les aigües residuals en el seu punt de vessament mateix.

Un desavantatge de les normes de limitació de vessament és que no estableixen controls sobre el total de càrregues contaminants vessades en els receptors. Una gran indústria, per exemple, encara que porti a terme el mateix tractament que una petita indústria, pot causar molta més contaminació del receptor. Tanmateix, les normes de limitació de vessament són molt més fàcils de controlar que les de qualitat de les aigües dels receptors, que requereixen una anàlisi detallada de dites aigües.

La composició físico-química i biològica de l'aigua condiciona la seva reutilització. Amb aquest fi existeixen diversos criteris de qualitat per cada ús específic, que delimiten l'aptitud d'una aigua per aquest ús.

En quant a la legislació d'abocaments d'aigües residuals industrials, a la taula 1 es descriuen els contaminants típics de les aigües residuals i la quantitat límit que l'aigua residual pot contenir, per ser abocada des de la planta directament a mar a Catalunya [2].

Taula 1. Límits d'emissió d'abocaments d'aigües residuals industrials a mar.

Paràmetres	Valor límit	Unitats
ΔT ($^{\circ}C$) ¹	5	$^{\circ}C$
pH (interval)	6-10	Unitats de pH
MES (Matèria en Suspensió)	250	mg/l
DQO _{nd} ²	700	mg/l O ₂
DBO ₅	300	mg/l O ₂
TOC (Carboni Orgànic Total)	300	mg/l C
Olis i greixos/Matèries extractables	50	mg/l
Fòsfor Total	30	mg/l P
Fosfats	90	mg/l PO ₄ ³⁻
Nitrogen orgànic i amoniacal ³	80	mg/l N
Amoni	50	mg/l NH ₄ ⁺
Nitrats	100	mg/l NO ₃ ⁻
Cianurs	1	mg/l CN ⁻
Índex de Fenols	2	mg/l C ₆ H ₅ OH
Alumini	20	mg/l Al
Arsènic	1	mg/l As
Cadmi	0,5	mg/l Cd
Coure	3	mg/l Cu
Crom Hexavalent	0,5	mg/l Cr (VI)
Crom Total	3	mg/l Cr
Mercuri	0,1	mg/l Hg
Níquel	5	mg/l Ni
Plom	1	mg/l Pb
Zinc	10	mg/l Zn
MI (Matèries Inhibidores)	25	Equitox
Color	Inapreciable en dilució 1/30	
Nonilfenol	1	mg/l NP
Tensioactius Aniónics ⁴	6	mg/l LSS
Plaguicides Totals	0,10	mg/l

Taula 1. Continuació

Paràmetres	Valor límit	Unitats
Hidrocarburs Totals	15	mg/l
Hidrocarburs Aromàtics Policíclics	0,01	mg/l
BTEX ⁵	5	mg/l
AOX ⁶	1,5	mg/l Cl
Cloroform	1	mg/l Cl ₃ CH
1,2 Dicloretà	0,2	mg/l Cl ₂ C ₂ H ₄
Tricloroetilè (TRI)	0,2	mg/l Cl ₃ C ₂ H
Percloroetilè (PER)	0,2	mg/l Cl ₄ C ₂
Triclorobenzè	0,1	mg/l Cl ₃ C ₆ H ₃
Tetraclorur de Carboni	1	mg/l Cl ₄ Cl
Tributilestany	0,1	mg/l
PCB's	0,005	mg/l

1. El salt tèrmic no ultrapassarà una diferència de 5°C a una distància de 30 m mesurats des de la vertical del punt d'emissió en la direcció del corrent marí en contraposició de la temperatura a la mateixa distància i en sentit contrari.
2. DQO no decantada.
3. Nitrogen amoniacal + orgànic determinat d'acord amb el mètode *Kjeldahl*.
4. Substàncies actives amb el blau de metilè expressades com lauril sulfat sòdic (LSS).
5. Suma de benzè, toluè, etilbenzè i xilè.
6. Es podran contemplar valors superiors d'AOX en aquells casos on es compleixin els valors d'organoclorats individualitzats de la taula de referència.

Els compostos contaminants presents a l'aigua residual poden eliminar-se en gran part amb processos químics, físics i/o biològics, que s'utilitzen conjuntament en els sistemes de tractament. Uns dels processos predominantment físics són el desbast, el mesclat, la floculació, la sedimentació, la flotació, la transferència de gasos i la filtració. En els processos químics s'addicionen reactius químics per eliminar o convertir contaminants per precipitació, adsorció, desinfecció o per formar floculs. En els processos biològics es duu a terme la degradació dels contaminants per acció de l'activitat biològica de microorganismes, on la principal aplicació n'és l'eliminació de les substàncies orgàniques biodegradables presents a l'aigua residual en forma

col·loïdal o en dissolució. Bàsicament aquestes substàncies es converteixen en gasos, que s'alliberen a l'atmosfera, i en teixit cel·lular biològic.

Però malgrat tots aquests processos de tractament d'aigües en els sistemes convencionals, hi ha contaminants que no s'eliminen per complet [3-8], i això fa que les aigües tractades no es puguin reutilitzar, degut a la presència d'aquests compostos tòxics. És per aquest motiu, que cal buscar uns processos de tractament encara més eficients.

1.1.1. Processos convencionals de tractament d'aigües residuals

Els processos físics, químics i biològics es combinen i completen per donar lloc a diversos nivells de depuració de les aigües.

El grau de tractament requerit per una aigua residual depèn fonamentalment dels límits d'abocament per a cada efluent i de la càrrega de l'aigua d'entrada. Una classificació convencional dels processos de tractament d'aigües residuals, pot ser:

- Pretractament: Eliminació dels constituents que poden provocar problemes de manteniment i funcionament dels diferents processos.
- Tractament primari: Eliminació dels sòlids en suspensió i els materials flotants, imposat pels límits, tant de descàrrega al medi receptor com per poder dur els efluent a un tractament secundari.
- Tractament secundari convencional: Eliminació dels sòlids en suspensió i dels compostos orgànics biodegradables.
- Tractament terciari: Eliminació dels contaminants que no s'han pogut eliminar anteriorment per tal d'aconseguir una qualitat de l'efluent superior.

A la taula 2 [9] es presenten els diferents tipus de pretractament i tractaments primari, secundari i terciari de les aigües residuals.

Taula 2. Tipus de pretractament i tractaments de les aigües residuals.

Pretractament i Tractament Primari	
Operació	Aplicació
Desbast	Eliminació de sòlids grossos en suspensió mitjançant l'ús de reixetes.
Dilaceració	Trituració de sòlids grossos fins a aconseguir una mida menor.
Flotació	Separació de sòlids de baixa densitat o partícules líquides d'una fase líquida, generalment amb petites bombolles d'aire que els obliguen a elevar-se cap a la superfície.

Taula 2. Continuació

Pretractament i Tractament Primari	
Operació	Aplicació
Homogeneïtzació	Procés per a aconseguir un corrent mesclat i neutre.
Desensorrat	Eliminació de les sorres contingudes en les aigües residuals.
Desengreixat	Eliminació de la major part de greixos, olis i detergents que puguin interferir en processos posteriors.
Filtració	Eliminació de les partícules que no han sedimentat.
Sedimentació	Eliminació de les matèries per sedimentació en funció de la diferència de pes específic entre les partícules sòlides i el líquid on es troben, que acaba amb el dipòsit de les matèries en suspensió.
Floculació	Addició de certs reactius químics que permeten que les partícules molt petites augmentin de mida i sedimentin. Els principals floculants són: sulfat d'alumini, clorur fèrric i polielectrolits.
Coagulació	Agitació molt suau que ajuda a que els floculs s'uneixin entre ells fent-los més grans. També pot fer-se afegint coagulants (poliamides, poliacrilamides).
Tractament Secundari	
Operació	Aplicació
Fangs activats	Tractament biològic en el que se sotmet una aigua residual a una aireació durant un període de temps i es redueix el seu contingut de matèria orgànica, formant-se un fang floculent.
Aireació prolongada	És una modificació del procés de fangs activats aconseguint l'oxidació total i disminuint la quantitat de fang total.
Estabilització per contacte	És una modificació dels fangs activats en el que l'aigua residual es mescla amb un fang estabilitzat. El temps de contacte és més gran però es mantenen volums menors.
Llacunes airejades	Les llacunes airejades són basses profundes de 1-4m, en les que l'oxigenació de l'aigua residual es realitza mitjançant aireació. La diferència amb els fangs activats és que en aquests es recicla el fang i en les llacunes no.
Basses d'estabilització	Són basses en les que no s'utilitza l'aireació. L'oxigen necessari s'obté de la superfície natural d'aireació i de les algues que produeixen oxigen per fotosíntesi. L'oxigen alliberat per les algues en la fotosíntesi s'utilitza pels bacteris per la degradació aeròbica de la matèria orgànica. Els productes de degradació són utilitzats de nou per les algues, establint-se així, una relació simbiòtica.
Filtres percoladors	També anomenats filtres biològics. En aquest cas s'utilitza un suport pel creixement biològic que es manté fix, es denominen reactors de creixement biològic assistit.
Biodiscs	Són sistemes en els que la biomassa es presenta simultàniament en la forma de creixement assistit (filtres percoladors) i creixement en suspensió (fangs activats).
Tractaments anaerobis	El tractament anaerobi s'utilitza per les aigües residuals i per la digestió dels fangs. Els productes finals de la degradació anaeròbia són gasos metà i diòxid de carboni i petites quantitats de sulfur d'hidrogen.

Taula 2. Continuació

Tractament Terciari	
Operació	Aplicació
Adsorció en carbó actiu	El carbó actiu actua de fase sòlida adsorbint els contaminants de la fase líquida que es volen eliminar.
Intercanvi iònic	Procés en el que els ions es mantenen units a grups funcionals sobre la superfície d'un sòlid, mitjançant forces electrostàtiques i s'intercanvien per ions d'una espècie diferent de dissolució.
Osmosi inversa	El procés d'osmosi inversa utilitza una membrana semipermeable per separar els sòlids dissolts de l'aigua. S'anomena osmosi inversa ja que es requereix una pressió per forçar el pas de l'aigua pura a través de la membrana, sortint les impureses darrera.
Electrodiàlisi	Procés electroquímic que permet dessalar un corrent aquós mitjançant l'ús de corrent elèctrica.
Cloració	Procés de desinfecció de l'aigua residual, mitjançant l'ús de clor.
Ozonització	Procés de desinfecció de l'aigua residual, mitjançant l'ús d'ozó.
Desinfecció	Destrucció selectiva de microorganismes causants de possibles malalties.
Precipitació química	Eliminació de fòsfor present a les aigües residuals fent-lo precipitar en forma de fosfats. Els agents de precipitació més utilitzats en l'eliminació de fòsfor són Fe^{3+} (com $FeCl_3$), Ca^{2+} (com calç) i Al^{3+} (com $Al_2(SO_4)_3 \cdot 16H_2O$).

La selecció dels processos de tractament d'aigües residuals o la sèrie de processos de tractament depenen d'un cert nombre de factors, entre els que s'inclouen:

- Característiques de l'aigua residual: DBO (Demanda Bioquímica d'Oxigen), matèria en suspensió, pH, productes tòxics.
- Qualitat de l'efluent de sortida requerit.
- Disponibilitat de terrenys (en el cas de tancs d'estabilització).
- Previsió de límits de qualitat de vessaments més estrictes, que necessiten el disseny de tractaments més sofisticats en el futur.

Una estació depuradora d'aigües residuals (EDAR) és una instal·lació destinada a la reducció de la contaminació que contenen les aigües residuals abans de ser abocades al medi receptor. Aquesta reducció es realitzarà en major o menor grau en funció dels processos de depuració implantats.

Les EDAR es poden classificar segons el tipus d'aigües residuals, urbanes o industrials, que es vol tractar. Les aigües residuals urbanes tenen un elevat contingut de matèria orgànica biodegradable i procedeixen dels nuclis urbans. En canvi, les aigües residuals industrials són de naturalesa molt diversa, ja que depenen de l'activitat industrial de la que procedeixen.

Un altre tipus de classificació de les EDAR és segons el tractament: físicoquímiques, on s'addicionen agents químics per afavorir la decantació dels sòlids en suspensió presents a l'aigua residual, i biològiques, on la depuració té lloc mitjançant processos biològics on hi intervenen microorganismes que actuen sobre la matèria orgànica i inorgànica, en suspensió, dissolta i col·loïdal, present a l'aigua residual transformant-la en sòlids sedimentables més fàcils de separar. Per aconseguir una depuració més òptima, el més comú és combinar aquests dos tipus de depuració.

Les depuradores solen tenir dues línies de funcionament: la línia d'aigües i la línia de fangs [10]. La primera correspon a la part del procés de depuració que tracta únicament les aigües residuals. La segona correspon a la part del procés de depuració que tracta els fangs regenerats com a conseqüència del procés de depuració de la línia d'aigua.

A la figura 1 es mostra el diagrama de flux d'una estació depuradora d'aigua residual a nivell global, destacant la línia d'aigües i la línia de fangs, i a la figura 2, el diagrama de flux indicant cadascun dels processos que hi intervenen [10,11].

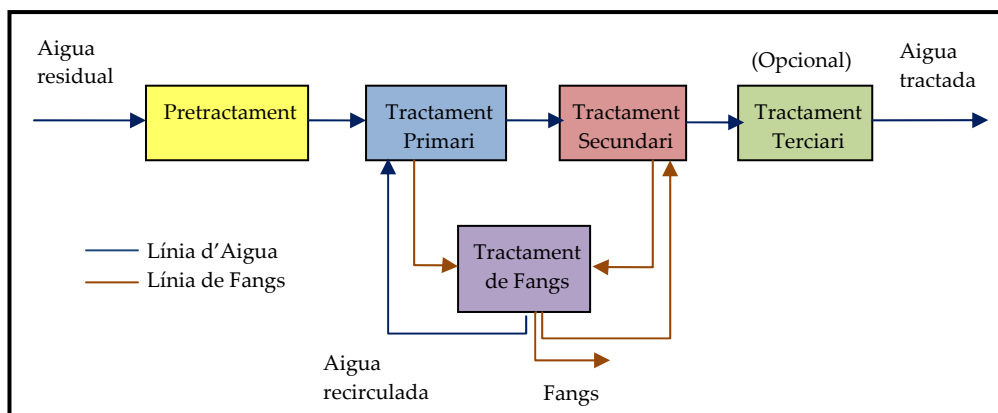


Figura 1. Diagrama de flux general d'una EDAR.

El funcionament d'una depuradora típica, com la mostrada a la figura 2, es descriu a continuació:

- Línia d'Aigües:
 1. L'aigua arriba a l'estació depuradora a través d'un sistema de col·lectors. El tractament s'inicia al pou on s'extreuen, per mitjans mecànics, els elements més pesats i de major mida.
 2. Unes reixes de desbast retenen la porqueria sòlida més grossa.

3. L'aigua s'impulsa cap al pretractament, on se separen les partícules petites. Aquest procés acaba amb el desensorrat-desengreixat on, a través de processos mecànics, es fa enfonsar la sorra i flotar els greixos.
 4. Se separen físicament els sòlids en suspensió al decantador primari, quedant en el fons els fangs primaris. En casos de fortes contaminacions industrials, s'afegeixen coagulants químics i es produeix la floculació, el que afavoreix la decantació de la matèria en suspensió.
 5. S'elimina la càrrega contaminant restant mitjançant un tractament biològic, ja que determinats bacteris s'alimenten de la matèria orgànica, tant la que està dissolta com la que està en suspensió. És necessari un reactor biològic i una aportació d'oxigen que els bacteris necessiten per poder assimilar la matèria orgànica.
 6. Degut al seu pes, la biomassa formada al reactor es diposita en el fons del decantador secundari i així se separa de l'aigua (fangs secundaris). L'aigua tractada, si ja presenta la qualitat adequada per al seu abocament s'aboca o es reutilitza, o sinó, se la sotmet a un tractament terciari. Aquest tractament terciari pot ser de diversos tipus, i s'utilitza o bé per dur un procés d'eliminació de contaminants de mida més petita o d'uns contaminants en concret, per dessalar les aigües, per eliminar el fòsfor de les aigües, o bé per desinfectar les aigües residuals, és a dir, per eliminar els possibles microorganismes que hi puguin haver.
- Línia de Fangs:
 7. Els fangs decantats en el tractament primari s'incorporen a la línia de fangs a través del bombeig de fangs primaris.
 8. El fang procedent dels decantadors és pràcticament líquid. El primer pas del seu tractament és l'espessiment, per a reduir-ne el seu volum. Generalment, per l'espessiment dels fangs primaris s'utilitza un nou decantador.
 9. La resta de fangs procedents del tractament biològic van a parar a un espessidor de fangs secundaris per flotació, augmentant així la concentració del fang.
 10. Un cop el fang està espès, passa a un digestor anaerobi on es redueix la matèria orgànica present.
 11. La digestió anaeròbia ve acompanyada per una alliberació de gas metà que, en el cas de plantes grans pot aprofitar-se com a font d'energia. Aquest gas s'acumula al gasòmetre.

12. Si hi ha excés de gas, al no poder alliberar-lo a l'atmosfera, es disposa d'un cremador per transformar-lo a CO_2 , que encara que afecta a l'efecte hivernacle, ho fa en una proporció molt menor que el CH_4 .
13. El fang digerit passa al dipòsit d'emmagatzematge de fangs, on s'acumula per alimentar el procés de deshidratació.
14. En el procés de deshidratació de fangs s'elimina la màxima part d'aigua possible, per fer el fang menys voluminós i més econòmic de transportar.
15. Un cop deshidratats, els fangs passen a ser emmagatzemats, des d'on són enviats al seu destí definitiu: planta de compostatge, incineradora, vessador, ...

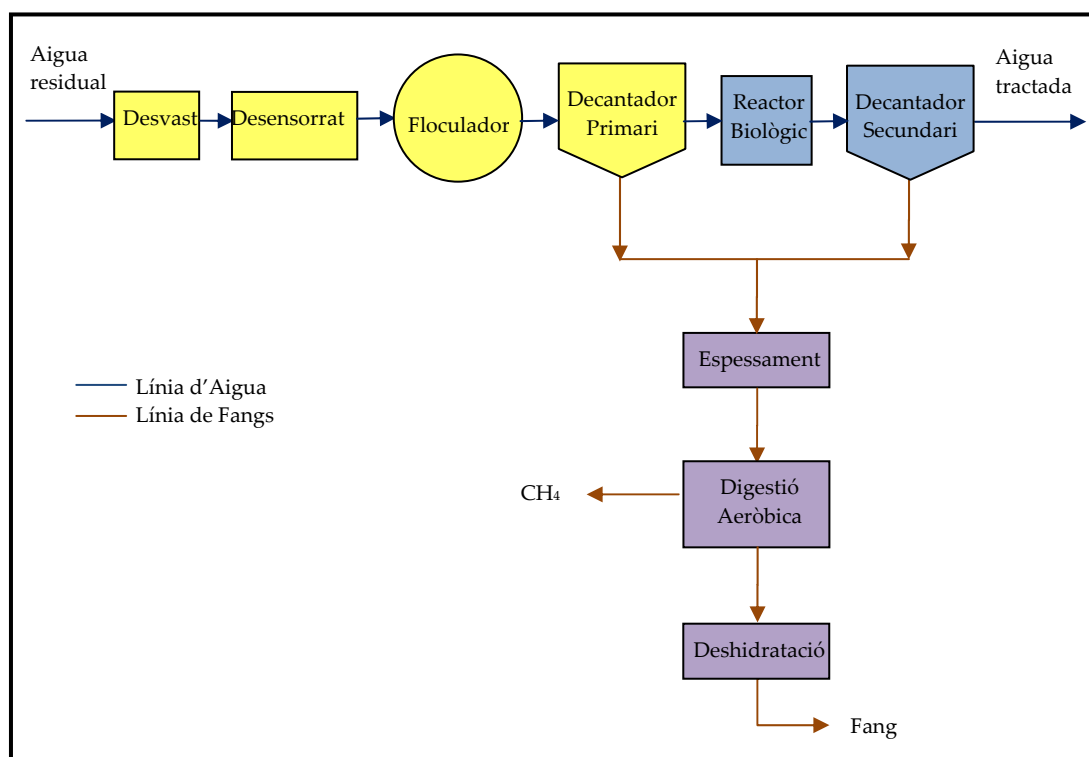


Figura 2. Diagrama de flux i processos d'una EDAR.

La figura 3 mostra com exemple l'estació depuradora d'aigües residuals de Blanes [12], d'on es poden observar alguns dels processos descrits per tractar l'aigua residual i el fang. En primer lloc les aigües residuals que entren en aquesta EDAR són pretractades, a continuació es duu a terme un tractament primari on es decanten els sòlids més pesats. Les aigües sobrenedants es porten al reactor biològic on es tracten per un procés de fangs activats convencional i, seguidament van a parar a un decantador secundari, on s'acabaran de separar les partícules més grosses. Els fangs decantats tant en el decantador primari com en el secundari, es tractaran en un espessidor i posteriorment es deshidrataran per portar-se, per exemple, a la incineradora.



Figura 3. EDAR de Blanes.

1.1.2. Bioreactors de Membrana

Les tècniques biològiques de tractament d'aigües residuals són molt antigues i es venen desenvolupant des de fa més de cent anys. De tots els processos que s'han desenvolupat el sistema convencional de fangs activats ha estat el més estès [13-15].

L'eficàcia dels processos biològics depèn de dos factors principals: la concentració de biomassa al reactor i la relació de transformació específica dels microorganismes. La majoria dels intents de millora dels processos biològics en els últims cent anys ha tingut com a objectiu augmentar la concentració de microorganismes al reactor, bé separant els sòlids i líquids i fent després una recirculació de la biomassa decantada, o bé desenvolupant reactors amb cultiu fix en els que els microorganismes es fixen a un suport.

La tecnologia de membrana, en principi, tenia limitat el seu ús i només s'utilitzava com un tractament terciari en el procés convencional on hi havia requeriments de vessament molt rigorosos o on es pretenia reutilitzar l'aigua depurada. Els factors principals que van limitar el desenvolupament de la tecnologia de membrana van ser l'elevat cost d'inversió i operació i un inadequat coneixement dels avantatges potencials de les membranes en el tractament d'aigües residuals [16].

Tanmateix, darrers desenvolupaments d'una nova generació de membranes d'ultrafiltració i microfiltració, més productives i menys costoses, juntament amb l'enduriment dels requisits d'abocament han fet que sorgís un nou concepte de tractament biològic: el bioreactor de membranes (BRM).

Els requisits bàsics que es plantegen per aquest sistema de depuració d'aigües més modern són: un alt rendiment de depuració amb la mínima producció de fangs, alta flexibilitat degut a les grans diferències en la natura de les aigües residuals, i la menor necessitat d'espai possible.

Així doncs, els bioreactors de membranes són una modificació dels processos convencionals de tractament biològic, on es reemplacen els dipòsits de sedimentació secundària per unitats de membranes.

Les primeres plantes amb BRM van aparèixer a Nord-Amèrica a finals de la dècada dels 70 i a Japó a principis dels 80. En aquesta mateixa època, els processos anaerobis de tractament d'aigua residual industrial van començar a Sud-Àfrica. La introducció a Europa dels BRM aerobis, però, no es va produir fins a mitjans dels 90 [15].

Actualment, existeixen en torn a 500 BRM operant en diverses parts del món i n'hi ha molts altres en fase de projecte o construcció. A Japó és a on més s'ha estès aquesta tecnologia (aproximadament compta amb el 66% dels processos a nivell mundial), juntament amb Nord-Amèrica i Europa [17].

Més del 98% d'aquests sistemes uneixen el procés de separació amb membrana amb un procés biològic aerobi abans que amb un procés anaerobi. Aproximadament el 55% d'aquests sistemes funcionen amb membrana submergida en el bioreactor, mentre que el 45% restant presenta una configuració de membrana externa al bioreactor.

Els BRM aerobis han tractat amb èxit efluent de diverses indústries, com les cosmètiques, farmacèutiques, metal·lúrgiques, tèxtils, alimentàries, papereres i químiques.

L'interès cap a la tecnologia pel tractament d'aigües residuals mitjançant un bioreactor de membrana s'ha incrementat, degut a les estrictes regulacions de qualitat de l'aigua, la necessitat de reutilització i reciclatge i l'increment de l'eficiència en els costos de les tecnologies de membrana. L'ús de membranes submergides ha reduït significativament els consums energètics en els BRM i això ha produït un augment potencial de les membranes en el tractament de l'aigua residual.

Els bioreactors de membranes es poden definir com la combinació de dos processos bàsics –degradació biològica i separació per membranes- en un procés únic en el que els sòlids en suspensió i microorganismes responsables de la biodegradació són separats de l'aigua tractada, mitjançant una unitat de filtració per membranes.

En els bioreactors de membranes l'aigua residual a tractar entra al bioreactor on hi ha la biomassa en suspensió i on es produeix el tractament biològic que permet la degradació de la matèria orgànica. A continuació, l'aigua és filtrada a través de les membranes per un procés de separació sòlid-líquid que, segons la configuració de les membranes, es dona en una etapa externa en el bioreactor (membranes externes) o bé en una etapa integrada dins del bioreactor (membranes submergides), on les membranes estan immerses en el tanc biològic [18,19].

A la figura 4 es mostra un BRM amb membranes externes. Aquesta configuració implica la recirculació de la mescla de biomassa i aigua a tractar des del bioreactor fins a la unitat de membranes que es disposa externament a la unitat biològica [20].

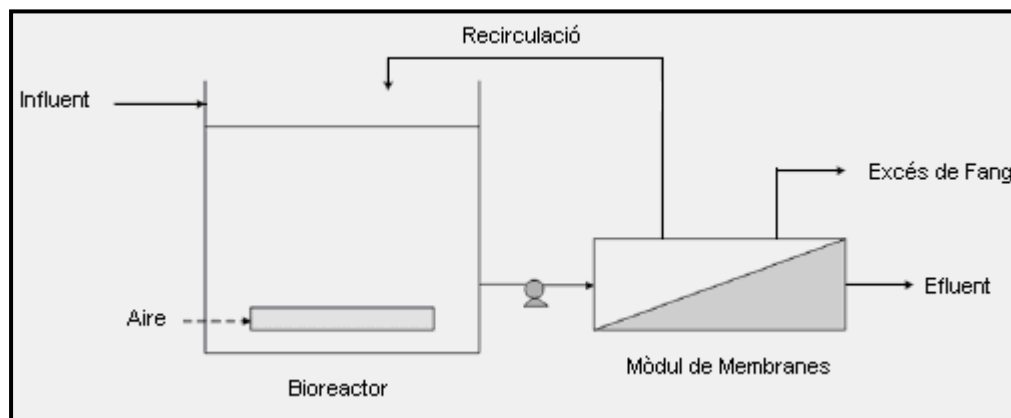


Figura 4. Esquema d'un bioreactor amb membranes externes.

En canvi, en els bioreactors amb membranes integrades o submergides, la unitat de membranes que realitza la separació sòlid-líquid està immersa en el tanc biològic. A més a més, en aquest cas es col·loca un difusor d'aire just per sota del mòdul de membranes per subministrar l'aire necessari per al procés biològic, per homogeneïtzar el contingut del tanc i per la pròpia neteja de les membranes. A continuació, a la figura 5 es mostra un esquema d'aquest tipus de configuració [11,17].

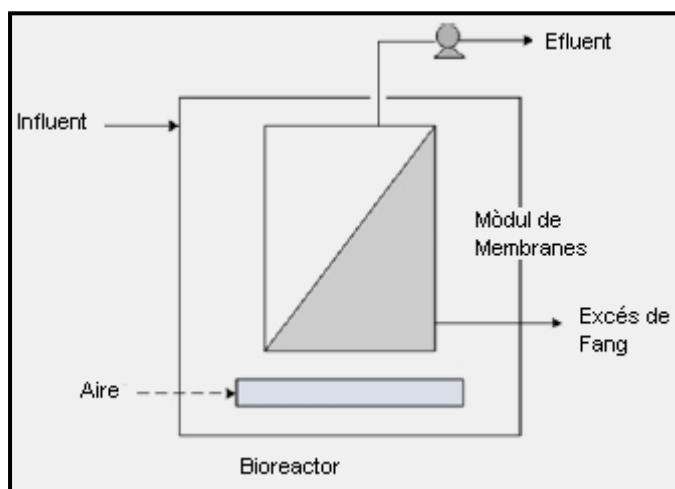


Figura 5. Esquema d'un bioreactor amb membranes submergides.

A part de les diferències en la disposició de les membranes, les dues configuracions es diferencien també per la tecnologia utilitzada per crear el gradient de pressió entre els dos costats de la membrana (força directriu) [11,17].

En els BRM amb membranes submergides, la força impulsora a través de la membrana és assolida pressuritzant el bioreactor o creant pressió negativa en el costat de permeat de la membrana. En canvi, en els BRM amb membranes externes, la força impulsora és la pressió creada per l'alta velocitat del flux de recirculació a través de la superfície de la membrana.

A més a més, en els BRM amb membrana submergida, l'aireació de la mescla de biomassa i aigua a tractar és aprofitada per subministrar l'oxigen necessari pel procés biològic i per reduir l'embrutiment sobre la superfície de les membranes. Aquest embrutiment està molt influenciat per les condicions hidrodinàmiques d'operació del sistema, com el flux de permeat, la velocitat d'aireació i la concentració de sòlids.

El funcionament d'ambdós tipus de dissenys és important donat que fa variar les consideracions de disseny i d'operació. A la taula 3 es comparen ambdues configuracions.

Taula 3. Comparació de bioreactors amb membranes submergides i de bioreactors amb membranes externes [8,11,17].

AMB MEMBRANES SUBMERGIDES	AMB MEMBRANES EXTERNES
Costos d'aireació alts (90%)	Costos d'aireació baixos (20%)
Costos de bombeig molt baixos	Costos de bombeig alts (60 – 80%)
Flux baix d'operació (10 – 60 l/m ² -h)	Flux alts d'operació (40 – 120 l/m ² -h)
Freqüència de neteja baixa	Requereix major freqüència de neteja
Costos menors d'operació	Costos d'operació elevats
Inversió inicial forta	Inversió inicial menor
Pressions transmembranals baixes (-0,05 a 0,5 bar)	Pressions transmembranals majors (-0,5 a 5 bar)

Els últims desenvolupaments sobre la tecnologia de membrana, que les han fet menys costoses i més resistents, unit als menors requeriments de pressió i menor freqüència de neteja, han potenciat l'ús a nivell mundial dels BRM amb membrana submergida.

Les membranes són films prims que separen les dues fases i actuen de barrera selectiva al transport de matèria. Tal com es pot observar a la figura 6, aquestes membranes només permeten el pas d'algunes matèries i són conegudes com membranes semipermeables. La membrana realitza una selecció dels elements continguts en l'alimentació [21].

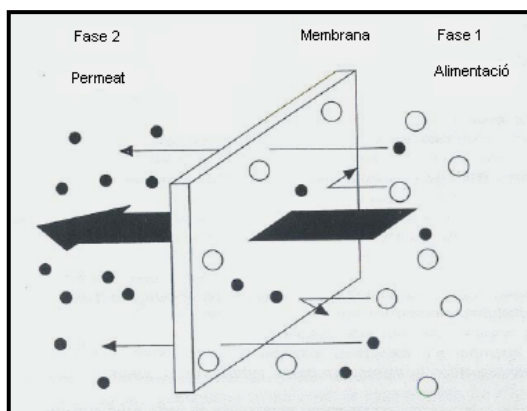


Figura 6. Membrana BRM.

Com ja s'ha comentat anteriorment, en el cas dels BRM la força directora o la força actuant és una diferència de pressió a través de la membrana. Així doncs, a la figura 7 poden observar-se les diferents eficàcies de membranes que treballen sota aquest principi.

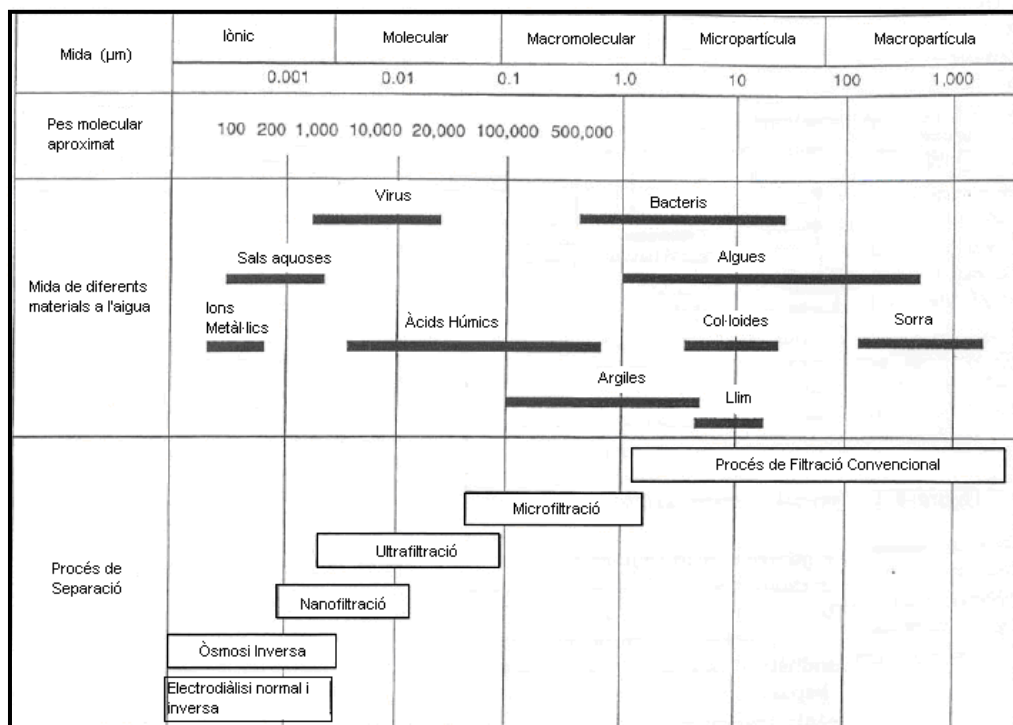


Figura 7. Tipus d'operacions de membrana mitjançant pressió [8].

Les Membranes de Microfiltració (MF) tenen mides de porus de 0,1 µm o majors, i proporcionen una elevada eliminació de sòlids en suspensió, incloent la majoria de bacteris, així com l'eliminació parcial de virus i macromolècules. La pressió de treball es manté baixa i similar a la de les membranes d'ultrafiltració.

Les Membranes d'Ultrafiltració (UF) tenen mides de porus que van des de 0,1 µm fins a menys de 5 nm (0,005 µm). Aquest tipus de membranes acostumen a permetre el rebuig de macromolècules, tot tipus de microorganismes com virus i bacteris i altres tipus de partícules. La pressió de treball es manté baixa (50 a 500 KPa).

Les Membranes de Nanofiltració (NF) tenen porus d'una mida inferior a 0,01 µm, el que permet l'eliminació de la majoria de les espècies, excepte de certs ions monovalents i molècules de baix pes molecular. Aquest tipus de membranes rarament són

utilitzades en bioreactors de membrana degut a la seva alta resistència hidràulica, però poden ser d'interès en molts altres processos.

A la figura 8 es mostra un petit esquema dels dos tipus de membrana utilitzats principalment en els bioreactors de membrana [8].

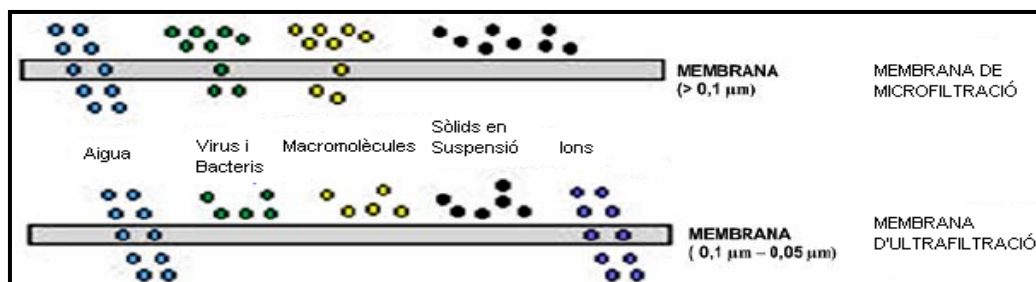


Figura 8. Membranes de Microfiltració i d'Ultrafiltració.

Per tal d'aconseguir un bon flux transmembranal és important seleccionar la membrana adequada, ja que proporcionarà les característiques requerides en quant a concentració d'espècies en el permeat. Les membranes es poden classificar d'acord als diferents criteris que es mostren a la taula 4 [19,22-24].

Taula 4. Classificació de les membranes.

Morfologia	Membranes Simètriques	Compostes per un sol material i uniformes en tot l'espessor de la membrana
	Membranes Asimètriques	Compostes per un sol material però no són uniformes en tot l'espessor de la membrana
	Membranes Mixtes	Compostes per diferents materials
Estructura	Membranes Poroses	Separació en funció de la mida
	Membranes Denses o No Poroses	Separació per dissolució o per difusió
Geometria	Membranes Planes	
	Membranes Cilíndriques	Tubular Fibra Buida
Material de Composició (Naturalesa Química)	Membranes Orgàniques (polímers)	Hidròfils: Poliamides, poliacrilonitril
		Hidròfobs: Polietilè, polifluorur de vinilidè, policarbonat, isopropilè
	Membranes Inorgàniques	Ceràmiques

Les membranes poden ser simètriques (homogènies) o asimètriques. Les membranes simètriques tenen una estructura uniforme en tot l'espessor de la membrana. Les membranes asimètriques estan fetes d'un mateix material que presenta una estructura que canvia al llarg de l'espessor de la membrana.

L'estructura de la membrana pot ser porosa o densa. Les membranes d'estructura porosa només permeten el pas d'aquelles substàncies que per la seva mida poden passar a través dels porus. Les membranes denses, en canvi, només deixen passar les substàncies que per les seves característiques químiques poden dissoldre's i difondre's a través del material de la membrana.

L'objectiu de les membranes asimètriques és tenir en una de les cares de la membrana una capa molt poc espessa que actui pròpiament de membrana, mentre que la resta de la membrana actui com a suport, proporcionant resistència mecànica a la membrana de poc espessiment. Així s'aconsegueix augmentar la permeabilitat de la membrana sense perdre resistència mecànica.

Les membranes també poden estar constituïdes de dos o més materials amb diferent composició química i estructura física. S'anomenen membranes mixtes. L'objectiu és el mateix que en el cas de les membranes asimètriques però en aquest cas s'utilitzen diferents materials per ajustar millor la permeabilitat (capacitat de producció) i la selectivitat de la membrana (eficiència en la separació).

D'aquesta classificació cal destacar que els materials més emprats en les membranes pels BRM són els polimèrics, degut a que són més econòmics. Les membranes ceràmiques són més cares i més fràgils que les membranes polimèriques. Les membranes ceràmiques són poroses i estan constituïdes d'òxids: SiO_2 , TiO_2 , ZrO_2 , Al_2O_3 , i són tèrmica i químicament molt inerts.

Hi ha diverses diferències entre el procés de fangs activats i els bioreactors de membranes. Si més no, l'essència dels dos tractaments és la mateixa: tots dos són dos tipus de tractaments biològics que consten d'un procés físic de separació sòlid-líquid. Mentre que el procés biològic és bàsicament el mateix, exceptuant les diferències entre els paràmetres operacionals, el tractament físic de separació sòlid-líquid estableix la major diferència entre tots dos, el qual afecta de forma directa al tractament biològic [11,15,20,25,26].

En el tractament de fangs activats la separació sòlid-líquid es realitza mitjançant un clarificador secundari i, en canvi, en els bioreactors de membranes es realitza mitjançant l'ús de membranes de micro o ultrafiltració.

En quant a la qualitat de l'efluent, en els BRM s'obté una aigua amb una qualitat de tractament terciari independentment de la qualitat de l'afluent, degut a que el tractament biològic és molt més eficient en l'eliminació de contaminants lentament biodegradables, i l'aigua ha estat filtrada a través de les membranes, pel que està lliure de sòlids en suspensió, i presenta concentracions de microorganismes molt baixes.

A més a més, els bioreactors de membrana permeten un disseny de reactors amb una concentració de fangs activats tres vegades superior als reactors biològics de les plantes convencionals. Aquest augment de concentració és possible degut a que la separació entre la biomassa i l'aigua tractada no es realitza en un decantador, sinó a través de la membrana de micro o ultrafiltració.

Com que els temps de retenció dels sòlids en el bioreactor són més grans, aquest fet permet la respiració endògena dels microorganismes presents a l'aigua residual, el que provoca una menor producció de fang (que després s'haurà de tractar), a més a més de permetre el creixement de bacteris especialitzats per la depuració de l'aigua, com els nitrificants.

Aquest augment de la concentració de biomassa en el bioreactor permet treballar amb un sistema més compacte, el que es tradueix en una reducció en la superfície necessària, respecte al tractament convencional.

Per tant, amb la tecnologia amb bioreactors de membrana s'aconsegueix una reducció molt important de la superfície ocupada i de l'obra civil necessària per la instal·lació de la depuradora, degut a que es necessita un menor volum de reactor i no es requereix un decantador.

Ara bé, el procés de BRM presenta alguns inconvenients importants que fan que el seu desenvolupament i expansió sigui lent: l'embrutiment de les membranes, anomenat *fouling*, i el seu cost de manteniment. El cost de les membranes és el més car de tota la inversió de la planta de tractament amb BRM, i necessiten un manteniment exhaustiu. A més a més, tenen un elevat consum energètic [14].

Així doncs, des del punt de vista econòmic i en funció de les exigències actuals de qualitat de l'aigua, el procés convencional de fangs activats pot semblar més viable que el procés de BRM, però si es té en compte la possibilitat de reutilitzar l'aigua tractada, el consum d'aigua de l'empresa es pot reduir molt. Des del punt de vista mediambiental, es prefereixen els BRM, ja que s'aconsegueix una major qualitat d'aigua ocupant aproximadament la meitat de la superfície. Degut a que cada cop la normativa en quant a vessaments està sent més estricta i a la possibilitat de

reutilització d'aigües, actualment els bioreactors de membranes poden veure's com una inversió de futur.

En el futur es volen desenvolupar membranes que permetin llargs temps d'operació sense necessitat de netejar les membranes i una reducció en quant al consum d'energia, per tal de disminuir els costos esmentats anteriorment i poder dur a terme una ràpida expansió dels bioreactors de membrana pel tractament d'aigües residuals.

Si bé s'han començat a fer diferents estudis sobre l'eficàcia dels bioreactors de membranes en el tractament d'aigües residuals, no són molts els estudis orientats a avaluar l'eficàcia d'aquests processos cara a eliminar alguns dels contaminants individualitzats que tenen una gran importància cara a avaluar la qualitat de l'aigua vers una futura utilització.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013

1.2. Presència de contaminants orgànics en aigües residuals

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013

El desenvolupament industrial i els canvis que s'han produït en l'estil de vida de la societat han donat lloc a un increment de la producció i utilització de nombrosos compostos orgànics sintètics que poden provocar greus efectes de contaminació sobre el medi ambient i els humans (toxicitat, propietats cancerígenes i mutagèniques, etc.).

Molts compostos orgànics poden trobar-se en les aigües a concentracions normalment baixes (de l'ordre de $\mu\text{g/l}$ o inferiors) causant efectes negatius sobre el medi ambient, motiu pel qual sovint es denominen microcontaminants orgànics. En les Estacions Depuradores d'Aigües Residuals (EDARs) municipals sovint es detecta una àmplia presència d'aquests compostos, ja que aquests no són eliminats pels sistemes de tractament convencionals i són identificats en aigües de sortida de les depuradores [27-29].

La capacitat de ser degradats biològicament i la seva toxicitat són dos dels criteris que s'empren per caracteritzar el comportament dels compostos orgànics presents a les aigües. En base a aquest criteri, les substàncies orgàniques es poden dividir en els següents quatre grups:

1. Substàncies biològicament degradables i no tòxiques
2. Substàncies biològicament degradables i tòxiques
3. Substàncies biològicament no degradables i no tòxiques
4. Substàncies biològicament no degradables i tòxiques

La disposició de compostos orgànics dels dos darrers grups, és a dir, dels compostos que no són biològicament degradables, ha d'estar limitada i controlada en la mesura del possible.

Els microcontaminants orgànics també poden subdividir-se segons els seus efectes i la seva perillositat en:

- Persistents: els seus efectes perduren al llarg del temps. Se solen conèixer com COP's (Contaminants Orgànics Persistents).
- Bioacumulables: els que poden ser absorbits i acumulats en éssers vius.
- Tòxics: ja sigui per la salut humana com pels ecosistemes aquàtics. Si a més són persistents es solen conèixer com CTP's (Contaminants Tòxics Persistents).
- Cancerígens.
- Mutagènics: capaços d'augmentar la taxa de mutació d'un organisme.
- Alteradors endocrins: que poden alterar els mecanismes de reproducció a altres funcions hormonals. Són compostos naturals o sintètics que

interfereixen en el sistema endocrí d'homes i animals i alteren el seu desenvolupament, creixement, reproducció i comportament.

Dins dels microcontaminants orgànics hi destaquen d'una banda els microcontaminants prioritaris, que són compostos apolars, tòxics, persistents i bioacumulables, com són els hidrocarburs aromàtics policíclics (HAPs), els policlorobifenils (PCBs) i les dioxines. I d'una altra banda, hi destaquen també els contaminants que es coneixen com microcontaminants emergents, que són compostos que prèviament eren desconeguts i dels quals no se'n sabia massa però que s'ha vist que afecten notablement a la salut de les persones i animals. Es tracta de compostos que donada la seva elevada producció i consum, i la seva contínua introducció en el medi ambient, no necessiten ser persistents per arribar a ocasionar efectes negatius en el medi ambient. Molts d'aquests compostos són productes d'ús diari amb aplicacions tant industrials com domèstiques. Alguns exemples de microcontaminants emergents són els alquilfenols etoxilats, les parafines clorades, els ftalats, els compostos organoestànics, els pesticides, els compostos farmacèutics i els productes d'higiene personal (com cosmètics, fragàncies i cremes), les hormones excretades en residus humans o animals, els retardants de flama bromats, els subproductes de desinfecció d'aigües, etc. [30,31]. En general, aquests contaminants no estan regulats però al Setembre de 2009, l'Agència de Protecció Ambiental dels Estats Units (US EPA) va publicar la llista definitiva (Llista 3) dels contaminants orgànics emergents no regulats que tenen potencial per presentar risc en la salut a través de l'aigua de beguda [32].

Un altre tipus de compostos orgànics contaminants que no ha estat tan estudiat com els anteriors és la família dels contaminants orgànics nitrogenats. Dins d'aquesta família de compostos es pot destacar el grup de les amines alifàtiques primàries i el grup de les *N*-Nitrosamines, que són el tema principal de la present Tesi Doctoral i que es comentaran en més detall a continuació.

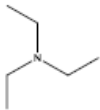
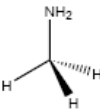
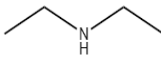
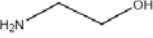
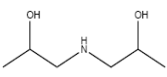
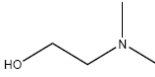
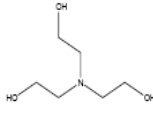
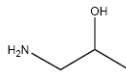
1.2.1. Compostos nitrogenats

Les amines alifàtiques es formen quan un o més àtoms d'hidrogen de l'amoniac (NH_3) són substituïts per un, dos o tres radicals alquil o alcanol. Les amines alifàtiques inferiors són gasos com l'amoniac i perfectament solubles en aigua, però les homòlogues superiors són insolubles en aigua. Totes les amines alifàtiques són bàsiques, i formen sals que són sòlids no volàtils, inodores i solubles en aigua. En funció del nombre d'hidrògens substituïts, les amines poden ser primàries (NH_2R), secundàries (NHR_2) o terciàries (NR_3) [33].

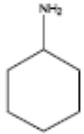
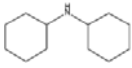
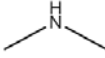
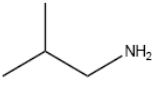
Les amines alifàtiques de cadena curta són compostos àmpliament distribuïts en el mediambient degut a que s'utilitzen en una gran varietat d'indústries. Algunes d'elles es produeixen en quantitats de més de 100000 tones per any a l'Oest d'Europa. S'utilitzen com a matèria primera o com a intermedis en la producció de fàrmacs, cautxú, plàstics, colorants, teixits, cosmètics, emulsionants, herbicides, metalls i inhibidors de la corrosió [34]. També són productes de degradació de matèria orgànica, com aminoàcids i proteïnes [33].

A la taula 1 es mostren algunes de les diferents amines alifàtiques que s'utilitzen, el tipus, els riscos que presenten i la seva fórmula química.

Taula 1. Tipus, possibles riscos i estructura química d'algunes amines alifàtiques.

Compost	Tipus	Risc	Fórmula
Trietilamina	Terciària	Irrita ulls, pell i sistema respiratori. En animals provoca lesions miocàrdiques, renals i hepàtiques.	
Metilamina	Primària	Irrita ulls, pell, sistema respiratori; provoca tos, cremades a la pell i a les mucoses	
Dietilamina	Secundària	Irrita ulls, pell, sistema respiratori. En animals ocasiona degeneració miocàrdica.	
Etanolamina	Primària	Irrita ulls, pell i sistema respiratori.	
Diisopropanol- amina	Secundària	Enrogiment, sensació de cremada, dolor, visió borrosa	
2-Dimetil- aminoetanol	Terciària	Tos, dificultat respiratòria, nàusees, dispnea, mal de gola, vòmits	
Trietanolamina	Terciària	----	
Isopropanol- amina	Primària	----	

Taula 1. Continuació.

Compost	Tipus	Risc	Fórmula
Ciclohexilamina	Primària	Irrita ulls, pell, mucosa, sistema respiratori. Provoca cremades als ulls i a la pell. Ocasiona sensibilitat a la pell, tos, edema pulmonar; mareig, diarrea, nàusees i vòmits	
Diciclohexilamina	Secundària	----	
Dimetilamina	Secundària	Irrita el nas i la gola. Provoca esternuts, tos, edema pulmonar; conjuntivitis	
Isobutilamina	Primària	----	

La trietilamina i la metilamina s'utilitzen a la indústria fotogràfica com a acceleradors per reveladors. La dietilamina s'utilitza a les indústries metal·lúrgiques com inhibidor de la corrosió i a la indústria petroquímica com a dissolvent. La metilamina, etanolamina i diisopropanolamina són agents utilitzats per estovar pells i cuir a la indústria del cuir. El 2-dimetilaminoetanol serveix per a controlar l'acidesa de l'aigua a les calderes. La trietanolamina, isopropanolamina, ciclohexilamina i diciclohexilamina s'utilitzen en sabons per la neteja en sec. La trietanolamina s'utilitza molt a la indústria per fabricar tensioactius, ceres, vernissos i herbicides, i també s'empra a la indústria petroquímica per recuperar el sulfur d'hidrogen del gas natural i el cru de petroli amb grans continguts de sofre. L'etanolamina extreu tant el diòxid de carboni com el sulfur d'hidrogen del gas natural. L'etilamina actua com a estabilitzant de làtex de cautxú i és el producte intermedi de tints, mentre que la butilamina és un pesticida i un líquid alcalí fort utilitzat en les indústries del cautxú, en productes farmacèutics i en colorants. L'etanolamina és un altre líquid alcalí fort utilitzat en la preparació de colorants, acceleradors del cautxú, fungicides, ceres sintètiques, productes farmacèutics, resines, insecticides i agents humidificants per asfalts. La dimetilamina i la isobutilamina s'utilitzen a la indústria del cautxú com a acceleradors de la vulcanització. La dimetilamina s'utilitza també en la fabricació de sabons detergents. L'etilenimina és un compost important utilitzat en indústries papereres, de teixits, petroquímiques, en laques, vernissos, cosmètics i en fotografia. La dietanolamina és un agent depurant de gasos i un agent emulsionant de

productes agroquímics, cosmètics i farmacèutics. Altres agents emulsionants molt utilitzats són la isobutanolamina, la isopropanolamina i la ciclohexilamina [34].

Des de fa molt temps se sap que les amines alifàtiques i aromàtiques poden aparèixer com a productes de biodegradació de la matèria orgànica com proteïnes, aminoàcids, i altres compostos orgànics que contenen nitrogen. A més a més, com ja s'ha comentat anteriorment, les amines són utilitzades com a productes de partida o intermedis en la fabricació d'un ampli interval de productes químics. Degut al seu caràcter polar, són difícils d'eliminar de l'aigua i algunes formen part de la llista de contaminants orgànics persistents [35,36].

Les amines volàtils fan mala olor, són inflamables i són compostos considerats com a perillosos per la salut per irritar pell, ulls, mucoses i sistema respiratori. També poden reaccionar amb agents nitrogenats, provocant la formació de compostos potencialment cancerígens, les *N*-Nitrosamines [37,38].

Un altre tipus d'amines que existeixen són les amines biògenes, que són bases orgàniques que es formen i es degraden com a resultat de l'activitat metabòlica en plantes i animals. Aquestes es poden trobar en fluids biològics, mostres mediambientals i en corrents de processos industrials, normalment a nivells traça [33].

Per tot això, és important determinar les amines alifàtiques en mostres reals mediambientals. Actualment no existeix una concentració màxima permesa que estigui establerta per la legislació pel cas d'amines alifàtiques en mostres d'aigua, encara que sí que ho està la concentració del nitrogen *Kjeldahl* total (NKT), a 80 mg/l de N, tal com s'ha indicat anteriorment a la taula 1 de la secció 1.1. Això és degut a que encara hi ha poca informació sobre la seva presència en aigües residuals industrials i en aigües superficials, però se sap que en algun tipus d'aigua apareixen en quantitats molt petites pel que, en aquest cas, els mètodes per la seva determinació han de ser altament sensibles.

Per la seva part, les *N*-Nitrosamines, es formen com a conseqüència de la reacció de les amines secundàries amb l'àcid nítrós. Si bé es poden formar una gran quantitat de compostos derivats d'aquesta reacció, els més importants són les alquilnitrosamines, concretament la *N*-Nitrosodimetilamina i la *N*-Nitrosodietilamina, i les nitrosamines d'estructura cíclica, com per exemple la *N*-Nitrosopiperidina, *N*-Nitrosopirrolidina i les acilalquil-nitrosamines o nitroamides.

Aquests processos de nitrosació tenen lloc en diferents medis, com per exemple en alguns aliments com vegetals, peix i especialment en alguns aliments que contenen nitrats com a conservants, i s'ha identificat la seva presència en aliments fumats, cervesa, ... També a l'atmosfera es produeixen reaccions que poden donar origen a la síntesi de *N*-Nitrosamines, principalment amb productes derivats dels processos de combustió en empreses dedicades a la fabricació d'herbicides, pesticides, compostos farmacèutics, etc., i també es poden trobar en els sòls, després de processos de fertilització amb nitrogen mineral o per biotransformació d'alguns pesticides o altres precursors [39]. Un punt d'interès especial és la formació d'alguns d'aquests compostos en els processos de cloració i/o desinfecció de l'aigua que s'utilitza freqüentment en les etapes de potabilització, concretament la formació de la *N*-Nitrosodimetilamina entre d'altres i que estan englobades dins d'un grup de compostos denominats productes de desinfecció (DBPs) [40].




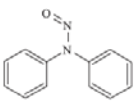


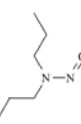

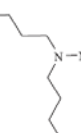
Les *N*-Nitrosamines són un grup de compostos extensament estudiats pel seu elevat poder carcinogènic, per la qual cosa han estat classificades com a potencials carcinògens per l'Agència Internacional de Recerca del Càncer [41]. Fins al moment, 5 nitrosamines han estat detectades en aigua potable de la xarxa. Nawrocki i Andrzejewski han publicat recentment una revisió de la presència d'aquests compostos en aigua potable [42].

Tot i la toxicitat d'aquests compostos i la seva presència en molts aliments i aigua potable, no hi ha gaire legislació que reguli la seva presència. Concretament en mostres d'aigua, 5 *N*-Nitrosamines han estat incloses en la *USEPA New Contaminant Candidate List-3* [43]. Tot i aquestes tendències o intencionalitats, s'admet que el màxim recomanable de *N*-Nitrosodimetilamina i altres nitrosamines no ha de superar el valor de 10 ng/L. Més recentment, l'estat de Califòrnia ha publicat uns nivells límits de la *N*-Nitrosodimetilamina de 3 ng/L [44] i la USEPA recomana uns nivells per aquests compostos en rius i llacs de 1,4 ng/L per tal de prevenir possibles efectes sobre la salut, tant si és per aigua de consum com si és per l'alimentació de peixos d'aquestes aigües [45].

Les *N*-Nitrosamines són ambientalment tòxiques i poden ser metabolitzades com a potents agents genotòxics, havent-hi un gran nombre d'estudis sobre aquest tema [40]. La *N*-Nitrosodimetilamina és un exemple clar d'aquest comportament i induïx a mutacions genètiques i cromosòmiques, així com també canvis en l'ADN. L'*Integrated Risk Information System* (IRIS) identifica 4 nitrosamines com a probables carcinògens humans (grup B2) i l'*International Agency for Research on Cancer* (IARC) mostra suficients evidències en animals per demostrar que 4 nitrosamines tenen poders carcinogènics [46]. D'acord amb la base de dades d'IRIS, 7 ng/L en aigua de beguda representa 10^{-5} risc de càncer en població adulta.

A la següent taula 2 es poden veure les estructures de les *N*-Nitrosamines.

Taula 2. Estructures i propietats de les *N*-Nitrosamines.

Nitrosamine	Abbrev.	Molecular formula	CAS #	Structure	10 ⁻⁶ upper bound lifetime cancer risk from drinking water consumption	Log octanol/water coefficient (Log K _{ow})	Water solubility (g/100 mL)
<i>N</i> -nitrosodimethylamine	NDMA	C ₂ H ₆ N ₂ O	62-75-9		0.7 ng/L	-0.57	∞
<i>N</i> -nitrosopyrrolidine	NPyr	C ₄ H ₈ N ₂ O	930-55-2		20 ng/L	-0.19	∞
<i>N</i> -nitrosopiperidine	NPip	C ₅ H ₁₀ N ₂ O	100-75-4		NA	0.63	7.7
<i>N</i> -nitrosodiphenylamine	NDPhA	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O	86-30-6		7000 ng/L	3.13	0.003
<i>N</i> -nitrosodiethylamine	NDEA	C ₄ H ₁₀ N ₂ O	55-18-5		0.2 ng/L	0.48	10.6
<i>N</i> -nitrosomethylethylamine	NMEA	C ₃ H ₈ N ₂ O	10595-95-6		2 ng/L	0.08	0.12
<i>N</i> -nitrosodipropylamine	NDPA	C ₆ H ₁₄ N ₂ O	621-64-7		5 ng/L	1.36	0.98
<i>N</i> -nitrosomorpholine	NMor	C ₄ H ₆ N ₂ O	59-89-2		NA	-0.44	∞
<i>N</i> -nitrosodibutylamine	NDBA	C ₈ H ₁₈ N ₂ O	924-16-3		6 ng/L	1.92	0.12

NA = Not available.

1.2.1.1. Determinació d'amines alifàtiques en aigües mediambientals i llots

Les tècniques típicament emprades per la determinació d'amines alifàtiques en aigües han estat la cromatografia de gasos (GC) i la cromatografia de líquids (HPLC). L'electroforesi capil·lar (CE) ha estat menys emprada en la determinació d'aquests analits en mostres aquoses, però s'ha aplicat en la determinació d'amines biògenes de cadena llarga en mostres d'aliments i de vi.

La determinació d'amines alifàtiques en aigües mitjançant GC és complexa degut a les propietats físicoquímiques de les amines: elevada volatilitat i polaritat, caràcter bàsic i elevada solubilitat en aigua. A més a més del seu caràcter bàsic, el grup amino introdueix un llarg dipol a la molècula, que és responsable de fortes interaccions amb els grups silanol i ponts siloxà en l'estructura de la fase estacionària de la columna capil·lar del GC. Això sovint ocasiona efectes d'adsorció no lineal, que dona lloc a pics amb molta cua en el cromatograma, pèrdues i baixa sensibilitat en els detectors [27], i sovint és necessari derivatitzar-les per reduir la seva polaritat. Els detectors més emprats són: el de nitrogen-fòsfor (NPD) i l'espectròmetre de masses (MS), tot i que també hi ha alguns treballs amb detector d'ionització de flama (FID).

També és complexa la determinació d'amines alifàtiques mitjançant HPLC degut a la seva baixa absorptivitat a la zona ultraviolada-visible (UV-Vis) i a que no tenen propietats fluorescents. Per aquestes raons, la majoria dels mètodes amb HPLC proposats, incorporen una derivatització química per transformar els analits en els seus derivats que poden ser més fàcilment detectats per augmentar la seva sensibilitat: major absorptivitat a l'UV-Vis o bé amb propietats fluorescents. Els típics detectors emprats són: l'UV-Vis, el de fluorescència (FL) i el quimiluminiscent (CL).

A continuació es presenta una revisió bibliogràfica dels mètodes desenvolupats en la determinació d'amines alifàtiques en mostres aquoses mitjançant la cromatografia de gasos, la cromatografia de líquids i l'electroforesi capil·lar.

Determinació d'amines alifàtiques mitjançant GC

La cromatografia de gasos ha estat molt utilitzada en la determinació d'amines per la seva simplicitat, alt poder de resolució, alta sensibilitat i baix cost. En general, les amines poden ser separades en columnes amb fases estacionàries bàsiques en la seva forma lliure. En aquests casos, es fa un ajust de pH bàsic a les mostres i s'analitzen o bé per injecció directa o per espai de cap. Per tal de baixar els límits de detecció del mètode, s'addiciona en moltes ocasions un solvent orgànic a la mostra per extreure i preconcentrar les amines abans de la seva determinació.

En els casos en que s'utilitza la injecció directa o l'espai de cap es minimitza el temps de preparació de la mostra, fet que redueix la seva possible contaminació. S'han utilitzat algunes columnes empaquetades desactivades amb hidròxid de potassi, trimetilclorosilà o amoni en el gas portador. Recentment s'ha estudiat l'ús de líquids iònics com a agents desactivants de les columnes [47]. Tanmateix, aquestes tècniques estan limitades perquè no s'obtenen baixos límits de detecció i les amines alifàtiques són presents en les mostres aquoses mediambientals a nivells traça [36].

En la majoria dels estudis realitzats, independentment del tipus de detector emprat amb més o menys selectivitat (NPD o MS) quasi sempre s'utilitza un sistema de preconcentració de la mostra per tal de baixar els límits de detecció del mètode. Aquesta millora dels límits de detecció es pot dur a terme per extracció líquid-líquid (LLE), extracció en fase sòlida (SPE), microextracció en fase sòlida (SPME), etc., tot i que la més emprada actualment és la SPE [48].

Tot i que no és freqüent determinar aquests compostos sense derivatització, hi han alguns treballs que ho fan, com per exemple el de Maris *et al.* [49] que han desenvolupat un mètode per determinar amines alifàtiques volàtils en aigües emprant la tècnica d'espai de cap (HS) i una columna cromatogràfica PoraPLOT, utilitzant un detector de NPD. Els analits que determinen són: metilamina, etilamina, *n*-propilamina, isopropilamina, *n*-butilamina, *tert*-butilamina, dimetilamina, dietilamina, etilmetilamina, diisopropilamina, trimetilamina, dimetiletilamina, trietilamina i dietilmetilamina. Optimitzen diversos paràmetres i els límits de detecció obtinguts varien entre 0.2 i 3000 µg/l.

Recentment Krzyzaniak *et al.* [47] han desenvolupat un mètode en el que utilitzen líquids iònics com a agents desactivants dels grups silanol presents a la columna i pre-columna cromatogràfica, i d'aquesta manera es pot realitzar una anàlisi directa de les amines primàries alifàtiques i diamines en solució aquosa, sense necessitat de derivatitzar. En aquest mètode es proven tres líquids iònics diferents, i el que dona millors resultats és el 1-metil-3-propilimidazoliumbis(trifluorometil-sulfonil)imida[pmim][Tf2N]. El mètode es duu a terme injectant una solució del líquid iònic en metanol en el sistema cromatogràfic abans de l'anàlisi de les amines primàries per GC-FID. Les amines primàries que es determinen són: butilamina, pentilamina, putrescina, cadaverina i 1,2-diamina. El mètode no s'aplica en mostres reals d'aigua, i els límits de detecció que s'obtenen són força elevats, al voltant de 100 mg/l.

Degut a la tendència que tenen les amines d'adsorbir-se i descomposar-se en les columnes cromatogràfiques, poden donar pics cromatogràfics amb cua, és bastant comú derivatitzar aquests analits per obtenir derivats menys polars [36] i millorar les propietats cromatogràfiques de separació i detecció. Les reaccions de derivatització

sovint són selectives pel tipus d'amina (primària, secundària i terciària), i s'han estudiat molts agents derivatitzants per determinar aquestes amines mitjançant GC. Tanmateix, el principal inconvenient d'utilitzar una reacció de derivatització és la manipulació de la mostra i l'augment de temps en la preparació d'aquesta. Al *Handbook of Analytical Derivatization Reactions* [50] hi trobem una recopilació de diferents reactius emprats per derivatitzar amines. Kataoka efectua una recopilació de les diverses reaccions de derivatització emprades en l'anàlisi mitjançant la GC [36]. Els procediments de derivatització més comuns [50] són l'acilació (emprant per exemple, anhídrid trifluoroacètic), la sililació (utilitzant per exemple, *N*-trimetilsilil o *N*-*t*-butildimetilsilil), la dinitrofenilació (amb dinitrofluorobenzè o amb àcid 2,4-dinitrobenzensulfònic) i la formació de Bases de Schiff (amb pentafluorobenzaldehid com a reactiu, per exemple), a banda de la permetilació, la formació de carbamats, sulfonamides i fosfonamides, que també s'han estudiat. L'acilació i la sililació requereix la reacció en condicions anhidres perquè els reactius emprats poden hidrolitzar-se, en canvi, la dinitrofenilació, permetilació, la formació de Bases de Schiff, carbamats (emprant per exemple dietilpirocarbonat), sulfonamides i fosfonamides poden ser realitzades en solució aquosa.

Seguidament s'inclouent alguns exemples on s'utilitza la tècnica de derivatització per a la determinació d'aquests compostos, com per exemple el treball de Pietsch *et al.* [51] on es descriuen dos mètodes per la determinació d'amines alifàtiques (*n*-propilamina, pentilamina, hexilamina, heptilamina i octilamina) i amines alicícliques (pirrolidina, morfolina, piperidina i piperazina), en aigües mediambientals com són aigües de riu i aigües provinents de plantes de tractament d'aigües residuals. Un dels mètodes utilitzats consisteix en la derivatització de les amines a tricloroetil carbamats seguida de LLE i GC-MS. L'altre mètode emprat utilitza l'HPLC i es descriurà en el següent apartat. Els límits de detecció del mètode es troben a nivells de 0.005 µg/l.

Sacher *et al.* [52] desenvolupen un mètode per la determinació d'amines alifàtiques primàries i secundàries en aigües residuals i superficials derivatitzant-les amb 2,4-dinitrofluorobenzè (2,4 DNFB) o clorur de benzenesulfonil (BSC) i LLE amb diclorometà seguit de GC-MS. Les amines determinades són: metilamina, dimetilamina, etilamina, dietilamina, piperidina, pirrolidina i morfolina. En el mètode emprat quan utilitzen BSC obtenen temps totals d'anàlisi inferiors (2 hores) i límits de detecció més baixos, al voltant de 100 ng/l.

Akyüz i Ata [53] realitzen la derivatització simultània d'amines alifàtiques i aromàtiques en aigües mediambientals (residuals, aigües de riu i de mar) i en mostres de sediments per LLE amb cloroform utilitzant el parell iònic amb bis-2-etilhexilfosfat (BEHPA), derivatització amb isobutil cloroformat (IBCF) i

determinació dels derivats amb GC-MS. Es determinen un grup de 33 amines, i s'obtenen uns límits de detecció entre 0.07 i 0.50 ng/l.

Kusch et al. [54] determinen amines alifàtiques primàries de cadena llarga, anomenades *tert*-octadecilamines, utilitzades com a inhibidors de la corrosió en el circuit de l'aigua en el tractament químic de calderes en centrals elèctriques. El mètode que utilitzen consisteix en una derivatització de les amines utilitzant anhídrid trifluoroacètic (TFAA) seguit de SPE i determinació per GC utilitzant diferents detectors: FID, NPD i MS, mentre que Mishra *et al.* [55] desenvolupen un mètode per determinar amoni, amines alifàtiques, amines aromàtiques i fenols a nivells de µg/l en aigües mediambientals derivatitzant els compostos amb clorur de bonzoïl i combinada amb l'SPE utilitzant com a sorbent un copolímer d'estirè i divinilbenzè seguit de GC-MS. El mètode s'ha aplicat en aigües de beguda, aigües de riu i aigües subterrànies. Les amines alifàtiques que determinen són: dimetilamina, metilamina, etilamina, isopropilamina i dietilamina. Els límits de detecció que obtenen es troben entre 7 i 39 ng/l.

A més a més de la utilització dels reactius derivatitzants comercials, hi ha diferents autors que utilitzen reactius derivatitzants sintetitzats per ells, amb la finalitat de millorar l'estabilitat o la resposta dels compostos formats. Aquest és el cas de Zhao *et al.* [56] que sintetitzen un nou reactiu derivatitzant, *N*-hidroxisuccinimidil fenilacetat (SIPA) per tal de derivatitzar amines alifàtiques, com són la metilamina, etilamina, propilamina, butilamina i pentilamina, i determinar-les mitjançant la GC-MS i GC-FID. El procediment per extreure els compostos de la fase aquosa consisteix en una extracció líquid-líquid (LLE) utilitzant diclorometà i un bany d'ultrasons. Els límits de detecció que obtenen es troben entre 7.6 i 46 µg/l però no obstant, el mètode no s'aplica a mostres reals. Més tard, Zhao et al. [57] descriuen un nou mètode per determinar amines alifàtiques sintetitzant un nou reactiu derivatitzant, *N*-succinimidil benzoat (SIBA), combinat amb la HS-SPME i seguit de GC, utilitzant la MS per identificar els compostos i el FID per determinar-los. Les amines que determinen són: metilamina, dimetilamina, etilamina, *n*-propilamina, *n*-butilamina, *n*-pentilamina i *n*-hexilamina. La derivatització es realitza en solució tampó de borat a pH 8.8, a 60 °C durant 22 minuts. L'extracció de la HS-SPME es duu a terme en una solució saturada de clorur sòdic, a 80 °C durant 60 minuts i la desorció a 250 °C durant 2 minuts. Els límits de detecció obtinguts es troben entre 13 i 320 ng/l. El mètode s'aplica a mostres d'aigua de llac.

A més a més de les tècniques usuales per a preconcentrar els analits, han aparegut recentment altres tècniques que permeten desenvolupar el procés de preconcentració sense la utilització de solvents orgànics, aquest és el cas de la microextracció en fase sòlida (SPME). Pan *et al.* [58] van ser els primers que van combinar l'SPME en espai de cap (HS-SPME) i la derivatització química amb pentafluorobenzaldehid (PFBA)

per la determinació d'amines alifàtiques en aire i aigua mitjançant GC-FID. Van demostrar que la transformació dels analits en els seus derivats menys polars reduïa considerablement els límits de detecció envers a l'aplicació directa de l'SPME sense derivatitzar. Les amines alifàtiques en mostres aquoses determinades en aquest estudi van ser: metilamina, etilamina, isobutilamina, butilamina, amilamina i hexilamina. El recobriment de la fibra d'SPME que els va donar més bons resultats va ser el de poliacrilat (PA). El temps de derivatització va ser de 15 minuts a 80 °C i el temps d'extracció dels derivats imina va ser de 30 minuts a temperatura ambient. Els límits de detecció del mètode varien de 0.4 a 26 µg/l.

També Ábalos *et al.* [38] desenvolupen un mètode per determinar amines alifàtiques volàtils en aigües residuals i de riu, en el que utilitzen HS-SPME sense derivatitzar, emprant una columna capil·lar PoraPLOT, i utilitzant un detector de NPD (emprant també coma a detector un MS per confirmar els pics obtinguts). Els analits que determinen són: metilamina, dimetilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, propilamina, isopropilamina, *sec*-butilamina, *tert*-butilamina. Realitzen diverses proves emprant diferents tipus de recobriments de fibres: polidimetilsiloxà (PDMS) 100 µm, carbowax-divinilbenzè (CW-DVB) 65 µm, poliacrilat (PA) 85 µm i carboxè-polidimetilsiloxà (CAR-PDMS) 75 µm, i el que els dona millors resultats és el de PDMS. Optimitzen l'etapa d'extracció (30 min a temperatura ambient amb agitació) i de desorció (220 °C a l'injector del cromatògraf de gasos durant 3 min). Els límits de detecció obtinguts varien de 3 a 56 µg/l.

Lin *et al.* [59] apliquen un mètode en el que utilitzen un GC-FID portàtil per determinar amines alifàtiques de cadena curta en mostres aquoses mediambientals, en el que utilitzen la derivatització amb PFBAY seguit de la HS-SPME utilitzant una fibra de divinilbenzè-carboxè-polidimetilsiloxà (DVB/CAR/PDMS). Les amines estudiades són: etilamina, propilamina i butilamina. El temps d'anàlisi total del mètode és molt curt, 22 minuts, i els límits de detecció es troben entre 1.2 i 4.6 µg/l. El mètode s'aplica en aigües de riu.

A més a més de les fibres comercials, també s'han desenvolupat nous recobriments de fibres per SPME sistetitzats per extreure amines alifàtiques de cadena curta o bé per extreure els derivats formats un cop s'han derivatitzat aquests analits [60].

Li *et al.* [61] desenvolupen un mètode per deteminar amines alifàtiques utilitzant una fibra SPME amb un nou recobriment de *25,27-dihydroxy-26,28-oxy(2',7'-dioxo-3',6'-diazaoctyl)oxy-p-tert-butylcalix[4]arene/hydroxy-terminat-ed silicone oil*, seguida de la detecció amb GC-FID. Aquest nou recobriment mostra una bona selectivitat i sensibilitat a les amines alifàtiques polars, una elevada estabilitat tèrmica (380 °C), una elevada estabilitat a dissolvents polars i una bona reproduïbilitat entre fibres. En aquest cas no derivatitzen les amines. Els analits determinats són: trimetilamina,

butilamina, trietilamina, tri-*n*-propilamina, *n*-butilamina, di-*n*-butilamina i tri-*n*-butilamina. En aquest estudi optimitzen els paràmetres de l'extracció dels analits amb la nova fibra i comparen els resultats obtinguts amb les fibres comercials de PDMS-DVB i PA, donant una major sensibilitat en el cas de la nova fibra. Els límits de detecció del mètode varien entre 0.19 i 39.51 µg/l.

Cai *et al.* [60] utilitzen nous recobriments de fibres de SPME, *sol-gel dibenzo-18-crown-6*, i un nou reactiu derivatitzant, *tetrafluorobenzoic acid N-hidroxisuccinimie ester* (TBza-suc), per la determinació d'amines alifàtiques en aigües de llac mitjançant GC-FID (utilitzen GC-MS per confirmar els derivats). Els analits que determinen són: metilamina, dimetilamina, etilenamina, propilamina, butilamina, pentilamina i hexilamina. Els límits de detecció del mètode varien de 0.005 a 0.05 µg/l. El reactiu TBza-suc només derivatitza amines alifàtiques primàries i secundàries, i no reacciona amb amines aromàtiques ni amb grups hidroxil, tiol ni fenol.

En alguns casos, i per tal de disminuir els límits de detecció del mètode, s'han inclòs processos de desorció tèrmica al sistema de preconcentració de la mostra. Baltussen *et al.* [62] determinen amines alifàtiques de cadena curta en aigües mitjançant la derivatització amb clorur de pentafluorobenzoil (PFBOC) i la preconcentració en cartutxos amb fases de PDMS i PA (similars als de l'SPE), seguida de la desorció tèrmica i GC-NPD. Els cartutxos de PA els sintetitzen ells mateixos, i obtenen millors resultats degut a que és un sorbent més polar i té més afinat cap als derivats de les amines. Les amines determinades són: dimetilamina, etilamina, dipropilamina, pentilamina i hexilamina. El volum de mostra emprat és d'1 ml i els límits de detecció que s'obtenen són de sub-µg/l.

Darrerament també s'han desenvolupat algunes tècniques de preconcentració que minimitzen la utilització de solvents orgànics i que tot i no tenir una molt bona reproduïbilitat, presenten resultats acceptables. Aquest és el cas de Kaykhai *et al.* [63] que desenvolupen un mètode per determinar amines alifàtiques volàtils en aigües de riu i d'aixeta per GC-FID utilitzant com a tècnica de preconcentració el *headspace solvent drop microextraction* (HS-SDME), que és una miniaturització de la LLE, redueix la quantitat de solvent a utilitzar, i consisteix en posar una gota de solvent orgànic (per exemple alcohol benzílic) en l'agulla d'una xeringa, i deixar-la a l'espai de cap del vial que conté la mostra per a que es produeixi l'extracció dels analits. A la figura 1 es mostra un esquema d'aquest procediment d'extracció. Aquesta tècnica és econòmica i sensible, però és poc reproduïble. En aquest cas no derivatitzen les amines. Les amines extretes són: etilamina, 2-propanamina, 1-propanamina, *N*-etil-etanamina i 1-butanamina. El temps total de l'anàlisi és de 25 minuts i els límits de detecció obtinguts varien de 2.5 a 25 µg/l.

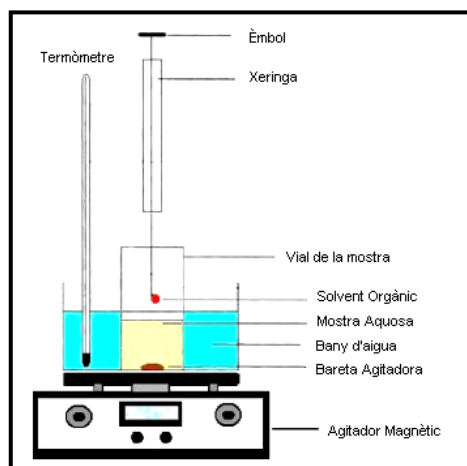


Figura 1. Esquema de l'HS-SDME.

També Deng *et al.* [64] desenvolupen un mètode per determinar amines alifàtiques de cadena curta en aigües residuals mitjançant la derivatització amb PFBAY i extracció simultània amb HS-SDME, seguit de GC-MS. Les amines estudiades són: etilamina, propilamina, butilamina i pentilamina. Fan proves amb diversos solvents orgànics: 1-octanol, hexadecà i decà, i el que els dona millors resultats és el decà. El reactiu derivatitzant l'afegeixen a la gota de 2 μl de solvent perquè es doni la derivatització i l'extracció simultàniament. Els límits de detecció obtinguts varien entre 0.6 i 1.1 $\mu\text{g/l}$, i el temps de preparació de la mostra és molt curt, 6 minuts.

Darrerament Singh *et al.* [65] han desenvolupat un mètode en el que realitzen una extracció i derivatització simultània utilitzant el PFBOC com a agent derivatitzant i la SDME submergida en la mostra aquosa, seguit de GC-MS. Les amines alifàtiques curtes de baix pes molecular que han estudiat són: metilamina, etilamina, 1-propilamina, 1-butilamina, 1-pentilamina, 1-hexilamina, 1-heptilamina i 1-octilamina. La derivatització l'han realitzat en un tampó de bicarbonat a pH 10.5. Per tal de realitzar la SDME submergida, afegeixen 3 μl de medi d'extracció ($4.6 \cdot 10^{-4}$ mol/L de PFBOC en nitrobenzè) a una xeringa de GC i submergeixen la punta de l'agulla de la xeringa en una posició consistent en 4 ml de mostra tamponada a pH 10.5, i es prem l'èmbol de la xeringa per exposar una gota de 2 μl de solvent en el vial de la mostra, i així realitzar l'extracció i derivatització simultània durant 25 minuts a temperatura ambient i sota una agitació constant de 300 rpm. Els límits de detecció que s'assoleixen varien de 0.117 a 1.527 ng/l, i les mostres aquoses reals en les que apliquen aquest nou mètode són aigües de llac, de riu i aigües residuals industrials.

També s'han utilitzat processos d'extracció amb membrana, utilitzant petits tubs permeables als analits. Així doncs, Chia *et al.* [66] desenvolupen un mètode per la

derivatització (amb PFBAY) i extracció simultània d'amines primàries en aigües de riu utilitzant la microextracció en fase líquida dinàmica en fibra buida (HF-LPME) seguida de GC-MS. L'HF-LPME consisteix en dipositar un volum petit (3 μ l) de solvent orgànic (normalment toluè), amb l'ajut d'una xeringa cònica, en un segment de fibra buida porosa, a través de la qual s'extreuen els analits d'interès. S'hi acobla una bomba per xeringues i la fibra buida se submergeix en la mostra que s'està agitant. Durant l'extracció, l'èmbol de la xeringa contrau i descontrau regularment els 3 μ l de solvent orgànic per l'acció de la bomba. Després dels 30 minuts de l'etapa d'extracció, s'injecten 2 μ l al cromatògraf de gasos per la seva anàlisi. Els analits determinats són: metilamina, etilamina, propilamina, butilamina, pentilamina i hexilamina. A més a més, comparen aquest treball desenvolupat amb un mètode en el que empren la *single-drop microextraction* (SDME) amb immersió directa, on exposen 3 μ l de toluè (contrets amb una agulla) que formen una gota directament a la mostra, durant un temps d'extracció de 30 min, després dels quals n'injecten 2 μ l al cromatògraf de gasos, com en el cas anterior. Les precisions dels dos mètodes són similars, però el mètode que utilitza HF-LPME és més sensible i l'eficàcia de l'extracció és major. Els límits de detecció del mètode que utilitza l'HF-LPME varien de 0.29 a 0.44 mg/l, i en el cas d'emprar SDME varien de 1.1 a 2.4 mg/l.

Recentment Kamarei *et al.* [67] han desenvolupat un mètode en el que realitzen una microextracció amb barres que contenen un solvent orgànic (SBME) per extreure amines alifàtiques de mostres aquoses, en la que no utilitzen reactiu derivatitzant, seguit de la determinació per GC-FID. Les amines alifàtiques que determinen són: *N*-etilidiisopropilamina, dibutilamina, dipropilamina, dibenzilamina, *N,N*-dimetilbenzilamina. En la SBME el solvent d'extracció que s'utilitza ha de ser immiscible en aigua, tenir una baixa pressió de vapor per poder formar la barra de solvent, ha de tenir un comportament adequat en el GC i ha de tenir un pic cromatogràfic que se separi bé dels analits. En aquest treball, per tal de dur a terme la SBME, a una fibra buida de 1.5 cm de llargada se li afegeixen 5 μ l de solvent orgànic (*n*-nonanol) amb una microxeringa, tenint un dels extrems de la fibra segellat amb unes tenalles. La fibra se submergeix en el solvent orgànic durant 20 segons perquè el solvent penetri en els porus de la paret de la fibra. Després d'impregnar-se, se segella l'extrem obert de la fibra, i així es forma la barra de solvent. A continuació s'introdueix la barra de solvent en un vial de 10 ml que conté 8 ml de la solució aquosa, en la que prèviament s'ha ajustat la força iònica (20 % p/v) i la concentració d'hidròxid de sodi (1 mol/l). El vial de la mostra es troba en un bany d'aigua a 45 °C i la mostra s'agita a 700 rpm durant l'extracció. Després de 30 minuts d'extracció, es treu la barra de solvent de la solució, es dessegellen els dos extrems de la fibra i s'injecta una alíquota d'1 μ l del solvent d'extracció en el GC. Per tal d'optimitzar l'extracció realitzen un Plackett-Burman com a disseny experimental per trobar les variables més influents en el procés d'extracció, que són la concentració d'hidròxid sòdic, la força iònica, l'addició de solvent orgànic i el temps d'extracció. La velocitat

d'agitació i la temperatura d'extracció són les variables menys influents. A continuació realitzen un disseny Box-Behnken per optimitzar els quatre factors més rellevants trobats en el primer disseny, i així obtenen una superfície de resposta amb la seva corresponent equació polinomial del model. En aquest cas es veu que els factors més rellevants són els corresponents a les variables concentració d'hidròxid sòdic, degut a que per extreure les amines de la fase aquosa és necessari incrementar la concentració d'hidròxid sòdic per tenir més amines desionitzades en la fase orgànica, la força iònica, ja que quan augmenta aquesta disminueix la solubilitat dels analits en la fase aquosa i augmenta en la fase orgànica, i el temps d'extracció. Els límits de detecció del mètode varien de 0.01 µg/l en el cas de la dibutilamina a 0.06 µg/l en el cas de la *N*-etilidiisopropilamina. Les mostres d'aigua reals que analitzen són aigües residuals provinents d'una indústria farmacèutica i aigua de pou.

Determinació d'amines alifàtiques mitjançant HPLC

Tot i que la cromatografia de gasos ha estat una tècnica molt emprada per a la determinació de compostos nitrogenats, també la cromatografia de líquids pot emprar-se per aquestes determinacions. A l'igual que en el cas anterior, també és freqüent introduir un procés de derivatització dels compostos per tal que tinguin una resposta adequada al detector i emprar un sistema de preconcentració de la mostra amb la finalitat de baixar els límits de detecció dels diferents mètodes.

Al *Handbook of Analytical Derivatization Reactions* [50] també hi trobem alguns dels reactius emprats per derivatitzar amines per HPLC. Els reactius més utilitzats en cromatografia de líquids són els que donen lloc a derivats amb grups cromòfors o fluorescents. Per exemple, els derivats sulfonamides tenen grups cromòfors i se sintetitzen en fer reaccionar l'amina amb clorur de 5-dimetilaminonaftalen-1-sulfonil (Dns-Cl) o di-*n*-butilaminonaftalen-1-sulfonil (Bns-Cl), i els derivats fluorescents es poden preparar a partir del reactiu fluorescamina.

Actualment en els mètodes més comuns per la determinació de compostos amino mitjançant HPLC es realitza la derivatització dels compostos donant derivats fluorescents, per tal d'augmentar la sensibilitat, de forma simultània a l'extracció en fase sòlida.

S'han emprat bastants agents derivatitzants fluorescents, però encara no s'ha trobat cap mètode de derivatització que no presenti cap inconvenient. Per exemple, el mètode que utilitza l'*o*-ftalaldehid (OPA) ofereix una elevada sensibilitat en un ampli grup de compostos, però només es pot utilitzar per derivatitzar amines primàries, altres reactius com el 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-F) i el 7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl) mostren una descomposició en metanol-aigua

en 25 minuts quan s'exposen a la llum. Recentment, els reactius 9-fluorenilmetil cloroformat (FMOC), 1-(9-fluorenil)etil cloroformat (FLEC) i 2-(9-antil)etil cloroformat (AEOC) han estat emprats per la derivatització d'amines, aminoàcids i pèptids. Aquests reactius donen molt bons resultats d'absorció UV i una elevada sensibilitat amb un detector de fluorescència, però molts procediments actuals que utilitzen FMOC també donen problemes: per dur a terme una derivatització efectiva cal utilitzar un excés de reactiu que després s'ha d'eliminar, degut a que interfereix en la separació dels derivats i és perjudicial per la columna cromatogràfica. Un altre reactiu que ha estat emprat és el 6-aminoquinolil-*N*-hidroxisuccinimidilcarbamat (AQC), que dona derivats estables amb amines i aminoàcids, però té l'inconvenient de que en solució aquosa no presenta una fluorescència gaire intensa.

Entre els reactius més utilitzats hi ha el clorur de dansil, així doncs, Meseguer *et al.* [68] desenvolupen un mètode per determinar amines alifàtiques de baix pes molecular en aigües d'irrigació, de llac, d'aixeta i residuals industrials, realitzant la seva derivatització amb Dns-Cl, una preconcentració emprant SPE amb un cartutx C₁₈ i detecció amb HPLC-UV i FL. Les amines determinades són: metilamina, etilamina, dimetilamina, *n*-propilamina, butilamina, dietilamina, pentilamina i hexilamina. Els límits de detecció varien entre 10 i 250 µg/l, i el temps total de l'anàlisi és inferior a 25 minuts. També varen utilitzar el mateix reactiu Cobo *et al.* [69] que desenvoluparen un mètode per la determinació d'amines de baix pes molecular en aigües d'aixeta, superficials, subterrànies i de riu, mitjançant la derivatització amb Dns-Cl i l'extracció en fase sòlida *on-line*, i separació amb HPLC utilitzant la detecció quimiluminiscent. Les amines estudiades varen ser: metilamina, etilamina, propilamina i butilamina. En l'extracció en fase sòlida varen provar diferents tipus de sorbents: IR-120PLUS, CG-120 i IRC-50, i van obtenir els millors resultats d'extracció amb el darrer, IRC-50, que és un sorbent de bescanvi iònic. Els límits de detecció d'aquest mètode varien entre 15 i 340 ng/l.

També altres autors utilitzen reactius pel procés de derivatització, com per exemple Sánchez-Misiego *et al.* [70] que desenvoluparen un mètode per determinar amines alifàtiques derivatitzant-les amb fenilisotiocianat (PIT) seguit d'HPLC utilitzant un detector amperomètric. Les amines estudiades són: metilamina, propilamina, *n*-butilamina i isobutilamina. Els límits de detecció obtinguts es troben en un interval entre 9 i 79 µg/l. També Wang *et al.* [71] desenvolupen un mètode per determinar amines alifàtiques emprant com a reactiu derivatitzant l'*N*-hidroxisuccinimidil fluoresceïn-*O*-acetat (SIFA) i HPLC-FL. Les amines determinades són: metilamina, etilamina, etilendiamina, isopropilamina, isobutilamina, *n*-butilamina, 1,4-butilendiamina i 1,5-amilendiamina. Els límits de detecció d'aquest mètode estan al voltant de 0.25 ng/l. El mateix grup d'investigació [72] desenvolupa un mètode per determinar amines en aigües de llac i d'aixeta utilitzant l'àcid 2,6-dimetil-4-quinolina carboxil *N*-hidroxisuccinimida éster com a reactiu derivatitzant, seguida d'HPLC-FL.

En aquest cas les amines determinades són: metilamina, etilamina, *n*-propilamina, *n*-butilamina, *n*-amilamina i *n*-hexilamina.

Donat que els resultats obtinguts amb aquests reactius derivatitzants no són òptims, tal i com s'ha comentat anteriorment, diferents autors han seguit sintetitzant nous compostos per a ser utilitzats com a reactius derivatitzants per aquests tipus d'analits. Així doncs, You *et al.* [73] han sintetitzat l'àcid 2-(2-fenil-1H-fenantro-[9,10-d]-imidazol-1-il)-acètic (PPIA), que és un reactiu molt estable en estat cristal·lí, i els derivats formats en medi acetonitril i amb la presència de dimetilaminopiridina com a catalitzador a temperatura ambient es donen amb rendiments elevats.

També Yamaguchi *et al.* [74] desenvolupen un mètode per la determinació d'amines primàries i secundàries utilitzant com a agent derivatitzant el 4-(5',6'-dimetoxibenzotiazoli)fenilisotiocianat mitjançant HPLC-FL. Les amines determinades són: propilamina, heptilamina i *n*-metilhexilamina. Els límits de detecció d'aquest mètode estan al voltant de 10 ng/l. I Verdú *et al.* [75] han desenvolupat un mètode per la determinació d'amines en aigua de riu i d'aixeta mitjançant la derivatització amb 3,5-dinitrobenzoil (DNB) i preconcentració en un cartutx d'extracció en fase sòlida C₁₈ seguit d'HPLC-UV. Les amines determinades han estat: etilamina, isopropilamina i dimetilamina. El temps total de l'anàlisi és de 15 minuts i els límits de detecció varien entre 2 i 5 µg/l. Els mateixos investigadors [76] més tard van desenvolupar un altre mètode per determinar les amines: metilamina, etilamina, dimetilamina, *n*-butilamina, *n*-pentilamina i *n*-hexilamina en mostres d'aigua de riu i aigües residuals d'origen industrial. En aquest mètode el reactiu utilitzat va ser el fluorenmetil cloroformat (FMOC), i van realitzar una SPE amb cartutxos C₁₈ seguida de la determinació per HPLC-FL. El temps total de l'anàlisi és inferior a 20 minuts i els límits de detecció varien entre 0.25 i 50 µg/l.

Altres treballs que apareixen a la bibliografia i que utilitzen nous reactius són per exemple el de Cao *et al.* [77] que sintetitzen un nou reactiu derivatitzant, el 6-oxi-(*N*-succinimidil acetat)-9-(2'-metoxicarbonil)fluoresceïna (SAMF), per obtenir derivats de les amines alifàtiques fluorescents, i determinar-los per HPLC-FL. Aquest nou reactiu derivatitzant mostra una fosforescència independent del pH de la mostra (pH 4-9) i una molt bona estabilitat a la llum. Les amines alifàtiques que determinen són: etanolamina, metilamina, etilamina, *n*-propilamina, *n*-butilamina, *n*-pentilamina i *n*-hexilamina. Els límits de detecció del mètode es troben entre 0.122 i 32.32 ng/l. Les mostres aquoses en les que es determinen aquests compostos són aigües de llac, i també es determinen en mostres d'aliments.

Zhang *et al.* [78] sintetitzen un nou reactiu derivatitzant, 3-(4-fluorinbenzoïl)-2-quinolina carboxaldehid (FBQCA) i l'utilitzen per derivatitzar amines alifàtiques a derivats fluorescents per determinar aquests compostos per HPLC-FL. Aquest reactiu no és fluorescent però forma isoindols altament fluorescents quan reacciona amb amines primàries en medi bàsic. Les amines que determinen són: etanolamina, metilamina, etilamina, *n*-propilamina, *n*-butilamina, *n*-pentilamina, *n*-hexilamina, *n*-heptilamina, *n*-octilamina, *n*-nonilamina i *n*-decilamina. Els límits de detecció obtinguts es troben en un interval entre 15.5 i 141.3 ng/l. Les mostres en les que s'aplica aquest mètode són aliments i mostres mediambientals, incloent sòls i aigua d'aixeta.

You *et al.* [79] desenvolupen un mètode sensible per determinar amines alifàtiques utilitzant un reactiu nou altament fluorescent, el 2-(11H-benzo[a]carbazol-11-il) etil cloroformat (BCEC-Cl), seguit d'HPLC-FL. La identificació dels derivats es duu a terme utilitzant com a detector un espectròmetre de masses utilitzant ionització química a pressió atmosfèrica (APCI/MS). Comparat amb altres reactius derivatitzants d'amines com són el BCEOC-Cl i el FMOC-Cl, el BCEC-Cl dóna lloc a derivats amb unes excel·lents propietats fluorescents, que es tradueix en una major sensibilitat. A més a més, la derivatització es duu a terme en menys de 3 minuts en condicions suaus. Les amines que determinen són: metilamina, etilamina, propilamina, butilamina, pentilamina, hexilamina, heptilamina, octilamina, nonilamina, decilamina, undecilamina i dodecilamina. Les mostres en les que s'aplica aquest mètode són aliments i mostres mediambientals, incloent sòls i aigua residual. Els límits de detecció obtinguts es troben en un interval entre 0.26 i 0.56 ng/l.

Zhao *et al.* [80] sintetitzen un reactiu derivatitzant, 1,2-benzo-3,4-dihidrocarbazol-9-etil cloroformat (BCEOC) per derivatitzar amines alifàtiques seguit de la determinació per HPLC-FL. La identificació dels derivats es duu a terme utilitzant com a detector l'APCI/MS-MS. Comparat amb altres reactius derivatitzants d'amines com són el CEOC i el FMOC, el BCEOC dóna lloc a derivats amb una intensitat de fluorescència superior. Les amines que determinen són: metilamina, etilamina, propilamina, butilamina, pentilamina, hexilamina, heptilamina, octilamina, nonilamina, decilamina, undecilamina i dodecilamina. Les mostres en les que s'aplica aquest mètode són sòls i aigües residuals. Els límits de detecció obtinguts es troben en un interval entre 123.3 i 625.3 ng/l.

Moliner-Martínez *et al.* [81] presenten un mètode per determinar amoni i amines alifàtiques de cadena curta (metilamina, etilamina, propilamina, *n*-butilamina i *n*-pentilamina) en mostres aquoses utilitzant OPA-NAC com a reactiu derivatitzant i la separació per cromatografia líquida capil·lar seguida de detecció amb UV. El mètode és molt senzill i ràpid, ja que no necessita una preconcentració prèvia dels compostos,

i el volum de mostra que es necessita és només de 0.1 ml. Els límits de detecció es troben en un interval entre 8 i 50 µg/l. El mètode va ser aplicat a diferents mostres reals: aigua d'irrigació, de riu, de llac, aigua d'entrada i de sortida provinent d'una planta de tractament d'una indústria dedicada a la producció de fungicides, entre d'altres.

Huang *et al.* [82] desenvolupen un mètode per determinar amines alifàtiques (metilamina, etilamina, *n*-propilamina, *n*-butilamina, *n*-amilamina, *n*-hexilamina, *n*-heptilamina) i diamines (etilendiamina) per HPLC-FL després de derivatitzar els compostos amb l'éster de l'àcid 2,6-dimetil-4-quinolincarboxílic i *N*-hidroxisuccinimida (DMQC-OSu), donant derivats fluorescents. Els límits de detecció obtinguts es troben en un interval entre 0.6 i 60 ng/L. El mètode va ser utilitzat per determinar amines alifàtiques en aigua d'aixeta, aigua de riu, orina humana i sèrum.

Kamarei *et al.* [83] descriuen un mètode per la determinació d'amines alifàtiques primàries i secundàries en mostres d'aigües mediambientals (d'aixeta, de riu, de mar i residual) utilitzant la derivatització i extracció simultànies mitjançant la microextracció líquid-líquid dispersiva basada en la solidificació en una gota de solvent orgànic flotant (DLLME-SFO) seguit de la HPLC-DAD. Una barreja d'agent dispersant, un agent extractant i un reactiu derivatitzant (fenil isotiocianat) va ser utilitzada per la derivatització i extracció simultànies. Un disseny experimental, Plackett-Burman, va ser utilitzat per determinar les variables més significatives que afectaven a l'eficiència de l'extracció, i un disseny experimental Box-Behnken (BBD) i les superfícies de resposta que en derivaren es van utilitzar per optimitzar els factors més significatius. Els límits de detecció obtinguts es trobaren entre 0.005 i 0.02 µg/l.

En la majoria dels casos, després del procés de derivatització es produeix una etapa de preconcentració, generalment amb sistemes d'extracció en fase sòlida. Alguns autors realitzen simultàniament aquests dos processos realitzant el procés de derivatització en el mateix cartutx d'extracció, com és el cas dels treballs de Sahasrabuddhey *et al.* [84] que desenvolupen un mètode per la determinació d'amoni i amines alifàtiques en aigües de riu, subterrànies i de l'aixeta, utilitzant una derivatització en un cartutx amb sorbent C₁₈ i determinant els derivats feniltiourees obtinguts mitjançant HPLC-UV. Les amines determinades són: metilamina, dimetilamina, etilamina, isopropilamina i dietilamina. Els límits de detecció d'aquest mètode varien entre 0.3 i 0.6 µg/l.

Si bé el sistema de preconcentració més utilitzat és l'extracció en fase sòlida, també la tècnica de la microextracció en fase sòlida (SPME) ha estat emprada en la determinació d'aquests compostos per HPLC, com és el cas dels treballs de Cháfer-Pericás *et al.* [85] que desenvolupen un mètode per determinar específicament la

dimetilamina en aigües de l'aixeta, d'irrigació, de riu i subterrànies, mitjançant la derivatització en dues etapes amb FMOC i *o*-ftalaldialdehid (OPA), seguit de la preconcentració amb una fibra de microextracció en fase sòlida amb recobriment de CW-TR i separació i detecció per HPLC-FL. La fibra se submergeix successivament en els reactius derivatitzants i posteriorment en la mostra que conté la dimetilamina. El límit de detecció obtingut per aquest mètode és de 0.3 mg/l. El mateix grup d'investigació [86] desenvolupa un mètode per la determinació selectiva de trimetilamina en aigües (de l'aixeta, subterrànies, de riu i de mar) i aire, mitjançant l'SPME utilitzant una fibra amb recobriment de CW-TR, amb derivatització en la fibra amb FMOC seguit de la separació i detecció amb HPLC-FL. Els límits de detecció obtinguts en les mostres d'aigua són de 0.25 mg/l.

Els treballs de Herráez-Hernández *et al.* [87], desenvolupen un mètode per determinar amines alifàtiques en aigües d'aixeta, de riu i residuals d'origen industrial, emprant la derivatització amb FMOC seguida de la microextracció en fase sòlida utilitzant una fibra amb recobriment CW-TR i separació i detecció mitjançant HPLC-FL. La fibra de CW-TR se satura de reactiu derivatitzant FMOC i seguidament se submergeix la fibra a la mostra per extreure les amines. Les amines estudiades varen ser: metilamina, dimetilamina i trimetilamina. Els límits de detecció d'aquest mètode varien entre 5 i 250 µg/l.

La mateixa tècnica és emprada en un altre treball de Herráez-Hernández *et al.* [88] que desenvolupen un mètode per determinar metilamina en mostres aquoses utilitzant la SPME per l'extracció i la derivatització de l'analit. El reactiu derivatitzant que utilitzen és el 9-fluorenilmetil cloroformat (FMOC). Proben diferents tipus de recobriments de fibres d'SPME (de PDMS, PDMS-DVB, CW-TPR, PDMS-DVB-CAR), les quals submergeixen successivament en les mostres i en la solució de reactiu derivatitzant per extreure la metilamina i el FMOC, respectivament, en el que s'anomena derivatització *on-fiber*. Després d'un temps de reacció, la metilamina derivatitzada es desorbeix en la columna cromatogràfica de l'HPLC-FL en mode d'elució en gradient. La fibra que els dona millors resultats és la que té el recobriment de CW-TPR. Comparant els resultats obtinguts amb el del mètode prèviament validat en un estudi anterior [89] en el que utilitzen cartutxos d'SPE C₁₈ convencionals per l'extracció i subseqüent derivatització de les amines amb FMOC, ambdós mètodes obtenen una exactitud i precisió comparables, però en el procediment de derivatització en la fibra d'SPME es manipula menys la mostra, tant en l'etapa d'extracció com en l'etapa de derivatització. El desavantatge del procediment que utilitza l'SPME és que necessita una instrumentació adicional (interfase SPME-HPLC, precolumna i vàlvula) i, a més a més, degut a les petites dimensions de les fibres SPME comercials, el total de metilamina i/o derivat FMOC de metilamina que pot ser extret o bé format en la fibra és inferior del que pot ser extret o format en un cartutx d'SPE. Com a resultat, la sensibilitat que s'aconsegueix

en el procediment que utilitza la SPME és inferior. Tanmateix, el mètode que utilitza l'SPME és una simple i ràpida alternativa. El límit de detecció obtingut per aquest mètode és de 0.75 mg/l. El mètode s'aplica a l'anàlisi d'aigua de l'aixeta, aigua subterrània i aigua residual obtinguda d'una indústria dedicada a la producció de fertilitzants.

Tot i que aquests processos de preconcentració s'estan imposant en tots els laboratoris, també es poden trobar alguns treballs en que utilitzen extraccions líquid-líquid, com és el cas del treball de Pietsch *et al.* [51] que descriuen dos mètodes per la determinació d'amines alifàtiques (*n*-propilamina, pentilamina, hexilamina, heptilamina i octilamina) i amines alicíclics (pirrolidina, morfolina, piperidina i piperazina), en aigües mediambientals com són aigües de riu i aigües provinents de plantes de tractament d'aigües residuals. Un dels mètodes utilitza la GC i ja s'ha descrit anteriorment. L'altre mètode consisteix en una extracció líquid-líquid (LLE) i una derivatització dels compostos amb FMOC-Cl, formant 9-fluorenilmetil carbamats, i la seva determinació utilitzant HPLC-FL.

Determinació d'amines alifàtiques mitjançant CE

L'electroforesi capil·lar és una tècnica no gaire emprada per la determinació d'amines alifàtiques. S'han desenvolupat alguns mètodes per la determinació d'amines biògenes en vins i begudes i també en mostres aquoses.

Liu *et al.* [33] desenvolupen un mètode per determinar amines biògenes: diaminopropà, putrescina, cadaverina i diaminohexà, en aigües de llac mitjançant la seva derivatització amb *N*-(4-aminobutil)-*N*-etilisoluminol (ABEI) i separació per cromatografia micel·lar electrocinètica amb detecció quimiluminiscent *on-line*, obtenint uns límits de detecció entre 2.5 i 15 µg/l. En el mateix grup d'investigació, Zhang *et al.* [90], utilitzen l'electroforesi capil·lar per zones amb detecció amperomètrica mitjançant la derivatització en precolumna amb naftalè-2,3-dicarboxaldehyd (NDA), aplicant-ho a la determinació de quatre diamines alifàtiques de cadena llarga: putrescine, cadaverine, diaminohexà i diaminopropà, en aigües de llac. Els límits de detecció obtinguts varien entre 4.5 i 45 µg/l.

Santos *et al.* [91] desenvoluparen un mètode ràpid per determinar amines alifàtiques de baix pes molecular en aigua de riu i d'aixeta utilitzant l'electroforesi capil·lar assistida amb pressió acoblada a un espectròmetre de masses. En mostres reals fou necessari aplicar un *clean-up* i una pre-concentració de les mostres, que es va realitzar automàticament insertant una minicolumna en el sistema de re-ompliment de l'equip comercial.

A la taula 3 es mostra un resum dels diferents mètodes desenvolupats per determinar amines alifàtiques en mostres aquoses mitjançant GC, HPLC i CE.

1.2.1.2. Determinació d'*N*-Nitrosamines en aigües mediambientals i llots

La determinació de *N*-Nitrosamines s'ha desenvolupat principalment per cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (GC-MS) [92-94], tot i que també s'han desenvolupat alguns mètodes emprant la detecció de nitrogen-fosfor [93] o el d'ionització de flama [95]. La gran popularitat del GC-MS és deguda principalment a la seva elevada sensibilitat i la selectivitat que ofereix, sobretot treballant amb mode de monitorització d'ions (SIM).

La GC-MS és una excel·lent tècnica per a la determinació de *N*-Nitrosamines semi volàtils o termoestables com per exemple la nitrosodimetilamina. Altres tecnologies s'han aplicat per a la determinació d'altres nitrosamines que no són tèrmicament estables i que es poden descomposar en l'injector del GC, com per exemple la *N*-Nitrosodifenilamina. En aquests casos és necessari emprar tècniques de cromatografia de líquids per a la determinació d'aquests compostos. Així doncs, per a la determinació de la *N*-Nitrosodifenilamina, compost inclòs en la llista de productes derivats de processos de cloració (DBPs), s'ha d'emprar la cromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria de masses (LC-MS) [96].

La baixa concentració d'aquests compostos tant en mostres líquides com en mostres sòlides, fa necessari un pretractament previ de la mostra, que implica en els casos de mostres líquides, una preconcentració i una etapa de neteja prèvia, i en el casos de mostres sòlides una primera etapa d'extracció.

En el cas de mostres líquides, on les concentracions dels analits en estudi estan a valors de ng/l, s'utilitzen normalment sistemes d'extracció líquid-líquid (LLE), de microextracció en fase sòlida (SPME) o d'extracció en fase sòlida (SPE).

Els sistemes d'extracció líquid-líquid van ser els primers en ser utilitzats però els resultats obtinguts no van ser satisfactoris al obtenir-se valors de recuperació per a les nitrosamines baixos [97]. Aquests baixos valors són confirmats pels valors del Log K_{ow} que es poden veure a la taula 2. La gran quantitat de solvent necessari per a poder fer l'extracció, així com el temps i la ineficàcia en monitoritzacions de rutina (poca automatització), fan que l'aplicació d'aquesta tècnica hagi sigut utilitzada i ha estat substituïda per l'extracció en fase sòlida (SPE) [97].

Taula 3. Resum dels diferents mètodes desenvolupats en la determinació d'amines alifàtiques en mostres aquoses.

Tipus amines	Mostra d'aigua	Reactiu Derivatitzant	Tècnica Preconcentració	Detector	LODs (µg/l)	Referència
<i>Cromatografia de Gasos</i>						
Amines alifàtiques volàtils	---	---	HS	NPD	0.2 – 3000	[49]
Amines alifàtiques primàries i diamines	---	---	---	FID	~ 10 ⁵	[47]
Amines alifàtiques i alicíclics	Residual i de riu	Tricloroetil carbamats	LLE	MS	0.005	[51]
Amines alifàtiques primàries i secundàries	Residual i superficial	BSC	LLE	MS	~ 0.1	[52]
Amines alifàtiques i aromàtiques	Residual, de riu i de mar	IBCF	LLE amb parell iònic	MS	7·10 ⁻³ – 5·10 ⁻⁴	[53]
Amines alifàtiques primàries	---	Nou reactiu sintetitzat, SIPA	LLE	MS i FID	7.3 – 46	[56]
Amines alifàtiques primàries	De llac	Nou reactiu sintetitzat, SIBA	HS-SPME	MS i FID	0.013 – 0.32	[57]

Taula 3. Continuació.

Tipus amines	Mostra d'aigua	Reactiu Derivatitzant	Tècnica Preconcentració	Detector	LODs (µg/l)	Referència
<i>Cromatografia de Gasos</i>						
Amines alifàtiques primàries de cadena llarga	Aigua en circuit de tractament químic de calderes en centrals tèrmiques	TFAA	SPE	FID, NPD i MS	---	[54]
Amoni, amines alifàtiques, amines aromàtiques i fenols	De beguda, de riu i subterrànies	Clorur de benzoil	SPE	MS	0.007 – 0.039	[55]
Amines alifàtiques primàries	Aigües residuals	PFBA	HS-SPME	FID	0.4 - 26	[58]
Amines alifàtiques volàtils	Residual i de riu	---	HS-SPME	NPD	3 - 56	[38]
Amines alifàtiques de cadena curta	---	PFBOC	SPE però amb cartutx de PA	NPD	---	[62]

Taula 3. Continuació.

Tipus amines	Mostra d'aigua	Reactiu Derivatitzant	Tècnica Preconcentració	Detector	LODs (µg/l)	Referència
<i>Cromatografia de Gasos</i>						
Amines alifàtiques de cadena curta	Residual	PFBAY	HS-SDME	MS	0.6 – 1.1	[64]
Amines alifàtiques curtes de baix pes molecular	De llac, de riu i aigües residuals industrials	PFBOC	SDME	MS	11.7·10 ⁻⁵ – 15.27·10 ⁻³	[65]
Amines alifàtiques primàries	De riu	PFBAY	HF-LPME	MS	290 - 440	[66]
			SDME		1100-2400	
Amines alifàtiques	Aigua de pou i aigua residual	---	SBME	FID	0.01 – 0.06	[67]
Amines alifàtiques	De llac	Nou reactiu sintetitzat, TBza-suc	SPME amb nou recobriment sintetitzat	FID i MS	0.005 – 0.05	[60]

Taula 3. Continuació.

Tipus amines	Mostra d'aigua	Reactiu Derivatitzant	Tècnica Preconcentració	Detector	LODs ($\mu\text{g/l}$)	Referència
<i>Cromatografia de Líquids</i>						
Amines alifàtiques de baix pes molecular	D'irrigació, de llac, d'aixeta i residuals industrials	Dns-Cl	SPE amb cartutx C_{18}	UV i FL	10 - 250	[68]
Amines alifàtiques	---	Fenil isotiocianat (PIT)	---	Amperomètrica	9 - 79	[70]
Amines alifàtiques	---	SIFA	---	FL	$2.5 \cdot 10^{-4}$	[71]
---	De riu, d'aixeta i superficial	---	SPE amb cartutx C_{18}	UV	0.3-0.6	[84]

Taula 3. Continuació.

Tipus amines	Mostra d'aigua	Reactiu Derivatitzant	Tècnica Preconcentració	Detector	LODs (µg/l)	Referència
<i>Cromatografia de Líquids</i>						
Etilamina, isopropilamina i dimetilamina	De riu i d'aixeta	DNB	SPE amb cartutx C ₁₈	UV	2 – 5	[75]
Amines alifàtiques primàries i secundàries	De riu i residual d'origen industrial	FMOOC	SPE amb cartutx C ₁₈	FL	0.25 – 50	[76]
Amines alifàtiques de baix pes molecular	De l'aixeta, superficial, subterrània i de riu	Dns-Cl	SPE amb IRC-50	CL	0.015 - 0.34	[69]
Trimetilamina	D'aixeta, de riu, subterrània i de mar	FMOOC	SPME amb recobriment de CW-TR	FL	250	[86]

Taula 3. Continuació.

Tipus amines	Mostra d'aigua	Reactiu Derivatitzant	Tècnica Preconcentració	Detector	LODs (µg/l)	Referència
<i>Cromatografia de Líquids</i>						
Amoni i amines alifàtiques primàries de cadena curta	D'irrigació, de riu, de llac, residual industrial	OPA-NAC	---	UV	8 - 50	[81]
Metilamina, dimetilamina i trimetilamina	D'aixeta, de riu i residuals industrials	FMOc	SPME amb recobriment de CW-TPR	FL	5 - 250	[87]
Metilamina	---	FMOc	SPME amb recobriment de CW-TPR	FL	750	[88]

Taula 3. Continuació.

Tipus amines	Mostra d'aigua	Reactiu Derivatitzant	Tècnica Preconcentració	Detector	LODs ($\mu\text{g/l}$)	Referència
<i>Cromatografia de Líquids</i>						
Etaqno lamina i amines alifàtiques primàries	De llac	SAMF	---	FL	$0.12 \cdot 10^{-3}$ – 0.032	[77]
Etaqno lamina i amines alifàtiques primàries	D'aixeta	FBQCA	---	FL	0.015 – 0.14	[78]
Amines alifàtiques primàries	Aigua residual	BCEC-Cl	---	FL i MS	$0.26 \cdot 10^{-3}$ - $0.56 \cdot 10^{-3}$	[79]

Taula 3. Continuació.

Tipus amines	Mostra d'aigua	Reactiu Derivatitzant	Tècnica Preconcentració	Detector	LODs ($\mu\text{g/l}$)	Referència
<i>Cromatografia de Líquids</i>						
Amines alifàtiques primàries i etilendiamina	D'aixeta, de riu	DMQC-OSu	---	FL	$0.6 \cdot 10^{-3}$ – $60 \cdot 10^{-3}$	[82]
Amines alifàtiques primàries i secundàries	D'aixeta, de riu, de mar i residual	Fenil isotiocianat (PIT)	DLLME-SFO	DAD	0.005 – 0.02	[83]

Taula 3. Continuació.

Tipus amines	Mostra d'aigua	Reactiu Derivatitzant	Tècnica Preconcentració	Detector	LODs ($\mu\text{g/l}$)	Referència
<i>Electroforesi Capil·lar</i>						
Amines alifàtiques de cadena llarga: diaminopropà, putrescina, cadaverina, diaminohexà	De llac	ABEI	---	CL	2.5 – 15	[33]
Amines alifàtiques de cadena curta	D'aixeta i de riu	---	---	MS	---	[91]

La microextracció en fase sòlida (SPME) presenta millores sobre l'extracció amb líquids, principalment per la no utilització de solvents orgànics i la seva facilitat per automatitzar el procés. Una de les principals dificultats per l'aplicació de la tècnica es poder arribar als límits de detecció imposats per les normatives. Així doncs, Grebel *et al.* [100] varen desenvolupar un mètode per SPME-GC-MS per a la determinació de vuit *N*-Nitrosamines obtenint uns límits de detecció entre 30 ng/l i 138 ng/l. Recentment el mètode s'ha modificat obtenint-se valors de límits de detecció entre 3.2 i 15 ng/l [101].

El mètode més emprat és l'extracció en fase sòlida (SPE). Diferents sorbents han estat emprats per alguns autors per a la concentració de les *N*-Nitrosamines, alguns d'ells convinant el procés d'extracció amb sorbents de fase reversa amb carbons activats. Els sorbents més emprats han estat l'Ambersorb 572, C-18, Oasis HLB, Oasis MCX i Oasis MAX [102]. Els resultats obtinguts han permès detectar aquests compostos a nivells de ng/l i per tant poder determinar aquests compostos sota normativa.

En el cas de voler determinar la presència d'aquests compostos en mostres sòlides, com per exemple fangs de depuradora, és necessari, prèviament al sistema de preconcentració i neteja, una primera etapa on s'extreguin els analits de la mostra sòlida. Les tècniques més emprades per a fer-ho són, a més a més del tradicional Soxhlet, els sistemes d'extracció amb fluids pressuritzats (PLE) [103] o els sistemes amb microones (MAE) [104,105].

Una variant del sistema d'extracció amb fluids pressuritzats és la utilització d'aigua subcrítica en el procés d'extracció (PHWE) [106], que ha estat emprada amb analits polars amb bons resultats. Aquesta tècnica presenta l'avantatge de que després es pot acoblar directament un procés de preconcentració (SPE) i microextracció (SPME) directament a la mostra aquosa.

Els estudis més importants que s'han dut a terme han estat en la determinació d'aquests compostos en aigua potable o de xarxa, degut principalment ha que existeixen normatives que regulen la seva presència. És doncs primordial monitoritzar la presència de les *N*-Nitrosamines per assegurar la qualitat de l'aigua. El fet de que es tracti d'una mostra relativament neta, sobretot comparant-la amb aigües residuals, possibilita el fet de que puguin ser determinats aquests compostos amb un simple quadrupol amb una pre-concentració senzilla a baixos ng/l.

En un estudi desenvolupat en una planta de potabilització Nord-americana [107] on s'estudia l'aparició d'aquests compostos en diferents processos de tractament (tractament amb cloramines, amb clor i amb clor i ozó), s'identifiquen la presència de 3 *N*-Nitrosamines (NDMA, NDPhA i NMOR) en els diferents processos i amb unes concentracions per la NDMA, que és la més elevada, entre <2.4 i 130 ng/l. En altres

estudis, en un planta japonesa, també la NDMA ha estat el compost més identificat amb concentracions superiors a 2.8 ng/l en aigua de beguda i superiors a 4.3 ng/l en aigua bruta.

En plantes de tractament d'aigües residuals, també s'han fet estudis de la presència d'aquests compostos, sobretot en etapes prèvies a processos de cloració. Així doncs, en una planta suïssa [108] s'ha trobat com a nitrosamina més freqüent la NDMA, principalment a l'efluent primari, a concentracions entre 5 i 20 ng/l i amb algunes mesures puntuals de fins a 1000 ng/l. També s'ha determinat la NMOR a concentracions entre 5 i 30 ng/l i altres nitrosamines a concentracions més baixes.

Les plantes de tractament amb llots activats actuen com eliminadors de les nitrosamines generades durant els processos de cloració, així doncs en treballs com el de Padhye *et al.* [109], on es determinen la presència d'aquestes nitrosamines en llots de depuradora, es determina que tant en els fangs primaris, com en els activats com en els finalment acumulats en digestió anaeròbica, la presència de NDMA és molt abundant, 834, 994 i 363 ng/l respectivament. També la DMA apareix a concentracions elevades, concretament 2159, 883 i 799 µg/l respectivament, a més d'altres nitrosamines a més baixos nivells, com per exemple la NDBA i la NPYR.

1.3. Bibliografia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013

- [1] E. Huerga, Desarrollo de alternativas de tratamiento de aguas residuales industriales mediante el uso de tecnologías limpias dirigidas al reciclaje y/o valoración de contaminantes, Universitat de València, Tesis Doctoral (2005).
- [2] MAH/285/2007, per la qual es dóna publicitat a l'Acord del Consell d'Administració de l'Agència Catalana de l'Aigua d'1 d'abril de 2004, de fixació de criteris en relació amb la vigilància i el control de la qualitat de les aigües marines litorals i els paràmetres i límits dels abocaments de terra a mar.
- [3] M. Bernhard, J. Müller, T.P. Knepper, *Water Res.* 40 (2006) 3419.
- [4] M. Clara, B. Strenn, O. Gans, E. Martinez, N. Kreuzinger, H. Kroiss, *Water Res.* 39 (2005) 4797.
- [5] H. Li, F. Jiku, H.F. Schröder, *J. Chromatogr. A* 889 (2000) 155.
- [6] T. Reemtsma, S. Weiss, J. Mueller, M. Petrovic, S. Gonzalez, D. Barceló, F. Ventura, T.P. Knepper, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 5451.
- [7] J. Comas, Development, Implementation and Evaluation of an Activated Sludge Supervisory System for the Granollers WWTP, Universitat de Barcelona, Tesi Doctoral (2006).
- [8] M. Petrovic, S. González, D. Barceló, *Trends in Anal. Chem.* 22 (2003) 685.
- [9] Metcalf and Eddy, *Wastewater Engineering Treatment and Reuse*, McGraw Hill (2003).
- [10] GENCAT, Generalitat de Catalunya, Departament de Medi Ambient, ACA, Agència Catalana de l'Aigua <http://aca-web.gencat.cat/aca/appmanager/aca/aca/>, [Consulta: 21 de novembre 2011].
- [11] G. Wen, J. Ma, L. Zhang, G. Yu, *Comprehensive Membrane Sci. and Engineering* 4 (2010) 195.
- [12] <http://www.aiguescb.com> [Consulta: 22 de novembre 2011].
- [13] A. Hernández Muñoz (2001). *Depuración y desinfección de aguas residuales*. Colegio de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos de Madrid.
- [14] J. J. Salas Rodríguez, *Tecnologías de depuración: Situación actual y perspectivas*, Centro de las Nuevas Tecnologías del Agua (CENTA), http://www.congreso.us.es/ciberico/archivos_word/JuanJoseSalas.doc [Consulta: 22 de novembre 2011].
- [15] N. Cicek, Membrane bioreactors in the treatment of wastewater generated from agricultural industries and activities. AIC 2002 Meeting CSAE/SCGR Program Saskatoon, Saskatchewan, <http://engrwww.usask.ca/oldsite/societies/csae/PapersAIC2002/CSAE02-404.pdf>, [Consulta: 22 de novembre 2011].
- [16] F. Sánchez Font, Estudio y diseño de una planta de producción de membranas cerámicas de coste reducido, Projecte Fi de Carrera, Enginyer Industrial, 2007, <http://www.fcca.es/Docs/MBRhistoria.pdf>, [Consulta: 21 de novembre 2011].

- [17] Introducción a los Bioreactores de Membranas, Centro Canario del Agua, 2003, http://www.ingenieroambiental.com/4014/introduccion_mbr.pdf, [Consulta: 23 de novembre 2011].
- [18] S. Álvarez Blanco, J. Lora García, Tratamiento de Aguas residuales mediante tecnología de membranas, Grupo de I+D+I de Procesos de Membranas, Tratamiento de Efluentes y Optimización (PROMETEO), http://www.fitec.org/general/APLIMATEC/Presentaciones/APLIMATEC04_Lora.pdf, [Consulta: 21 de novembre 2011].
- [19] N. Bjarne, Desalination 153 (2003) 355.
- [20] M. Gander, B. Jefferson, S. Judd, Separation and Purification Technology 18 (2000) 119.
- [21] T. Stephenson, B. Jefferson, S. Judd, K. Brindle, Membrane bioreactor for wastewater treatment, 2000 IWA publishing, London, UK.
- [22] P. Aptel, C. Buckley. Tipos de operaciones de membranas. Tratamiento del agua por procesos de membrana. Principios, procesos y aplicaciones. 1998 American Water Works Asociation Research Fundation. Madrid. McGrawHill.
- [23] GAIKER Centro Tecnológico: Principales líneas de investigación en membranas, 2004, <http://grupos.unican.es/redmembranas/GAIKER.pdf>, [Consulta: 23 de novembre 2011].
- [24] C. C. Salazar Díaz, Reducción de disruptores endocrinos, microcontaminantes y modificación de características organolépticas de las aguas residuales utilizando técnicas de filtración avanzadas. E.T.S.I. Caminos, Canales y Puertos (UPM), Tesis Doctoral (2006).
- [25] J. Manem, R. Sanderson. Bioreactores de membrana. Tratamiento del agua por procesos de membrana. Principios, procesos y aplicaciones. 1998 American Water Works Asociation Research Fundation. Madrid. McGrawHill.
- [26] BREF, Reference Document on Best Available Techniques in Common Waste Water and Waste Gas Treatment/Management Systems in the Chemical Sector, Integrated Pollution Prevention and Control (IPPC), European Commission (2003), [Consulta: 21 de novembre 2011].
- [27] S. Navalon, M. Alvaro, H. Garcia, Environ. Technol. 32 (2011) 295.
- [28] B. Kraigher, T. Kosjek, E. Heath, B. Kompore, I. Mandi-Mulec, Water Res. 42 (2008) 4578.
- [29] M. Carballa, F. Omil, J.M. Lema, M. Llompart, C. García-Jares, I. Rodríguez, M. Gómez, T. Ternes, Water Res. 38 (2004) 2918.
- [30] C.G. Daughton, Environ. Impact Assess. Rev. 24 (2004) 711.
- [31] S.D. Richardson, Anal. Chem. 81 (2009) 4645.
- [32] US EPA, in (2009) Federal Register: Third list of candidates of contaminants in drinking water of Environmental Protection Agency, 51850-51862, Washington, DC.

- [33] Ministerio de Trabajo y asuntos sociales. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (España), http://www.mtas.es/insht/ntp/ntp_243.htm [Consulta: 12 de desembre 2011].
- [34] Y.M. Liu, J.K. Cheng, J. Chromatogr. A 1003 (2003) 211.
- [35] J.K. Lin., Clin. Biochem. 23 (1990) 67.
- [36] H. Kataoka, J. Chromatogr. A 733 (1996) 19.
- [37] P. Simon, C. Lemacon, Anal. Chem. 59 (1987) 480.
- [38] M. Ábalos, J.M. Bayona, F. Ventura, Anal. Chem. 71 (1999) 3531.
- [39] A.R. Fernandez-Alba, A. Agüera, W. Paul, T. Alan, P. Collin (Eds.), Encyclopedia of Analytical Science, Elsevier, Oxford, 2005, p. 197.
- [40] S.D. Richardson, M.J. Plewa, E.D. Wagner, R. Schoeny, D.M. DeMarini, Mut. Res. Rev. Mut. Res. 636 (2007) 178.
- [41] International Agency for Research on Cancer IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans: Some N-nitroso compounds. IARC. Lyon. France. 1978, p.365.
- [42] J. Nawrocki, P. Andrzejewski, J. Hazard. Mater. 189 (2011) 1.
- [43] USEPA, The New Contaminant Candidate List-3, www.epa.gov/safewater/ccl (consulta 2/04/2013).
- [44] California Department of Public Health, NDMA and the other nitrosamines-Drinking water, <http://www.cdph.ca.gov/certlic/drinkingwater/Pages/NDMA.aspx> /consulta 2/04/2013).
- [45] USEPA, Ambient Water Criteria for Nitrosamines, EPA 440/5-80-064, 1980.
- [46] IARC, List of classification by alphabetical order, <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php> (consulta 03/04/2013).
- [47] A. Krzyzaniak, W. Weggemans, B. Schuur, A. B. Haan, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 9086
- [48] C. Molins-Lagua, P. Campins-Falcó, Anal. Chim. Acta 546 (2005) 206.
- [49] C. Maris, A. Laplanche, J. Morvan, M. Bloquel, J. Chromatogr. A 846 (1999) 331.
- [50] D.R. Knapp, Handbook of Analytical Derivatization Reactions, Wiley Interscience, New York, USA, 1979.
- [51] J. Pietsch, S. Hampel, W. Schmidt, H.J. Brauch, E. Worch, Fresenius J. Anal. Chem. 355 (1996) 164.
- [52] F. Sacher, S. Lenz, H.J. Brauch, J. Chromatogr. A 764 (1997) 85.
- [53] M. Akyüz, S. Ata, J. Chromatogr. A 1129 (2006) 88.
- [54] P. Kusch, G. Knupp, M. Hergarten, M. Kozupa, M. Majchrzak, J. Chromatogr. A 1113 (2006) 198.
- [55] S. Mishra, V. Singh, A. Jain, K.K. Verma, Analyst 126 (2001) 1663.
- [56] Y.-Y. Zhao, Z.-Z. Jing, H. Wang, H.-S. Zhang, J.-X. Yu, Anal. Chim. Acta 468 (2002) 255.

- [57] Y.Y. Zhao, L.S. Cai, Z.Z. Jing, H. Wang, H.X. Yu, H.S. Zhang, *J. Chromatogr. A* 1021 (2003) 175.
- [58] L. Pan, J.M. Chong, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 773 (1997) 249.
- [59] H. Lin, C. Deng, X. Zhang, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 3225.
- [60] L. Cai, Y. Zhao, S. Gong, L. Dong, C. Wu, *Chromatographia* 58 (2003) 615.
- [61] X. Li, Z. Zeng, J. Zhou, S. Gong, W. Wang, Y. Chen, *J. Chromatogr. A* 1041 (2004) 1.
- [62] E. Baltussen, F. David, P. Sandra, H.G. Janssen, C. Cramers, *J. High Resol. Chromatogr.* 21 (1998) 645.
- [63] M. Kaykhani, S. Nazari, M. Chamsaz, *Talanta* 65 (2005) 223.
- [64] C. Deng, N. Li, L. Wang, X. Zhang, *J. Chromatogr. A* 1131 (2006) 45.
- [65] D. K. Singh, S. K. Sanghi, S. Gowri, N. Chandra, S. B. Sanghi, *J. Chromatogr. A* 1215 (2011) 5683.
- [66] K.J. Chia, S.D. Huang, *J. Chromatogr. A* 1103 (2006) 158.
- [67] F. Kamarei, H. Ebrahimzadeh, Y. Yamini, *J. Hazard. Mater.* 178 (2010) 747.
- [68] S. Meseguer, C. Molins, P. Campins, *J. Chromatogr. A* 978 (2002) 59.
- [69] M. Cobo, M. Silva, *J. Chromatogr. A* 848 (1999) 105.
- [70] A. Sánchez-Misiego, E. Pinilla-Gil, J.R. González-Lomba, *Electroanalysis* 12 (2000) 459.
- [71] H. Wang, J. Lin, X. Liu, H.S. Zhang, *Anal. Chim. Acta* 423 (2000) 77.
- [72] H. Wang, X. Liu, N. Zhang, L.W. Cao, H.S. Zhang, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 635.
- [73] J. You, X. Zhao, Y. Suo, H. Wang, Y. Li, J. Sun, *Anal. Chim. Acta* 565 (2006) 168.
- [74] M. Yamaguchi, S. Hara, J. Aoki, K. Yoshikuni, T. Iwata, *Anal. Sci.* 14 (1998) 425.
- [75] J. Verdu Andrés, P. Campíns Falcó, R.H. Hernandez, *Analyst* 126 (2001) 1683.
- [76] J. Verdu Andrés, P. Campíns Falcó, R.H. Hernandez, *Chromatographia* 55 (2002) 129.
- [77] L.W. Cao, H. Wang, J.S. Li, H.S. Zhang, *J. Chromatogr. A* 1063 (2005) 143.
- [78] N. Zhang, Y.Z. Zhao, H.S. Zhang, H. Wang, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 38.
- [79] J. You, W. Zhao, L. Liu, X. Zhao, Y. Suo, H. Wang, Y. Li, C. Ding, *Talanta* 72 (2007) 914.
- [80] X. Zhao, J. You, Y. Suo, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 30 (2007) 1963.
- [81] Y. Moliner-Martínez, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, *J. Chromatogr. A* 1164 (2007) 329.
- [82] K.-J. Huang, C.-Y. Wei, W.-Z. Xie, Y.-M. Liu, Y.-H. Chen, J.-F. Zhang, *Chromatographia* 70 (2009) 747.
- [83] F. Kamarei, H. Ebrahimzadeh, A.A. Asgharinezhad, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 2719.
- [84] B. Sahasrabudhhey, A. Jain, K. Verma, *Analyst* 124 (1999) 1017.

- [85] C. Cháfer-Pericás, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, *Talanta* 66 (2005) 1139.
- [86] C. Cháfer-Pericás, P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández, *Talanta* 69 (2006) 716.
- [87] R. Herráez-Hernández, C. Cháfer-Pericás, J. Verdú-Andrés, P. Campíns-Falcó, *J. Chromatogr. A* 1104 (2006) 40.
- [88] R. Herráez-Hernández, C. Cháfer-Pericás, P. Campíns-Falcó, *Anal. Chim. Acta* 513 (2004) 425.
- [89] X. Yang, T. Peppard, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 1925.
- [90] L.Y. Zhang, Y.M. Liu, Z.L. Wang, J.K. Cheng, *Anal. Chim. Acta* 508 (2004) 141.
- [91] B. Santos, B. M. Simonet, A. Rios, M. Valcarcel, *Electrophoresis* 25 (2004) 3231.
- [92] A. Raksit, S. Johri, *J. AOAC Int.* 84 (2001) 1413.
- [93] R.C. Cheng, C.J. Hwang, C. Andrews-Tate, Y.B. Guo, S. Carr, I.H. Suffer, *J. AWWA* 98 (2006) 82.
- [94] W.A. Mitch, A.C. Gerecke, D.L. Sedlak, *Water Res* 37 (2003) 3733.
- [95] B. Jurado-Sánchez, E. Ballesteros, M. Gallego, *J. Chromatogr. A*, 1154 (2007) 66.
- [96] Y.Y. Zhao, J. Boyd, S.E. Hrudey, X.F. Li, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 7636.
- [97] S. Jenkins, C. Koester, V. Taguchi, D. Wang, J.-P. Palmentier, K. Hong, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2 (1995) 207.
- [98] D. Djozan, M.A. Faraj-Zadeh, *J. High Resol. Chromatogr.* 19 (1996) 633.
- [99] Y. Moliner-Martínez, C. Molins-Legua, P. Campíns-Falcó, *Talanta* 62 (2004) 373.
- [100] J.E. Grebel, C.C. Young, I.H. Suffet, *J. Chromatogr. A*, 1117 (2006) 11.
- [101] H.W. Hung, T.F. Lin, C.H. Chiu, Y.C. Chang, T.Y. Hsieh, *Water Air Soil Pollut.* 213 (2010).
- [102] J.M. Boyd, S.E. Hrudey, S.D. Richardson, X.-F. Li, *Trends in Anal Chem.*, 30 (2011) 1410.
- [103] N. Ramirez, M.Z. Özel, A.C. Lewism, R.M. Marcé, F. Borrull, J.F. Hamilton, *J. Chromatogr. A* 1219 (2012) 180.
- [104] H. Man-Chun, C. Hsin-Chang, F. Ssu-Chien, *Food Chemistry* 138 (2013) 227.
- [105] N. Campillo, P. Viñas, N. Martínez-Castillo, *J. Chromatogr. A*, 396 (2010) 1815.
- [106] M.G. Pintado-Herrera, E. González-Mazo, P.A. Lara-Martin, *Anal. and Bioanal. Chem.*, 405 (2013) 401.
- [107] J.M. Boyd, Y.Y. Zhao, M. Wagner, F. Qin, P. Levallois, C. Legay, J.W.A. Charrois, S.D. Richardson, S.E. Hrudey, X.F. Li, Occurrence of *N*-nitrosodiphenylamine and *N*-nitrosodimethylamine in 38 drinking water

system in Canada and de USA, IWA World Water Congress and Exhibition, 2010, p.8.

- [108] M. Krauss, P. Longrée, F. Dorusch, C. Ort, J. Hollander, Water Res. 43 (2009) 4381.
- [109] L. Padhye, U. Tezel, W.A. Mitch, S.G. Pavlostathis, C.H. Huang, Environ. Sci. Technol. 43 (2009) 3087.

2. OBJECTIUS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013

L'objectiu principal d'aquesta tesi és l'avaluació de l'eficàcia del bioreactor de membrana en els processos de tractament d'aigües residuals, a la vegada que comparar els resultats obtinguts amb els d'una planta de tractament tradicional amb microorganismes. L'estudi inclou els paràmetres generals d'aquests processos (TOC, SS, etc.), així com també la caracterització dels compostos individualitzats que apareixen en aquestes aigües per tècniques cromatogràfiques i espectrometria de masses.

Un segon objectiu és el desenvolupament de diferents mètodes per a la determinació de dues famílies de compostos, les amines alifàtiques i les *N*-Nitrosamines, tant en mostres d'aigua com també en fangs obtinguts en els processos de depuració. Aquests estudis han de permetre determinar la seva presència i a la vegada avaluar la capacitat de les plantes vers la seva eliminació.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013

3. PART EXPERIMENTAL, RESULTATS I DISCUSSIÓ

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013

En aquest capítol s'inclou la part experimental i els resultats obtinguts en els diferents estudis realitzats durant la present Tesi Doctoral, encaminada a l'estudi de l'eliminació de compostos orgànics contaminants en diferents tipus de plantes de tractament d'aigües. Aquests estudis, tal com mostra la llista dels articles inclosa a l'Annex I, han estat publicats en diferents revistes científiques internacionals, de manera que, a continuació, es presenten en format article. Prèviament a cada estudi o grup d'estudis, s'inclou una breu introducció en la que es detallen els objectius principals de la recerca que es varen establir en el moment de plantejar els diferents estudis, així com una breu discussió dels resultats més importants obtinguts en cadascun d'ells.

Els motius que van encoratjar la realització de la present Tesi Doctoral van ser, per una banda, el creixent interès que ha suscitat la determinació de compostos orgànics contaminants en aigües residuals, tant des del punt de vista de la problemàtica mediambiental que es deriva de l'abocament d'aquestes aigües al medi aquàtic com des de la perspectiva de la reutilització de les aigües residuals tractades en processos industrials, agrícoles i fins i tot per us de boca. Per altra banda, la forta presència de la indústria química al Camp de Tarragona, ha sensibilitzat d'una manera especial als habitants de la zona vers la disponibilitat de tractaments efectius per l'obtenció d'uns efluents industrials lliures de residus potencialment tòxics per a la salut. En diversos estudis s'ha pogut observar que la majoria dels compostos orgànics contaminants no s'eliminen completament en les plantes de tractament d'aigües convencionals, i és per aquest motiu que se n'ha de controlar la seva presència en els emissaris i desenvolupar noves tècniques més efectives pel tractament de les aigües. A més a més, les autoritats governamentals a nivell mundial estan imposant cada cop normatives més severes pel que fa al tractament d'aigües residuals i als límits de vessament. Aquest fet implica, en primer lloc, desenvolupar nous processos de tractament d'aigües que permetin millorar l'eficiència de l'eliminació de les plantes de tractament convencionals i complir amb les normatives actuals, i en segon lloc, desenvolupar mètodes analítics altament sensibles per tal d'identificar la presència d'aquests compostos contaminants a les baixes concentracions en les que es troben.

Tenint en compte aquesta problemàtica, actualment s'estan estudiant noves tecnologies de tractament d'aigües residuals que s'adaptin a les necessitats del medi, i s'ha observat que la tecnologia dels bioreactors de membrana (BRM), juntament amb d'altres com la ultrafiltració, la nanofiltració, l'osmosi inversa, etc., és una alternativa a considerar.

Així doncs, tal com s'ha esmentat anteriorment, el primer objectiu d'aquesta tesi va ser dur a terme la posta en funcionament d'una planta pilot amb bioreactor de membrana (BRM) per a estudiar-ne la seva eficiència en l'eliminació de contaminants orgànics, a nivell global, en diferents aigües residuals industrials. El segon objectiu

d'aquesta tesi va ser el desenvolupament de mètodes analítics altament sensibles per tal de determinar dues famílies de compostos nitrogenats, amines alifàtiques primàries i *N*-Nitrosamines, en diferents tipus de mostres, preferentment aigües residuals, i també en llocs provinents de plantes de tractament d'aigües, i estudiar-ne la seva presència i eficàcia d'eliminació en les diferents plantes.

Els treballs realitzats es presenten agrupats en tres blocs. En el primer bloc s'ha dut a terme la posta en funcionament d'una planta pilot amb BRM submergides de microfiltració per al tractament d'aigües residuals de diferents orígens industrials.

Concretament, en aquest primer bloc es van plantejar dos treballs: en el primer, es va avaluar l'eficiència de la planta pilot amb BRM pel tractament d'aigües residuals d'una planta del sector petroquímic, i en el segon, pel tractament de les aigües residuals mixtes provinents de quatre indústries diferents (indústries de tensioactius, hidrocarburs halogenats, acetat de vinil i plàstics). En el segon treball, a més a més, es va poder comparar l'eficiència en la depuració de les aigües entre la planta pilot i la planta de tractament convencional de l'empresa on es va instal·lar la planta pilot. En cadascun dels estudis, per tal d'avaluar l'eficiència de la planta pilot en l'eliminació dels compostos orgànics contaminants de cadascuna de les aigües d'origen industrial, primerament es van determinar els paràmetres generals de l'aigua tant de les aigües d'entrada com de sortida de la planta pilot, com són la demanda química d'oxigen (DQO), els sòlids en suspensió (SS) o la conductivitat, entre d'altres. I, a continuació, per tal de determinar la presència a baixes concentracions de contaminants orgànics, es van aplicar diferents mètodes en els que es va emprar una tècnica de preconcentració seguida de la separació i detecció dels diferents compostos utilitzant la cromatografia de gasos acoblada a un espectròmetre de masses (GC-MS). En el primer treball es va fer una caracterització global de les aigües d'entrada i de sortida de la planta pilot utilitzant com a tècnica de preconcentració l'extracció en fase sòlida seqüencial (SSPE), mentre que en el segon treball ens varem plantejar determinar una família de compostos, en concret sis ftalats i un adipat ester, decisió motivada pel fet que aquests compostos són utilitzats en una gran varietat d'indústries químiques, principalment com a agents plastificants en plàstics, però també com a additius en pintures, pegues, lubricants, productes farmacèutics, cosmètics i pesticides, entre d'altres. Cal destacar que, donat que aquests compostos no estan units covalentment als productes, poden introduir-se al medi ambient i, com s'ha vist en alguns treballs, s'han trobat en aigües residuals i llocs activats de plantes de tractament convencionals urbanes i industrials. Degut a la toxicitat d'aquests compostos com a alteradors endocrins, s'ha de controlar la seva presència i eliminació en els efluent de les aigües residuals tractades. La tècnica de preconcentració utilitzada en aquest treball va ser la microextracció en fase sòlida (SPME). Per tal de confirmar els resultats que es varen obtenir de l'eliminació d'aquests compostos en les aigües residuals industrials, es va estudiar la presència

d'aquests compostos en els llots activats, tant de la planta pilot com en la planta de tractament convencional de l'empresa, utilitzant extraccions successives en un bany d'ultrasons i injectant l'extracte final al GC-MS.

En el segon bloc de treballs es plantejà la determinació individualitzada de dues famílies de compostos orgànics contaminants en diferents tipus de mostres aquoses. En concret, es van plantejar dos treballs: en el primer treball es va dur a terme la determinació d'una família de deu amines alifàtiques primàries en les aigües d'entrada i de sortida de tres plantes de tractament d'aigües residuals industrials, d'una planta de tractament d'aigües residuals urbanes, i d'una planta de tractament d'aigua potable. En el segon treball es van determinar les nou *N*-Nitrosamines de l'*U.S. Environmental Protection Agency* (USEPA), en aigua d'aixeta, aigües d'entrada i de sortida de dues plantes de tractament d'aigües residuals urbanes, en tres plantes de tractament d'aigües residuals industrials i en una planta de tractament d'aigua potable. Per tal de poder detectar la presència d'aquestes famílies de compostos a les baixes concentracions en les que estan presents en les mostres d'aigua analitzades, en cada cas es va desenvolupar un mètode analític en el que es va utilitzar com a tècnica de preconcentració la SPME seguida de la cromatografia de gasos acoblada a un espectròmetre de masses en tàndem (GC-MS-MS). El mètode analític desenvolupat en ambdós casos és totalment automàtic i és altament sensible, podent arribar a detectar els compostos a molt baixes concentracions. Cal comentar que, per tal de poder determinar les amines alifàtiques primàries, degut a les seves propietats químiques, prèviament a la seva determinació va ser necessari realitzar una derivatització *in situ*, és a dir, en la pròpia mostra i de manera simultània a l'extracció.

Finalment, en el tercer bloc, que consta de tres treballs, s'ha dut a terme la determinació de les dues famílies de compostos nitrogenats citades anteriorment, amines alifàtiques primàries i *N*-Nitrosamines, aquest cop en llots activats provinents de tres plantes de tractament d'aigües residuals comentades anteriorment. Concretament, en els dos primers treballs d'aquest tercer bloc es varen determinar les deu amines alifàtiques primàries, i en el tercer treball es varen determinar les nou USEPA *N*-Nitrosamines. Per tal d'extreure els compostos dels llots activats, en cada cas es va desenvolupar un mètode analític respectuós pel medi ambient, és a dir, que no utilitza dissolvents orgànics contaminants. La tècnica d'extracció que utilitza és l'extracció pressuritzada en estat subcrític (PHWE). A continuació, per preconcentrar els compostos es va emprar la SPME seguit de la separació i detecció mitjançant la GC-MS-MS. Cal destacar que els mètodes desenvolupats són innovadors, ja que a la recerca bibliogràfica que s'ha realitzat no s'ha trobat cap mètode analític per determinar els compostos que hem estudiat en llots activats utilitzant la PHWE. Com en el cas de la determinació d'aminas alifàtiques primàries en mostres aquoses, per caracteritzar els llots activats és

necessària una derivatització prèvia. En el primer treball s'ha dut a terme una derivatització *in situ* de les amines extretes dels llots, en canvi, en el segon treball s'ha presentat un mètode alternatiu a aquest, realitzant la derivatització *on-fiber*, és a dir, sobre la fibra de la SPME, i aquest fet ha permès obtenir un mètode analític més automatitzat i lleugerament més sensible que en el cas anterior, resultat que concorda amb l'observat per altres investigadors utilitzant altres compostos.

3.1. Tractament d'aigües residuals utilitzant bioreactors de membrana

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013

Tal i com s'ha comentat en el capítol anterior, els motius que han dut al desenvolupament d'aquesta Tesi Doctoral han estat, principalment, la preocupació a causa del gran impacte negatiu en el medi ambient que suposa l'abocament al medi aquàtic d'aigües residuals urbanes i industrials que contenen contaminants orgànics que no s'han eliminat completament en les plantes de tractament, i també la necessitat de reutilitzar els efluent de les plantes de tractament d'aigües residuals, ja que l'aigua és una font natural molt preuada i és una de les bases del desenvolupament econòmic i del benestar social dels països desenvolupats [1-3].

Darrerament s'estan desenvolupant noves tecnologies de tractament d'aigües per tal de poder eliminar els contaminants orgànics que no s'eliminen completament en les plantes de tractament convencionals, i una alternativa a considerar és la dels sistemes amb Bioreactors de Membrana (BRM) [4-6].

Els BRM són una modificació dels processos convencionals de tractament biològic on es realitza una substitució dels dipòsits de sedimentació secundaris per unes unitats de micro o ultrafiltració per membrana que s'acoblen al reactor de depuració biològica i que ofereixen grans avantatges en comparació amb els processos convencionals, com són, per exemple, la compactació del procés i l'obtenció d'un efluent lliure de sòlids en suspensió i contaminants associats, amb una qualitat superior que en els tractaments convencionals. A més a més, hi ha una major flexibilitat en la operació del procés biològic, ja que no depèn de les propietats de sedimentació dels llots activats [2,7,8].

Nombrosos estudis han publicat els avantatges d'utilitzar aquest tipus de procés de tractament que utilitza bioreactors de membrana per el tractament d'aigües residuals d'origen urbà [9-15]. Tanmateix, hi ha molt poca informació sobre el tractament d'aigües d'origen industrial utilitzant bioreactors de membrana [16]. Es va considerar doncs iniciar aquesta Tesi Doctoral amb la realització de l'estudi en el que es va instal·lar i posar en funcionament una planta pilot amb Bioreactor de Membranes per tractar aigües residuals industrials de diferents orígens. En el primer treball que es presenta, la planta amb BRM es va instal·lar en una indústria petroquímica de la zona del Camp de Tarragona. En aquest estudi es van utilitzar dos tipus diferents d'aigües a tractar: en primer lloc es va estudiar el tractament d'aigües de procés d'una planta d'olefines, caracteritzada per tenir una composició estable, una salinitat baixa, en la que s'hi poden trobar compostos com amines neutralitzants, trietilenglicol, àcid acètic, entre d'altres. En segon lloc, es va avaluar l'eficiència d'aquesta planta en el tractament de les aigües residuals totals, en la que la seva procedència és molt diversa: unitats de procés de refinament, plantes d'olefines, unitats d'energia i tractament d'aigües d'olefines, aigües de refrigeració que s'aboquen a través de l'aigua de procés i altres aigües de caràcter més esporàdic. Aquestes aigües residuals totals contenen sals amoniacals, sulfurs, hidrocarburs en

emulsió (parafines, naftalènics, aromàtics i algun cop olefínics), amines neutralitzants, trietilenglicol, àcid acètic i sals de sulfat sòdic, entre d'altres.

Per tal de controlar de forma global la depuració biològica de les aigües, es va decidir determinar els paràmetres generals de les aigües residuals d'entrada i de sortida de la planta pilot amb BRM. Els paràmetres generals de l'aigua que es van determinar van ser: el pH, la conductivitat, els sòlids en suspensió (SS), la demanda química d'oxigen (DQO), la demanda biològica d'oxigen (DBO₅) i el carboni orgànic total (TOC). També es va realitzar la determinació de la concentració de la biomassa en suspensió (MLSS) dels llots activats del bioreactor de membranes per tal de mantenir-la a una concentració entre 10 i 12 g/l.

Paral·lelament, per tal de determinar els compostos contaminants en les aigües d'entrada i de sortida de la planta BRM i caracteritzar així les aigües, es va proposar aplicar un mètode cromatogràfic en el que es va emprar l'extracció en fase sòlida seqüencial (SSPE) com a tècnica de preconcentració, obtenint de cada mostra quatre fraccions de diferent polaritat, que posteriorment es van analitzar per GC-MS. Finalment es varen comparar els perfils cromatogràfics de les diferents fraccions de les aigües d'entrada amb les corresponents de sortida, per controlar l'eliminació dels contaminants.

Un cop realitzat el primer treball, a continuació es va ubicar la planta pilot amb BRM en una indústria del Polígon Sud del Camp de Tarragona, concretament en una indústria que es dedica a la fabricació de tensioactius aniònics i no iònics i activadors del blanqueig, entre d'altres productes. Aquesta indústria té una planta pròpia de tractament convencional que tracta les seves pròpies aigües residuals i les aigües residuals de tres indústries de la vora. Per tant, la composició de les aigües a tractar és una mescla de les aigües residuals de les quatre indústries químiques diferents, i és diferent a les aigües residuals de la indústria petroquímica del cas anterior. Els objectius d'aquest treball van ser: d'una banda, comparar l'eficiència en la depuració de les aigües de la planta pilot amb BRM que varem instal·lar a l'empresa, amb la de la planta de tractament convencional pròpia de la indústria. I d'altra banda, dur a terme una caracterització de les aigües d'entrada i de sortida tant de la planta pilot amb BRM com de la planta convencional, a més a més de determinar la presència en aquest tipus d'aigües d'una família de compostos, ftalats i un adipat ester.

Primerament, per tal d'avaluar l'eficiència en la depuració de les aigües en ambdues plantes de tractament, es varen realitzar les anàlisis de les aigües d'entrada i de sortida de la planta amb BRM, i també de les aigües de sortida de la planta de tractament convencional d'aquesta indústria. Els paràmetres de l'aigua que es van analitzar són alguns d'ells similars als de l'estudi anterior: la DQO, els SS, la terbolesa, el pH, la conductivitat, el nitrogen total i el fòsfor total, com a indicadors

de control de la depuració. Pel control del procés, en ambdós processos (BRM i convencional) es va determinar en els llots generats la concentració de la biomassa en suspensió (MLSS), així com també es va observar al microscopi els microorganismes continguts en aquests llots activats.

A continuació es va realitzar la caracterització de les aigües residuals industrials d'entrada i de sortida del BRM i de la planta convencional, utilitzant un mètode cromatogràfic emprant la microextracció en fase sòlida com a tècnica de preconcentració (SPME) seguida de GC-MS. En aquest cas, a més a més, es va determinar una família de ftalats i un adipat: dimetil ftalat, dietil ftalat, di-n-butil ftalat, butil benzil ftalat, bis(2-etilhexil) ftalat, di-n-octil ftalat i bis(2-etilhexil) adipat ester. Aquests compostos són utilitzats en molts tipus d'indústries, principalment con a agents plastificants en plàstics i també com a additius en pintures, pegues, lubricants, productes farmacèutics, cosmètics i pesticides. Aquest estudi ha donat lloc a l'elaboració del segon treball que es presenta en aquesta secció.

Els treballs que s'adjunten a continuació inclouen els resultats obtinguts en aquests estudis. El primer treball ha estat publicat a la revista *Water, Air and Soil Pollution* (2009) 197:349–359, i el segon treball s'ha publicat a la revista *Water Sci & Technol* (2009) 60(9):2425-2437.

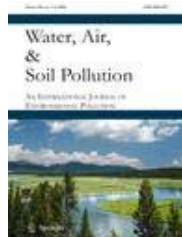
Bibliografia

- [1] S. Aguayo, M.J. Muñoz, A. De la Torre, J. Roset, E. De la Peña, M. Carballo, *Sci. Total Environ.* 328 (2004) 69.
- [2] M. Cirja, P. Ivashechkin, A. Schäffer, P.F.X. Corvini, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 7 (2008) 61.
- [3] S. Navalon, M. Alvaro, H. García, *Environ. Tehnol.* 32(3) (2011) 295.
- [4] B. Fan, X. Huang, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 5245.
- [5] M. Clara, B. Strenn, O. Gans, E. Martinez, N. Kreuzinger, H. Kroiss, *Water Res.* 39 (2005) 4797.
- [6] H. Bouju, G. Buttiglieri, F. Malpei, *Desalination* 224 (2008) 1.
- [7] G. T. Daigger, S. Adham, G. Andreottola, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 399A.
- [8] H. Y. Ng, S. W. Hermanowicz, *Water Res.* 39 (2005) 981.
- [9] S.K. Marttinen, R.H. Kettunen, K.M. Sormunen, J.A. Rintala, *Water Res.* 37 (2003) 1385.
- [10] J. B. Quintana, S. Weiss, T. Reemtsma, *Water Res.* 39 (2005) 2654.
- [11] M. Bernhard, J. Müller, T. P. Knepper, *Water Res.* 40 (2006) 3419.

- [12] M. Bodzek, M. Dudziak, *Desalination* 198 (2006) 24.
- [13] T. Melin, B. Jefferson, D. Bixio, C. Thoeye, W. De Wilde, J. De Koning, J. Van der Graaf, T. Wintgens, *Desalination* 187 (2006) 271.
- [14] J. Radjenovic, M. Petrovic, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2006) 1365.
- [15] S. González, M. Petrovic, D. Barceló, *J. Hydrol.* 356 (2008) 46.
- [16] T. Reemtsma, B. Zywicki, M. Stueber, A. Kloepfer, M. Jekel, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 1102.

**3.1.1. Evaluation of the removal of pollutants
from petrochemical wastewater using a
membrane bioreactor treatment plant**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013



EVALUATION OF THE REMOVAL OF POLLUTANTS FROM PETROCHEMICAL WASTEWATER USING A MEMBRANE BIOREACTOR TREATMENT PLANT

Anna Llop, Eva Pocerull and Francesc Borrull

Departament de Química Analítica i Química Orgànica. Universitat Rovira i Virgili
Marcel·lí Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain

Abstract

A submerged membrane bioreactor (MBR) was used to treat two types of petrochemical wastewater: olefin process wastewater and total petrochemical wastewater. Various operational MBR conditions, such as influent pH and hydraulic retention time (HRT), were tested while these wastewaters were treated. The MBR treatment of olefin process wastewater reduced chemical oxygen demand (COD) and total organic carbon (TOC) by around 90% in both cases, and more than 90% of the suspended solids (SS) were removed. When MBR was used, the reduction in COD and TOC was also high for the total petrochemical wastewater, and was compared with the reduction obtained when the conventional activated sludge treatment plant was used (CASP). However, MBR effluent wastewaters showed high conductivity so for some reuse purposes subsequent reverse osmosis (RO) treatment would be needed. We characterized the MBR influent and MBR effluent wastewaters using a sequential solid phase extraction (SSPE) followed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analyses. The main compounds that were tentatively identified were hydrocarbons, alkyl benzenes, phenols, acidic acids and esters, almost all of which could be partially or completely removed by MBR treatment.

Keywords: *membrane bioreactor, industrial reuse, petrochemical wastewater, wastewater treatment, GC-MS, organic pollutants*

INTRODUCTION

For several years now, the membrane bioreactor (MBR), which couples a microfiltration (MF) or an ultrafiltration (UF) membrane with a bioreactor, has received a great deal of attention in wastewater treatment and reclamation (Brindle *et al.*, 1996; Fan *et al.*, 2002).

An MBR consists of a biological suspended growth reactor coupled to a membrane, which acts as a separation device. It prevents certain particles from passing through and thus solves some of the problems generally associated with traditional activated sludge processes (Buttiglieri *et al.*, 2005). The MBR operates in a similar way to a conventional activated sludge process but does not require secondary clarification or tertiary steps such as sand filtration.

The two main MBR configurations involve either submerged membranes or external circulation (side-stream configuration). The submerged MBR is the configuration that is most often applied in municipal wastewater treatment (Melin *et al.*, 2006).

Because it has many advantages over conventional activated sludge systems, MBR has been considered as one of the most promising processes for wastewater treatment (Brindle *et al.*, 1996; Fan *et al.*, 2002; Ng *et al.*, 2005; Daigger *et al.*, 2005; Le-Clech *et al.*, 2006).

In conventional activated sludge plants (CASP) the aeration tank and the final clarifier form one process unit. Treated wastewater and sludge are separated in the clarifier via sedimentation. Therefore, the ability to sediment is an important selection criterion. The biomass concentration in the mixed liquor is limited by the capacity of the clarifier. In MBRs this parameter is of minor importance, as separation is done via membrane filtration. Thus, the plant can be operated at higher biomass concentrations (10–50 g·L⁻¹) which leads to smaller plant sizes and less sludge production. The most important advantage of MBRs is that they completely retain suspended solids, so they produce superior effluent quality in terms of suspended solids, turbidity, bacteria and viruses. Compared to conventional activated sludge systems, the main disadvantages of MBR technology are that it is relatively expensive to install and operate. Likewise, soluble and particulate materials are deposited on and in the membrane (fouling) which means that expensive maintenance is also required. Research has been done to reduce the effect of this major drawback and process limitation (Le-Clech *et al.*, 2006).

Both municipal and industrial wastewaters can be treated in this kind of reactor (Brindle *et al.*, 1996; Reemtsma *et al.*, 2002; Clara *et al.*, 2005) and several studies have reported the advantages of using the MBR process to treat urban

wastewater (Quintana *et al.*, 2005; Bernhard *et al.*, 2006; Melin *et al.*, 2006; González *et al.*, 2006; Göbel *et al.*, 2007; Radjenovic *et al.*, 2007). However, there is a little information on the efficiency of this process for treating industrial wastewater, and even less on petrochemical wastewater (Qin *et al.*, 2007).

The process-intensive petrochemical industry has been facing environmental management challenges to protect water, soil and atmosphere from refinery pollution. Petroleum refineries use relatively large volumes of water, especially for cooling systems. In fact, wastewater from the petrochemical industry usually contains such hazardous chemicals as hydrocarbons and phenols (Scholz *et al.*, 2000; Barrios-Martinez *et al.*, 2006).

The aim of this study was to investigate how efficient an MBR pilot plant was at removing pollutants from two types of petrochemical wastewaters: olefin process wastewater and total wastewater. We tested performance under several conditions, but always controlled the general water parameters, such as pH, conductivity, chemical oxygen demand (COD), total organic carbon (TOC), suspended solids (SS) and mixed liquor suspended solids (MLSS). Another aim of this study was to compare the treatment of total petrochemical wastewater by the industry's CASP process and the MBR process. We also evaluated the

possibility of water reuse in industrial processes.

Finally, we characterized the two types of petrochemical wastewaters and investigated the removal of particular compounds during the MBR process by a sequential solid phase extraction (SSPE) followed by GC-MS.

EXPERIMENTAL

MBR pilot plant

The membrane bioreactor (MBR) was equipped with three submerged A4 Kubota membranes, which were made of chlorinated polyethylene and had a total surface of 0.3 m² and a mesh width of 0.4 µm. For the start-up, the MBR was filled with 21 L of activated sludge from the petrochemical wastewater treatment plant. The initial MLSS (mixed liquor suspended solids) concentration in the bioreactor was 9 g·L⁻¹ and this was maintained between 9 and 12 g·L⁻¹ throughout the study. The reactor was fed with olefin process wastewater stored in a 1000 L tank that was refilled every two weeks with this type of water during the first study and with total petrochemical wastewater during the second. A low effluent flow was selected to allow the slow acclimatization of the biomass in the membrane bioreactor. The MBR was operated under aerobic conditions (oxygen concentration in the tank: 1-2 mg·L⁻¹). In order to minimize cake formation on the membrane surface, the membranes

operated intermittently (filtering for 9 min followed by a 1 min rest in which no permeate was obtained). In the first conditions tested, the effluent flow was $2 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ whereas in the second part it was increased to $5 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$. The HRT (hydraulic retention time) was 12.5 and 5 h, respectively. An antifoaming (Antiescum DB-79, Derypol, Barcelona, Spain) was needed to prevent foam from forming in the bioreactor.

Feedwater characteristics

Two different types of petrochemical feedwater were used to evaluate the efficiency of the MBR: olefin process wastewater and total petrochemical wastewater. The characteristics of the first type of wastewater were low salinity, maximum total organic carbon (TOC) of $850 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and pH 9, whereas the characteristics of the second type were a high content of hydrocarbons, TOC between 250 and $450 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and pH 10.

The pollutants we expected to find in the olefin process wastewater were compounds derived from the steam cracking process, such as hydrocarbons and phenols. The total petrochemical wastewater came from various sources such as the refinery process plant, the olefin process plant, refrigeration, energy unities, and other sporadic wastewaters.

Sampling

Two liters of water were taken in duplicate from the reactor influent and effluent twice a week in glass bottles. One duplicate sample was used to determine general parameters and the other to determine organic pollutants. The samples of the general parameters were analyzed immediately in the laboratory. The samples of the pollutants were filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ nylon filter (Whatman, Maidstone, UK), stored at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ and analysed within a week. A reactor-mixed liquor sample was taken once a week to determine the MLSS concentration in the MBR bioreactor.

It should be noted that in this study the influent samples were obtained from the 1 mm filtered water that was ready to enter the bioreactor of the pilot plant. If we had taken the influent sample from the storage tank, the SS related to this sample and the removal of the SS would have been higher.

Analytical methods

General Parameters

General parameters analyzed in feedwater and permeate water of MBR included: pH, conductivity, SS, COD, biological oxygen demand (BOD5) and TOC. pH and conductivity were determined by conventional methods using a Metrohm pH-meter 826 and a 712

conductimeter (Herisau, Switzerland). The SS was determined by gravimetry. The sample was filtered through a 1.2 µm glass fibre filter 47 mm in diameter (UNE-EN 872 1996) and the COD of this filtered sample was determined using reactive agents and photometric cuvette tests (Dr. Lange, Germany), an HT-200S thermostat and a LASA 50 photometer (Dr. Lange). BOD₅ was determined by respirometry using a sensomat-BSB/BOD system (Aqualytic GmbH & Co., Dortmund, Germany), incubation bottles and an IR sensor. TOC was measured using a TOC analyzer (Shimadzu Corp., Japan) model 5000A (SM 5310B).

MLSS concentration of the bioreactor was determined by gravimetry using a 15 cm diameter filter without ashes (UNE-EN 872).

Pollutants

The analytical method used to determine particular compounds in the MBR influent and effluent wastewater involved a sequential solid-phase extraction (SSPE) for pollutant preconcentration and fractionation, followed by a GC-MS determination to allow the sample extracts to be characterized.

The SSPE procedure was chosen because of the complexity of the petrochemical wastewaters. This approach uses several sorbents in series and differential elution so that the compounds in different sample

fractions can be extracted depending on the polarity of the organic content. This procedure was based on Castillo *et al.* (1999) and was applied to the preconcentration of petrochemical wastewater samples.

Two different sorbents were used: a C18 phase (500 mg, 3 ml) (J.T. Baker, Phillisburg, NJ, USA) in series with a styrene-divinylbenzene sorbent Lichrolut EN (200 mg, 6 ml) (Merck, Darmstadt, Germany). Before each use the cartridges were conditioned by passing 7 ml of MeOH (SdS, Peypin, France) and 3 ml of Milli-Q water (Millipore, Bedford, MA, USA) through them. They were then allowed to dry for 10 min under vacuum, using a manifold (Teknokroma, Madrid, Spain) and a pump as a vacuum source.

We applied 250 ml of influent and effluent filtered samples (0.45 µm) to the preconditioned C18 cartridge, and eluted the retained compounds using consecutively different solvents in order to obtain three extracts containing contaminants with different polarities. These were:

- Fraction A - 2 x 5 ml of n-hexane (Merck) which we obtained after waiting five minutes between the two aliquots to allow sufficient contact time between the solvent and the trapped analytes
- Fraction B - 2 x 5 ml of dichloromethane (SdS) - n-hexane (4:1)

- Fraction C - methanol-dichloromethane (9:1)

A solution containing polar compounds, which were not retained in the C18 cartridge, was acidified to pH 3.5 with acetic acid (SdS) and loaded into the Lichrolut EN cartridge. The elution was done by adding 2 x 5 ml of methanol to obtain fraction D.

The extracts were totally evaporated with a stream of nitrogen of 99.995% purity (Carbueros Metálicos, Barcelona, Spain). The extracts were reconstituted with the same solvent to a final volume of 2 ml prior to analysis. In order to estimate the reduction of the organic pollutants, we added 30 µl from a 2 g·L⁻¹ solution of the internal standard prepared in n-hexane, d10-acenaphthene (Sigma-Aldrich, Steinheim, Switzerland). We injected 2 µl of the resulting solution into the gas chromatograph.

The GC-MS system used was an Agilent HP-6890 chromatograph connected directly to a 5973 inert mass spectrometer (Agilent Technologies, EUA). The GC capillary column was an HP-5MS (30 m x 0.25 mm i.d. with 0.25 µm film thickness). The analyses were done in splitless mode; detector and inlet temperature were 290 °C and 250 °C, respectively, and the carrier gas was helium (99.995% quality, Carbueros Metálicos) at a flow rate of 1.7 ml/min. The temperature program applied to the GC oven was: from 40 °C to 290 °C at 8 °C·min⁻¹, it was then

held at 290 °C for 10 min and returned to initial conditions for 10 min. The MS detector was operated in electron ionization (EI) mode (70 eV, 200 µA), using full-scan mode (m/z 50-400). The solvent delay was set at 4.5 min.

RESULTS AND DISCUSSION

MBR start-up

We used wastewater from the olefin process for the start-up of the membrane bioreactor treatment pilot plant. The typical pH value of the olefin process wastewater was 9, but it was acidified with HNO₃ to pH 6 in the storage tank because the supplier recommended having an appropriate medium for the membranes and microorganisms. The activated sludge concentration (MLSS) was 9 g·L⁻¹ and the effluent flow was 2 L·h⁻¹. The microorganisms in the MBR bioreactor took two weeks to acclimatize sufficiently, with oxygen being constantly supplied. In order to reach the optimum medium conditions for the activated sludge, every week 162 g of urea and 85 g of KH₂PO₄ were added directly to the bioreactor as nutrients. The ideal quantities in the bioreactor were calculated to be the following: 100 parts of carbon (in terms of influent wastewater DBO₅), 5 parts of nitrogen and 1 part of phosphorous. Greater foam formation was observed during the biological treatment and 2.5 ml of an antifoaming substance was added twice a week to prevent this. MBR

kept working under these initial conditions for six weeks.

General quality parameters

In order to check the treatment efficiency of the MBR, we determined the general quality parameters of MBR influent and effluent. These parameters included: TOC and COD, which reflect the total organic charge of waters before and after treatment; SS, which shows the organic matter contained in influent and effluent wastewaters; and conductivity, which is related to the total dissolved ions in the samples.

Several MBR operation conditions were tested to improve the efficiency of the treatment. Firstly, the pH of the olefin process wastewater was modified from 6 (previously acidified) to 9 (without any acidification) to find out which is better for the growth of specialised microorganisms. Secondly, the HRT was decreased from 12.5 to 5 h and less time was allowed for the biological depuration. This shorter depuration may lead to incomplete water treatment.

The second study used total petrochemical wastewater, without any pH acidification (pH 9). At first the HRT was 2.5 h but after some weeks it was changed to 5 h. No changes in pH were made because the treatment efficiency in olefin process wastewater was high without any wastewater acidification.

The TOC values obtained for influent and effluent MBR (bars) and the TOC reduction line are shown in Figure 1. During the study, the TOC removal of olefin process wastewater increased (Figure 1a) from 70 to 90%. The shape of the TOC reduction curve suggests that this is because of the acclimatization of the microorganisms rather than the effect of the influent's pH on the biological treatment. At pH 9 conditions were stable and the MBR was quite efficient at treating wastewater. We tested two different effluent flows (2 and 5 L·h⁻¹) and found no significant differences in TOC reductions, which was around 90%. As we had expected, COD removal was also good (around 90%) at optimum acclimatization conditions, because of the relationship between these two parameters. Total petrochemical wastewater had a lower organic load and lower TOC concentration than olefin process wastewater (Figure 1b), due to the dilution effect when different sources of residual water are mixed. We observed a high percentage (around 92%) in TOC reduction in the MBR treatment at the two MBR effluent flows. The corresponding COD reduction was approximately 84%. The results obtained with the total petrochemical wastewater using the MBR treatment were compared with the industry's conventional activated sludge treatment, which gave TOC and COD removals of 92% and 83%. It seems that both processes are quite similar in their biological treatment of total petrochemical wastewater, and

that MBR is a suitable and advantageous system for treating these types of wastewater.

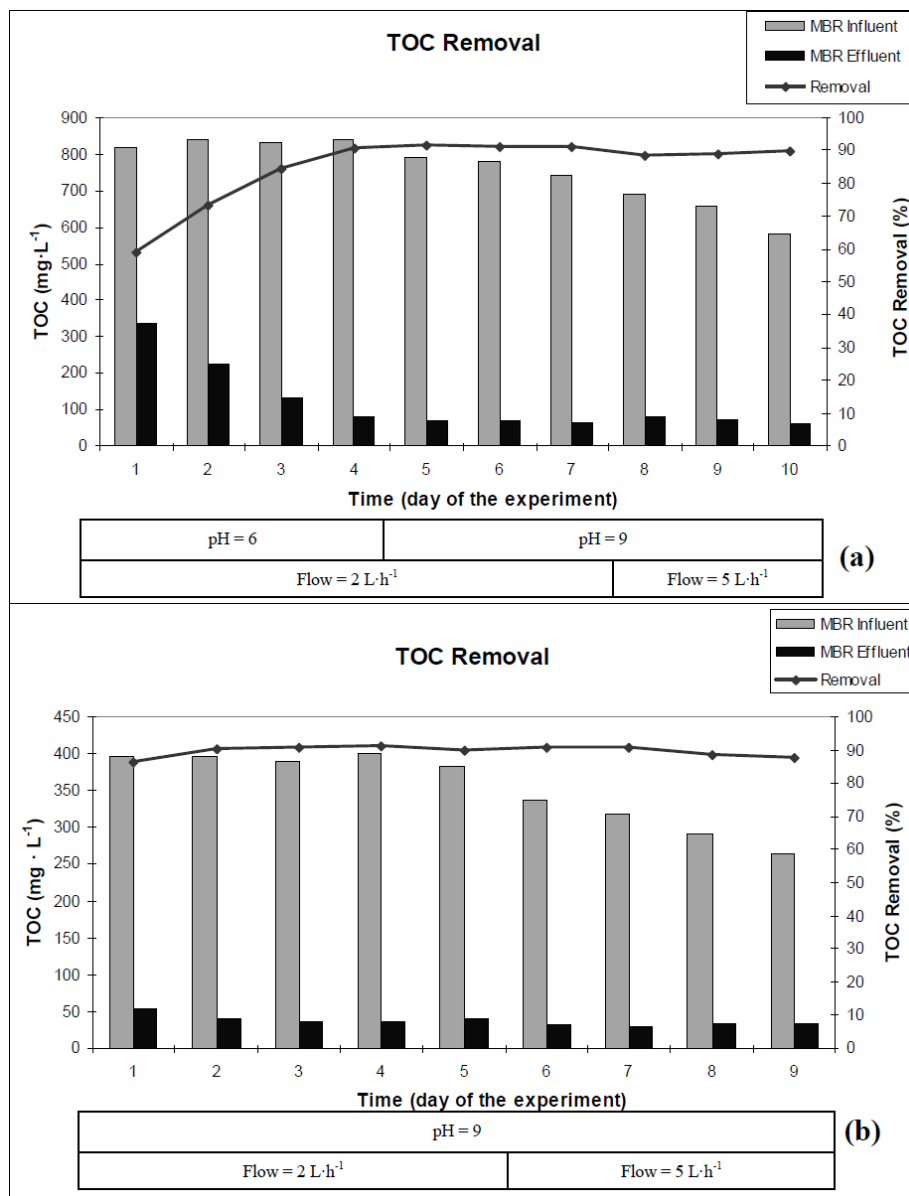


Figure 1. TOC concentrations in the MBR influent and effluent (*bars*) and TOC removals (*lines*) for **a** olefin process wastewater and **b** total petrochemical wastewater. pH and flow conditions are shown at the bottom of the x-axis.

Figure 2 shows the SS values of MBR influent, MBR effluent and the SS reduction line. SS varied greatly in olefin process wastewater (from 5 to 40 mg·L⁻¹) and reduced by around 92% (Figure 2a). SS values in total petrochemical wastewater ranged from 30 to 110 mg·L⁻¹, and SS reduced by around 98% (Figure 2b). As we have said before, if we had taken influent samples from the storage tank, SS from influent samples and their removal would have been even higher. The results showed the advantages of MBR in SS reduction. The different operating conditions, the influent pH and the effluent flow, did not affect SS reduction because these parameters only modify the biological treatment conditions and not the filtration step. The averaged conductivity of the olefin process wastewater was around 930 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ and 1100 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ for the MBR influent and MBR effluent respectively, whereas for total petrochemical wastewater it was even higher, 1650 and 2185 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ for MBR influent and MBR effluent respectively. As expected, microfiltration membranes are not able to reduce the inorganic ions contained in this type of wastewater because they are too small, whereas larger organic ions cannot pass through membrane meshes.

In terms of wastewater reuse, the quality of the treated wastewater in

the two types of petrochemical wastewater was very good because organic matter (COD and TOC) had been reduced and the SS had been removed. However, the treated wastewater showed a high conductivity because of the dissolved ions. It has been generally accepted that treated industrial wastewater with conductivity below 100-300 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ can be reused (Lee *et al.*, 2005), although these values depend on what the water is to be reused for. In this case, to further reduce conductivity in this type of water, reverse osmosis membrane (RO) treatment should be applied subsequently. RO membranes depend more on influent wastewater than microfiltration membranes, and they also require more cleaning maintenance. For this reason treatment with RO membranes alone is not advisable.

Pollutants

In order to check the treatment efficiency of the MBR, we determined the general quality parameters of MBR influent and effluent. These parameters included: TOC and COD, which reflect the total organic charge of waters before and after treatment; SS, which shows the organic matter contained in influent and effluent wastewaters; and conductivity, which is related to the total dissolved ions in the samples.

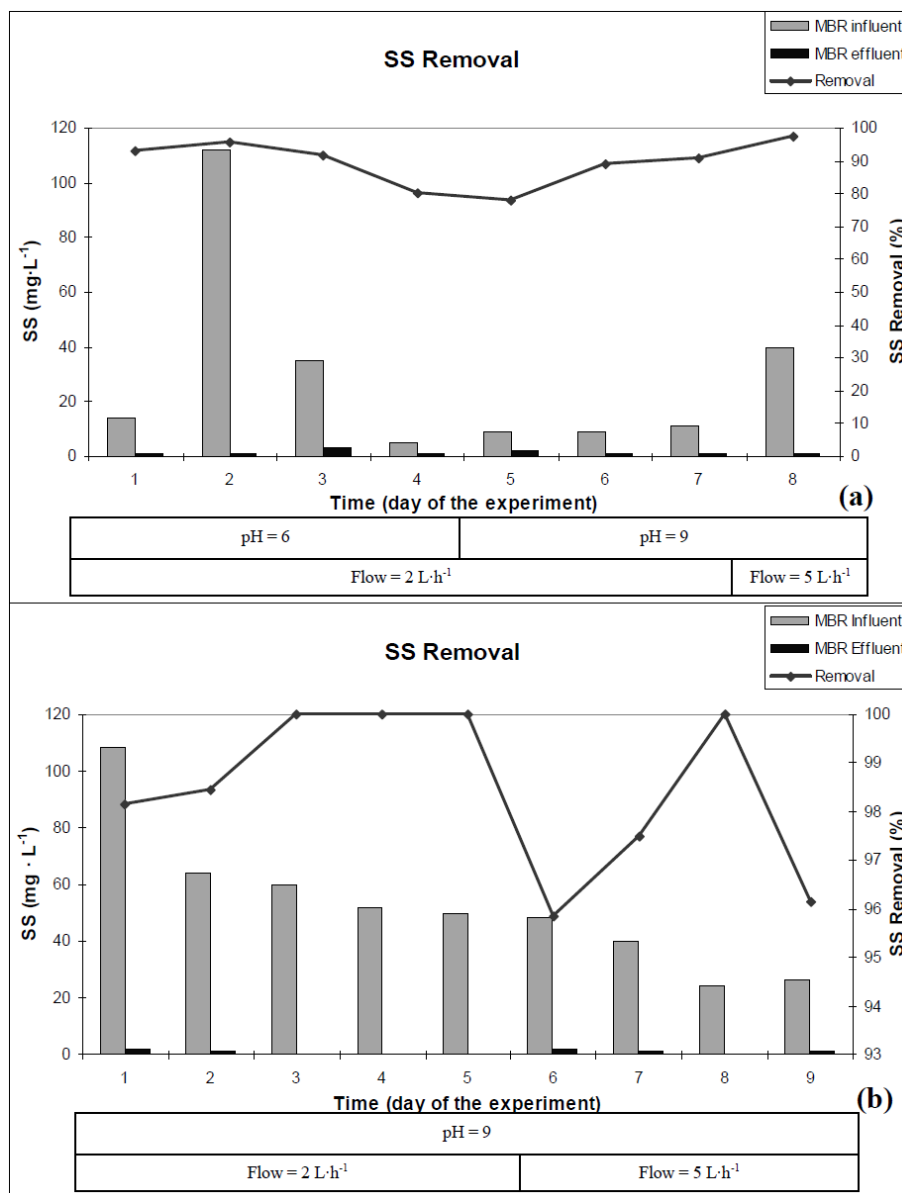


Figure 2. SS concentration in the MBR influent and effluent (*bars*) and SS removals (*lines*) for **a** olefin process wastewater and **b** total petrochemical wastewater. pH and flow conditions are shown at the bottom of the x-axis.

The chromatograms obtained for the MBR influent and MBR effluent olefin process wastewaters show the partial or complete removal of the majority of compounds in all the fractions. Similar profiles of chromatograms were obtained on different days for the same fraction.

For instance, the chromatograms for fractions A, B, C and D in the olefin process wastewater sample (Figure 3) show non-inverted and inverted chromatograms corresponding to the MBR influent and MBR effluent samples respectively. Fraction A (Figure 3a) contains the most apolar compounds and shows almost complete pollutant reduction. Fraction B (Figure 3b) contains fewer apolar compounds than fraction A and also shows very efficient pollutant

reduction in the MBR influent. Fraction C shows almost complete pollutant removal (Figure 3c). Although some compounds appeared in the MBR effluent of fraction D (Figure 3d), pollutants were also effectively reduced. However, the MBR treatment was least effective in fraction D compared with the other three fractions, probably because fraction D has the smallest apolar fraction and MBR treatment is more effective at removing apolar compounds. Similar chromatograms were obtained for total petrochemical wastewater, and we observed an almost complete reduction in compounds, which was independent of the fraction and its polarity. This showed that the MBR treatment was extremely efficient at removing organic pollutants.

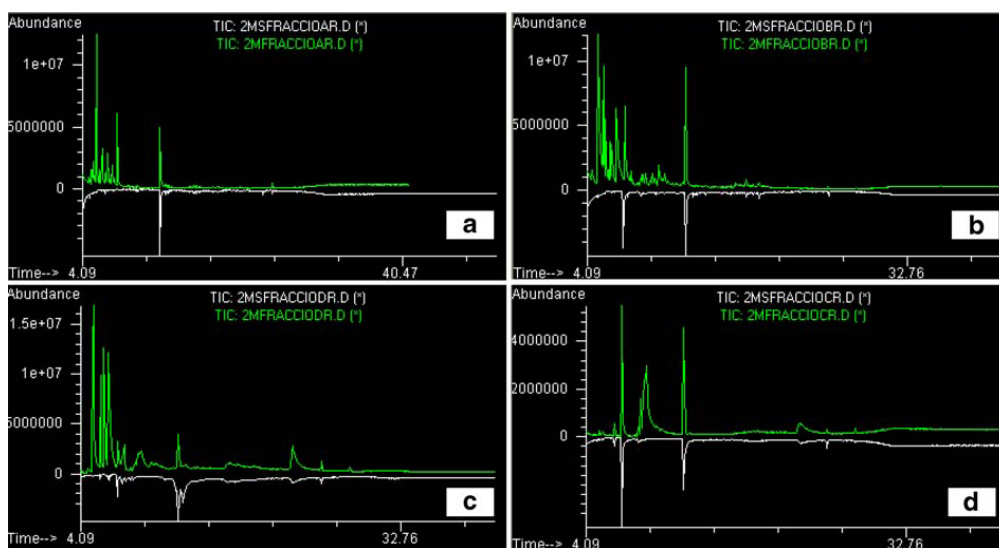


Figure 3. MBR influent (*non-inverted*) and MBR effluent (*inverted*) chromatograms obtained in SSPE/GC-MS analysis of fractions A(a), B (b), C (c) and D (d) of olefin process wastewater.

The profile of the chromatograms showed fewer compounds than in the olefin process wastewater chromatograms, mainly because the dilutive effect of mixing different sources of wastewater meant that the organic load was lower. In both cases the MBR treatment was effective.

On the basis of the similarity between mass spectra (mass fragments and their abundance), we identified compounds and calculated the

probability percentage using the Wiley mass spectrometer library's Match Factor to find out which types of compound were present in both types of wastewater and how much these compounds had been reduced through MBR treatment (Li *et al.*, 2000; Kosjek *et al.*, 2007). We divided this group of compounds into present and probable compounds, with a probability percentage of 91-100% and 80-90% respectively. Tables 1 and 2 show the present and probable

Table 1. Present and probable compounds identified in the olefin process wastewater analysis by SSPE/GC-MS (n = 6) and totally reduced in the MBR treatment.

Present Compounds	Probable Compounds
1- Octanol	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis (2-methylpropyl) ester *
1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester *	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl-8-methylnonyl ester *
1,2-Benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester *	1-Hexanol-2-ethyl *
1,8-Diaza-2,9-Diketocyclotetradecane *	1H-Indene *
1-Hexadecene	1H-Indene, 2,3-dihydro-5-methyl
1H-Indene, 1-methyl	1-Nonadecene
1-Octadecene	2,3-dihydro-1-methylindene
Azulene	2,5,8,10,14-Pentaoxapentadecane
Benzene, (1-methyl-2-cyclopropen-1-yl)	Acetic acid, phenyl ester
Benzene, 1,2,3,4-tetramethyl-	Benzene, 1,4-diethyl-
Benzene, 1,2,3,5-tetramethyl-	Benzenemethamine, N,N-dimethyl-
Benzene, 1,2,4,5-tetramethyl	Docosane, 11-decyl-
Benzene, 1,2,4-trimethyl	Heptacosane
Benzene, 1,3,5-trimethyl	Heptadecane
Benzene, 1-ethenyl-2-methyl-	Hexatriacontane
Benzene, 1-ethyl-3,5-dimethyl-	Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)
Benzene, 1-propynyl *	Phenol, 2,6-bis (1,1-dimethylethyl)
Benzene, 2-ethyl-1,3-dimethyl-	Tricosane
Benzene, 2-ethyl-1,4-dimethyl-	
Benzene, 4-ethenyl-1,2-dimethyl	
Benzene, ethyl- 1,2,4-trimethyl	
Benzenemethanol	
Benzenemethanol, 2-methyl	
Cyclohexadecane	

* Compounds only partially reduced during the MBR treatment

Table 1. (continuation)

Present Compounds	Probable Compounds
Eicosane	
Ethanone, 1-(2-methylphenyl) *	
Ethanone, 1-(3-methylphenyl) *	
Ethanone, 1-(4-methylphenyl) *	
Ethanone, 1-phenyl	
Hexadecane	
Hexadecanoic acid	
Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl) ethyl ester *	
Hexanedioic acid, bis(1,1-methylethyl) ester	
Naphthalene	
Naphthalene, 1-methyl	
Naphthalene, 2-methyl	
Phenol	
Phenol, 2,6-bis (1,1-dimethylethyl)-4-methyl *	
Phenol, 2-methyl	
Phenol, 3-methyl	
Phenol, 4-methyl	
Pyridine, 2,5-dimethyl	
Pyridine, 3,4-dimethyl	
Pyridine, 3,5-dimethyl	
Pyridine, 5-ethyl-2-methyl	
Tetradecane *	
Tetradecanoic acid	
Tetratetracontane	
Undecane *	

* Compounds only partially reduced during the MBR treatment

compounds and their averaged reduction through MBR treatment for olefin process and total petrochemical wastewater respectively. The partially reduced compounds during the MBR treatment are marked with an asterisk

in both tables. The compounds identified in these types of petrochemical wastewater were mainly hydrocarbons, phenols, alkyl benzenes, esters and pyridine derivatives. Some of the identified

compounds in fraction A were alkyl benzenes and some of them were totally eliminated; in fraction B, some esters and hydrocarbons were identified and reduced; in fraction C some hydrocarbons were totally or partially reduced; and in fraction D

mainly phenol derivatives were identified. As can be seen, almost all the compounds identified with the Wiley library were totally removed from the effluent by the MBR treatment.

Table 2. Present and probable compounds identified in the total petrochemical wastewater analysis by SSPE/GC-MS (n = 9) and totally reduced in the MBR treatment.

Present Compounds	Probable Compounds
1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis (2-ethylhexyl) ester *	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl cyclohexyl ester
1,8-Diaza-2,9-Diketocyclotetradecane *	1H-Indene, 2,3-dihydro-2-methyl
1H-Indene, 1-methyl	1H-Indene, 2,3-dihydro-5-methyl
Azulene	7-methoxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzothiopyran
Benzene, 1,2,3,4-tetramethyl	Benzene, (1-methyl-1-propenyl)
Benzene, 1,2,3,5-tetramethyl	Decane, 2,3,6-trimethyl
Benzene, 1-ethyl-2,3-dimethyl	Docosane
Benzene, 1-ethyl-3,5-dimethyl	Docosane, 11-decyl
Benzene, 2-butene	Hentriacontane
Benzene, 2-ethyl-1,3-dimethyl	Heptacosane
Benzene, 2-ethyl-1,4-dimethyl	Hexadecane
Eicosane	Hexadecanoic acid
Ethanol, 1(2-butoxyethoxy)	Hexatriacontane
Ethanol, 2(2-butoxyethoxy)	Nonahexadecanoic acid
Heneicosane	Pentadecane
Heptadecane	Phenol
Hexadecanoic acid, dioctyl ester	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)
Lycopersen *	Phenol, 2,5-bis(1,1-dimethylethyl)
Naphthalene	Tetratetracontane
Nonadecane	
Octadecane	
Octadecane, 3-methyl	
Octadecanoic acid, methyl ester	
Octane, 2,4,6-trimethyl	
Pentacosane	
Phenol, 2,4-dimethyl	
Phenol, 2-methyl	
Phenol, 3,4-dimethyl	
Phenol, 3,5-dimethyl	

* Compounds only partially reduced during the MBR treatment

Table 2. (continuation)

Present Compounds	Probable Compounds
Phenol, 3-methyl	
Phenol, 4-methyl	
Tetradecane	
Triacotane	
Urea, N, N'-dicyclohexyl *	

* Compounds only partially reduced during the MBR treatment

CONCLUSIONS

This study looks at the effectiveness of a membrane bioreactor at treating two different types of petrochemical wastewater: olefin process wastewater and total petrochemical wastewater. The membrane bioreactor used activated sludge which had been acclimatization.

The MBR system was very efficient in removing pollutants. The reduction values of the olefin process wastewater at an HRT of 5 and 12.5 h for TOC and COD were around 90%, and the SS removal was 92%. No significant changes were observed in the two different HRTs tested. Similar results in the COD and TOC reductions, 92% and 83% respectively, were obtained when the total petrochemical wastewater was treated using the conventional activated sludge treatment. However, MBR treatment is more suitable and advantageous than CAST for treating these petrochemical wastewaters. Although the COD, TOC and SS

results from the wastewater treatment were good, conductivity was not reduced, and to solve this problem so that the wastewater can be reused, subsequent treatment with RO membranes would probably be needed, depending on what the water is going to be reused for.

Most of the compounds identified (i.e. some hydrocarbons, benzene, phenol and ester derivatives) were partially or completely removed from the wastewater during the MBR treatment.

Acknowledgements

The authors would like to thank the *Direcció General de Investigació* of the Ministry of Science and Technology (CTM 2004-06265-C03-02 and CTM 2005-01774), the *Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca* of the *Generalitat de Catalunya* for A. Llop's predoctoral grant (2007 FI00026), and the Petrochemical Industry for allowing us to do this study.

REFERENCES

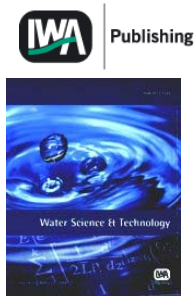
- Barrios-Martinez, A., Barbot, E., Marrot, B., Moulin, P., & Roche, N. (2006). Degradation of synthetic phenol-containing wastewaters by MBR. *Journal of Membrane Science*, 281, 288-296.
- Bernhard, M., Müller, J., & Knepper, T.P. (2006). Biodegradation of persistent polar pollutants in wastewaters: Comparison of an optimised lab-scale membrane bioreactor and activated sludge treatment. *Water Research*, 40, 3419-3428.
- Brindle, K. & Stephenson, T. (1996). The application of membrane biological reactors for the treatment of wastewaters. *Biotechnology and Bioengineering*, 49, 601-610.
- Buttiglieri, G., Malpei, F., Daverio, E., Melchiori, M., Nieman, H. & Lighthart, J. (2005). Denitrification of drinking water sources by advanced biological treatment using a membrane bioreactor. *Desalination*, 178, 211-218.
- Castillo, M., Barceló, D., Pereira, A.S. & Aquino, F.R. (1999). Characterization of organic pollutants in industrial effluents by high-temperature gas chromatography-mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*, 18, 26-36.
- Clara, M., Strenn, B., Gans, O., Martinez, E., Kreuzinger, N. & Kroiss, H. (2005). Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Research*, 39, 4797-4807.
- Daigger, G.T., Adham, S. & Andreottola, G. (2005). Are membrane bioreactors ready for widespread application? *Environmental Science & Technology*, 39, 399A-406A.
- Fan, B. & Huang, X. (2002). Characteristics of a self-forming dynamic membrane coupled with a bioreactor for municipal wastewater treatment. *Environmental Science & Technology*, 36, 5245-5251.
- Göbel, A., McArdell, C.S., Joss, A., Siegrist, H. & Giger, W. (2007). Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies. *The Science of the Total Environment*, 372, 361-371.
- González, S., Müller, J., Petrovic, M., Barceló, D. & Knepper, T.P. (2006). Biodegradation studies of selected priority acidic pesticides and diclofenac in different bioreactors. *Environmental Pollution*, 144, 926-932.
- Kosjek, T., Health, E. & Kompare, B. (2007). Removal of pharmaceutical residues in a pilot wastewater treatment plant. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 1379-1387.
- Le-Clech, P., Chen, V. & Fane, T.A.G. (2006). Fouling in membrane bioreactors used in wastewater

- treatment. *Journal of Membrane Science*, 284, 17-53.
- Lee, J.-W., Kwon, T.-O. & Moon, I.-S. (2005). Performance of polyamide reverse osmosis membranes for steel wastewater reuse. *Desalination*, 177, 69-82.
- Li, H.Q., Jiku, F. & Schröder, H.F. (2000). Assessment of the pollutant elimination efficiency by gas chromatography / mass spectrometry, liquid chromatography-mass spectrometry and -tandem mass spectrometry. Comparison of conventional and membrane-assisted biological wastewater treatment processes. *Journal of Chromatography A*, 889, 155-176.
- Melin, T., Jefferson, B., Bixio, D., Thoeye, C., De Wilde, W., De Koning, J., Van der Graaf, J. & Wintgens, T. (2006). Membrane bioreactor technology for wastewater treatment and reuse. *Desalination*, 187, 271-282.
- Ng, H.Y. & Hermanowicz, S.W. (2005). Membrane bioreactor operation at short solids retention times: performance and biomass characteristics. *Water Research*, 39, 981-992.
- Radjenovic, J., Petrovic, M. & Barceló, D. (2007). Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 1365-1377.
- Reemtsma, T., Zywicki, B., Stueber, M., Kloepfer, A. & Jekel, M. (2002). Removal of sulfur-organic polar micropollutants in a membrane bioreactor treating industrial wastewater. *Environmental Science & Technology*, 36, 1102-1106.
- Scholz, W. & Fuchs, W. (2000). Treatment of oil contaminated wastewater in a membrane bioreactor. *Water Research*, 34, 3621-3629.
- Qin, J.-J., Oo, M.H., Tao, G. & Kekre, K.A. (2007). Feasibility study on petrochemical wastewater treatment and reuse using submerged MBR. *Journal of Membrane Science*, 293, 161-166.
- Quintana, J.B., Weiss, S. & Reemtsma, T. (2005). Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Research*, 39, 2654-2664.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013

**3.1.2. Comparison of the removal of phthalates and other organic
pollutants from industrial wastewaters in membrane
bioreactor and conventional activated sludge treatment plants**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013



**COMPARISON OF THE REMOVAL OF PHTHALATES AND
OTHER ORGANIC POLLUTANTS FROM INDUSTRIAL
WASTEWATERS IN MEMBRANE BIOREACTOR AND
CONVENTIONAL ACTIVATED SLUDGE TREATMENT PLANTS**

Anna Llop, Francesc Borrell and Eva Pocurull

Departament de Química Analítica i Química Orgànica. Universitat Rovira i Virgili
Marcel·lí Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain

Abstract

In recent years greater attention has been paid to the presence of organic pollutants in wastewater treatment plants, mainly because of strict environmental regulations and the possibility of reusing treated water in industrial processes. Since some organic pollutant compounds are not sufficiently removed in conventional activated sludge treatment (CAST) plants, new treatment processes have been developed, such as membrane bioreactors (MBRs). In this study a submerged membrane bioreactor (MBR) was used to treat mixed industrial wastewaters in parallel with a CAST plant. Two hydraulic retention times (HRT) of wastewater were tested as one of the operational conditions of MBR and the quality of effluents of the two processes were studied and compared. Several general quality parameters were analysed in wastewaters: chemical oxygen demand (COD), pH, conductivity, nitrogen, phosphate, suspended solids (SS) and turbidity. The two systems reduced COD by around 90%. SS was reduced by around 81% in the CAST plant and around 90% in the MBR plant. The results for the other general parameters were similar or better in the MBR process, which worked at a lower HRT. We also studied the removal of a group of six phthalates and bis(2-ethylhexyl) adipate ester by SPME/GC-MS in the two treatment plants. Most of these compounds were not completely removed in the two treatment plants and were identified at low $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ levels. We also tentatively identify some organic compounds in the wastewaters. Most of the compounds we found in the influent, MBR effluent and CAST effluent were benzene derivatives, styrene, naphthalene and naphthalene derivatives, and phenol derivatives.

Keywords: GC-MS, industrial wastewater, membrane bioreactor, organic pollutants, phthalate esters, SPME

INTRODUCTION

For many years, the evaluation of water pollution was restricted to monitoring such general parameters as chemical oxygen demand (COD), nitrogen, phosphate and suspended solids (SS). In recent years, considerable attention has been paid to organic pollutant compounds that may not be completely removed or degraded in conventional activated sludge treatment (CAST) plants by chemical, physical and biological treatment processes (Aguayo, 2004; Cirja, 2008). Therefore, and because of strict environmental regulations and the possibility of water being reused, it is important to improve the efficiency of organic compound removal in CAST plants. New processes for urban and industrial wastewater treatment have been developed, such as membrane bioreactors (MBRs) (Fan, 2002; Clara, 2005; Bouju, 2008). MBR processes are a modification of CAST plants in which the secondary settler is replaced by a membrane filtration module with membranes of micro-, ultra- or nanofiltration. The advantages of this new system are high effluent quality in terms of COD, nitrogen and phosphorous; the retention of suspended solids and microorganisms; reliable biomass concentration; efficient treatment of complex waste streams; and the compactness of the installation (Daigger, 2005; Ng, 2005; Cirja, 2008). Compared to the CAST system, the main disadvantages of MBR

technology are that it is relatively expensive to install and operate. Likewise, soluble and particulate materials are deposited on and in the membrane (fouling) which means that expensive maintenance is also required. Research has been done to reduce the effect of this major drawback (Le-Clech, 2006). Numerous studies have reported the advantages of using this kind of process to treat urban wastewater (Marttinen, 2003; Quintana, 2005; Bernhard, 2006; Bodzek, 2006; Melin, 2006; Radjenovic, 2007; González, 2008) but fewer have discussed the treatment of industrial wastewater (Reemtsma, 2002; Llop, 2009).

Of these emerging contaminants, phthalates are one of the biggest concerns. This is mainly due to the global use of these compounds as plasticizers in the manufacture of such plastics as polyvinylchloride (PVC), and as additives in paints, lacquers, glues, inks, cosmetics, perfumes, etc (Amir, 2005). In order to improve the mechanical properties of a plastic resin, phthalate plasticizers are not bound covalently to the resin and can therefore migrate into the environment (Aparicio, 2007; Shen, 2007). In recent years phthalate production and use has increased significantly and, as a result, they are often found in environmental matrices such as waters and soils (Peñalver, 2000). The most commonly used phthalates (DMP, DEP, DnBP, BBP, DEHP, di-n-octyl phthalate (DnOP) and another plasticizer, bis(2-

ethylhexyl) adipate (DEHA), have been included on the list of priority pollutants in several countries (Peñalver, 2000; Amir, 2005). Some studies have shown that they may cause hormone disrupting activity and also some of them are suspected to be mutagens and carcinogens. Bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) is included in class B2 (probable human carcinogen) while benzyl butyl phthalate (BBP) belongs to class C (possible human carcinogenic). Other phthalates: di-n-butyl phthalate (DnBP), diethyl phthalate (DEP) and dimethyl phthalate (DMP) are included in class D (not classified as human carcinogens) (Peñalver, 2000; Amir, 2005). These compounds from domestic, agricultural or industrial sources may be released directly or indirectly into the aquatic environment (Marttinen, 2003; Tan, 2007). Wastewater treatment plants (WWTPs) appear to be one of the major secondary sources of pollution because these compounds may not be totally removed or degraded in the CAST plants (Fauser, 2003; Aguayo, 2004; Bodzek, 2006; Roslev, 2007). Different types of membranes (reverse osmosis, nanofiltration and ultrafiltration) have been tested on a small scale (Kiso, 2001; Bodzek, 2004) to study the removal of phthalates from tap water, and these compounds have been found to be reduced by more than 97%. However, as far as we know, no studies have been made to evaluate the removal of these compounds using MBR in industrial wastewaters.

The purpose of our current research was to investigate how efficient an MBR pilot plant was at removing pollutants from a mixed industrial wastewater. We tested performance by modifying the hydraulic retention time (HRT) in the MBR, and controlled the general water parameters (pH, conductivity, COD, SS and mixed liquor suspended solids (MLSS)). Another aim of the study was to compare the treatment of the industrial wastewater by the industry's CAST plant and the MBR plant. We also evaluate the possibility of water reuse in industrial processes. Finally, we used a SPME/GC-MS method to study the removal of a group of phthalate and adipate esters in the MBR and the CAST plant. We used the MS library to compare spectra so that we could tentatively identify other organic compounds in the MBR influent and the MBR and CAST effluent wastewaters, characterize these industrial wastewaters and investigate the removal of organic pollutants using MBR and CAST processes.

EXPERIMENTAL

Feedwater characteristics

The industrial wastewater fed into the CAST plant came from four different chemical industries. Industry A produces anionic, cationic and non-ionic surfactants as well as bleach activators. Industry B produces halogenated hydrocarbons such as difluorochloromethane and

1,1,1,2,3,3,3-heptafluoro propane. Industry C produces vinyl acetate with applications in paints, adhesives, papers and textiles. Industry D produces plastics such as isocyanides, polyurethanes and ABS thermoplastics. The feed of the MBR and CAST biological reactors consisted of on a mixture of these four wastewaters. The composition of the feed varied considerably between days because the discharging time, the quantity discharged by each industry and the compounds produced at the moment of the discharge also varied. Characterizing the compounds in the influent and the treated effluent is, then, highly complex because of the different origins of this wastewater, and powerful separation and identification techniques (such as GC-MS) are required.

Conventional activated sludge treatment plant

The mixed industrial wastewater was treated in a CAST plant located in one of these industries in Tarragona (Spain). A scheme of the mixed wastewater treatment in the CAST plant can be seen in Figure 1. The wastewater of the industries A, B and C was pre-clarified by a primary treatment with coagulation and flocculation using FeCl_2 and anionic polymers. The primary treatment effluent was fed directly into the homogenization tank. The wastewater from industry D, which did not need a primary treatment, was also fed into the same tank. In this tank, the pH was adjusted to around 9 using H_2SO_4 or NaOH . One fraction of the homogenization tank was sent to the MBR, and the other was fed into the biological reactor of the CAST plant. A conventional secondary treatment was made in the biological reactor

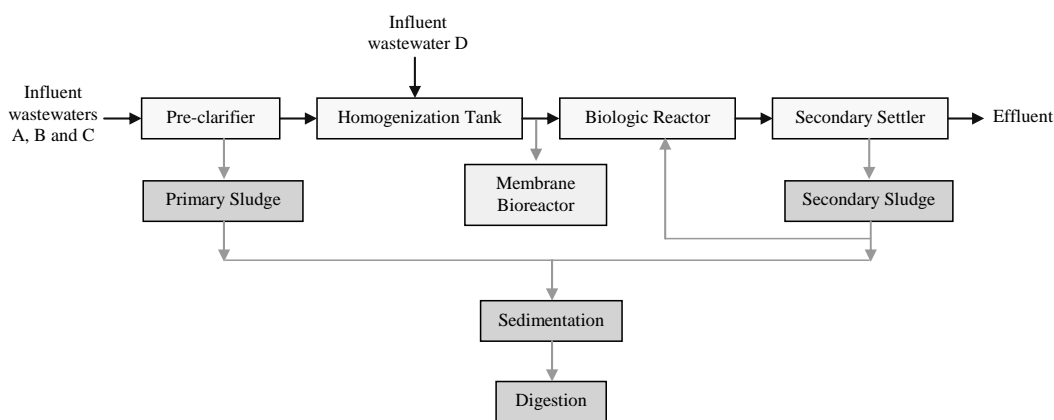


Figure 1. Stages in the process of treating wastewater and sludge in the conventional activated treatment plant (CAST) with the membrane bioreactor connected in parallel.

using activated sludge. KH_2PO_4 and urea, and an antifoaming agent (Nalco 71-D5) were added to this reactor. The treated water and sludge were separated in a conventional secondary settler. A fraction of the settled sludge was recycled to the biological reactor. The other fraction was dehydrated and together with the digested primary sludge was collected and then brought to a special waste centre.

The normal working conditions of the CAST plant were a mixed liquor suspended solids (MLSS) concentration in the activated reactor of around $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, an effluent flow of $15,000 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ and a hydraulic retention time (HRT) of 80 h.

Membrane bioreactor

The membrane bioreactor was equipped with three submerged A4 Kubota membranes (Osaka, Japan), consisting of chlorinated polyethylene with a total surface area of 0.3 m^2 and a mesh width of $0.4 \mu\text{m}$ (range of microfiltration) (Figure 2). For the start-up, the MBR was inoculated with 21 L of activated sludge from the CAST plant. The initial MLSS concentration in the bioreactor was around $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ MLSS and this was maintained between 10 and $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ MLSS throughout the study. The reactor was fed continuously with the effluent from the homogenization tank of the CAST. The effluent flow was set low at first so that the biomass in the bioreactor could slowly acclimatize. The MBR was operated

under aerobic conditions (oxygen concentration in the tank: $1\text{-}2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). In order to minimize cake formation on the membrane surface, the membranes operated intermittently (filtering for 9 min followed by 1 min rest in which no permeate was obtained). In the first conditions tested, the effluent flow was $1.6 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ whereas in the second conditions this was increased to $3.2 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$. This meant a HRT (hydraulic retention time) of 16 and 8 h, respectively. An antifoaming agent (Nalco 71-D5) was needed to prevent foam formation in the bioreactor. In order to reach the optimum medium conditions for the activated sludge, 162 g of urea and 85 g of KH_2PO_4 per week were directly added to the bioreactor as nutrients.

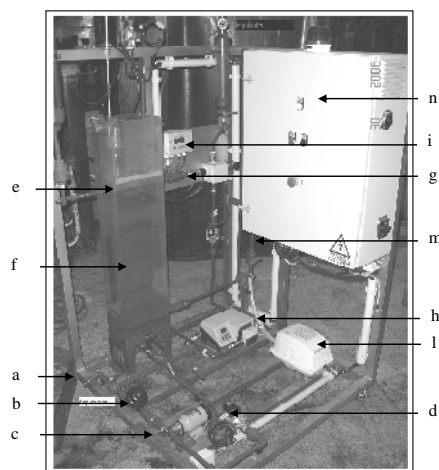


Figure 2. Photography of the membrane bioreactor. (a) feed, (b) filter, (c) gear pump, (d) electrovalve, (e) bioreactor, (f) membrane module, (g) permeate, (h) peristaltic pump, (i) flowmeter, (l) blower, (m) rotameter, (n) control panel.

The ideal quantities in the bioreactor were calculated to be 100 parts of carbon (in terms of influent wastewater chemical oxygen demand, 5 parts of nitrogen and 1 part of phosphorous. The main characteristics of the MBR influent wastewater were a pH value of around 9, COD of 3500 mg·L⁻¹ and SS around 250 mg·L⁻¹.

The membranes were cleaned when the transmembrane pressure was around 30 kPa. A total of 1.5 L of NaClO solution of 500 mg·L⁻¹ was added to the tube, which was connected directly to the microfiltration membranes, and maintained for 2 hours. The objective was to eliminate the particles deposited onto and into the membranes (fouling) and to make them permeable once again. Artiga *et al.* (2005) observed that prolonged chemical cleaning with a solution of NaClO was effective for recovering membrane permeability. The membranes were cleaned every two months.

Sampling

Twice a week 1 L of water was taken from the influent, MBR effluent and CAST effluent, and collected in glass bottles. 500 ml sample were used to determine general parameters and the other 500 ml were used to quantify phthalate and adipate esters and identify other organic pollutants. The general parameter samples were analyzed immediately in the laboratory. The samples used to

determine pollutants were stored at 4 °C until they were analyzed. Also twice a week 200 ml of reactor-mixed liquor sample was taken from the aeration tank in the CAST plant and the MBR reactor to determine the MLSS concentration in both bioreactors. Several samples of 500 ml of activated sludge were taken from each biological reactor (the MBR and the CAST plant), immediately filtered to reduce the water volume and frozen in glass bottles until they were analyzed.

Analytical methods

General parameters

The performance of the membrane bioreactor was monitored by analyzing influent, effluent and reactor-mixed liquor samples. pH, conductivity, turbidity, SS and MLSS were determined with standard methods. COD, total nitrogen (Tot-N) and total phosphorous (Tot-P) were determined with photometric cuvette tests (Dr. Lange, Germany). The morphology of the MBR sludge was also examined using the 'wet smear on glass slide' procedure with a cover slip on top. Then, it was read under light microscopy using an Olympus BX51 microscope with an X 10 eyepiece and an objective magnification of X 40. Pictures were taken by Soft Imaging System software.

SPME/GC-MS

In order to compare the removal of a group of phthalates and adipate esters in the CAST plant and the MBR treatment plant, we first used a solid phase microextraction (SPME) technique and then GC-MS as the separation and determination technique. The influent, MBR effluent and CAST effluent wastewater samples were also characterized using this method.

SPME was executed in accordance with the prior experience of our research group (Peñalver, 2000). Wastewater samples were firstly filtered through a 0.45 μm nylon membrane filter (Whatman, Maidstone, UK), and 3.5 ml of filtered water samples were poured into 4 ml vials. The SPME fiber used in this study was a 65 μm PDMS/DVB (polydimethylsiloxane/divinylbenzene), and was obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Before the initial application, the fiber was conditioned in the injection port of the gas chromatograph at 250 $^{\circ}\text{C}$, according to the supplier's instructions. Every day and between analyses, the fiber was thermally cleaned in the GC injector and a blank analysis was performed to verify that no extraneous compounds were desorbed from the fiber. The fiber was directly immersed into the sample solution for 30 min at 80 $^{\circ}\text{C}$. Samples were heated and continuously stirred at a constant speed of 1400 rpm using a magnetic stirrer and heater unit (Selecta,

Abrera, Spain). Finally, the compounds were thermally desorbed from the fiber into the GC injector, which was maintained at a temperature of 250 $^{\circ}\text{C}$. In order to avoid carryover effects, desorption time was 16 min, the total time of the chromatographic analysis.

GC-MS was performed on a Hewlett-Packard 5890 Series II gas chromatograph (Palo Alto, CA, USA) equipped with a split-splitless injector and an HP 5972 mass spectrometer. A Merlin high-pressure microseal and an insert liner of 0.75 mm i.d., both from Hewlett-Packard, were used. An HP-5MS fused-silica capillary column (cross-linked methylsilicone) of 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm was selected to separate the compounds. The temperature program used for the analyses was as follows: the initial temperature was 60 $^{\circ}\text{C}$ which was then increased to 280 $^{\circ}\text{C}$ at 20 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. This final temperature was held for 5 min. The total run time was 16 min. The injector and detector temperatures were 250 $^{\circ}\text{C}$ and 280 $^{\circ}\text{C}$, respectively. The helium flow-rate was maintained at 1.2 ml $\cdot\text{min}^{-1}$. The samples were injected in splitless mode and the splitter was opened after 4.5 min. Electron ionization (EI) was used at 70 eV and the mass range scanned was 50-450 m/z. The MS was tuned to m/z 69, 219 and 502 for EI corresponding to perfluorobutylamine (PFBA). The data were acquired with the HP Chemstation. It was equipped with the mass spectral library Wiley 198,

which was used to compare the experimental spectrum obtained.

A group of phthalate and adipate esters were studied: dimethyl- (DMP), diethyl- (DEP), di-n-butyl- (DnBP), butylbenzyl- (BBP), bis(2-ethylhexyl)- (DEHP), and di-n-octyl-(DnOP) phthalate esters, and bis(2-ethylhexyl) (DEHA) adipate ester. All the phthalate esters were purchased from Riedel-de Hën (Seelze-Hannover, Germany) and the adipate ester from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). They were more than 98% pure. A stock standard solution of 2000 mg·L⁻¹ of each compound was prepared in ethyl acetate of Suprasolv quality obtained from Merck (Darmstadt, Germany). A working standard solution of 100 mg·L⁻¹ containing all compounds was prepared weekly in ethyl acetate. Stock and working standards were stored at 4 °C in the refrigerator. The aqueous solutions for the calibration curve were prepared daily by diluting the working solution with water of HPLC quality supplied by Carlo Erba Reagents SDS (Peypin, France). As some authors have described (Holadová, 2007), analysing phthalates can be difficult because of the high risk of secondary contamination from chemicals, materials and laboratory equipment. So all the glass material (glass bottles, vials, volumetric material, etc.) used in sampling and in extraction processes was carefully cleaned to avoid contamination problems. No peaks were found in the HPLC water

blank chromatograms so external calibration was used.

Ultrasonic bath extraction followed by GC – MS

Several activated sludge samples from the biological reactor of the two treatment systems were analyzed in order to verify the results of removing the compounds from the wastewaters. We followed the guidelines of an extraction technique used by Roslev (2007). A total of 500 ml of the frozen sludge was lyophilized by the freeze dry system (Labconco, Kansas City, MO, USA). Then it was homogenized using a mortar and pestle and sieved to obtain particles with a diameter less than 125 µm. Subsequently, 2 g of sample was put into a 35 ml vial. Four 20-min extractions were then carried out in an ultrasonic bath, by adding 20 ml of hexane:ethyl acetate (1:1) to each extraction. In this way, four extracts were obtained. Each extract was concentrated under a stream of nitrogen to a final volume of 1 ml, and injected into the GC-MS using the same chromatographic method as we used in wastewaters (SPME/GC-MS).

RESULTS AND DISCUSSION

Comparison of the efficiency of the wastewater treatments in the CAST and MBR plants

In order to determine the treatment efficiency of both systems we analyzed the general quality parameters of the wastewater and the

activated sludge. These parameters were pH, conductivity, turbidity, SS, COD, total nitrogen, total phosphorous and MLSS. We also examined the morphology of the MBR sludge using a microscope to ensure the presence and diversity of microorganisms.

Two different hydraulic retention times (HRT) were tested in the MBR treatment plant to improve the treatment efficiency. First, the effluent flow of the MBR was set at 1.6 L·h⁻¹ (HRT of 16 h). This was then increased to 3.2 L·h⁻¹ so that the biological depuration treatment would take less time (HRT of 8 h).

This shorter depuration may lead to incomplete water treatment.

The COD values obtained for MBR-influent, MBR-effluent and CAST-effluent (bars), and the COD reductions for the MBR and the CAST plants (points) are shown in Figure 3. In both systems the COD was reduced by between 80 and 95% and few differences were found between them at the two HRT tested in MBR (16 and 8 h). The MBR system worked at a lower HRT than the CAST plant (80 h), and was more advantageous, because it gave a slightly better quality effluent in less time. Table 1 shows the two HRT conditions, the

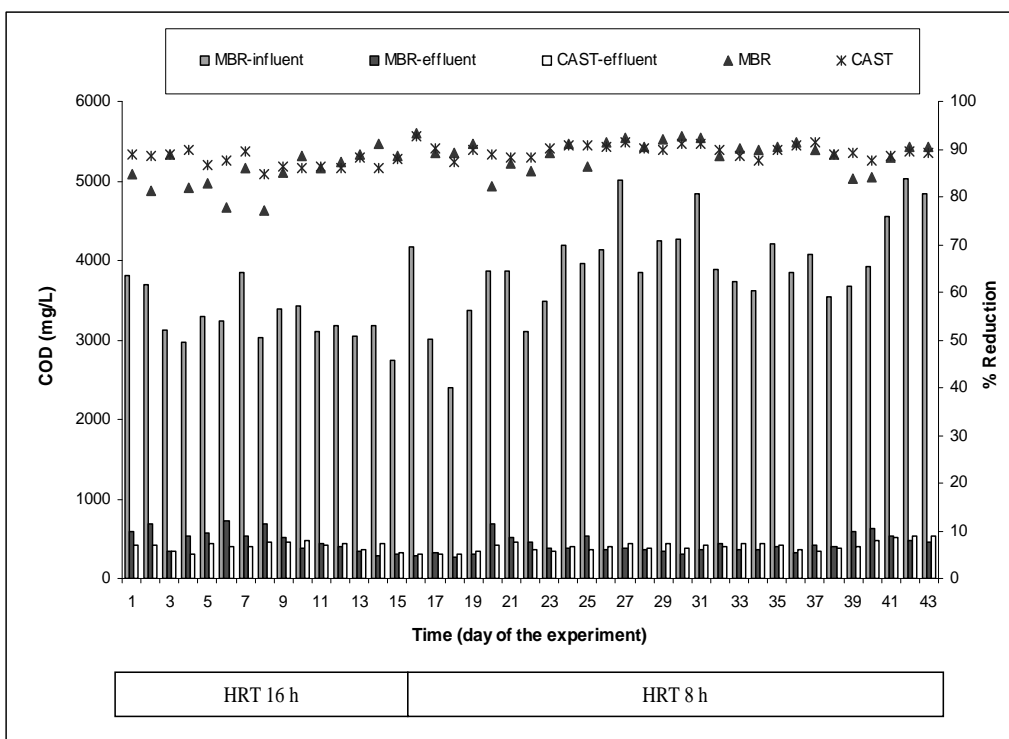


Figure 3. COD concentration (bars) in MBR-influent, MBR-effluent and CAST-effluent, and COD removal (points) in CAST and MBR plants.

range and the average values of the general water parameters for the influent, MBR effluent and the CAST effluent of 44 samples, and the average removal. The average COD values for the MBR and CAST effluents were similar (361 and 407 mg·L⁻¹, respectively) and the two treatment systems are acceptable because the maximum admissible concentration (MAC) of COD that can be discharged is 700 mg·L⁻¹ (DOGC, 2007).

In the MBR and CAST systems, the SS reduction was generally around 90% and 80%, respectively. Table 1 shows the average values of 22 and 40 mg·L⁻¹ for the MBR and CAST effluent, respectively. These results show that the use of microfiltration membranes in MBR is more effective at rejecting SS than the use of a clarifier to in the traditional CAST system to separate treated water of the MLSS. In both cases results were acceptable for SS in effluents, because were lower than the MAC 250 mg·L⁻¹ (DOGC, 2007). These results contrasted with the turbidity

of the influent and MBR-effluent (see Table 1). The average reduction in turbidity was 98.3%, and this reaffirms the effectiveness of the microfiltration. The turbidity of the CAST plant effluent was not available, but we observed that it must be even higher than the MBR effluent. The values for Tot-N and Tot-P were dispersive because they depended on the sampling day. Tot-N includes inorganic (nitrites and nitrates) and organic nitrogen, which involves organic nitrogen-containing compounds. The Tot-N in the influent wastewater came from the organic and inorganic compounds containing nitrogen, and from the urea that had been added as a nutrient for the microorganisms in the bioreactors. Tot-N must be reduced in the effluents because it is consumed by microorganisms. An incomplete reduction of the nitrogen may indicate some anomaly in the purification, such as the entry of toxic compounds that inhibit the function of microorganisms. Although there is not a MAC of Tot-N, the maximum

Table 1. Parameter values for the influent, MBR effluent and CAST effluent samples (n = 44).

Parameter	Influent		MBR-effluent			CAST-effluent		
	Range	Average	Range	Avg.	% Removal	Range	Avg.	% Rmv.
pH	4.9 – 11.0	9.4	6.1 – 9.1	7.9	---	7.1 – 8.3	7.7	---
Conductivity ($\mu S/cm$)	6185 – 11390	8499	6450 – 11920	8850	---	6160 – 12190	9550	---
Turbidity (NTU)	9 – 285	100	0 – 5	1.7	98.3	---	---	---
COD (mg/L)	2400 – 5031	3717	262 – 453	361	90.3	299 – 534	407	89.1
SS (mg/L)	48 – 994	248	0 – 55	22	89.5	2 – 184	40	80.7
Tot-N (mg/L)	0 – 460	195	0 – 90	44	78.1	19 – 86	43	78.5
Tot-P (mg/L)	0.5 – 4.8	2.1	0 – 2.3	0.6	70.0	0.4 – 3.4	1.5	26.5

discharge of organic nitrogen and ammonia allowed is $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of N (DOGC, 2007). Typical values of Tot-N were $195 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ in the influent and $44 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ in the effluent of the two treatment plants, which gave reductions around 78%. The results of Tot-P were similar to those of Tot-N. Typical values in the influent were $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of P, and 0.6 and $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of P for the MBR-effluent and CAST-effluent, giving reductions of 70 and 26%, respectively. The MAC of Tot-P is $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of P (DOGC, 2007), much higher than the concentrations obtained in the two effluents.

The average values of conductivity in the influent wastewater, MBR-effluent and CAST-effluent were around 8500 , 8850 and $9550 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, respectively. As we expected, the microfiltration membranes were not able to reduce the inorganic ions in wastewaters because they were too small. Larger ions, however, were removed because they could not pass through the membrane. The values of the influent

pH (around 9.4) were quite dispersive because they depended on the sampling day, whereas the typical pH values of the two effluents were similar (around 7.7).

In general, the general parameters of wastewaters obtained by both systems of wastewater treatment were quite similar for this type of industrial wastewater. However, in some cases the MBR bioreactor gave better removals and treated the wastewater in less time.

We examined the morphology of the microorganisms in MBR sludge samples. The most common microorganisms were *Vorticella Alpestris* (Figure 4a) and *Euplotes sp.* (Figure 4b). They are a type of ciliated protozoa habitually present in systems of activated sludge. These microorganisms are desirable because they show that no inhibitor compounds are present in the wastewater so the biological degradation is effective.

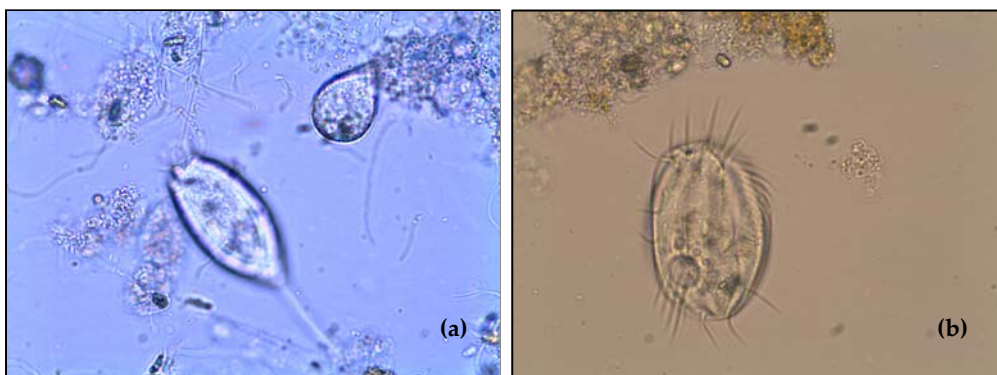


Figure 4. Microbial photographs of the membrane bioreactor sludge.

Phthalate and adipate esters elimination

A group of phthalates and adipate ester was determined using a SPME/GC-MS method. A calibration curve was obtained by adding aliquots of the working standard solution to the HPLC quality water to obtain concentrations of compounds between 25 and 300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The method was used to determine these compounds in 16 samples of each type: MBR-influents, MBR-effluents and CAST-effluents. Table 2 shows the average concentrations and the RSD percentages. Despite of the variation in samples between days, the concentrations of the compounds were very similar in the MBR and CAST effluents. Although individual effluent samples did not correspond to the same influent samples because of the different HRT, we took into account the average concentrations of phthalates in the influents and the effluents of the 16 samples, and we observed that removal efficiencies were low in both treatment systems.

We determined the same group of phthalates in the activated sludge of the biological reactor of both treatment systems, so that the results of phthalate removal from the effluents of both plants could be compared. In the two types of sludge we only detected one DEHP peak, the concentration of which was near to the detection limit. So we can conclude that these compounds were poorly biodegraded and were not accumulated in the activated sludge, which verifies our previous finding: phthalates and the adipate ester were not completely removed from the effluents of the two treatment plants. Some studies we found in the literature have studied the removal of phthalates in the treatment of municipal wastewaters by the use of a CAST system (Fauser, 2003; Cai, 2007; Roslev, 2007). However, as far as we know, no studies have been made to evaluate the removal of these compounds using MBR in the treatment of industrial wastewaters. Comparing our results with those of municipal wastewaters found in the

Table 2. Concentration and % RSD in the influent, MBR effluent and CAST effluent samples ($n = 16$).

Compound	Influent		MBR-effluent		CAST-effluent	
	Concentration ($\mu\text{g}/\text{l}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g}/\text{l}$)	RSD (%)	Conc. ($\mu\text{g}/\text{l}$)	RSD (%)
DMP	ND	--	ND	--	ND	--
DEP	NQ	--	0.67	--	0.32	--
DnBP	53.3	7.9	54.6	9.1	53.5	8.1
BBP	69.0	0.4	68.8	0.3	68.8	0.1
DEHP	65.5	24.6	58.8	5.3	59.9	6.0
DnOP	n.d.	--	ND	--	ND	--
DEHA	66.3	10.7	64.1	3.5	63.9	1.5

ND, Not Detected; NQ, Not Quantified

literature, we observed that phthalates are detected in the influents at similar levels (low $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Although the matrix was different, in that case they did not achieve complete removal of phthalates, but the reduction in the degradation of phthalates during the effluents was much more efficient. For instance, Fauser *et al.* (2003) achieved a removal of 98% in the effluents. In sludge they found 28% of phthalates and they attributed the remaining 70% to the microbiological treatment. However, other investigators (Li, 2007), like us, found phthalates in the secondary effluents of a CAST plant. They tried to force the removal of these compounds by treating the secondary effluent with ozone and ultraviolet radiation followed by biological activated carbon in a pilot plant. They achieved a phthalate removal of 79 to 100% in the effluents. This treatment is more efficient at removing phthalates but is not very common because of the cost.

Other authors who used different types of MBR plants in small-scale studies obtained good removals of phthalates for purifying tap waters. For instance, Bodzek *et al.* (2004) tested reverse osmosis, nanofiltration and ultrafiltration membranes to remove phthalates from tap waters, and they obtained removals in the effluents between 97.6 and almost 99.9%. Other researchers (Kiso, 2001) studied phthalate rejection properties with nanofiltration membranes in pure waters using different salting conditions and they found a rejection

of more than 96%. Since we used different membranes (microfiltration) and industrial wastewater, the results cannot be compared.

Other organic pollutants

The mass spectral library Wiley of the MS was used to characterize the industrial wastewaters, and other organic compounds were tentatively identified. We admitted that organic compounds were present when the mass spectrum of the compounds was at least 90% comparable (mass fragments and their abundance) with the mass spectrum of the Wiley library (Li, 2000; Kosjek 2007).

The chromatograms of the influents, CAST effluents and MBR effluents showed partial or complete removal of most compounds in both treatment systems. Although wastewater composition varied between days, similar chromatographic profiles were acquired on different days for the same type of sample. For instance, Figure 5 shows the chromatograms obtained for each type of sample on the same sampling day. The influent wastewater (Figure 5a) showed lots of chromatographic peaks which were partially or completely removed in the MBR effluent (Figure 5b) and the CAST effluent (Figure 5c). Although the chromatographic profiles were similar for the two effluents, the retention time and the mass spectrum of the compounds showed differences in some peaks. Table 3 shows the average percentage of organic

compounds identified with a similarity greater than 90% in each type of sample (influent, CAST effluent and MBR effluent) and the retention time of each compound in

the chromatograms. Most of the organic compounds identified were benzene derivatives, styrene, naphthalene, naphthalene derivatives, and phenol derivatives.

Table 3. Organic compounds identified by GC/MS in influent, CAST effluent and MBR effluent samples (n = 15) and their average percentage of presence in these samples. All compounds were more than 90% similar to the Wiley library.

Retention time (min)	Compound	Influent (%)	CAST effluent (%)	MBR effluent (%)
2.56	Benzene 1,2-dimethyl	40	20	ND
2.70	Styrene	80	60	40
4.05	Benzene, 4-ethyl-1,2-dimethyl-	60	ND	ND
4.30	Benzene, 1,2,3,5-tetramethyl-	40	ND	ND
4.31	Benzene, 1,2,3,4-tetramethyl-	80	40	40
4.86	1-Butanamine, N,N-dibutyl-	40	20	20
4.92	Naphthalene	60	20	20
5.23	Ethanol, 2[(2-ethylhexyl)oxy]-	40	ND	ND
5.23	Benzothiazole	ND	40	ND
5.36	1H-Indene,2,3-dihydro-4,7-dimethyl-	40	20	ND
5.76	Naphthalene, 1-methyl-	60	40	20
5.80	Naphthalene-2-methyl-	40	40	40
6.37	1,1'-Biphenyl	60	ND	ND
6.65	Naphthalene, 1,5-dimethyl	20	20	20
6.81	Naphthalene, 1,3-dimethyl	20	20	20
6.83	Cyclododecane	40	ND	20
7.17	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-	20	40	60
7.23	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	ND	20	40
7.34	1,1'-Biphenyl, 2,2'-dimethyl-	20	20	20
7.89	1-Tetradecene	40	20	20
8.15	Cyclotetradecane	20	40	20
8.37	Ethanol, 2-(dodecyloxy)-	40	ND	20
8.56	Phenol-nonyl-	60	20	40
9.62	Methyl-3-(3,5-ditertbutyl-4-hydroxyphenyl)propionate	20	20	60
9.75	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl 2-methylpropyl ester	40	60	60

ND, Not Detected

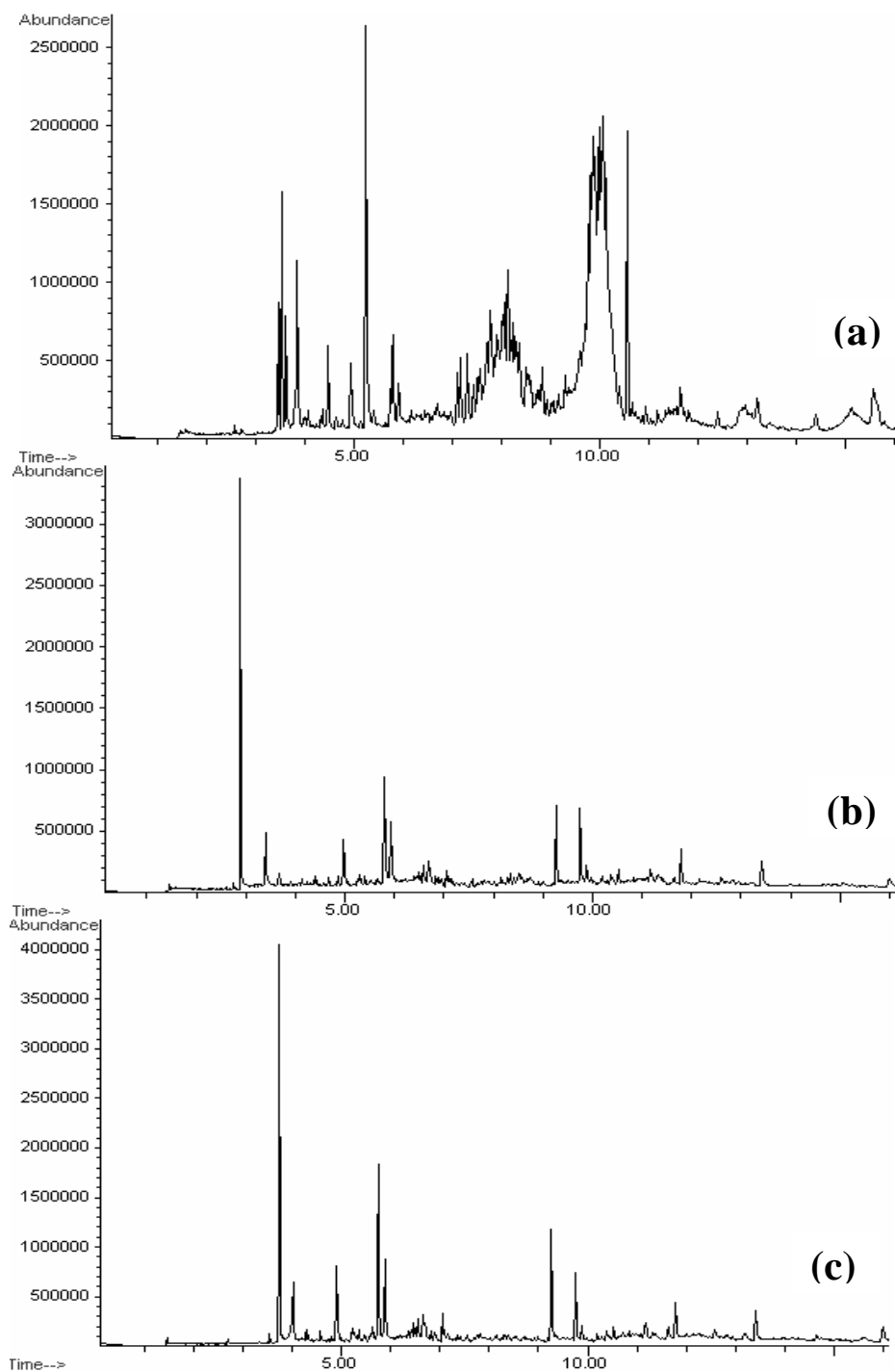


Figure 5. Chromatograms of (a) MBR-influent, (b) MBR-effluent and (c) CAST-effluent samples analysed by SPME/GC-MS.

CONCLUSIONS

This paper looks at how effective an MBR pilot plant is at treating mixed industrial wastewaters. The MBR had three microfiltration membranes and operated in two different HRT conditions. The COD values in the industrial wastewater were reduced around 90% when the MBR was used. These values were similar to those obtained with the CAST. However, SS removal in the MBR was much higher than in the CAST plant (90% and 81%, respectively). The MBR plant worked at a lower HRT than the CAST plant, and gave general parameters that were similar to or better than those given by the CAST plant. The MBR system, then, is more advantageous than the CAST system. Although most of the general parameters reduced considerably, conductivity did not. Therefore, if the wastewater is to be reused (and depending on what it is going to be used for), it would probably require subsequent treatment with RO membranes.

We identified and quantified some phthalate and adipate esters: DEP, DnBP, BBP, DEHP and DEHA at low $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ levels using SPME/GC-MS. These compounds were not completely removed in either the MBR or the CAST plant. The results were checked by analyzing the activated sludge in the two treatment plants, where the compounds could not be detected. One way of removing these compounds could be to subsequently treat the effluent with

ultraviolet radiation and ozone using a system of activated carbon. The literature suggests (Li, 2007) that this system is more efficient at removing phthalate but it is not very common because of the cost.

Most of the compounds tentatively identified in these industrial wastewaters (i.e. some benzene derivatives, styrene, naphthalene, naphthalene derivatives, and phenol derivatives) were partially or completely removed during the MBR or CAST treatment.

Acknowledgements

The authors would like to thank the *Dirección General de Investigación* of the Ministry of Science and Technology (CTM 2004-06265-C03-02 and CTM 2005-01774), and the *Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca* of the *Generalitat de Catalunya* for A. Llop's predoctoral grant (2007 FI00026).

REFERENCES

- Aguayo, S., Muñoz, M. J., De la Torre A., Roset, J., De la Peña, E. & Carballo, M. (2004). Identification of organic compounds of sewage treatment plants (STP) effluents. *Science of the Total Environment*, 328, 69-81.
- Amir, S., Hafidi, M., Merlina, G., Hamdi, H., Jouraiphy, A., El Gharous, M., & Reel, J. C. (2005). Fate of phthalic acid esters during composting of both lagooning and activated sludges.

- Process Biochemistry*, 40, 2183-2190.
- Aparicio, I., Santos, J. L. & Alonso, E. (2007). Simultaneous sonication-assisted extraction, and determination by gas chromatography-mass spectrometry, of di-(2-ethylhexyl)phthalate, nonylphenol, nonylphenol ethoxylates and polychlorinated biphenyls in sludge from wastewater treatment plants. *Analytica Chimica Acta*, 584, 455-461.
- Artiga, P., Ficara, E., Malpei, F., Garrido, J. M. & Méndez, R. (2005). Treatment of two industrial wastewaters in a submerged membrane bioreactor. *Desalination*, 179, 161-169.
- Bernhard, M., Müller, J. & Knepper, T. P. (2006). Biodegradation of persistent polar pollutants in wastewaters: Comparison of an optimised lab-scale membrane bioreactor and activated sludge treatment. *Water Research*, 40, 3419-3428.
- Bodzek M., Dudziak M., Luks-Betlej K. (2004). Application of membrane techniques to water purification. Removal of phthalates. *Desalination*, 162, 121-128.
- Bodzek, M. & Dudziak M. (2006). Elimination of steroidal sex hormones by conventional water treatment and membrane processes. *Desalination*, 198, 24-32.
- Bouju, H., Buttiglieri, G. & Malpei, F. (2008). Perspectives of persistent organic pollutants (POPs) removal in an MBR pilot plant. *Desalination*, 224, 1-6.
- Cai, Q.-Y., Mo, C.-H., Wu, Q.-T., Zeng, Q.-Y. & Katsoyiannis, A. (2007). Occurrence of organic contaminants in sewage sludges from eleven wastewater treatment plants, China. *Chemosphere*, 68, 1751-1762.
- Cirja, M., Ivashechkin, P., Schäffer, A. & Corvini, P.F.X. (2008). Factors affecting the removal of organic micropollutants from wastewater in conventional treatment plants (CTP) and membrane bioreactors (MBR). *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 7, 61-78.
- Clara, M., Strenn, B., Gans, O., Martinez, E., Kreuzinger, N. & Kroiss, H. (2005). Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Research*, 39, 4797-4807.
- Daigger, G. T., Adham, S. & Andreottola, G. (2005). Are membrane bioreactors ready for widespread application? *Environmental Science and Technology*, 39, 399A-406A.
- DOGC núm. 4818– 09/02/2007 (2007). Acord del Consell d'Administració de l'Agència Catalana de l'Aigua d'1 d'abril de 2004, de fixació de criteris en relació amb la vigilància i el

control de la qualitat de les aigües marines litorals i els paràmetres i límits dels abocaments de terra a mar.

- Fan, B. & Huang, X. (2002). Characteristics of a self-forming dynamic membrane coupled with a bioreactor for municipal wastewater treatment. *Environmental Science and Technology*, 36, 5245-5251.
- Fausser, P., Vikelsee, J., Sorensen, P. B. & Carlsen L. (2003). Phthalates, nonylphenols and LAS in an alternately operated wastewater treatment plant-fate modelling based on measured concentrations in wastewater and sludge. *Water Research*, 37, 1288-1295.
- González, S., Petrovic, M. & Barceló D. (2008). Evaluation of two pilot scale membrane bioreactors for the elimination of selected surfactants from municipal wastewaters. *Journal of Hydrology*, 356, 46-55.
- Holadová, K., Prokupková, G., Hajslová, J. & Poutska, J. (2007). Headspace solid-phase microextraction of phthalic acid esters from vegetable oil employing solvent based matrix modification. *Analytica Chimica Acta*, 582, 24-33.
- Kiso, Y., Kon, T., Kitao, T. & Nishimura, K. (2001). Rejection properties of alkyl phthalates with nanofiltration membranes. *Journal of Membrane Science*, 182, 205-214.
- Kosjek, T., Health, E. & Kompare, B. (2007). Removal of pharmaceutical residues in a pilot wastewater treatment plant. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 1379-1387.
- Le-Clech, P., Chen, V. & Fane, T. A. G. (2006). Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment. *Journal of Membrane Science*, 284, 17-53.
- Li, H. Q., Jiku, F. & Schröder, H. F. (2000). Assessment of the pollutant elimination efficiency by gas chromatography / mass spectrometry, liquid chromatography-mass spectrometry and -tandem mass spectrometry. Comparison of conventional and membrane-assisted biological wastewater treatment processes. *Journal of Chromatography A*, 889, 155-176.
- Li, L., Zhu, W., Zhang, P., Lu, P., Zhang, Q. & Zhang, Z. (2007). UV/O₃-BAC process for removing organic pollutants in secondary effluents. *Desalination*, 207, 114-124.
- Llop, A., Pocurull, E. & Borrull, F. (2009). Evaluation of the removal of pollutants from petrochemical wastewater using a membrane bioreactor treatment plant. *Water Air and Soil Pollution*, 197, 349-359.
- Marttinen, S. K., Kettunen, R. H., Sormunen, K. M. & Rintala, J. A. (2003). Removal of bis(2-ethylhexyl) phthalate at a sewage treatment plant. *Water Research*, 37, 1385-1393.

- Melin, T., Jefferson, B., Bixio, D., Thoeye, C., De Wilde, W., De Koning, J., Van der Graaf, J. & Wintgens, T. (2006). Membrane bioreactor technology for wastewater treatment and reuse. *Desalination*, 187, 271-282.
- Ng, H. Y., Hermanowicz, S. W. (2005). Membrane bioreactor operation at short solids retention times: performance and biomass characteristics. *Water Research*, 39, 981-992.
- Peñalver, A., Pocurull, E., Borrull, F. & Marcè, R.M. (2000). Determination of phthalate esters in water samples by solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 872, 191-201.
- Quintana, J. B., Weiss, S. & Reemtsma, T. (2005). Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water Research*, 39, 2654-2664.
- Radjenovic, J., Petrovic, M. & Barceló, D. (2007). Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 1365-1377.
- Reemtsma, T., Zywicki, B., Stueber, M., Kloepfer, A. & Jekel, M. (2002). Removal of sulfur-organic polar micropollutants in a membrane bioreactor treating industrial wastewater. *Environmental Science and Technology*, 36, 1102-1106.
- Roslev, P., Vorkamp, K., Aarup, J., Frederiksen, K., Nielsen, P. H. (2007). Degradation of phthalate esters in an activated sludge treatment plant. *Water Research*, 41, 969-976.
- Shen, H.-Y., Jiang, H.-L., Mao, H.-L., Pan, G., Zhou, L. & Cao, Y.-F. (2007). Simultaneous determination of seven phthalates and four parabens in cosmetic products using HPLC-DAD and GC-MS methods. *Journal of Separation Science*, 30, 48-54.
- Tan, B., Hawker, D., Müller, J., Leusch, F., Tremblay, L. & Chapman, H. (2007). Modelling of the fate of selected endocrine disruptors in a municipal wastewater treatment plant in South East Queensland, Australia. *Chemosphere*, 69, 644-654.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013

3.1.3. Discussió de Resultats

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013

Tot i que els resultats de la recerca experimental que s'inclou en aquest primer bloc han estat discutits prèviament de manera individual en els articles publicats citats anteriorment, aquest apartat presenta els resultats més importants d'aquests treballs.

En el primer treball, es va instal·lar la planta pilot a l'empresa i es va comprovar que funcionava correctament, podent-se controlar la planta pilot amb el sistema informàtic i monitoritzant el seu funcionament. Per tal d'optimitzar el seu funcionament es va creure convenient provar de modificar el pH de l'aigua d'entrada i el cabdal de l'aigua de sortida, per establir, d'una banda el pH òptim pel creixement de microorganismes especialitzats en la depuració de les aigües, i d'altra banda, per determinar el temps de residència hidràulica necessari per tal d'arribar a un compromís entre un tractament de les aigües adequat a les normatives i el temps de residència de les aigües en el reactor. Els resultats dels paràmetres generals de l'aigua que s'han obtingut han mostrat que aquest tipus de plantes de tractament amb BRM són adequades pel tractament d'aquestes aigües residuals d'origen petroquímic, ja que els resultats de les anàlisis generals de les aigües de sortida mostren unes reduccions dels paràmetres significatives (DQO, TOC, SS, ...), i a més a més, els seus valors són inferiors als límits de vessament permesos. Tanmateix, aquests tipus de bioreactors de membrana que tenen membranes de microfiltració no són capaços de reduir la conductivitat, i això podria limitar-ne la seva reutilització segons les aplicacions posteriors de l'aigua tractada per un us industrial.

Pel que fa als diferents perfils cromatogràfics que s'han obtingut mitjançant la SSPE seguida de la GC-MS, s'ha observat que els cromatogrames de les fraccions de les aigües de sortida mostren molts menys pics cromatogràfics i que a més a més la seva abundància és significativament inferior que els corresponents pics de les diferents fraccions de les aigües d'entrada, per tant, l'eliminació de compostos ha estat eficaç, ja que s'han eliminat parcial o totalment. Alguns compostos contaminants orgànics s'han pogut identificar de forma aproximada utilitzant la llibreria d'espectres Wiley de l'espectròmetre de masses, utilitzant les bases de similitud entre els espectres de massa (les masses dels fragments i la seva abundància). Només es van considerar aquells compostos amb una similitud superior a un 80%. Els compostos amb una similitud entre 91 i 100% es van considerar com compostos presents, i els compostos amb una similitud entre 80 i 90% es van considerar com compostos probables. S'ha observat que la majoria dels compostos orgànics presents en aquest tipus d'aigües petroquímiques corresponen a compostos derivats d'hidrocarburs, alquil benzens, fenols, àcids carboxílics i derivats d'esters.

En el segon treball, la posta en funcionament de la planta pilot BRM es va dur a terme correctament i els llots activats es van aclimatar al medi i a les condicions de la planta pilot. Degut a la gran formació d'escuma, va ser necessària l'addició d'un antiespumant, i per afavorir el procés de depuració biològica, es van afegir nutrients

que contenen nitrogen i fòsfor. Es va modificar el cabal d'aigua de sortida de la planta pilot (de 1.6 a 3 l/h), relacionat amb el temps de retenció hidràulica (16 i 8 h, respectivament), i es va observar que no afectava significativament en els paràmetres de qualitat de les aigües.

Els resultats de depuració de la planta pilot amb BRM han estat bastant similars als obtinguts amb la planta de tractament convencional de la indústria. Els percentatges de reducció de DQO han estat entre el 80 i el 95%, en les dues plantes de tractament, i els valors de DQO de l'efluent es trobaren per sota dels límits legiscats en ambdós casos. Respecte als SS, els valors de reducció obtinguts han estat entre el 80 i el 100%, obtenint-se millors resultats d'eliminació en els efluentes de la planta amb BRM, degut a la microfiltració. Aquests resultats s'han confirmat mesurant la torbesa de les mostres de la planta pilot amb BRM i per observació de les mostres d'ambdues plantes, on clarament s'ha observat que les mostres dels efluentes de la planta amb BRM eren més translúcides i sense partícules en suspensió.

La conductivitat de les mostres d'aigua de sortida de les dues plantes de tractament és bastant elevada per a poder ser reutilitzada en algunes aplicacions. Utilitzant aquests dos sistemes de tractament, l'eliminació de la conductivitat en les aigües de sortida no pot ser efectiva. Les membranes de microfiltració no estan dissenyades per eliminar ions tan petits. Com a solució, es podria aplicar un tractament terciari, com la osmosi inversa, que té membranes amb una mida de porus més petita, i milloraria la qualitat de l'aigua, tot i que hi hauria una despesa energètica addicional important.

A més a més, en aquest estudi es va dur a terme la determinació d'un grup d'ftalats i d'un adipat en les aigües residuals d'entrada i en les sortides de les dues plantes de tractament, BRM i convencional. El mètode va utilitzar la microextracció en fase sòlida seguida de la separació i detecció dels compostos per GC-MS. Els resultats cromatogràfics que es varen obtenir van mostrar la presència de 5 dels compostos estudiats (DEP, DnBP, BBP, DEHP y DEHA) en aquestes aigües, a uns nivells de µg/l.

Segons les anàlisis que s'han obtingut en les aigües d'entrada i de sortida de les dues plantes de tractament, els ftalats i l'adipat estudiats no s'eliminen completament durant el tractament biològic.

Amb la finalitat de confirmar els resultats obtinguts, s'han determinat els mateixos compostos en els llots activats dels reactors biològics de la planta BRM i de la planta convencional. Els cromatogrames obtinguts han mostrat que aquests compostos realment no s'eliminen de les aigües residuals.

Diversos investigadors han estudiat l'eliminació dels ftalats durant el tractament d'aigües urbanes utilitzant sistemes de tractament convencionals [1-3]. Tanmateix, no s'ha trobat informació sobre com s'eliminen aquests compostos utilitzant BRM en el tractament d'aigües residuals industrials. Observant els resultats de l'eliminació dels ftalats en aigües urbanes de la bibliografia, trobem que concorden amb els obtinguts en l'estudi realitzat, ja que es detecta la presència de ftalats en els influents a nivells similars, baixos $\mu\text{g/l}$. Tot i que la matriu és diferent, en els estudis realitzats en aigües residuals urbanes tampoc s'obté una completa eliminació d'aquests compostos, tot i que l'eficiència en l'eliminació és molt superior a la trobada en l'estudi realitzat. Per exemple, Fauser *et al.* [1] obtingueren uns efluentes amb una eliminació del 98%, trobaren un 28 % de ftalats en els llots activats, i es va atribuir que el 70% restant s'eliminava mitjançant el tractament biològic de la planta de tractament.

Tanmateix, trobem informació que concorda amb els resultats obtinguts en el nostre estudi. Li *et al.* [4] detecten la presència de ftalats en els efluentes secundaris de la planta de tractament convencional. Utilitzant un tractament amb ozó i radiació ultraviolada varen forçar l'eliminació de ftalats dels efluentes secundaris, i van obtenir una eliminació d'entre el 79 i el 100%. Aquest tractament que utilitza ozó i radiació ultraviolada s'ha vist que és molt eficient per eliminar compostos com són els ftalats, però tot i això no s'acostuma a utilitzar pel seu elevat cost.

Altres autors han utilitzat diferents tipus de plantes pilot amb BRM per purificar aigües d'aixeta, i han obtingut bons resultats d'eliminació dels ftalats. Per exemple, Bodzek *et al.* [5] van provar diversos tipus de membranes: d'osmosi inversa, de nanofiltració i d'ultrafiltració; per eliminar els ftalats de les aigües d'aixeta, obtenint bons resultats d'eliminació en els efluentes: entre el 97.6 i el 99.9%. Altres investigadors com Kiso *et al.* [6] van estudiar l'eliminació d'aquests compostos en aigües purificades utilitzant membranes de nanofiltració, emprant diferents condicions, i obtingueren més d'un 96% d'eliminació.

Aquests darrers resultats, però, no poden ser comparats amb els que varem obtenir en el nostre estudi, ja que utilitzen diferents tipus de membranes (varem utilitzar la microfiltració) i el tipus d'aigües a tractar també és molt diferent (aigües residuals industrials en el nostre cas).

Finalment es va dur a terme la identificació de diversos compostos orgànics per tal de caracteritzar les aigües residuals tant d'entrada com de sortida de les dues plantes de tractament mitjançant el mètode cromatogràfic desenvolupat anteriorment, utilitzant la biblioteca d'espectres Wiley de l'espectròmetre de masses. En els cromatogrames que s'han obtingut s'observa una reducció de molts compostos de les aigües d'entrada, comparant-les amb les respectives sortides de les dues plantes de

tractament. En els efluent de la planta amb BRM s'han observat petites millores en la reducció dels compostos, respecte als de la planta convencional.

Els compostos identificats per la llibreria d'espectres de l'espectròmetre de masses corresponen bàsicament a derivats de benzè, estirè, naftalè, derivats de naftalè i derivats de fenol. Les mostres no són homogènies, i per tant l'aparició dels diferents compostos no sempre és constant, i inclús poden trobar-se en les aigües de sortida però no en les d'entrada, degut a possibles degradacions dels compostos o degut al temps de retenció hidràulica de l'aigua residual en els reactors biològics.

Bibliografia

- [1] P. Fauser, J. Vikelsoe, P.B. Sorensen, L. Carlsen, *Water Res.* 37 (2003) 1288.
- [2] Q.-Y. Cai, C.-H. Mo, Q.-T. Wu, Q.-Y. Zeng, *Chemosphere* 68 (2007) 1751.
- [3] P. Roslev, K. Vorkamb, J. Aarup, K. Frederiksen, P. H. Nielsen, *Water Res.* 41 (2007) 969.
- [4] L. Li, W. Zhu, P. Zhang, P. Lu, Q. Zhang, Z. Zhang, *Desalination* 207 (2007) 114.
- [5] M. Bodzek, M. Dudziak, K. Luks-Betlej, *Desalination* 162 (2004) 121.
- [6] Y. Kiso, T. Kon, T. Kitao, K. Nishimura, *J. Membrane Sci.* 182 (2001) 205.

3.2. Determinació d'amines alifàtiques primàries i *N*-Nitrosamines en mostres aquoses

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013

En els estudis anteriors s'ha posat de manifest que tot i la important eliminació de compostos orgànics presents en les aigües residuals, segueixen existint en les aigües de sortides de les diferents plantes de tractament alguns compostos orgànics que poden ser potencialment tòxics en funció de l'ús que se'n vulgui fer d'aquesta aigua. Un coneixement més intensiu de la naturalesa d'aquests compostos ha de ser bàsic per potenciar tècniques de tractament millorades que proporcionin aigües de millor qualitat.

Tot i la informació coneguda sobre l'evolució dels paràmetres generals de qualitat de l'aigua, hi ha encara poca informació sobre l'eliminació de diverses famílies de compostos en les plantes de tractament d'aigües. En aquest bloc ens centrarem en l'estudi de la presència d'alguns dels compostos nitrogenats, com són les amines alifàtiques primàries i les N-Nitrosamines en diferents tipus de mostres aquoses, la majoria de les quals són aigües residuals. Per tal de determinar la presència d'aquests compostos en els diferents tipus de mostres, en cada cas es va desenvolupar un mètode cromatogràfic altament sensible, ja que aquests compostos es troben a baixes concentracions [1-4].

L'elecció d'aquestes famílies de compostos nitrogenats ha estat motivada pel fet que, d'una banda, com s'ha comentat anteriorment, hi ha poca informació sobre la seva presència en aigües residuals i sobre la seva eliminació [5-9], i d'altra banda, s'han de controlar, degut a que són compostos que presenten una toxicitat elevada, inclús algun d'ells s'ha vist que són potencialment cancerígens [10-12]. A més a més, una de les indústries on es va decidir dur a terme els estudis de l'eliminació d'aquests compostos sintetitza tensioactius a partir d'amines de cadena llarga, i degut a la degradació biològica d'aquests tensioactius, podrien formar-se les amines alifàtiques primàries de cadena curta que es van proposar estudiar. Per altra banda, les N-Nitrosamines que ens plantejarem estudiar s'ha vist que poden ser formades a partir d'amines durant els processos de desinfecció d'aigües en les plantes de tractament [6,8,13-17].

En concret, en el primer treball es va desenvolupar un mètode cromatogràfic per determinar amines alifàtiques primàries en diferents mostres aquoses mitjançant una derivatització *in situ* amb pentafluorobenzaldehid i una microextracció en fase sòlida amb espai de cap (HS-SPME) seguida de GC-MS-MS, utilitzant un espectròmetre de masses amb trampa iònica. S'ha tingut cura també de que el mètode fos el més automatitzat possible, per tal de minimitzar la manipulació de la mostra i optimitzar recursos. Els compostos que s'han determinat han estat: metilamina, etilamina, propilamina, butilamina, isobutilamina, amilamina, isoamilamina, ciclohexilamina, heptilamina i 2-feniletilamina. Aquests compostos, a més a més, són importants intermedis de reacció en la producció de fàrmacs, tints de teixits, inhibidors de corrosió i polímers entre d'altres [1,5,13,14,18,19] a la vegada que poden reaccionar

donant lloc a la formació de *N*-Nitrosamines. Aquest mètode s'ha aplicat a la determinació d'aquests compostos en aigües residuals de diferents orígens: plantes de tractament d'aigües industrials amb diferents tecnologies de tractament d'aigües, plantes de tractament d'aigües urbanes i també en una planta potabilitzadora d'aigües. Les plantes de tractament on s'ha realitzat l'estudi utilitzen diferents tecnologies per depurar les aigües: plantes de tractament convencionals, plantes amb BRM amb membranes de microfiltració o d'ultrafiltració i osmosi inversa.

En el segon treball vàrem desenvolupar un mètode cromatogràfic per tal de determinar les 9 EPA (Environmental Protection Agency) *N*-Nitrosamines, compostos altament cancerígens, en aigües residuals mitjançant SPME-GC-CI-MS-MS. Els compostos que s'han estudiat són: *N*-Nitrosodimetilamina, *N*-Nitrosometiletilamina, *N*-Nitrosodietilamina, *N*-Nitrosodipropilamina, *N*-Nitrosodibutilamina, *N*-Nitrosomorfolina, *N*-Nitrosopiperidina i *N*-Nitrosopirrolidina i *N*-Nitrosodifenilamina.

Tal com s'ha comentat anteriorment, s'ha trobat que aquests compostos poden aparèixer com a productes de desinfecció en la cloració d'aigües de consum i d'aigües residuals [8,15-17]. Alguns d'aquests compostos estan classificats com a compostos altament cancerígens per la USEPA [12]. Aquest mètode s'ha aplicat per estudiar la presència d'aquests compostos en mostres aquoses, com aigua de l'aixeta, aigües residuals provinents de plantes de tractament industrials i urbanes i en aigües d'una planta potabilitzadora. De la mateixa manera que en l'estudi de les amines alifàtiques primàries, els sistemes de tractament utilitzats en les plantes de tractament d'aigües són diversos: plantes de tractament convencionals, plantes amb BRM amb membranes de microfiltració o d'ultrafiltració, i osmosi inversa.

Els treballs que s'adjunten a continuació inclouen els resultats obtinguts en aquests estudis. El primer treball ha estat publicat en la revista *Journal of Chromatography A* (2010) 1217:575-581, i el segon treball ha estat publicat a la revista *Journal of Separation Science* (2010) 33:3692-3700.

Bibliografia

- [1] K.J. Chia, S.D. Huang, *J. Chromatogr. A* 1103 (2006) 158.
- [2] B. Jurado-Sánchez, E. Ballesteros, M. J. Gallego, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1200.
- [3] S.D. Richardson, *Anal. Chem.* 81 (2009) 4645.
- [4] S.D. Richardson, *Trend Anal. Chem.* 22 (2003) 666.

- [5] F. Sacher, S. Lenz, H.J. Brauch, *J. Chromatogr. A* 764 (1997) 85.
- [6] M. Ábalos, J.M. Bayona, F. Ventura, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3531.
- [7] L. Pan, J.M. Chong, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 773 (1997) 249.
- [8] W.A. Mitch, J.O. Sharp, R.R. Trussell, R.L. Valentine, L. Alvarez-Cohen, D.L. Sedlak, *Environ. Eng. Sci.* 20 (2003) 389.
- [9] D.L. Sedlak, R.A. Deeb, E.L. Hawley, W.A. Mitch, T.D. Durbin, S. Mowbray, S. Carr, *Water Environ. Res.* 77 (2005) 32.
- [10] H. Greim, D. Bury, H.J. Klimisch, M. Oeben-Negele, K. Ziegler-Skylakakis, *Chemosphere* 36 (1998) 271.
- [11] Y.Y. Zhao, L.S. Cai, Z.Z. Jing, H. Wang, J.X. Yu, H.S. Zhang, *J. Chromatogr. A* 1021 (2003) 175.
- [12] M. Asami, M. Oya, M.K. Kosaka, *Sci. Total Environ.* 407 (2009) 3540.
- [13] S. Meseguer, C. Molins, P. Campins, *J. Chromatogr. A* 978 (2002) 59.
- [14] L. Cai, Y. Zhao, S. Gong, L. Dong, C. Wu, *Chromatographia* 58 (2003) 615.
- [15] US EPA Contaminant Candidate List 3 (CCL 3), as of January 2009b, <http://www.epa.gov/OGWDW/ccl/ccl3.html>.
- [16] L. Padhye, U. Tezel, W.A. Mitch, S.G. Pavlostathis, C.-H. Huang, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 3087.
- [17] Y.-Y. Zhao, J.M. Boyd, M. Woodbeck, R.C. Andrews, F. Qin, X.-F. Li, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 4857.
- [18] S. Mishra, V. Singh, A. Jain, K.K. Verma, *Analyst* 126 (2001) 1663.
- [19] M. Akyüz, S. Ata, *J. Chromatogr. A* 1129 (2006) 88.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013

**3.2.1. Automated determination of aliphatic primary amines in
wastewater by simultaneous derivatization and
headspace solid-phase microextraction followed by gas
chromatography–tandem mass spectrometry**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013

Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 575–581



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

**AUTOMATED DETERMINATION OF ALIPHATIC PRIMARY AMINES IN
WASTEWATER BY SIMULTANEOUS DERIVATIZATION AND HEADSPACE
SOLID-PHASE MICROEXTRACTION FOLLOWED BY GAS
CHROMATOGRAPHY–TANDEM MASS SPECTROMETRY**

Anna Llop, Eva Pocurull and Francesc Borrull

Departament de Química Analítica i Química Orgànica. Universitat Rovira i Virgili
Marcel·lí Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain

Abstract

This paper presents a fully automated method for determining ten primary amines in wastewater at ng/L levels. The method is based on simultaneous derivatization with pentafluorobenzaldehyde (PFBAY) and headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) followed by gas chromatography coupled to ion trap tandem mass spectrometry (GC–IT–MS–MS). The influence of main factors on the efficiency of derivatization and of HS-SPME is described in detail and optimized by a central composite design. For all species, the highest enrichment factors were achieved using a 85 μm polyacrylate (PA) fiber exposed in the headspace of stirred water samples (750 rpm) at pH 12, containing 360 g/L of NaCl, at 40 °C for 15 min. Under optimized conditions, the proposed method achieved detection limits ranging from 10 to 100 ng/L (except for cyclohexylamine). The optimized method was then used to determine the presence of primary amines in various types of wastewater samples, such as influent and effluent wastewater from municipal and industrial wastewater treatment plants (WWTPs) and a potable water treatment plant. Although the analysis of these samples revealed the presence of up to 1500 $\mu\text{g/L}$ of certain primary amines in influent industrial wastewater, the concentration of these compounds in the effluent and in municipal and potable water was substantially lower, at low $\mu\text{g/L}$ levels. The new derivatization–HS-SPME–GC–IT–MS–MS method is suitable for the

fast, reliable and inexpensive determination of primary amines in wastewater in an automated procedure.

Keywords: *aliphatic primary amines, derivatization, solid-phase microextraction, GC-IT-MS-MS, industrial and municipal wastewater, central composite design*

INTRODUCTION

Aliphatic primary amines such as methylamine, ethylamine, nbutylamine and cyclohexylamine are important intermediates in the production of dyestuffs, pharmaceuticals, corrosion inhibitors and polymers [1–6]. Some aliphatic amines are produced in quantities of more than one million tons per year in Western Europe [7]. In addition to their industrial applications, amines may occur as biodegradation products of proteins and aminoacids or other nitrogen-containing compounds [6,8,9]. Most of them are toxic, sensitizers and irritants to the skin, mucous membranes and the respiratory tract [10,11]. Moreover, aliphatic amines can react with nitrite, forming carcinogenic nitrosamines [3,4,12]. Amines may cause environmental contamination and have been detected in biological fluids and environmental samples, usually at trace levels [5]. Their determination is important in the chemical and pharmaceutical industries [13,14] and they have often been found in foods [9,15] and wines [8]. Even though amine content in water is not currently regulated, European legislation establishes content values

of 0.5 and 1 mg/L for ammonium and Kjeldahl nitrogen for consumption water, respectively, and between 15 and 85 mg/L for wastewater [3]. Up to now, little information has been available on the occurrence of aliphatic amines in wastewater and surface water. Some researchers have detected aliphatic amines at the ng/L to µg/L levels in river water [6], in lake water [4] and in wastewater samples [1,12,13].

Analysis of aliphatic amines in aqueous samples has traditionally been difficult due to the particular physicochemical properties of aliphatic amines, such as high volatility and polarity, basic character and high solubility in water [1,12]. The most widely used techniques for determining amines in water samples are gas chromatography (GC) and liquid chromatography (LC). GC analysis is often problematic because of the high polarity of amines and their hydrogen-bonding properties, which result in tailing peaks and memory effects [4]. Furthermore, aliphatic amines exhibit poor chromatographic performance and do not have any structural features that could allow their detection without derivatization. They undergo α -

cleavage, usually resulting in a base peak at m/z 30 ($\text{CH}_2=\text{NH}_2^+$) that provides little scope for confirmation of identity or quantification through selected ion monitoring (SIM) [2]. LC analysis is also difficult due to the low absorptivity of aliphatic amines in UV-vis and also because they do not have fluorescent properties. In order to improve the properties of amines, several GC and HPLC methods have been developed that involve a derivatization step prior to chromatographic analysis [1,3]. Derivatization reactions of amines have been reviewed by Kataoka [16], and derivatization with pentafluorobenzoyl chloride or pentafluorobenzaldehyde (PFBAY) followed by GC is often preferred over LC in environmental samples due to its superior selectivity and sensitivity [5,13,16–18]. In conventional methods, liquid-liquid extraction (LLE) [1,6,19] and solid-phase extraction (SPE) [2,3,15,20] are often used to isolate and preconcentrate aliphatic amines from aqueous phase into organic phase prior to or following derivatization. Solid-phase microextraction (SPME), developed in the early 1990s by Pawliszyn *et al.* [21] is uniquely capable of incorporating extraction and concentration in a single step. The technique offers many advantages: it is a solvent free and efficient technique, it has a high concentrating efficiency, it is simple to perform and it is easy to automate [4,7–9,11–13,21,22].

The main aim of this study was to develop a rapid, automated and sensitive method that could be applied to potable, municipal and industrial wastewater samples from various wastewater treatment plants (WWTPs) in order to determine ten primary amines. This paper presents an analytical procedure that enables the precise determination of amines using simultaneous derivatization with PFBAY and HS-SPME followed by separation and detection by gas chromatography coupled with an ion trap tandem-in-time mass spectrometry detection system (GC-IT-MS-MS). IT-MS-MS was selected as the detector because of its ability to perform simultaneous quantitative analysis and characterization of trace level compounds, and because the use of MS-MS detection, rather than single MS, was expected to increase the selectivity of the determinations for complex matrices such as wastewater samples. This study showed, for the first time, the determination of primary amines at ng/L levels in various types of wastewater by means of fully automated derivatization-HS-SPME-GC-IT-MS-MS. The influence of various parameters on the efficiency of the derivatization and of SPME is described in detail and optimized by a central composite design, and the method's performance is compared to that of previously reported methods.

EXPERIMENTAL

Reagents and solutions

Methylamine (MA) (40 wt.% in H₂O), ethylamine (EA) (70 wt.% in H₂O), isopropylamine (IPA), isobutylamine (IBA), n-butylamine (BA), isoamylamine (IAA), amylamine (AA), n-heptylamine (HA), 2-phenylethylamine (PEA), cyclohexylamine (CA), methyl-d₃-amine hydrochloride (dMA) that was chosen as a surrogate standard, 2,3,4,5,6-pentafluorobenzaldehyde (PFBAY) that was the derivatization reagent and sodium chloride were supplied by Aldrich (Steinheim, Germany). The purity of all standards was greater than 98%. Sodium hydroxide and hydrochloric acid were obtained from Scharlau Chemie (Barcelona, Spain). Acetonitrile and ethyl acetate were purchased from SDS (Peypin, France) and were HPLC grade. Ultrapure water was obtained using a Milli-Q purification system (18.2M Ω cm) (Millipore, Bedford, MA, USA).

Individual stock standard solutions of each aliphatic amine and PFBAY solution were prepared in acetonitrile at a concentration of 2000 mg/L. A stock standard solution of dMA at 2000 mg/L was prepared in pure water and acetonitrile (1:1). The working mixed solution of 1 mg/L was prepared weekly by diluting different amounts of each stock standard solution with acetonitrile.

All solutions were stored in darkness at 4 °C.

Instrumentation

GC-MS analysis were performed using a Varian 3800 gas chromatograph (Varian, Walnut Creek, CA, USA) connected to a Varian 4000 ion trap mass detector. The GC was equipped with a 1079 programmable vaporizing temperature (PTV) injector, a Merlin high-pressure microseal and a 0.8 mm i.d. insert liner (Varian). A fused silica capillary column (3 m x 0.25 mm i.d.) from Supelco (Bellefonte, PA, USA) was used as a guard column connected to a ZB-5 analytical column (30 m x 0.25 mm i.d.; 0.25 μ m film thickness) from Torrance (CA, USA). Helium (99.9999%) from Carbueros Metálicos (Tarragona, Spain) was used as a carrier and collision gas at a flow rate of 1 mL/min. Varian Workstation software was used for instrument control and data processing.

The 85 μ m polyacrylate (PA) and 60 μ m polyethyleneglycol (PEG) fibers used in this study were purchased from Supelco. The fibers were conditioned prior to use according to the supplier's instructions by inserting them into the GC injector.

In the derivatization and HS-SPME optimization, the experimental design matrix and data analysis were performed using the Statgraphics statistical computer package

"Statgraphics Plus 5.1" (Manugistics, Inc., Rockville, MD, USA). A CombiPAL autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) was used for the derivatization and extraction.

Analytical methods

Optimization of chromatographic separation

We optimized the chromatographic separation of the compound derivatives by following previous studies [8,13]. Thus, each compound, including the

surrogate, was individually derivatized by adding 50 μL of amine (2000 mg/L) and 75 μL of PFBAY (2000 mg/L) in a 20 mL vial that had previously been filled with 10 mL of Milli-Q water at pH 12 adjusted with NaOH (1 M). A stir bar was added and the vial was then sealed and placed in a water bath at 80 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min. The mixture was then cooled to room temperature and 2 mL of ethyl acetate was added to the vial in order to extract the derivatives by LLE. Finally, 1 μL of the ethyl acetate extract was injected into the GC.

Table 1. Retention time and MS-MS parameters for the studied primary amines using the proposed method.

Segment	Compound	Retention time (min)	Parent ion (<i>m/z</i>)	<i>m/z</i> range	CID parameters		Product ions ^a (<i>m/z</i>)
					Storage level (<i>m/z</i>)	Amplitude (V)	
1	dMA ^b	3.67	211	81-221	80.2	1.2	190, 183 , 161
	MA	3.66	208	81-218	80.2	1.2	188, 181 , 158
2	EA	4.12	208	80-218	80.2	71	181 , 161, 158
	IPA	4.29	222	86-232	85.6	78	181 , 145 , 175
3	IBA	5.04	208	80-218	80.2	72	181 , 161, 158
	BA	5.31	208	80-218	80.2	72	188, 181 , 158
	IAA	5.64	208	80-218	80.2	72	181 , 158
	AA	5.82	250	96-260	96.4	79	187 , 181
4	CA	6.52	248	96-258	95.6	88	233, 228, 181 , 151
5	HA	6.73	250	96-260	96.4	80	207, 187 , 181
6	PEA	7.44	208	80-218	80.2	70	181 , 158

^a Quantification ions (*m/z*) are shown in bold type.

^b Surrogate standard.

The injector temperature was set at 250 °C and the analyses were done in splitless mode. The column oven was programmed as follows: the temperature was initially set at 60 °C, was increased by 20 °C/min to 135 °C, was then increased by 30 °C/min to 290 °C, and was held for 1.08 min. The total run time was just 10 min. The transfer line, manifold and trap temperatures were 280, 60 and 240 °C, respectively. A filament-multiplier delay of 3.40 min was established in order to prevent instrument damage. The analytes were ionized by electron impact (70 eV). The MS–MS process was carried out by collision-induced dissociation (CID) with resonant or non-resonant excitation, depending on the compound, since the response obtained was adequate and more reproducible. Table 1 shows the optimal MS–MS parameters for each compound.

Derivatization and headspace solid-phase microextraction (HS-SPME)

PA and PEG fibers were thermally conditioned in accordance with the manufacturer's recommendations by inserting them into the GC injector port. The used fibers were cleaned by heating them at 250 °C for 10 min prior to extraction, and a blank test was performed to check for possible carry-over. The entirely automated extractions were performed by a commercial autosampler CombiPAL commercial autosampler mounted on the GC–MS system.

Standards and filtered water samples were adjusted to pH 12 by the dropwise addition of NaOH (1 M). Since some precipitate substances appeared, the samples were filtered again through a 0.45 µm nylon membrane filter (Whatman, Maidstone, UK). Of these filtered water samples, 10 mL was poured into 20 mL headspace vials containing 3.6 g of sodium chloride and a magnetic stirring bar. dMA (100 µL of 1 mg/L) was added to the sample as a surrogate and PFBAY was then added to the vial as a derivatization reagent (200 µL of 2000 mg/L). The vial was immediately sealed tightly using a screw cap with a PTFE silicone-faced septum and placed in the tray for SPME. When the temperature of the heat/stir accessory reached 40 °C, the vial was automatically transported there and was stabilized for 1 min. The fiber was then introduced through the septum and kept in the headspace of the vial for 15 min at 40 °C. During the extraction, the sample was magnetically stirred at 750 rpm. Subsequently, the fiber was withdrawn into the SPME syringe needle, which was then pulled out of the sample vial and immediately inserted into the GC injection port for desorption. The desorption was conducted at 250 °C for 8 min. Finally, the compound derivatives were analysed by GC–MS at the same conditions described in Section 2.3.1.

Sampling

Several types of wastewater samples were collected from three different industrial wastewater plants (A, B and C), from a municipal wastewater plant (D), and from a potable water plant (E), all located on the outskirts of Tarragona (Spain). These waters had different origins and matrix complexities and had also undergone different treatment processes, such as conventional activated sludge (CAS) treatment or membrane bioreactor (MBR) treatment. For each sample, 500 mL was put in a glass bottle, acidified with hydrochloric acid (pH 3), filtered through a 0.45 μm nylon filter (Whatman, Maidstone, UK) and stored at 4 °C until analysis.

The industrial WWTP A is a CAS treatment plant that treats a mixture of wastewater from three different chemical plants that make products of various types, such as surfactants, vinyl acetate and plastics (isocyanides, polyurethanes and ABS). The industrial WWTP B is an MBR treatment plant that uses ultrafiltration membranes to treat wastewater from industrial plants of all sorts. The industrial WWTP C is an MBR treatment plant that uses ultrafiltration membranes to treat wastewater from the distillation of used oil. The municipal WWTP D is a CAS treatment plant that uses reverse osmosis after secondary treatment. It treats water from a population of approximately 35,000 inhabitants. The potable water plant E is a CAS

treatment plant that uses carbon filters in the last process to obtain a high-quality effluent. Samples were taken from the influent of the biological reactor (of the CAS and MBR plants) and from the effluent (treated water from the secondary treatment) of each WWTP and from the potable water plant. In WWTP D, samples were also taken from the permeate of the reverse osmosis membranes.

RESULTS AND DISCUSSION

GC-MS-MS optimization

Derivatization with PFBAY and LLE with ethyl acetate was performed for each compound as explained in Section 2.3.1 in order to identify the derivatives and then optimize their separation. The derivatives were identified by MS operating in full-scan mode in the range of 50–500 m/z . The mass spectra of the PFBAY-imine-derivatives showed typical fragment ions at m/z 208 and 181. The m/z 181 ion corresponds to the fragment $[\text{CH}-\text{C}_6\text{F}_5]^+$. When the aliphatic amine was unsubstituted in the α -position, we observed an m/z 208 product fragmentation ion, which in most cases was the base peak ion. This ion was one of the typical α -cleavage product ions, and it corresponded to $[\text{CH}_2-\text{N}=\text{CH}-\text{C}_6\text{F}_5]^+$ [8,13]. This ion was observed in all cases except for DMA, IPA and CA. The base peak of DMA was m/z 211. This agreed with the molecular structure of the compound, which has three

deuterated protons. The other amines substituted in the α -position, IPA and CA, did not have the m/z 208 ion, but in the case of IPA we observed the m/z 222 base peak ion corresponding to the loss of a methyl group, $[M-CH_3]^+$, and in the case of CA, we observed the m/z 248 base peak ion, corresponding to the loss of an ethyl group, $[M-C_2H_5]^+$. AA and HA had m/z 250 as a base peak the ion, corresponding to the loss of a propyl group, $[M-C_3H_7]^+$.

Once all the derivatives were identified, a standard mixed solution including each amine and the DMA was derivatized and extracted with ethyl acetate to optimize the chromatographic separation. All derivatives were separated in just 10 min using the chromatographic conditions described in Section 2.3.1.

In order to maximize the sensitivity of each compound, MS–MS optimization was performed, taking as a precursor ion the most abundant one that was selective enough. Table 1 shows that the parent ion selected in most of the cases were m/z 208. The MS–MS was optimized for each compound in order to select an amplitude excitation voltage able to give the maximum abundance of one of the products ions (100%) and a relative abundance of the parent ion between 10 and 20%. The isolation window of the parent ions of DMA and MA was 2 m/z units; for the parent ions of the rest of the compounds, we used an isolation window of 3 m/z units. The parent

ions were submitted to CID in resonant mode for DMA and MA and in non-resonant mode for the rest of the derivatives. The most abundant product ion found in most of the derivatives was m/z 181, which points to the fragment $[CH-C_6F_5]^+$.

Section 2.3.1 describes the optimal chromatographic conditions, and Table 1 summarizes the retention time and the MS–MS parameters used for each compound (segment, parent ion, CID parameters, m/z range and product ions).

Derivatization and HS-SPME optimization

One objective of this study was to select the best conditions for the simultaneous derivatization and HS-SPME of primary amines from aqueous samples. The performance of microextraction methods, particularly when they also involve a derivatization stage, is potentially affected by many factors. In order to optimize the method, we considered some of the optimal values reported by researchers in previous studies as initial derivatization and headspace microextraction conditions [8,13].

Since primary aliphatic amines and their imine-derivates are polar and hydrophilic compounds, according to the rule 'like dissolves like', polar fibers are preferred. Two types of polar fibers were selected to optimize the extraction: 85 μ m PA and 60 μ m PEG. PA had been tested by other

researchers for the extraction of some of the analytes obtaining good results [13], and PEG is a relatively new coating fiber that has been used to extract moderately and highly polar analytes (aldehydes, ketones, aromatic amines, phenols, alcohols and acids) [23] but to our knowledge has never been tested for the extraction of aliphatic amines. Since PA and PEG fibers have different structures and could therefore be affected differently by some variables, we optimized the extraction of each type of fiber individually. For each type of fiber we had some fixed variables and some variables to optimize. We first fixed the experimental variables that are best established in the literature, such as the sample pH, the derivatizing reagent (PFBAY) concentration, the sample agitation, the extraction mode (direct extraction or headspace extraction), the desorption temperature, and the desorption time. Afterwards, using an experimental design, we optimized the variables that are the most relevant: the fiber coating, the derivatization and extraction temperature, the derivatization and extraction time and the salt concentration. We considered the derivatization and extraction temperature and the time of derivatization and extraction as a single global factor to optimize in each case. A central composite design, which is probably the most widely used experimental design for fitting second-order response surfaces, was used to obtain the optimal conditions for each type of fiber.

Amines are bases that are easily protonated by water. To perform derivatization with PFBAY, in the first step of the reaction in water to produce the imine-derivates, the analytes must be in their non-ionic form in order to prevent their protonation. The required pH conditions depended on the pka values of the protonated conjugated acidic form of the amines. In the studied amines, this value was around 10.6 [13]. We therefore fixed the pH of the samples at 12 by adding NaOH (1 M). Some researchers have tested pH conditions for the derivatization step and observed at excessively high pH (13.5) PFBAY degraded to a geminal diol, which prevents its reaction with amines [8]. The concentration of the derivatization reagent (PFBAY) must be taken into account in the derivatization reaction. PFBAY must be present in greater quantities than the amines in order to have high reaction efficiencies. Since 10 µg/L of amines in 10mL water was used for optimization, 40 mg/L of PFBAY was used. Agitation has a strong effect on SPME kinetics and speeds up the equilibrium process, and for a given extraction time, responses are higher with agitation than without it. In our studies, we stirred the samples at the CombiPAL autosampler accessory's maximum available speed, which was 750 rpm. It was possible to use direct or headspace sampling for the analysis of the imine-derivates; headspace extraction was selected because derivatization produces highly volatile imines and,

furthermore, headspace mode is preferred with high-complexity samples such as wastewater, specifically industrial wastewater. The desorption temperature in the GC injector must be high enough to desorb all of the imine-derivates, but the stability and lifetime of the fiber must also be considered. We took into account the temperatures recommended by the supplier of the fibers and selected 250 °C. The desorption time was set at 8 min in each case in order to avoid possible injector contamination and carry-over effects.

Optimization by a central composite design

The factors selected for each type of fiber (PA and PEG) as potentially affecting the derivatization and extraction were derivatization and

extraction temperature, derivatization and extraction time, and salt concentration. In order to study the effect of these three factors, a central composite design (with $\alpha = 1.67$) was created in three orthogonal blocks using surface response. The Statgraphics statistical package was used to generate the experimental matrix and calculate the standardized main effects of the factors considered. The design involved 17 experiments, which were performed in random order in order to protect against the effects of lurking variables. Table 2 shows the values corresponding to the low (-1), high (+1) and centre (0) values for each factor. The individual chromatographic peak area of each derivatized compound was regarded as an experimental response for optimizing. Pareto charts were used to identify the most influential factors.

Table 2. Factor levels of the experimental design.

Variable	Low (-1)	High (+1)	Centre (0)
Extraction temperature (°C)	40	80	60
Extraction time (min)	15	60	37,5
Salt concentration (g/L NaCl)	0	360	180

The data obtained in each central composite design were evaluated by ANOVA at the 5% significance level. These results are shown in bar chart format, with the effects sorted in rank order. For instance, Fig. 1 shows the Pareto chart for the area of butylamine derivatized and extracted using PA

fiber. The information shown is similar to that in the Pareto chart for other compounds, and also using PEG fiber. In most cases, temperature was the most important parameter in the derivatization and extraction of the compounds. The chromatographic areas were largest when the

temperature was at the lowest level (40 °C). The NaCl concentration was the second most important parameter in seven of ten compounds, and the areas were largest when the NaCl concentration was at its highest level (360 g/L NaCl). Time was the least influential factor, and the areas were largest when time was at its lowest level (15 min). These results agree with the fact that the derivatization reaction can proceed rapidly in aqueous solution at room temperature and provide good yields [5,16]. Furthermore, high temperatures could result from a lesser affinity between the fiber and the analytes in the headspace. The results obtained for NaCl concentration were also

expected, since salt addition increases extraction efficiency, especially for polar and volatile compounds, such as aliphatic amines. For instance, Fig. 2 shows the response surface graph obtained by plotting derivatization and extraction temperature versus NaCl concentration for a derivatization and extraction time of 37.5 min for butylamine derivatized using PA fiber. The largest areas are found for 40 °C and 360 g/L NaCl. Comparing the best conditions obtained for PA and PEG fibers in each compound (40 °C, 15 min and 360 g/L NaCl), larger response areas were obtained using the PA fiber in all cases (see Fig. 3). PA fiber was therefore used in further experiments.

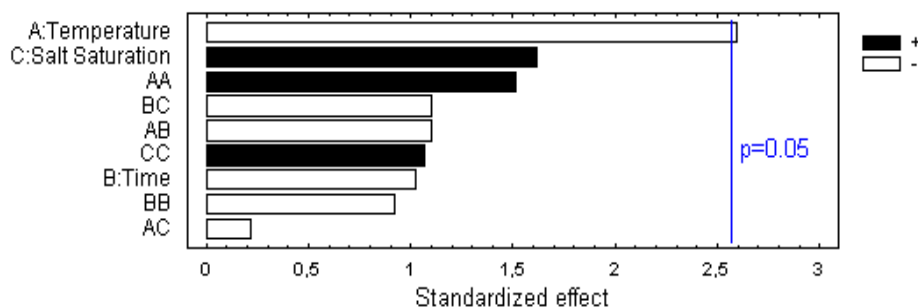


Figure 1. Standardized Pareto chart of the main effects in the central composite design for BA using PA fiber. The line represents the significant limit.

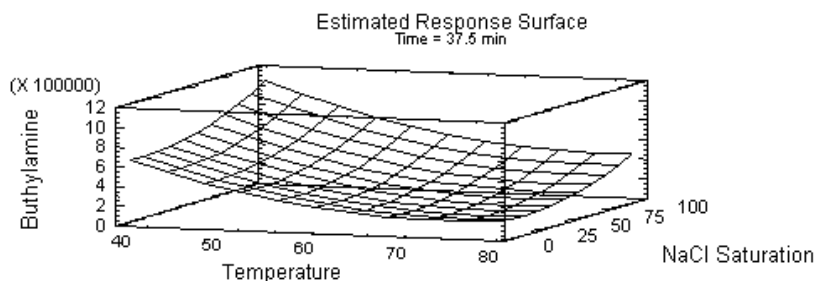


Figure 2. Estimated response surface for BA obtained using the central composite design by plotting derivatization and extraction temperature versus the NaCl concentration in PA fiber.

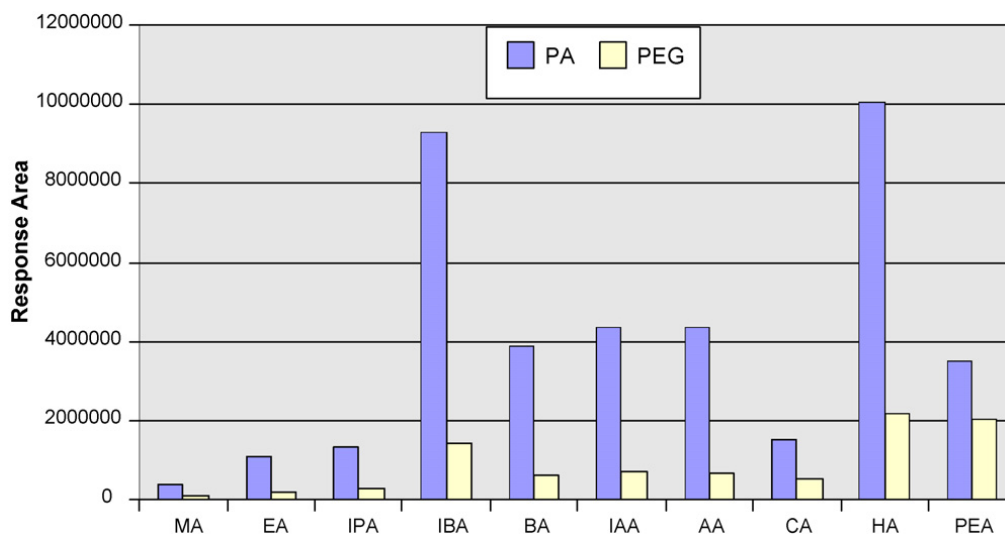


Figure 3. Comparison of the PA and PEG fibers in the extraction of 10 µg/L of each amine as its PFBAY-imine under the optimal conditions.

Method Validation

The analytical validation of the simultaneous derivatization and HS-SPME-GC-MS-MS method for the analysis of water samples was performed by establishing linear range, repeatability, reproducibility between days, and detection and quantification limits using secondary effluent from municipal WWTP samples as blanks.

In order to improve the reproducibility of the method, the linear range was obtained by analysing spiked concentrations ranging from 0.025 to 20 µg/L of amines and using 10 µg/L of DMA as an internal standard. Five blanks were analysed and the averaged peak area of each compound was subtracted

from the peak area of each spiked analysis. The calibration curves by internal standard were linear, with correlation coefficients (R^2) higher than 0.992 for all target compounds (Table 3). The intra-day (repeatability) and inter-day (reproducibility) precision of the method were determined by means of five determinations of the secondary effluent WWTP wastewater samples spiked at the same concentration (1 µg/L). Table 3 shows that the relative standard deviations (RSDs) for intra-day precision ranged from 2 to 7% whereas the RSD values for inter-day precision ranged from 5 to 12%. The limits of detection (LODs) of the method were defined for a signal-to-noise ratio of 3 for all compounds and ranged from 10 to 100 ng/L. The LOD of cyclohexylamine was one order of magnitude higher than that of the

other compounds (2500 ng/L). The limits of quantification (LOQs), calculated as the concentration of the lowest point of the calibration curve, ranged from 0.025 to 7.5 µg/L. The LODs and LOQs obtained in our study were comparable to and slightly better than those obtained in other studies determining only some of the studied amines and using different

detection systems or different extraction techniques, such as gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID) and liquid-phase microextraction (LPME) [5,13]. It should be noted that we included a larger number of compounds and used MS-MS detection, which allowed a more accurate identification of compounds.

Table 3. Method linear ranges, correlation coefficients (R^2), LODs, LOQs, repeatability and reproducibility between days (% RSD). See text for other conditions.

	Linear range (µg/L)	R^2	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Repeatability ^a (% RSD)	Reproducibility ^a (% RSD)
Methylamine	0.025 – 20.0	0.998	10	25	3	7
Ethylamine	0.050 – 17.5	0.994	10	50	5	11
Isopropylamine	0.100 – 5.0	0.993	25	100	4	9
Isobutylamine	0.025 – 10.0	0.997	10	25	3	7
Butylamine	0.025 – 20.0	0.995	10	25	2	6
Isoamylamine	0.200 – 20.0	0.998	50	200	3	5
Amylamine	0.750 – 20.0	0.998	100	750	6	10
Cyclohexylamine	7.500 – 20.0	0.993	2500	7500	7	11
Heptylamine	0.200 – 17.5	0.997	100	200	2	5
2-Phenylethylamine	0.025 – 20.0	0.996	10	25	6	10

^a n=5; 1 µg/L

Method application

The developed method was used to determine the primary amines in wastewater samples collected from several WWTPs and a potable water plant (see Section 2.4). During the analysis of the industrial wastewater samples, a strong matrix effect was observed. The analysis showed that the most complex samples (industrial wastewater) affected the measured

peak area of the internal standard (dMA). In fact, the peak size of the internal standard decreased when the complexity of the samples increased, because the derivatization and extraction processes were influenced by the constituents present in the medium. Thus, the quantification of primary amines by derivatization and HS-SPME turned out to be highly dependent on the composition of the matrix. In order to overcome this difficulty in relatively complex

matrices, we diluted the samples and quantified primary amines according to the method of standard addition. For the quantification of each compound, a calibration curve was constructed using least-square linear regression of standard solutions of primary amines to the internal

standard. As an example, Fig. 4 shows the derivatization-HS-SPME-GC-MS-MS chromatograms of the primary amines of a non-spiked effluent sample from industrial WWTP A. All compounds appeared in the sample at levels ranging from 0.20 to 25 $\mu\text{g/L}$.

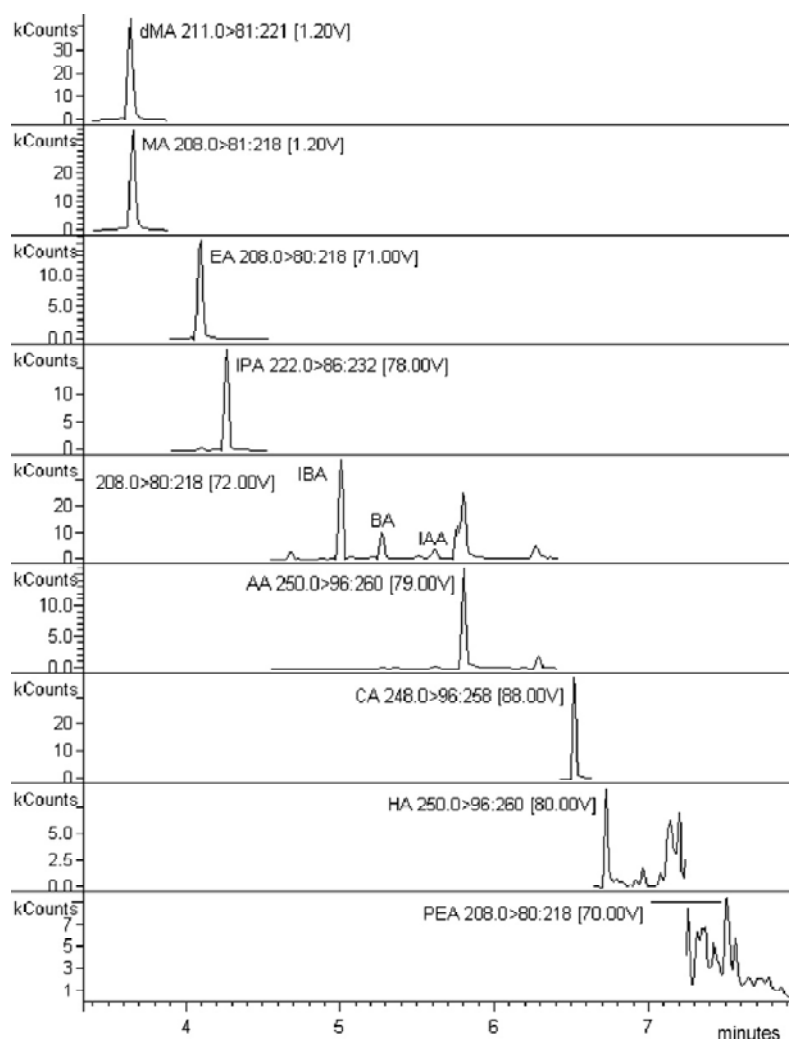


Figure 4. Derivatization-HS-SPME-GC-MS/MS chromatograms of primary amines of a non-spiked effluent industrial WWTP A sample. Spiked DMA concentration at 20 $\mu\text{g/L}$. Extraction conditions: PA fiber, 40 $^{\circ}\text{C}$, 15 min, 360 g/L of NaCl.

Table 4. Concentration ($\mu\text{g/L}$) of primary amines in the analysis of wastewater ($n=3$, $\text{RSD} < 12\%$).

Compound	WWTP A		WWTP B		WWTP C		WWTP D		Potable waterplant E		
	Influent	Effluent	Influent	Effluent	Influent	Effluent	Influent	Effluent	Influent	Effluent	
Methylamine	94	25	35	29	51	192	28	1.8	0.43	1.2	0.28
Ethylamine	9.6	2.2	36	10	180	36	4.1	0.47	0.52	0.24	0.30
Isopropylamine	3.2	3.5	20	11	45	5.8	2.3	0.54	1.8	1.7	0.30
Isobutylamine	150C	0.88	5.5	1.3	66	3.4	3.5	0.61	0.18	0.57	0.12
Butylamine	5.4	0.29	0.99	1.5	97	9.6	0.43	0.07	0.14	0.95	0.33
Isocetylamine	2.1	0.20	4.7	1.9	45	2.3	4.5	0.64	0.42	n.q.	n.q.
Amylamine	1.2	2.0	n.q.	n.q.	37	2.1	n.q.	n.q.	n.q.	n.d.	n.q.
Cyclohexylamine	150C	13	17	28	43	82	12	13	n.d.	n.d.	n.d.
Heptylamine	1.2	0.32	0.37	0.26	2.2	0.98	n.q.	n.q.	n.d.	n.d.	n.d.
2-Phenylethylamine	2.9	0.40	0.90	0.60	2.6	0.45	1.5	0.13	n.q.	n.d.	0.03

n.d.: not detected; n.q.: not quantified

Table 4 shows the results of the average concentrations of the studied compounds found in each type of sample ($n = 3$). As expected, the levels of most of the compounds were higher for the samples from WWTPs A, B and C (industrial wastewater) than for the samples from WWTP D (municipal wastewater) and potable water plant E. The concentrations of IBA and CA in the influent of WWTP A stand out for their high values, around 1500 $\mu\text{g/L}$. These values were expected because one of the industries that sends its water to WWTP A uses these compounds to make its products. For the same sample origin, the effluent did not correspond exactly to the treated influent because of differences in hydraulic retention time. Therefore, we were unable to perform a strict comparison between influent and effluent concentrations, but instead only make a comparison in general terms. In most cases, the amine concentration was higher in the influent than in the effluent. Thus, it seems that the treatment processes causes a partial reduction in these compounds.

Studies found in the literature have determined different levels of certain primary amines in industrial wastewater. Sacher *et al.* [1] determined MA, EA and BA at concentrations ranging from 1 to 30 $\mu\text{g/L}$ in industrial wastewater and Pan *et al.* [13] detected the presence of 700 $\mu\text{g/L}$ of MA in similar samples. Our results agree with those already mentioned. In river water, Akyüz *et al.*

[6] detected MA, EA, BA and PEA concentrations ranging from 0.26 to 83.02 ng/L . No information about potable water was found in the literature.

CONCLUSIONS

The fully automated derivatization–HS–SPME–GC–IT–MS–MS method was shown to be fast, simple, sensitive and suitable for determining ten primary amines in wastewater at ng/L levels. Simultaneous derivatization was done with PFBAY without using any organic solvent.

The most important parameters involved in the derivatization and extraction processes were evaluated using a central composite design. Under optimized conditions, derivatization and extraction were performed with a PA fiber in headspace mode at 40 °C for 15 min in the presence of 360 g/L sodium chloride.

The proposed method avoids the use of organic solvents, achieves low LODs between 10 and 100 ng/L (except for cyclohexylamine), and offers satisfactory precision (RSD $\leq 11\%$). In addition, the entire analytical process, including sample preparation and determination, is fully automated and performed in less than 30 min, which enables high sample throughput. Moreover, the use of MS–MS rather than single MS detection provides high selectivity for

the determination of primary amines in very complex matrices such as industrial wastewater samples.

Several wastewater samples, including industrial wastewater, municipal wastewater and potable water, were analysed in order to assess the applicability of the method. Although no matrix effects were observed for the less complex samples and an internal standard calibration curve was calculated, the industrial wastewater samples showed matrix effects. As a result, quantification had to be performed using standard addition. Most of the studied compounds were found in the influent and the effluent of the three industrial WWTPs at concentrations ranging from 0.20 to 1500 µg/L. In the influent and effluent municipal WWTP the amine concentrations of the detected compounds were lower, ranging from 0.07 to 28 µg/L, and even more lower in the influent and effluent of the potable water plant, ranging from 0.03 to 1.7 µg/L.

Acknowledgements

The authors wish to thank the personnel of the various water treatment plants for their cooperation in all aspects of this study. This study was financially supported by the Directorate-General for Research of the Spanish Ministry of Science and Technology, projects CTM2008-06847-C02-01/TECNO and PET2006-0706-01. A. Llop gratefully acknowledges the financial support of the Department of

Innovation, Universities and Enterprise of the Catalan Government, as well as the European Social Fund (2007 FI00026).

REFERENCES

- [1] F. Sacher, S. Lenz, H.J. Brauch, J. Chromatogr. A 764 (1997) 85.
- [2] S. Mishra, V. Singh, A. Jain, K.K. Verma, Analyst 126 (2001) 1663.
- [3] S. Meseguer, C. Molins, P. Campins, J. Chromatogr. A 978 (2002) 59.
- [4] L. Cai, Y. Zhao, S. Gong, L. Dong, C. Wu, Chromatographia 58 (2003) 615.
- [5] K.J. Chia, S.D. Huang, J. Chromatogr. A 1103 (2006) 158.
- [6] M. Akyüz, S. Ata, J. Chromatogr. A 1129 (2006) 88.
- [7] E. Baltussen, F. David, P. Sandra, H.-G. Janseen, C. Cramers, J. High Resol. Chromatogr. 21 (1998) 645.
- [8] K.K. Ngim, S.E. Ebeler, M.E. Lew, D.G. Crosby, J.W. Wong, J. Agric. Food. Chem. 48 (2000) 3311.
- [9] S.T. Chan, M.W.Y. Yao, Y.C. Wong, T. Wong, C.S. Molik, D.W.M. Sin, Eur. Food Res. Technol. 224 (2006) 67.
- [10] H. Greim, D. Bury, H.J. Klimisch, M. Oeben-Negele, K. Ziegler-Skylakakis, Chemosphere 36 (1998) 271.
- [11] Y.Y. Zhao, L.S. Cai, Z.Z. Jing, H. Wang, J.X. Yu, H.S. Zhang, J. Chromatogr. A 1021 (2003) 175.
- [12] M. Ábalos, J.M. Bayona, F. Ventura, Anal. Chem. 71 (1999) 3531.

- [13] L. Pan, J.M. Chong, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 773 (1997) 249.
- [14] P. Kusch, G. Knupp, M. Hergarten, M. Kozupa, M. Majchrzak, *J. Chromatogr. A* 1113 (2006) 198.
- [15] C. Molins-Legua, P. Campins-Falcó, *Anal. Chim. Acta* 546 (2005) 206.
- [16] H. Kataoka, *J. Chromatogr. A* 733 (1996) 19.
- [17] C. Deng, N. Li, L. Wang, X. Zhang, *J. Chromatogr. A* 1131 (2006) 45.
- [18] H. Lin, C. Deng, X. Zhang, *J. Sep. Sci.* 3225 (2008) 31.
- [19] M.-J. Paik, Y. Choi, K.-R. Kim, *Anal. Chim. Acta* 560 (2006) 218.
- [20] P. Kusch, G. Knupp, M. Hergarten, M. Kozupa, M. Majchrzak, *J. Chromatogr. A* 1113 (2006) 198.
- [21] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145.
- [22] R. Herráez-Hernández, C. Cháfer-Pericás, J. Verdú-Andrés, P. Campins-Falcó, *J. Chromatogr. A* 1104 (2006) 40.
- [23] S. Kulkarni, A.M. Shearrow, A. Malik, *J. Chromatogr. A* 1174 (2007) 50.

**3.2.2. Fully automated determination of *N*-Nitrosamines in
environmental waters by headspace solid-phase
microextraction followed by GC-MS-MS**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013



FULLY AUTOMATED DETERMINATION OF
N-NITROSAMINES IN ENVIRONMENTAL WATERS BY
HEADSPACE SOLID-PHASE MICROEXTRACTION
FOLLOWED BY GC-MS-MS

Anna Llop, Francesc Borrull and Eva Pocurull

Departament de Química Analítica i Química Orgànica. Universitat Rovira i Virgili
Marcel·lí Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain

Abstract

A fully automated method for determining nine Environmental Protection Agency *N*-nitrosamines in several types of environmental waters at ng/L levels is presented. The method is based on a headspace solid-phase microextraction followed by GC-MS-MS using chemical ionization. Three different fibers (carboxen/PDMS, divinylbenzene/carboxen/PDMS, and PEG) were tested. Solid-phase microextraction conditions were best when a divinylbenzene/carboxen/PDMS fiber was exposed for 60 min in the headspace of 10 mL water samples at pH 7 containing 360 g/L of NaCl, at 45 °C. All compounds were analyzed by GC-MS-MS within 18 min. The method was validated using effluent from an urban wastewater treatment plant and the LODs ranged from 1 to 5 ng/L. The method was then applied to determine the *N*-nitrosamines in samples of different complexities, such as tap water and several influent and effluent wastewater samples from urban and industrial wastewater treatment plants and a potable water treatment plant. Although the analysis of influent industrial wastewater revealed high concentrations of some compounds (*N*-nitrosomorpholine and *N*-nitrosodimethylamine at mg/L levels), in industrial effluents and other samples, the concentrations were substantially lower (ng/L levels). The new method is suitable for the simple and reliable determination of *N*-nitrosamines in highly complex water samples in a completely automated procedure.

Keywords: GC-MS-MS, *N*-nitrosamines, potable water, solid-phase microextraction, wastewater

INTRODUCTION

N-Nitrosamines, especially *N*-Nitrosodimethylamine (NDMA), are a group of compounds derived from amines that can have mutagenic, teratogenic, and carcinogenic effects in humans and a wide variety of animals [1]. They have been found in many food products [2], beer [3], cosmetics [4, 5], tobacco smoke [6], soils [7], water from chlorinated swimming pools [8], wastewater, treated wastewater, groundwater, and drinking water [8, 9]. Polymers, plasticisers, batteries, rocket fuel (incomplete oxidation of hydrazines), and other industrial products are the main anthropogenic sources of the *N*-nitrosamines [10]. They are usually formed by nitrosation or oxidation reactions of amine precursors [11, 12] but can also be generated in water and wastewater treatment systems by chlorine-based disinfection processes, making them an important group of potentially hazardous disinfection by-products [10, 13–15]. The US Environmental Protection Agency (EPA) has classified *N*-nitrosamines in the B2 group as probable human carcinogens [16] and has also established ng/L control levels in drinking water [1, 8, 9]. As a result, the maximum admissible concentrations of selected *N*-nitrosamines in water at a risk estimation of 10^{-4} are 20, 70, 600, 2000, and 700,000 ng/L for *N*-nitrosodiethylamine, NDMA, *N*-nitrosodibutylamine, *N*-nitrosopyrrolidine, and *N*-

nitrosodiphenylamine, respectively [1, 17]. Several *N*-nitrosamines have been detected at concentrations between 1 and 2 orders of magnitude higher than their cancer risk levels in the effluents of water and wastewater treatment plants (WWTPs) [13, 18]. Studying the presence of these compounds in sewage, then, is of a great interest because treated water may be reused [14, 19].

Several techniques have been used for the analytical determination of *N*-nitrosamines, the most common of which are LC and GC. LC has been used with UV, fluorescence, MS, and MS–MS detection [20–22]. Although LC–MS–MS may also be applied to determine *N*-nitrosamines, the sensitivity for most compounds was lower than that of GC–MS–MS [21, 23]. GC is often the preferred choice as it provides good resolution and it is easy to couple with sensitive and selective detectors, such as thermal energy analysis, nitrogen-phosphorus, nitrogen chemiluminescence, and MS [24–26]. When GC–MS detection is used, the low molecular weight of *N*-nitrosamines makes them susceptible to chemical interferences with electron ionization [2, 18, 26], which leads to poor sensitivity and selectivity, because electron ionization is a hard ionization process and produces non-distinctive fragmentation patterns. This can be counteracted by using positive chemical ionization (CI) either with GC–MS or with GC–MS–MS, which is a softer ionization

process that produces less molecular fragmentation [18, 27].

Recent studies have shown that NDMA is generally present at 10 ng/L or less in chlorinated drinking water, but can be present at 100 ng/L or higher in wastewater treated with chlorine [8]. Therefore, *N*-nitrosamines need to be determined at low ng/L levels in water samples, especially drinking water, so enrichment techniques are mandatory. The most common preconcentrating techniques used are liquid–liquid extraction, which uses large amounts of organic solvents and is difficult to automate [28]; SPE with carbonaceous sorbents such as Ambersorb 572 and coconut charcoal [18, 27, 29, 30]; supercritical fluid extraction [31]; and solid-phase microextraction (SPME) [2, 26], which is a solvent-free technique that is simple to perform and easy to automate, among other advantages.

The main aim of this study was to develop a sensitive and fully automated method to determine nine *N*-nitrosamines in such aqueous samples of different matrix complexities as tap water, potable water, urban wastewater, and industrial wastewater from various WWTPs. The analytical method uses a headspace SPME followed by a GC–MS–MS detection system using CI (HS-SPME-GC–CI–MS–MS).

MATERIALS AND METHODS

Safety considerations

N-Nitrosamines are potential or actual carcinogens and must be handled with extreme care inside a fume hood with ventilation. They must not be inhaled or come into contact with the skin, and appropriate personal protective equipment must be used (latex gloves, lab coat, safety glasses).

Reagents and solutions

A standard solution containing 2000 mg/L of the nine *N*-nitrosamines in methanol was purchased by Sigma-Aldrich (Buchs SG, Switzerland) in the highest purity available (EPA 8270/Appendix IX Nitrosamine Mix Catalog No. 502138): NDMA, *N*-nitrosomethylethylamine (NMEA), -diethylamine (NDEA), -di-*n*-propylamine (NDPA), -morpholine (NMOR), -pyrrolidine (NPYR), -piperidine (NPIP), di-*n*-butylamine (NDBA), and di-*n*-phenylamine (NDPhA). Working standard solutions of analytes of 1 mg/L were prepared in methanol weekly. All solutions were stored in darkness in the freezer.

Methanol was purchased from SDS (Peypin, France) and was of GC grade. Sodium chloride was supplied by Sigma-Aldrich. Sodium hydroxide, hydrochloric acid, and acetic acid were obtained from Scharlau Chemie (Barcelona, Spain). Ultrapure water was obtained using a Milli-Q

purification system (18.2MOcm) (Millipore, Bedford, MA, USA).

Instrumentation

The GC–CI–MS–MS analyses were performed on a Varian 3800 gas chromatograph (Varian, Walnut Creek, CA, USA) connected to a Varian 4000 ion trap mass detector. The GC was equipped with a 1079 programmable vaporizing temperature injector and a 0.8mm id insert liner (Varian). A fused silica capillary column (3 m x 0.25 mm i.d.) from Supelco (Bellefonte, PA, USA) was used as a guard column connected to a ZB-5 analytical column (30 m x 0.25 mm i.d.; 0.25 mm film thickness) from Torrance (CA, USA). Helium (99.9999%) from Carbueros Metálicos (Tarragona, Spain) was used as a carrier and collision gas at a flow rate of 1 mL/min. Methanol was used as CI reagent. Varian MS Workstation software v.6.9 was used for instrument control and data processing.

A CombiPAL autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) was used for the fully automated HS-SPME. The SPME device and the three fibers tested for *N*-nitrosamine extraction – 50/30 mm divinylbenzene/carboxen/PDMS (DVB/CAR/PDMS), 85 mm carboxen/PDMS (CAR/PDMS), and 60 mm PEG – were obtained from Supelco. Before the initial application, fibers were conditioned according to

the supplier's instructions by being inserted into the GC injector.

A standard solution containing 2000 mg/L of the nine *N*-nitrosamines in methanol was purchased by Sigma-Aldrich (Buchs SG, Switzerland) in the highest purity available (EPA 8270/Appendix IX Nitrosamine Mix Catalog No. 502138): NDMA, *N*-nitrosomethylethylamine (NMEA), -diethylamine (NDEA), -di-n-propylamine (NDPA), -morpholine (NMOR), -pyrrolidine (NPYR), -piperidine (NPIP), di-n-butylamine (NDBA), and di-n-phenylamine (NDPhA). Working standard solutions of analytes of 1 mg/L were prepared in methanol weekly. All solutions were stored in darkness in the freezer.

Sample collection

Fourteen water samples were collected from tap water (A), influent and effluent water from various urban (B and C) and industrial (D, E and F) WWTPs, and influent and effluent water from a potable water plant (G). These waters had different origins and matrix complexities. For each sample, 500 mL was put in a glass bottle, filtered through a 0.45 mm nylon filter (Whatman, Maidstone, UK), acidified to pH 3 with acetic acid and stored at 4 °C until analysis.

All the urban and industrial wastewater samples were taken from the influent and the effluent of the secondary treatment. Moreover, in the urban WWTP B an additional sample

was taken from the effluent of the tertiary treatment based on reverse osmosis. Potable water plant samples were taken from the influent of the treatment plant and the effluent of the tertiary treatment based on activated carbon.

Analytical method

Standards and water samples were adjusted to pH 7 by the dropwise addition of NaOH (1 M). A total of 10 mL was poured into 20 mL HS vials containing 3.6 g of sodium chloride and a magnetic stirring bar. The vials were immediately sealed tight using a screw cap with a PTFE silicone-faced septum and placed in the tray for SPME. When the temperature of the heat/stir accessory reached 45 °C, the vials were automatically transported there and stabilized for 1 min. The DVB/CAR/PDMS fiber was then introduced through the septum and kept in the HS of the vial for 60 min at 45 °C. During the extraction, the sample was magnetically stirred at 750 rpm. Subsequently, the fiber was withdrawn into the SPME syringe needle, which was then pulled out of the sample vial and immediately inserted into the GC injection port for desorption. The desorption was conducted at 250 °C for 18 min and finally the compounds were analyzed by GC-CI-MS-MS.

The DVB/CAR/PDMS fibers were cleaned by heating at 250 °C for 10 min prior to extraction, and a blank test was performed to check for

possible carry-over. As has been mentioned, the entirely automated extractions were performed by a commercial CombiPAL autosampler mounted on the GC-MS system.

For the chromatographic analysis, the injector was operated in splitless mode at 250 °C. The oven temperature programme was as follows: 40 °C hold for 2.10 min, ramp to 100 °C at 25 °C/min, hold for 4.50 min, and then ramp to 280 °C at 20 °C/min hold for 2 min. All compounds were separated within 18 min. The transfer line, manifold and trap temperatures were 280, 60, and 200 °C, respectively. A filament-multiplier delay of 3 min was established in order to prevent instrument damage. The analytes were ionized by positive CI using methanol. The CI-MS-MS process was carried out by CID using a resonant waveform type. Table 1 summarizes the retention time and the optimal GC-CI-MS-MS parameters for each compound.

RESULTS AND DISCUSSION

GC-CI-MS-MS Optimization

A mixed solution of 2 mg/L of the nine *N*-nitrosamines was prepared in methanol and 1 mL of this solution was directly injected into the GC-MS, using a CI fragmentation in full scan mode. All the compounds were identified by their molecular weight and afterwards the chromatographic separation was optimized by testing several oven temperature programs.

All compounds were separated in just 18 min using the chromatographic conditions described in Section 2.5. Three of the compounds, NPYR, NDPA, and NMOR, coeluted, but since they had different molecular ions and fragments they could be quantified separately.

In order to achieve maximum sensitivity/selectivity of the compounds, the MS-MS method was carried out by selecting appropriate precursor/product ions and then optimizing the CI-MS-MS parameters. The precursor ion, which was the most abundant and selective ion, was in most cases the protonated molecular ion $[M+H]^+$. Table 1 summarizes the parent ion selected for each compound. All the parent ions were submitted to a CID with a resonant excitation waveform and the isolation window was 3 m/z for all of

the compounds. The CI-MS-MS fragmentations were optimized for each compound by selecting an amplitude excitation voltage that gave the maximum abundance of one of the product ions (100%) and a relative abundance of the parent ion between 10 and 20%. The range of the CID amplitude voltage tested for each compound was between 0 and 1 V. Table 1 summarizes, for each compound, the optimum amplitude excitation voltage, the CID storage level, the product ions (quantifiers and qualifiers), the m/z range of ions analyzed by CI-MS-MS, and the scan time. Each compound was acquired separately in one segment, except NDMA and NMEA (segment 1), and NMPYR, NDPA, and NMOR (segment 3); because of this, the scan time of these compounds was shorter than the others.

Table 1. GC-CI-MS-MS conditions

Compound	Retention time (min)	Parent ion (m/z)	CID amplitude (V)	CID storage level (m/z)	Product ions ^a (m/z)	m/z range	Scan time (s/scans)
NDMA	3.33	75.0	0.50	35.0	47, 44	42-99	0.50
NMEA	4.52	89.0	0.50	35.0	61, 47	42-99	0.50
NDEA	5.20	103.1	0.50	38.0	85, 75	65-113	0.60
NPYR	7.86	101.1	0.48	39.0	55, 45	41-111	0.40
NDPA	7.89	131.0	0.48	50.0	100, 89	80-141	0.40
NMOR	7.99	117.1	0.45	50.0	87, 86, 57	53-127	0.40
NPIP	8.89	115.1	0.35	45.0	70, 69	60-125	0.60
NDBA	11.59	159.2	0.40	52.0	103, 57	53-169	0.60
NDPhA	14.75	170.1	0.25	73.1	169, 124, 92	75-180	0.60

^aQuantification ions (m/z) are shown in bold type.

HS-SPME optimization

To optimize the SPME conditions, three commercially available fibers (Section 2.3) were tested to extract the *N*-nitrosamines. CAR/PDMS is recommended for extracting gases and low molecular weight compounds (< 5 carbon atoms) such as NDMA, NMEA, NDEA, NPYR, NMOR, and NPIP. Some studies have already used this fiber to extract *N*-nitrosamines from food and wastewater [2, 26]. DVB/CAR/PDMS is a triple phase fiber that favours the extraction of more polar compounds in comparison to CAR/PDMS. This fiber has also been tested by some researchers to extract the nine EPA *N*-nitrosamines from food [2]. PEG has been recommended for the extraction of polar compounds. To our knowledge, PEG has never been tested to extract *N*-nitrosamines. Other researchers used 65 mm PDMS/divinylbenzene fibers (PDMS/DVB) to extract only NDMA from beer [3], but we decided not to test it because in other studies that evaluated the extraction of a group of *N*-nitrosamines from food [2], it was the least efficient for all the compounds.

The main parameters that affect the sorption and desorption processes in SPME were optimized for each fiber. Since the three fibers have different structures, they may be affected differently by the same variables, so the extraction of each type of fiber was optimized individually by maximizing the chromatographic area

of the compounds. To optimize the SPME extraction process in each fiber, a standard mixed solution of 2 mg/L of *N*-nitrosamines in ultrapure water was used. To obtain the best conditions for each fiber, initial conditions such as desorption temperature and time, HS mode and sample volume were established according to the bibliography and the fiber supplier's recommendations, and it was tested if they were suitable for our study. Finally, such variables as extraction temperature, extraction time, sample pH, and salt concentration were optimized because we expected them to be the most influential.

The initial conditions used in each fiber were as follows: HS mode, sample volume of 10 mL, desorption time of 18 min, desorption temperature of 250 °C, extraction time of 45 min, extraction temperature of 80 °C, sample pH of 7 and no addition of salt to the sample.

Of the parameters selected from the literature, the desorption temperature was the only one we had to modify on the basis of our experimental results. In the desorption step of the initial conditions, the fiber was inserted into the injector of the gas chromatograph at 250 °C. The DVB/CAR/PDMS fiber was also tested at 270°C which is the maximum operating temperature, but the chromatographic areas were not substantially different from those obtained at 250 °C. Therefore, 250 °C was set as the desorption

temperature. We tested 300 °C for the desorption of compounds with the CAR/PDMS fiber because, in general, the retention of the compounds using this fiber is usually higher, and the compounds require higher temperatures to desorb. At 300 °C the areas of the compounds improved, so 300 °C was set as the desorption temperature. The desorption temperature of PEG was set at 250 °C because this is the maximum recommended operating temperature for this fiber and lower temperatures may cause carryover effects.

The other parameters were fixed at their initial values because no increase in the chromatographic areas was observed when they were modified. So, the HS mode was used, a sample volume of 10 mL, and a desorption time of 18 min for each fiber.

The experimental variables expected to be most influential – extraction temperature, extraction time, sample pH and salt concentration – were subsequently optimized.

Extraction temperature

In order to optimize the extraction temperature, the following temperatures were tested: 45, 65, 80 (initial condition), and 90 °C. Extraction efficiencies were expected to be higher at high extraction temperatures because the volatility of *N*-nitrosamines increases with temperature. However, the desorption process is also favored at high

temperatures, and for each fiber we obtained different optimal extraction temperatures. For most of the compounds, the optimum extraction temperature was found to be 80 °C with CAR/PDMS and 65 °C with PEG but only 45 °C for DVB/CAR/PDMS.

Extraction time

The extraction time was evaluated between 45 and 120 min. The results suggest that the longer the extraction time, the higher the chromatographic areas were for all the studied *N*-nitrosamines. Although the partitioning of compounds from the aqueous phase to the SPME fiber is an equilibrium process and various researchers have shown that the equilibrium SPME extraction time of *N*-nitrosamines from food using different fibers is not reached after 24 h of extraction [2], the full equilibration time was deemed too long for analytical requirements. Therefore, 45 min was selected as the extraction time close to the point of equilibrium for CAR/PDMS, and 60 min for PEG and DVB/CAR/PDMS. When these times were increased, the areas did not increase substantially, and a compromise between analysis time and areas was found.

Sample pH

The pH of the sample was tested for the extraction efficiency of *N*-nitrosamines. Two pH levels were studied: pH 7 (initial condition) and 12 at the optimum conditions found

for each fiber. In the case of CAR/PDMS, five of the nine compounds were extracted slightly more efficiently at pH 7. Results were similar with PEG. DVB/CAR/PDMS showed slightly better results at pH 7 for all compounds except NMOR. So, a sample pH of 7 was selected for each fiber.

Salt concentration

The salt concentration was the last parameter to be optimized. Salt was added to the sample as NaCl to decrease the solubility of the analytes

in the aqueous phase and, in theory, improve the extraction of the analytes in the fiber. The salt concentration levels tested were: 0 (initial condition), 90, 180, and 360 g/L (salt saturation) of NaCl in the aqueous sample. The sorption of *N*-nitrosamines was better in the three fibers when high NaCl concentrations were added to the sample, particularly for PEG, which increased the areas by more than 100% in most compounds. Table 2 summarizes the final optimum conditions for each fiber.

Table 2. SPME optimum conditions for each fiber studied

Process	Variable	CAR/PDMS	PEG	DVB/CAR/PDMS
Sorption	Extraction temperature (°C)	80	60	45
	Extraction time (min)	45	60	60
	Sample pH	7	7	7
	Salt concentration (g/L NaCl)	360	360	360
Desorption	Time (min)	18	18	18
	Temperature (°C)	300	250	250

Figure 1 compares the chromatographic areas obtained by the three fibers (CAR/PDMS, DVB/CAR/PDMS, and PEG) in the optimal HS-SPME conditions for the extraction of *N*-nitrosamines from a standard mixed solution of 2 mg/L. Although CAR/PDMS was the most efficient at extracting one of the most carcinogenic and volatile compounds (NDMA) and PEG extracted most NPIP and NDPhA, DVB/CAR/PDMS

was the most efficient at extracting the majority of compounds. Moreover, PEG could not extract an important carcinogenic compound, NDMA, and the extraction efficiency for NMEA and NDEA was very low. And in comparison with the other fibers, the extraction of the other compounds, except NPIP and NDPhA, was lower. However, the reproducibilities obtained with CAR/PDMS were usually worse than the

reproducibilities obtained using the PEG and DVB/CAR/PDMS fibers, as some authors have mentioned [2, 32, 33]. Consequently DVB/CAR /PDMS was selected as the fiber for extracting

N-nitrosamines from water samples since six of the nine compounds studied were extracted more efficiently and reproducibilities were good.

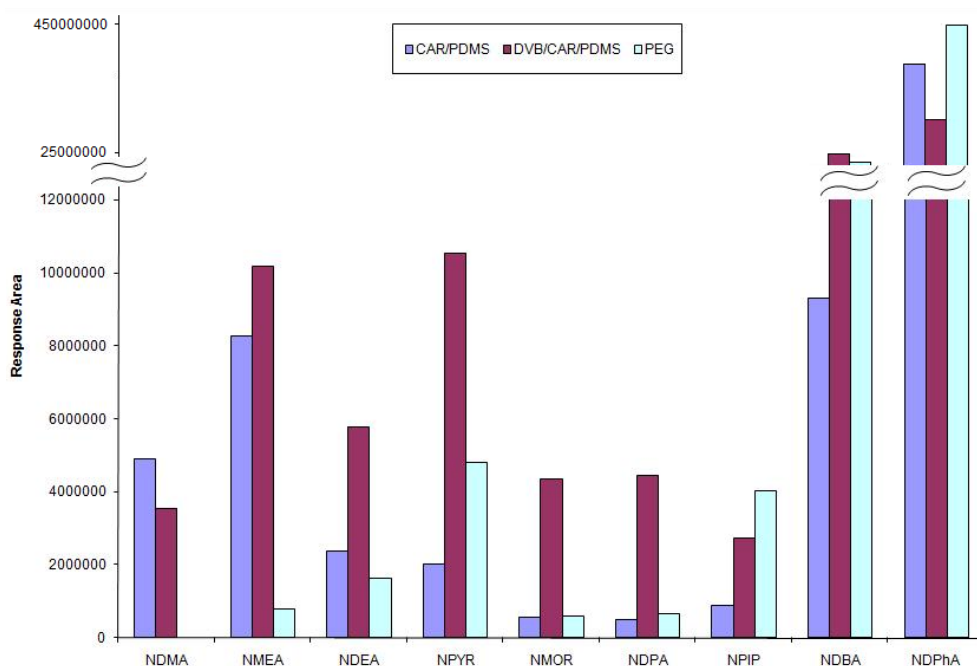


Figure 1. Comparison of the chromatographic areas obtained with the three fibers (CAR/PDMS, DVB/CAR/PDMS and PEG) in the optimal HS-SPME conditions for extracting *N*-nitrosamines from a standard solution of 2 mg/L.

Method validation

The method for determining the nine EPA *N*-nitrosamines in water samples using the DVB/CAR/PDMS fiber under the HS-SPME optimized conditions followed by GC–CI–MS–MS detection was analytically validated by establishing the linear ranges, LODs, LOQs, repeatabilities, and reproducibilities between days.

The effluent of the urban WWTP B was used as the sample matrix to validate the method. Five samples of the effluent WWTP B were analyzed and some peaks of NDMA, NDEA, NPYR, NMOR, and NDPhA appeared in the chromatogram. The averaged peak area of each detected compound was subtracted from the peak area of each spiked sample.

The linear range of the method was obtained by analysing the WWTP B effluent spiked at concentrations between 10 ng/L and 15 mg/L of *N*-nitrosamines. All the compounds showed a good linear range between 0.010 and 15 mg/L or between 0.015 and 15 mg/L with determination coefficients (R^2) higher than 0.995 (Table 3).

The LODs were defined as the concentration of analytes in the effluent WWTP B which caused a peak with a signal-to-noise ratio higher than 3 for the compounds that did not appear in this sample (NMEA, NDPA, NPIP, NDBA). For the compounds that appeared in the sample (NDMA, NDEA, NPYR, NMOR, and NDPhA) the LODs were defined as the concentration that gave a signal average of three times more than the standard deviation of the

blank signals. LOQs were defined as the lowest point of the calibration curve. LODs and LOQs ranged from 1 to 5 ng/L, and from 10 to 15 ng/L, respectively, and they are summarized in Table 3. The detection limits obtained using our method allowed us to determine *N*-nitrosamines in wastewater samples in a simple and automated HS-SPME method and the LOD values obtained were similar to the guide levels established in some European and American countries (between 1 and 12 ng/L) in drinking water [1, 8, 9].

The repeatability and reproducibility between days were determined by spiking five replicates of the effluent WWTP B at 100 ng/L, and the results obtained, expressed as %RSD, were lower than 13% for repeatability and 15% for reproducibility.

Table 3. Method linear ranges, LODs, LOQs, repeatability and reproducibility between days (%RSD, n=5, 100 ng/L). See text for other conditions.

Compound	Linear range (µg/L)	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Repeatability (% RSD)	Reproducibility (% RSD)
NDMA	0.015 – 15	5	15	3	7
NMEA	0.015 – 15	4	15	12	14
NDEA	0.010 – 15	3	10	3	9
NPYR	0.010 – 15	1	10	13	15
NDPA	0.010 – 15	2	10	7	11
NMOR	0.015 – 15	4	15	7	10
NPIP	0.015 – 15	5	15	6	9
NDBA	0.010 – 15	1	10	3	5
NDPhA	0.015 – 15	4	15	5	6

When the figures of merit obtained in our study were compared with the methods reported in the scientific literature, the methods that did not use automated SPME and another type of fiber to determine some of the *N*-nitrosamines in water samples obtained LOD values that were often higher. For instance, Grebel *et al.* [26] determined the *N*-nitrosamines in wastewaters using manual SPME followed by GC and tested nitrogen chemiluminescence, nitrogen-phosphorous and CI-MS as detectors. They obtained better results using a single CI-MS, and the LODs ranged from 30 to 138 ng/L, being not sensitive enough to determine the compounds in drinking water. In order to decrease the LODs, some authors used SPE to extract *N*-nitrosamines from drinking water using a sample volume of 0.5 or 1 L [18, 29]. However, this volume cannot be used in waters of high complexity such as industrial wastewater because the volume cannot pass through the SPE cartridge.

Method application

The method developed was applied to determine the *N*-nitrosamines in different types of water samples: tap water, effluent, and influent samples collected from several kinds of urban and industrial WWTPs, and effluent and influent samples taken from a potable water plant (Section 2.4).

During the analysis of all the industrial influent wastewater

samples, a strong matrix effect was observed. The determination of *N*-nitrosamines in these samples showed that the peak area of the compounds decreased when the complexity of the samples increased, because some interferences in the medium of the samples may compete with the compounds for sorption on the fiber. In order to overcome this difficulty, we quantified *N*-nitrosamines in industrial influent samples using the method of standard addition.

For the other less complex samples, we quantified the compounds using the calibration curves of the urban effluent wastewater B. As an example, Fig. 2 shows the HS-SPME-GC-CI-MS-MS chromatograms of the reverse osmosis effluent from WWTP B for the unspiked sample (a), and the sample spiked with 100 ng/L of *N*-nitrosamines (b). Three of the compounds appeared in the chromatograms of the non-spiked sample at concentrations of 7.1 (NPYR), 11.0 (NDBA), and 15.3 ng/L (NDPhA).

Table 4 summarizes the results of the average concentrations of the nine *N*-nitrosamines found in each type of sample ($n=3$). As we expected, in the tap water sample (A) almost all the compounds were found at low concentrations, ranging from 10.3 (NDMA) to 66.6 ng/L (NPYR).

In urban WWTP B, concentrations in the influent ranged from 11.4 (NDBA) to 1267 ng/L (NPYR). Concentrations

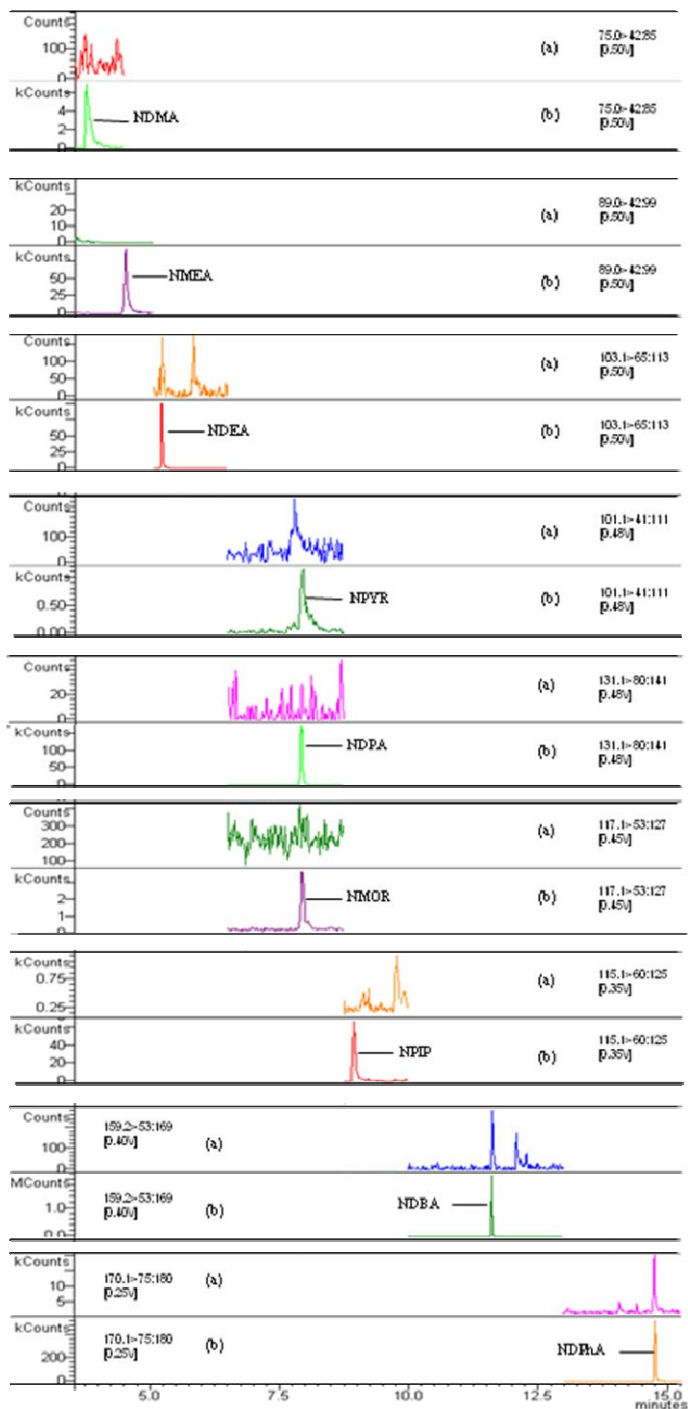


Figure 2. HS-SPME-GC-MS chromatograms of *N*-nitrosamines of a reverse osmosis effluent from WWTP B using the DVB/CAR/PDMS fiber. (a) Unspiked sample; (b) sample spiked with 100 ng/L of *N*-nitrosamines.

Table 4. Concentration (ng/L) of N-nitrosamines in water samples ($n=3$, RSD <13%)

Compound	Water A	WWTPB		WWTPC		WWTPD		WWTPE		WWTF		Water G		
		Influent	Effluent	Osmosis	Influent	Effluent	Influent	Effluent	Influent	Effluent	Influent	Effluent	Influent	Effluent
NDMA	10.3	n.d.	42.2	n.d.	n.d.	114.6	n.d.	n.d.	970.5	965.1	28993	25428	n.d.	n.q.
NMEA	288	22.3	n.d.	n.d.	n.d.	1498	34.6	n.d.	n.d.	n.d.	408.6	3209	16.9	n.d.
NDEA	n.d.	43.6	31.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	43.3	17447	9794	n.d.	n.d.
NPYR	66.6	1267	32.1	7.1	84.7	37.7	685.56	n.d.	n.d.	335.2	6654	16871	13.6	n.d.
NDPA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10.8	n.q.	n.d.	n.q.	n.d.	13.1	144.1	n.d.	n.q.	n.q.
NMOR	51.1	164.2	439.8	n.d.	2657	1910	5165	1806	174.1	3668	139718	19372	n.d.	18.8
NPJP	15.2	n.d.	n.d.	n.d.	16.4	n.d.	n.d.	15.7	n.d.	17.7	4780	1486	n.q.	n.q.
NDEA	n.q.	11.4	n.d.	11.0	n.q.	n.q.	n.d.	n.q.	n.d.	15.2	9001	3801	n.q.	n.q.
NDPhA	199	346.8	21.0	15.3	709.6	670.1	856.2	357.3	8267	1045	12372	3072	36.0	45.7

n.d.: <LOD; n.q.: <LOQ

in the effluent were slightly lower in most compounds, ranging from 21.0 (NDPhA) to 439.8 ng/L (NMOR), and in the reverse osmosis effluent they were even lower, ranging from 7.1 (NPYR) to 15.3 ng/L (NDPhA). Similar concentration levels were found in urban WWTP C. The influent concentrations ranged from 10.8 (NDPA) to 2657 ng/L (NMOR), and the effluent concentrations were lower: only four of the compounds were quantified, at concentrations ranging from 84.7 (NPYR) to 1910 ng/L (NMOR).

In the industrial wastewater samples, concentrations of the compounds depended on the type of industry; however, as expected, the concentrations of the compounds were higher for this type of samples than for urban wastewater samples. For instance, in WWTP F the concentrations of the compounds were the highest. All the compounds, with the exception of NDPA in the effluent, were detected between 144.1 (NDPA) and 139718 ng/L (NMOR) in the influent, and between 1436 (NPIP) and 25428 ng/L (NDMA) in the effluent. NMOR and NDMA were the most abundant *N*-nitrosamines we found, which agrees with the fact that NDMA might show up in relatively high concentrations and NMOR is generally more abundant and persistent than the other *N*-nitrosamines [30].

In the potable water treatment plant (G) hardly any of the compounds were detected or quantified. In the influent, the concentration ranged from 13.6 (NPYR) to 36.0 ng/L (NDPhA), and in the effluent only two compounds were detected, NMOR (18.8 ng/L) and NDPhA (45.7 ng/L). In this case and in the WWTP E samples, the concentration of some of the compounds may be higher in the effluent because they may form in the chlorination step of the disinfection treatment of water.

Jurado-Sánchez *et al.* [1] determined six of these compounds at concentrations between 25 (NDEA) and 510 ng/L (NDBA) in pre-screened waters; Planas *et al.* [18] determined these nine EPA *N*-nitrosamines in the influent of a potable water plant (from 0.2 ng/L for NPYR to 13.4 ng/L for NDMA) and urban effluents of a WWTP (from 3.1 ng/L of NPIP to 501.9 ng/L of NDEA). Grebel *et al.* [26] also determined the nine *N*-nitrosamines in a wastewater sample (type not specified), and only found NDMA at concentrations around 104 ng/L.

CONCLUDING REMARKS

The proposed HS-SPME-GC-CI-MS-MS method was shown to be completely automated, simple, and environmentally friendly. It also provided low LODs (between 1 and 10 ng/L) and satisfactory precision

(RSD 15%). Moreover, the use of CI-MS-MS instead of single CI-MS detection provided high selectivity and sensitivity for the determination of nine *N*-nitrosamines in such highly complex environmental water samples as industrial wastewater. The method proved to be suitable for determining *N*-nitrosamines in water samples such as urban and industrial wastewater, potable water samples and tap water at ng/L levels.

The most important parameters involved in the SPME extraction were evaluated and optimized. Three fibers were tested (CAR/PDMS, PEG and DVB/CAR/PDMS) and the best conditions were found to be the following: a DVB/CAR/PDMS fiber in HS-SPME mode at 45 °C for 60 min, pH 7 and with 360 g/L added sodium chloride.

Most of the studied compounds were found in industrial WWTPs (D, E and F) at high levels. Concentrations were highest in the influent and effluent of the industrial WWTP F, where almost all the compounds were detected between high ng/L and mg/L levels. In the influent and effluent of urban wastewaters (B and C), the level of the compounds was lower, and in tap water (A) slightly lower. The lowest concentrations of *N*-nitrosamines were found in the potable water plant (G), where the concentrations ranged between 13.6 (NPYR) and 45.7 ng/L (NDPhA).

Acknowledgements

The authors thank the personnel of the water treatment plants for their cooperation in all aspects of this study, which was financially supported by the Directorate-General for Research of the Spanish Ministry of Science and Technology, projects CTM2008-06847-C02-01/TECNO and PET2006-0706-01. A. Llop gratefully acknowledges the financial support of the Department of Innovation, Universities and Enterprise of the Catalan Government, as well as the European Social Fund (2007 FI00026).

REFERENCES

- [1] Jurado-Sánchez, B., Ballesteros, E., Gallego, M., *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 1200–1205.
- [2] Ventanas, S., Ruiz, J., *Talanta* 2006, 70, 1017–1023.
- [3] Méndez, D., González, G., Botello, E., Escamilla, E., Alvarado, J. F. J., *Food Chem.* 2008, 107, 1348–1352.
- [4] Schothorst, R. C., Somers, H. H. J., *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, 381, 681–685.
- [5] Flower, C., Carter, S., Earls, A., Fowler, R., Hewlins, S., Lalljie, S., Lefebvre, M., Mavro, J., Small, D., Volpe, N., *Int. J. Cosmet. Sci.* 2006, 28, 21–33.
- [6] Lee, H.-L., Wang, C., Lin, S., Hsieh, D. P. H., *Talanta* 2007, 73, 76–80.

- [7] Pan, X., Zhang, B., Cox, S. B., Anderson, T. A., Cobb, G. P., *J. Chromatogr. A* 2006, 1107, 2–8.
- [8] Richardson, S. D., *Anal. Chem.* 2009, 81, 4645–4677.
- [9] Richardson, S. D., *Trend Anal. Chem.* 2003, 22, 666–684.
- [10] US EPA Contaminant Candidate List 3 (CCL 3), as of January 2009b, <http://www.epa.gov/OGWDW/ccl/ccl3.html>.
- [11] Andrzejewski, P., Kasprzyk-Hordern, B., Nawrocki, J., *Desalination* 2005, 176, 37–45.
- [12] Llop, A., Pocurull, E., Borrull, F., *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 575–581.
- [13] Padhye, L., Tezel, U., Mitch, W. A., Pavlostathis, S. G., Huang, C.-H., *Environ. Sci. Technol.* 2009, 43, 3087–3093.
- [14] Mitch, W. A., Sharp, J. O., Trussell, R. R., Valentine, R. L., Alvarez-Cohen, L., Sedlak, D. L., *Environ. Eng. Sci.* 2003, 20, 389–404.
- [15] Zhao, Y.-Y., Boyd, J. M., Woodbeck, M., Andrews, R. C., Qin, F., Li, X.-F., *Environ. Sci. Technol.* 2008, 42, 4857–4862.
- [16] Asami, M., Oya, M., Kosaka, K., *Sci. Total Environ.* 2009, 407, 3540–3545.
- [17] US EPA, N-nitrosodimethylamine (CASRN 62-75-9). Integrated Risk Information System (IRIS) as of January 2009a, <http://www.epa.gov/ncea/iris/su bst/0045.html>.
- [18] Planas, C., Palacios, Ó., Ventura, F., Rivera, J., Caixach, J., *Talanta* 2008, 76, 906–913.
- [19] Sedlak, D. L., Deeb, R. A., Hawley, E. L., Mitch, W. A., Durbin, T. D., Mowbray, S., Carr, S., *Water Environ. Res.* 2005, 77, 32–39.
- [20] Kodamatani, H., Yamazaki, S., Saito, K., Amponsaa-Karikari, A., Kishikawa, N., Kuroda, N., Tomiyasu, T., Komatsu, Y., *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 92–98.
- [21] Zhao, Y.-Y., Boyd, J., Hrudey, S. E., Li, X.-F., *Environ. Sci. Technol.* 2006, 40, 7636–7641.
- [22] Krauss, M., Hollender, J., *Anal. Chem.* 2008, 80, 834–842.
- [23] Plumlee, M., López-Mesas, M., Heidelberger, A., Ishida, K. P., Reinhard, M., *Water Res.* 2008, 42, 347–355.
- [24] Byun, M. W., Ahn, H. J., Kim, J. H., Lee, J. W., Yook, H. S., Han, S. B., *J. Chromatogr. A* 2004, 1054, 403–407.
- [25] Grebel, J. E., Suffet, I. H., *J. Chromatogr. A* 2007, 1175, 141–144.
- [26] Grebel, J. E., Young, C. C., Suffet, I. H., *J. Chromatogr. A* 2006, 1117, 11–18.
- [27] Charrois, J. W. A., Arend, M. W., Froese, K. L., Hrudey, S. E., *Environ. Sci. Technol.* 2004, 38, 4835–4841.
- [28] Raksit, A., Johri, S., *J. AOAC Int.* 2001, 84, 1413–1419.
- [29] Munch, J. W., Bassett, M. V., *J. AOAC Int.* 2006, 89, 486–497.

- [30] Krauss, M., Longrée, P., Dorusch, F., Ort, C., Hollender, J., *Water Res.* 2009, 43, 4381–4391.
- [31] Reche, F., Garrigós, M. C., Marín, M. L., Cantó, A., Jiménez, A., *J. Chromatogr. A* 2002, 963, 419–426.
- [32] Elmore, J. S., Mottram, D. S., Hierro, E., *J. Chromatogr. A* 2000, 905, 233–240.
- [33] Pérez-Trujillo, J. P., Frías, S., Conde, J., Rodríguez Delgado, M. A., *J. Chromatogr. A* 2002, 963, 95–105.

3.2.3. Discussió de Resultats

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013

En el primer estudi presentat, es va determinar la presència d'un grup de 10 amines alifàtiques primàries en diferents tipus de mostres aquoses, com són aigües d'entrada i de sortida de tres plantes de tractament d'aigües residuals industrials, d'una planta de tractament d'aigües residuals urbanes i d'una planta potabilitzadora d'aigües.

Per tal de dur a terme l'estudi de la presència d'aquests compostos en cadascuna de les aigües, es va desenvolupar un mètode cromatogràfic automàtic, ràpid i sensible, fet que va permetre detectar els diferents compostos en les diferents aigües a nivells de ng/L.

El mètode desenvolupat ha consistit en la derivatització simultània amb pentafluorobenzaldehid (PFBAY) com a reactiu derivatitzant de les amines seguit de la microextracció en fase sòlida en espai de cap (HS-SPME), i separació i detecció per GC-MS-MS. Aquest mètode no utilitza solvents orgànics tòxics, pel que és respectuós amb el medi ambient.

Els paràmetres més importants que afecten a la derivatització i a l'extracció dels compostos varen ser avaluats i optimitzats mitjançant un disseny d'experiments. En concret, es va utilitzar el *central composite design*. Les condicions optimitzades que es varen utilitzar són: una fibra de poliacrilat (PA), el mode d'extracció en espai de cap, una temperatura d'extracció de 40 °C, un temps d'extracció de 15 minuts i l'addició de 360 g/L de NaCl a la mostra.

Utilitzant aquestes condicions òptimes es va poder arribar a límits de detecció molt baixos, entre 10 i 100 ng/L (exceptuant la ciclohexilamina), i s'obtingué una bona precisió ($\leq 11\%$). Cal esmentar que el mètode és completament automàtic i tot el procés es realitza en menys de 30 minuts. A més a més, utilitzant l'acoblament masses-masses (MS-MS) enlloc de la detecció amb masses simple (MS) s'arribà a obtenir una elevada selectivitat per la determinació d'amines alifàtiques primàries en mostres molt complexes com per exemple són les aigües residuals industrials.

Els límits de detecció i de quantificació obtinguts en aquest estudi són comparables, i inclús en alguns casos lleugerament millors que els obtinguts per altres investigadors que determinen alguns de les amines estudiades utilitzant diferents sistemes de detecció o diferents tècniques d'extracció o microextracció en fase líquida (LPME) [1,2].

A l'aplicar aquest mètode cromatogràfic a les mostres de diferents orígens, s'ha observat que la majoria dels compostos es troben en les aigües d'entrada i de sortida de les plantes de tractament estudiades. Degut a això, no ha estat possible obtenir una matriu lliure de compostos per a poder-la utilitzar com a blanc en l'estudi de la

validació del mètode analític, per aquest motiu es va decidir utilitzar les mostres de la sortida d'una planta de tractament d'aigua residual urbana com a blanc i tenir en compte la presència dels analits estudiants en les mostres per tal de determinar els paràmetres de mèrit del procediment. Per determinar la concentració dels compostos es va utilitzar el mètode del patró intern, emprant com a tal l'hidroclorur de d_3 -metilamina. Cal comentar que en la quantificació de les mostres més complexes, en concret, en les entrades de les plantes de tractament d'aigües industrials, es va observar efecte matriu, i per resoldre aquest inconvenient es va decidir diluir les mostres i quantificar els compostos pel mètode de les addicions estàndards.

Com s'ha comentat anteriorment, la majoria de les amines alifàtiques primàries s'han detectat en les mostres d'entrada i de sortida analitzades de cadascuna de les plantes de tractament estudiades. En concret, en les mostres provinents de les plantes de tractament industrials, aquests compostos s'han trobat a uns nivells entre 0.20 i 1500 $\mu\text{g/L}$. Aquests valors alts eren esperats, ja que una de les indústries que envia aigües a tractar utilitza amines per fabricar tensioactius; en les aigües d'entrada i de sortida de la planta de tractament urbana s'han trobat a nivells més baixos, entre 0.07 i 28 $\mu\text{g/L}$; i en les aigües d'entrada i sortida de la planta potabilitzadora d'aigües encara a nivells més baixos, entre 0.03 i 1.7 $\mu\text{g/L}$.

En alguns casos, per la mateixa planta de tractament s'observa que la mostra d'entrada conté una menor concentració d'amines que la corresponent mostra de sortida. Això és degut a que l'efluent no correspon exactament a la mostra d'aigua residual de l'influent degut a diferències en el temps de retenció hidràulica, i per aquest motiu no s'ha pogut realitzar una comparació estricta entre les concentracions d'entrada i de sortida. Només podem fer una comparació en termes generals. Cal esmentar, però, que en la majoria dels casos s'ha trobat que la concentració de la mostra d'entrada és major que la de sortida, i sembla que els diferents processos de tractament realitzin una eliminació parcial d'aquests compostos en les aigües.

En la recerca bibliogràfica s'han trobat diversos estudis que han determinat diferents nivells d'amines alifàtiques en aigües residuals industrials. Per exemple, Sacher *et al.* [3] varen determinar metilamina, etilamina i butilamina a concentracions entre 1 i 30 $\mu\text{g/L}$, mentre que Pan *et al.* [2] varen determinar la presència de 700 $\mu\text{g/L}$ de metilamina en aigües residuals industrials similars. Els nostres resultats obtinguts concorden amb ambdós estudis mencionats. En aigua de riu, Akyüz *et al.* [4] varen determinar metilamina, etilamina, butilamina i 2-feniletilamina a concentracions entre 0.26 i 83.02 ng/L . A la bibliografia no s'ha trobat informació sobre la determinació d'amines en aigua potable.

En el segon treball d'aquest bloc s'han determinat les 9 *N*-Nitrosamines classificades per la US Environmental Protection Agency (EPA) com a compostos altament

cancerígens, en diversos tipus de mostres aquoses, com són: aigua de l'aixeta, aigües d'entrada i de sortida de dues plantes de tractament d'aigües residuals urbanes, tres plantes de tractament d'aigües residuals industrials i una planta potabilitzadora d'aigües. Les mostres tenien diferent composició i diferents orígens.

El mètode que s'ha desenvolupat ha emprat la microextracció en fase sòlida (SPME) seguida de la cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses en tàndem (GC-MS-MS) utilitzant la ionització química (CI). En aquest cas no ha estat necessari derivatitzar els compostos. Aquest mètode proposat és completament automàtic, és senzill d'utilitzar i és respectuós amb el medi ambient, ja que no utilitza solvents orgànics tòxics, a l'igual que el mètode descrit anteriorment per les amines. A més a més, els límits de detecció que s'obtenen són molt baixos, entre 1 i 5 ng/L, i la precisió del mètode també és adequada (RSD \leq 15%). A més a més, cal destacar que s'utilitza l'espectrometria de masses en tàndem (MS-MS) i això permet obtenir una major selectivitat i sensibilitat en la determinació d'aquestes *N*-Nitrosamines en mostres tan complexes com la majoria de les analitzades.

Els paràmetres més importants involucrats en la microextracció en fase sòlida (SPME) han estat optimitzats. S'han provat tres fibres: carboxè/polidimetilsiloxà (CAR/PDMS), polietilenglicol (PEG), i divinilbenzè/ carboxè/polidimetilsiloxà (DVB/CAR/PDMS). Les millors condicions per determinar les *N*-Nitrosamines s'han trobat utilitzant la fibra de DVB/CAR/PDMS en mode espai de cap (HS-SPME), i utilitzant una temperatura d'extracció de 45 °C i un temps d'extracció de 60 minuts, a un pH de 7 i a una concentració de NaCl de 360 g/L.

A l'igual que en el cas anterior, no va ser possible obtenir mostres de blancs sense la presència dels analits en estudi, per lo que per a la validació del mètode es va emprar una aigua residual de sortida d'una planta de tractament i es va determinar la concentració mitjana dels compostos en estudi. Aquests valors es varen tenir en compte a l'hora de calcular els diferents paràmetres de qualitat del mètode analític.

Els límits de detecció obtinguts en el mètode desenvolupat es troben entre 1 i 5 ng/L, com ja s'ha comentat, i són similars als valors dels límits de detecció establerts en els nivells guia de diversos països europeus i americans (entre 1 i 12 ng/L) en aigües de beguda [5-7]. Altres investigadors que han determinat aquests compostos utilitzant altres mètodes, normalment obtenen límits de detecció de nivells més elevats. Per exemple, Grebel *et al.* [8] van determinar *N*-Nitrosamines en aigües residuals utilitzant la SPME de manera manual i no automatitzada, seguida de la GC, provant diversos tipus de detectors (nitrogen-quimiluminiscència, nitrogen-fòsfor i espectrometria de masses utilitzant ionització química (CI-MS)), i obtingueren millors resultats utilitzant com a detector la CI-MS, i els límits de detecció obtinguts utilitzant aquest detector van ser entre 30 i 138 ng/L, massa elevats com per

determinar els compostos en aigües de beguda. Per tal de disminuir els límits de detecció, altres autors han utilitzat l'extracció en fase sòlida (SPE) per extreure els compostos d'aigües de beguda utilitzant un volum de 0.5 o 1 L [9,10]. Tanmateix, aquest volum no pot ser utilitzat en l'extracció de mostres aquoses tan complexes com són les aigües residuals industrials, ja que aquest volum tan elevat no podria passar a través del cartutx de SPE degut a que quedaria molt taponat per la gran complexitat de la matriu.

Aplicant aquest mètode un cop optimitzat a les mostres reals s'ha observat que la majoria dels compostos estudiats es troben a les mostres provinents de les plantes de tractament d'aigües residuals industrials a uns nivells elevats (entre ng/L i mg/L). Els compostos que es van trobar en una major abundància varen ser la *N*-Nitrosomorfolina (NMOR) i la *N*-Nitrosodimetilamina (NDMA), el que concorda amb el fet de que la NDMA pot aparèixer a altes concentracions en les plantes de tractament i que la NMOR és generalment més abundant i persistent que les altres *N*-Nitrosamines [11]. En les aigües residuals urbanes les *N*-Nitrosamines s'han trobat a uns nivells més baixos, i en aigua de l'aixeta encara a nivells una mica més baixos. Les concentracions més baixes de *N*-Nitrosamines s'han trobat en la planta potabilitzadora d'aigües, a concentracions entre 13.6 ng/L (*N*-Nitrosopirrolidina) i 45.7 ng/L (*N*-Nitrosodifenilamina).

Jurado-Sánchez *et al.* [5] varen determinar sis de les *N*-Nitrosamines a concentracions entre 25 i 510 ng/L en aigües pre-tractades; Planas *et al.* [9] varen determinar aquestes 9 EPA *N*-Nitrosamines en l'influent d'una planta potabilitzadora d'aigües (entre 0.2 i 13.4 ng/L), i en efluent de plantes de tractament residuals urbanes (entre 3.1 i 501.9 ng/L).

Grebel *et al.* [8] també varen determinar les 9 EPA *N*-Nitrosamines en mostres d'aigües residuals (de tipus no especificat), i només varen trobar un dels compostos, NDMA, a concentracions al voltant de 104 ng/L.

Bibliografia

- [1] K.J. Chia, S.D. Huang, J. Chromatogr. A 1103 (2006) 158.
- [2] L. Pan, J.M. Chong, J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A 773 (1997) 249.
- [3] F. Sacher, S. Lenz, H.J. Brauch, J. Chromatogr. A 764 (1997) 85.
- [4] M. Akyüz, S. Ata, J. Chromatogr. A 1129 (2006) 88.
- [5] B. Jurado-Sánchez, E. Ballesteros, M. J. Gallego, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 1200.

- [6] S.D. Richardson, *Anal. Chem.* 81 (2009) 4645.
- [7] S.D. Richardson, *Trend Anal. Chem.* 22 (2003) 666.
- [8] J.E. Grebel, C.C. Young, I.H. Suffet, *J. Chromatogr. A* 1117 (2006) 11.
- [9] C. Planas, Ó. Palacios, F. Ventura, J. Rivera, J. Caixach, *Talanta* 76 (2008) 906.
- [10] J.W. Munch, M.V. Bassett, *J. AOAC Int.* 89 (2006) 486.
- [11] M. Krauss, P. Longrée, F. Dorusch, C. Ort, J. Hollender, *Water Res.* 43 (2009) 4381.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013

3.3. Determinació d'amines alifàtiques primàries i *N*-Nitrosamines en llots

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013

Per tal de completar aquest estudi de contaminants orgànics nitrogenats en plantes de tractament d'aigües residuals industrials, urbanes i d'una planta potabilitzadora d'aigües, es va considerar apropiat estudiar la presència d'amines alifàtiques primàries i N-Nitrosamines en els llots activats provinents d'aquestes plantes de tractament.

En primer lloc es va creure oportú desenvolupar, per cada tipus de família de compostos, un mètode cromatogràfic prou sensible per tal de determinar aquests compostos en els diferents llots activats. Es va optar per desenvolupar mètodes que fossin respectuosos amb el medi ambient, és a dir, sense utilitzar dissolvents orgànics contaminants. La tècnica d'extracció que es va considerar per extreure les dues famílies de compostos dels llots activats va ser l'extracció utilitzant aigua pressuritzada en estat subcrític (PHWE), donat que, a més a més, és una tècnica relativament senzilla d'utilitzar, ràpida i seguidament es pot realitzar una microextracció en fase sòlida (SPME) com a sistema de concentració, ja que s'utilitza aigua com a solvent d'extracció.

A la bibliografia s'han trobat molts pocs estudis sobre la determinació d'aquestes dues famílies de compostos en llots activats provinents de plantes de tractament d'aigües [1,2]. I, des del nostre coneixement, els mètodes proposats són novedosos, ja que no hi ha cap estudi utilitzant la PHWE per extreure aquestes famílies de compostos dels llots activats.

En concret, en el primer treball d'aquest bloc, tal com s'ha comentat anteriorment, s'ha desenvolupat un mètode analític per determinar amines alifàtiques primàries en llots activats provinents de plantes de tractament d'aigües residuals urbanes, industrials i d'una planta potabilitzadora. Per extreure els compostos dels diferents llots activats s'ha utilitzat la PHWE seguida de la derivatització *in situ* amb pentafluorobenzaldehid i HS-SPME en espai de cap i GC-MS-MS, utilitzant un espectròmetre de masses amb trampa iònica. Els compostos que s'han determinat han estat les 10 amines alifàtiques primàries ja estudiades en el treball on s'han analitzat diferents mostres aquoses.

El mètode desenvolupat s'ha aplicat a la determinació d'aquests compostos en llots activats de diferents orígens: plantes de tractament d'aigües residuals industrials amb diferents tecnologies de tractament d'aigües, plantes de tractament d'aigües residuals urbanes i també en una planta potabilitzadora d'aigües. Les plantes de tractament on s'ha realitzat l'estudi utilitzen diferents tecnologies per depurar les aigües: plantes de tractament convencionals, plantes amb BRM amb membranes de microfiltració o d'ultrafiltració i osmosi inversa.

En el segon treball vàrem desenvolupar un mètode cromatogràfic que també utilitza la PHWE seguit de derivatització amb pentafluorobenzaldehid i HS-SPME seguida de GC-MS-MS per determinar les 10 amines alifàtiques primàries en llots activats, però en comparació amb el mètode desenvolupat a l'anterior treball, aquest és lleugerament més sensible i és completament automàtic. En aquest cas s'ha realitzat una modificació en la part de la derivatització amb pentafluorobenzaldehid i HS-SPME, realitzant la derivatització i extracció de les amines alifàtiques primàries en la pròpia fibra de la SPME (*on fiber*). Aquesta modificació va ser motivada pel fet que diversos investigadors trobaren millores a l'utilitzar la derivatització *on fiber* comparat amb la derivatització *in situ* per extreure diversos compostos [3-7].

En el darrer treball es va desenvolupar un mètode cromatogràfic per determinar les 9 EPA N-Nitrosamines en els diferents tipus de llots activats provinents de diferents plantes de tractament d'aigües (residuals urbanes i industrials, i potabilitzadora d'aigües). En aquest cas el mètode desenvolupat ha consistit en la PHWE seguit de la HS-SPME i GC-MS-MS utilitzant ionització química i trampa iònica.

Els treballs que s'adjunten a continuació inclouen els resultats obtinguts en aquests estudis. El primer treball ha estat publicat en la revista *Analytica Chimica Acta* (2010) 665:231-236, el segon treball ha estat publicat a la revista *Journal of Separation Science* (2011) 34:1531-1537 i el tercer treball ha estat publicat a la revista *Talanta* (2012) 88:284-289.

Bibliografia

- [1] M. Akyüz, S.J. Ata, J. Chromatogr. A 1129 (2006) 88.
- [2] L. Padhye, U. Tezel, W.A. Mitch, S.G. Pavlostathis, C.H. Huang, Environ. Sci. Technol. 43 (2009) 3087.
- [3] L. Pan, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 69 (1997) 196.
- [4] R. Herráez-Hernández, C. Cháfer-Pericás, J. Verdú-Andrés, P. Campíns-Falcó, J. Chromatogr. A 1104 (2006) 40.
- [5] A. Scheyer, O. Briand, S. Morville, P. Mirabel, M. Millet, Anal. Bioanal. Chem. 387 (2007) 359.
- [6] C. Nerín, J. Salafranca, M. Aznar, R. Batlle, Anal. Bioanal. Chem. 393 (2009) 809.
- [7] C. Cháfer-Pericás, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, Talanta 66 (2005) 1139.

**3.3.1. Pressurised hot water extraction followed by simultaneous
derivatization and solid-phase microextraction and gas
chromatography-tandem mass spectrometry of
aliphatic primary amines in sewage sludge**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013

Analytica Chimica Acta 665 (2010) 231–236



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca



**PRESSURISED HOT WATER EXTRACTION FOLLOWED BY SIMULTANEOUS
DERIVATIZATION AND HEADSPACE SOLID-PHASE MICROEXTRACTION
AND GAS CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY FOR THE
DETERMINATION OF ALIPHATIC PRIMARY AMINES IN SEWAGE SLUDGE**

Anna Llop, Francesc Borrull and Eva Pocurull

Departament de Química Analítica i Química Orgànica. Universitat Rovira i Virgili
Marcel·lí Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain

Abstract

In this paper we describe an environmentally friendly and sensitive method for the determination of ten primary amines in sewage sludge. The method is based on pressurised hot water extraction (PHWE) followed by simultaneous derivatization with pentafluorobenzaldehyde (PFBAY) and headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and subsequent gas-chromatography ion-trap tandem mass spectrometry (GC-IT-MS-MS) analysis. The influence of the main factors on the PHWE of sludge was optimized by a central composite design. For all species the optimal conditions were water at pH 4 as the extracting solvent, an extraction temperature of 100 °C and an extraction time of 15 min. The separation and detection of the ten amines by GC-IT-MS-MS took just 10 min and the entire process took approximately 1 h. Repeatability and reproducibility between days, expressed as RSD (%) ($n = 5$), were less than 19 and 24%, respectively. The average limit of detection (LOD) was of 65 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ s (range found 9–135) and the average limit of quantification (LOQ) was of 230 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (range found 50–450) of dry weight (d.w.). Under optimized conditions we used this method to determine the compounds in industrial and municipal sewage sludge samples and in sludge from a potable water treatment plant. Methylamine and Isobutylamine showed the highest levels in one of the industrial sewage sludge samples (404 and 543 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (d.w.), respectively). To our knowledge, this paper presents for the first time the determination of ten primary amines in sewage sludge samples using PHWE.

Keywords: *primary aliphatic amines, sewage sludge, pressurised hot water extraction, solid-phase microextraction, gas chromatography–mass spectrometry–mass spectrometry, central composite design*

INTRODUCTION

Aliphatic amines such as methylamine, ethylamine, n-butylamine and cyclohexylamine are widely used as raw materials or intermediates in chemical and pharmaceutical industries [1–4]. In addition to these industrial uses, amines may also occur in environmental samples as biodegradation products of proteins and amino acids or other nitrogen-containing compounds [1,2]. Besides creating hygienic problems due to their unpleasant smell, these compounds have been considered as tumour-inducing agents and may be hazardous to human health as they are sensitizers and irritants to the skin, eyes, mucous membranes, and respiratory tract [2,5]. Moreover, they can react with nitrosating agents, leading to the formation of *N*-nitrosamines, which are potentially carcinogenic [2]. The determination of these compounds in environmental samples such as river water, wastewater, sediments and sewage sludge is therefore of great interest. There is a growing concern that these compounds are not completely eliminated in wastewater treatment plants (WWTPs) and may enter the environment. It is important to study

their presence in effluent wastewater and sewage sludge samples in order to evaluate the possibility of reusing. In recent years, the levels and consequences of aliphatic amines in various environmental waters have been the subject of several studies [1,2,6–10]. However, little information about their presence in sediments is available [7] and there is even less information about their presence in sewage sludge.

The techniques most widely used to determine aliphatic amines in environmental samples are gas chromatography (GC) and liquid chromatography (LC). In both cases, however, it is often necessary to convert free amines into suitable derivatives prior to analysis [11]. Because of its superior selectivity and sensitivity, gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) is recognised as the method of choice for determining aliphatic amines in environmental samples. Among existing derivatizing agents, pentafluorobenzaldehyde (PFBAY) is widely used for primary aliphatic amines because the derivatizing reaction can proceed rapidly in aqueous solutions at room temperature and yields are good [9,10,12,13]. The derivatives formed

require further extraction and concentration prior to GC analysis.

Extraction techniques such as Soxhlet [7], sonication, supercritical fluid extraction (SFE) and pressurised liquid extraction (PLE) have been used for solid samples to extract aromatic and aliphatic amines such as trialkylamines from sediments and sewage sludge samples [14]. Classical analytical procedures such as Soxhlet extraction and sonication are usually tedious and time consuming and require large amounts of solvent. Modern technologies, such as SFE and PLE, have been developed to minimize waste solvents and shorten analytical procedures. PLE requires a relatively short extraction time and a small amount of solvent but tedious clean-up procedures of the extracts are often needed because the selectivity of the extraction methods is low. Pressurised hot water extraction (PHWE) is an environmentally friendly organic solvent free technique that seems to be a good alternative to these techniques. In PHWE, water is used as the extraction solvent at elevated temperature and under pressure to keep water in liquid state. PHWE has been used to extract organic pollutants from solid matrices such as contaminated soils [15]. There is no specific commercially available device for PHWE but an automatic pressurised liquid extraction (PLE; Dionex trade name ASE for accelerated solvent extraction) instrument that uses water as the solvent has been described in some

studies [15,16]. Aliphatic primary amines are polar compounds that can be easily extracted using water as the extraction solvent by PHWE. One disadvantage of PHWE, however, is that the extract is a relatively dilute aqueous solution. To try to minimize the dilution of the analytes in the aqueous extract, we can use preconcentration techniques such as liquid-liquid extraction (LLE) [1,7,17], solid-phase extraction (SPE) [3,6,18,19], single-drop microextraction (SDME) [20], liquid-phase microextraction (LPME) [21], and solid-phase microextraction (SPME) [2,8-10,13,22-27]. SPME is a simple technique with several advantages: it is a solvent free, efficient technique that it is easy to automate and can easily be used after PHWE to extract and concentrate the analytes in a single step.

In this study we optimize a novel method based on pressurized hot water extraction of sewage sludge followed by simultaneous derivatization and headspace solid-phase microextraction (HSSPME). Separation by a gas chromatograph coupled to an ion-trap tandem-in-time mass spectrometry (GC-IT-MS-MS) detection system was used to determine ten primary aliphatic amines in several types of sewage sludge from WWTPs and a potable water plant.

EXPERIMENTAL

Reagents and solutions

The primary aliphatic amines we studied were methylamine (MA) (40 wt.% in H₂O), ethylamine (EA) (70 wt.% in H₂O), isopropylamine (IPA), isobutylamine (IBA), n-butylamine (BA), isoamylamine (IAA), amylamine (AA), n-heptylamine (HA), 2-phenylethylamine (PEA) and cyclohexylamine (CA). They were obtained from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). The derivatization reagent was 2,3,4,5,6-pentafluorobenzaldehyde (PFBAY) (Sigma–Aldrich). The purity of all standards was greater than 98%. Sodium hydroxide and hydrochloric acid was supplied by Scharlau Chemie (Barcelona, Spain) and sodium chloride was supplied by Sigma–Aldrich. HPLC-grade acetonitrile was purchased from SDS (Peypin, France). Ultrapure water was obtained using a Milli-Q purification system (18.2M_cm) (Millipore, Bedford, MA, USA). Helium and nitrogen were obtained from Carbuross Metàlics (Tarragona, Spain). Cellulose filters of 20mm obtained from Tecknokroma (Barcelona, Spain) and diatomaceous earth (95%) from Sigma–Aldrich were used for PHWE.

Individual stock standard solutions of each aliphatic amine and PFBAY solution were prepared in acetonitrile at a concentration of 2000 mg·L⁻¹. The working mixed solution of 10 mg·L⁻¹

was prepared weekly by diluting different amounts of each stock standard solution with acetonitrile. All solutions were stored in darkness at 4 °C.

Sampling

Several types of sewage sludge samples were collected from three industrial wastewater plants (A, B and C), a municipal wastewater plant (D), and a potable water plant (E). All these plants are located on the outskirts of Tarragona (Spain). These sludge samples had different origins and matrix complexities and had also undergone different treatment processes, such as conventional activated sludge (CAS) treatment or membrane bioreactor (MBR) treatment.

Sample pre-treatment

Each frozen sludge sample was lyophilized using the freeze dry system (Labconco, Kansas City, MO, USA) and sieved through a 125_μm screen to obtain particles with the same diameters.

To optimize the method, the sewage sludge samples were spiked with all compounds dissolved in acetone. After spiking, the samples were stirred intensively so that the compounds would be in sufficient contact with the matrix. The acetone was left to evaporate at room temperature until the sludge samples were dry (around 4 h).

Pressurised hot water extraction

PHWE extraction was performed on a Dionex (Sunnyvale, CA, USA) ASE 200 instrument equipped with 11 mL capacity stainless-steel extraction cells. One cellulose filter followed by 1 g of diatomaceous earth was placed at the bottom of each cell. 1 g of the dried sample was accurately weighed into a glass container and mixed with diatomaceous earth until the mixture became homogeneous. The mixture was then introduced into the cell, which was refilled with diatomaceous earth and tightly closed.

Each sample was extracted with ultrapure water at pH 4. The operating conditions were as follows: extraction temperature, 100 °C; extraction pressure, 1500 psi; preheating period, 5 min; static extraction, 15 min; number of cycles, 2; flush volume, 60% of extraction cell volume; final extraction volume, ~ 22 mL; and nitrogen purge, 60 s. The extraction temperature, extraction time and pH of water as extracting solvent were the parameters optimized by a central composite design. For this optimization the experimental design matrix and data analysis were performed using the Statgraphics statistical computer package "Statgraphics Plus 5.1" (Manugistics, Inc., Rockville, MD, USA).

Derivatization and headspace solid-phase microextraction

The PHWE extract was diluted with water to a final volume of 25 mL and adjusted to pH 12 with NaOH 1M. A solution of 10 mL was taken and poured into a 20 mL headspace vial, which contains 3.6 g of sodium chloride and a magnetic stirring bar. We then performed a simultaneous derivatization and HS-SPME, applying our previous method to the aqueous sludge extract [10]. We used an 85 µm polyacrylate (PA) fiber purchased from Supelco. Before use, the fiber was thermally conditioned in accordance with the manufacturer's recommendations by inserting it into the GC injector port. The used fibers were cleaned by heating them at 250 °C for 10 min prior to extraction and a blank test was performed to check for possible carry-over. The entirely automated SPME extractions were performed by a commercial autosampler CombiPAL (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) mounted on the GC-MS system.

PFBAY was added to the 20 mL headspace vial as a derivatization reagent (200 µL of 2000 mg·L⁻¹). The vial was immediately sealed tightly using a screw cap with a PTFE silicone-faced septum and placed in the tray for SPME. When the temperature of the heat/stir accessory reached 40 °C, the vial was automatically transported there and stabilized for 1 min. The fiber was then introduced through the septum

and kept in the headspace of the vial for 15 min at 40 °C. During extraction, the sample was magnetically stirred at 750 rpm. The fiber was then withdrawn into the SPME syringe needle, which was then pulled out of the sample vial and immediately inserted into the GC injection port at 250 °C for 8 min for the desorption.

Chromatographic analysis

The compound derivatives were analysed by GC-IT-MS-MS. The chromatographic instrument was a Varian 3800 gas chromatograph (Walnut Creek, CA, USA) connected to a Varian 4000 ion trap mass detector. The GC was equipped with a 1079 programmable temperature vaporizing (PTV) injector, a Merlin high-pressure microseal and a 0.8 mm i.d. insert liner (Varian). A fused silica capillary column (3 m × 0.25 mm i.d.) from Supelco (Bellefonte, PA, USA) was used as a guard column connected to a ZB-5 analytical column (30 m × 0.25 mm i.d.; 0.25 µm film thickness) from Torrance (CA, USA). Helium was used as a carrier and collision gas at a flow rate of 1 mL·min⁻¹. Varian Workstation software was used for instrument control and data processing.

The injector temperature was set at 250 °C and the analyses were done in splitless mode. The column oven was programmed as follows: the temperature was initially set at 60 °C, increased by 20 °C·min⁻¹ to 135 °C, then increased by 30 °C·min⁻¹ to 290 °C, and held for 1.08 min. The total run

time was just 10 min. The transfer line, manifold and trap temperatures were 280, 60 and 240 °C, respectively. A filament-multiplier delay of 3.40 min was established in order to prevent instrument damage. The analytes were ionized by electron impact (70 eV). The MS-MS process was carried out by collision-induced dissociation (CID) with resonant or non-resonant excitation, depending on the compound, because the response obtained was adequate and more reproducible. Table 1 shows the optimal MS-MS parameters for each compound.

RESULTS AND DISCUSSION

To extract the primary amines fast and efficiently from a solid matrix using PHWE, proper instrumental parameters (temperature, pressure, extraction time, number of cycles, flush volume and purge time) and a suitable pH of water as the extraction solvent should be selected. As previous studies on the extraction of primary amines from sewage sludge or sediments using PHWE or PLE do not exist, we selected the initial conditions according to previous experience by our research group to determine other organic contaminants in sewage sludge by PLE [28,29]. We tested water as an extraction solvent at different pH because primary amines are highly soluble polar compounds in water and the derivatization-HS-SPME can be performed easily in aqueous media.

Table 1. GC-IT-MS-MS conditions.

Compound	Parent ion (<i>m/z</i>)	CID amplitude (V)	CID storage level (<i>m/z</i>)	Product ions ^a (<i>m/z</i>)	<i>m/z</i> range	Scan time (s/scans)
Methylamine	208	1.2	80.2	188, 181 , 158	81-218	0.45
Ethylamine	208	71	80.2	181 , 161, 158	80-218	0.45
Isopropylamine	222	78	85.6	181 , 145 , 175	86-232	0.45
Isobutylamine	208	72	80.2	181 , 161, 158	80-218	0.45
Butylamine	208	72	80.2	188, 181 , 158	80-218	0.45
Isoamylamine	208	72	80.2	181 , 158	80-218	0.45
Amylamine	250	79	96.4	187 , 181	96-260	0.45
Cyclohexylamine	248	88	95.6	233, 228, 181 , 151	96-258	0.60
Heptylamine	250	80	96.4	207, 187 , 181	96-260	0.60
2-Phenylethylamine	208	70	80.2	181 , 158	80-218	0.60

^a Quantification ions (*m/z*) are shown in bold type.

Using water instead of toxic organic solvents also makes the extraction more environmentally friendly. Our initial conditions were a preheating period of 5 min, a pressure of 1500 psi, 2 cycles, a purge time of 60 s, a flush volume of 60% and 1 g of dry sample. The most critical factors affecting the extraction efficiency in PHWE were the pH of water as the solvent extraction, the extraction time and the extraction temperature [15,28]. To find the optimum conditions for the fast and efficient extraction of the primary amines from a sludge matrix, we chose a central composite design (with $\alpha = 1.67$) in three orthogonal blocks using surface response to optimize the pH of water as the

extraction solvent (from 4 to 11), the extraction temperature (from 50 to 100 °C), and the extraction time (from 5 to 15 min). We used the Statgraphics statistical package to generate the experimental matrix and calculate the standardized main effects of the factors considered. The complete design consisted of 17 randomly performed experiments (values are listed in Table 2). All experiments were conducted by extracting 1 g of a sewage sludge sample of WWTP E spiked at 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (dry weight, d.w.) of amines. The individual chromatographic peak areas of each compound derivate were recorded as experimental responses for optimizing.

Table 2 Matrix for central composite design.

Assay (Block)	Temperature (°C)	Time (min)	pH of water
1 (1)	50 (-1)	15 (1)	11 (1)
2 (1)	50 (-1)	5 (-1)	4 (-1)
3 (1)	75 (0)	10 (0)	7.5 (0)
4 (1)	100 (1)	15 (1)	4 (-1)
5 (1)	100 (1)	5 (-1)	11 (1)
6 (2)	100 (1)	5 (-1)	4 (-1)
7 (2)	50 (-1)	15 (1)	4 (-1)
8 (2)	100 (1)	15 (1)	11 (1)
9 (2)	75 (0)	10 (0)	7.5 (0)
10 (2)	50 (-1)	5 (-1)	11 (1)
11 (3)	117 (1.67)	10 (0)	7.5 (0)
12 (3)	33 (-1.67)	10 (0)	7.5 (0)
13 (3)	75 (0)	10 (0)	1.6 (-1.67)
14 (3)	75 (0)	18 (1.67)	7.5 (0)
15 (3)	75 (0)	10 (0)	13.4 (1.67)
16 (3)	75 (0)	10 (0)	7.5 (0)
17 (3)	75 (0)	2 (-1.67)	7.5 (0)

Pareto charts were used to identify the most influential factors. The data obtained in each central composite design were evaluated by ANOVA at the 5% significance level. These results are shown in bar chart format, with the effects sorted in rank order. For instance, Fig. 1 shows the Pareto chart for the area of methylamine extracted by PHWE followed by derivatization-HS-SPME-GC-IT-MS-MS. The tendency observed is similar to that in the Pareto chart for the other compounds. In most cases, the extraction temperature was the most important parameter in the PHWE process. The chromatographic peak areas were largest when the temperature was highest (100 °C). For most compounds the pH of water as the extraction solvent was the second most important factor and the areas were largest when the pH of water

was lowest (pH 4). The extraction time was the least influential factor and the areas were largest when the time was highest (15 min). These results agree with the fact that the primary amines studied are polar compounds that at a pH of below 10.5 are easily protonated and have more affinity for water. High temperatures improved the extraction of amines from sludge. The peak areas also increased as the extraction time increased. For example, Fig. 2 shows the response surface graph when the pH of water is plotted against the extraction temperature for an extraction time of 10min for methylamine derivate. The largest areas are found for pH 4 and 100 °C. The optimized conditions were therefore an extraction temperature of 100 °C and 2 cycles of 15 min with water (pH 4). These conditions were used for further experiments.

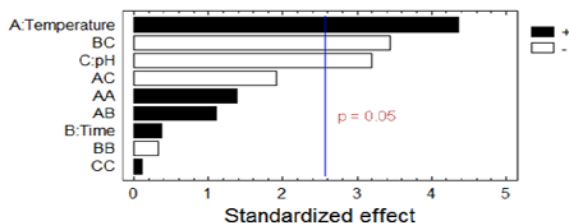


Figure 1. Standardized Pareto chart of the main effects in the central composite design affecting the PHWE of methylamine. The line represents the significant limit.

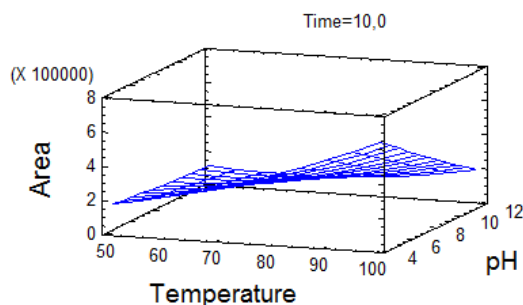


Figure 2. Estimated response surface for methylamine obtained using the central composite design and plotting the extraction temperature against the pH of water in PHWE.

Following the PHWE extraction of the sewage sludge under optimum conditions we used 10 mL of the diluted aqueous extract and used the simultaneous derivatization and HS-SPME of amines using PFBAY as a derivatizing reagent and an 85 μm PA fiber, and then performed determination with GC-IT-MS-MS [10].

Validation of the PHWE-derivatization-HS-SPME-GC-IT-MS-MS method

The sewage sludge samples from potable water plant E were taken for analysis to evaluate the developed method. Table 3 shows the data for retention times, limits of detection (LODs), linear ranges, determination coefficients, repeatabilities and reproducibilities for the primary amines under the optimized experimental conditions.

Table 3. Retention times, limits of detection (LODs), limits of quantification (LOQs), linear range, determination coefficients and precision for the analysis of primary amines by PHWE-derivatization-HS-SPME-GC-IT-MS-MS in sewage sludge.

Compound	Retention Time (min)	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Linear range ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Determination coefficient	Repeatability ^a (% RSD)	Reproducibility ^{a,b} (% RSD)
Methylamine	3.66	135	450- 10000	0.9994	6	17
Ethylamine	4.12	36	150- 10000	0.9997	7	19
Isopropylamine	4.29	39	150- 10000	0.9976	11	22
Isobutylamine	5.04	44	150- 10000	0.9993	16	22
Butylamine	5.31	36	150- 10000	0.9997	16	21
Isoamylamine	5.64	103	350- 10000	0.9998	9	20
Amylamine	5.82	9	50- 10000	0.9993	12	19
Cyclohexylamine	6.52	69	250- 10000	0.9989	5	15
Heptylamine	6.73	68	250- 10000	0.9984	19	24
2-Phenylethylamine	7.44	114	350- 10000	0.9981	12	20

^a n=5; 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (d.w.)

^b between days

When the PHWE extract of sewage sludge from potable water plant E was analyzed, some target compounds were present in the chromatogram. One of these, methylamine, showed high areas. Five blanks of this sewage sludge were analysed. The LODs of the compounds that did not appear in the sludge sample were defined as the concentration giving a signal-to-noise ratio of 3. The LODs of the compounds that did appear in the sludge sample were defined as the concentration giving a signal average of plus three times the standard deviation. Limits of quantification (LOQs) were defined as the lowest point of the calibration curve.

As when we used this method in industrial wastewater samples [10], in sewage sludge sample we found that some matrix components affected the behaviour of the analytes, which then affected the resulting area. For this reason, we checked the matrix effects

when developing the method. We compared the calibration curves obtained in ultrapure water with those obtained with the PHWE extract of sewage sludge E in both cases using derivatization-HS-SPME-GC-IT-MS-MS. For comparison we used the *F*-test ($\alpha = 0.05$, $n = 2$) and the *t*-test ($\alpha = 0.05$, $n = 2$) for each compound and found that the calibration curves were not comparable (t_{calc} was always higher than $t_{\alpha,n-2}$), so matrix effects were observed. The slopes of the calibration curves of the PHWE extract were much lower than those of ultrapure water, so calibration was performed by standard addition. Sewage sludge E was spiked with amines in range 10–10,000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (dry weight, d.w.). The linear range was between 150 and 10,000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (d.w.) for most compounds and the determination coefficients (r^2) were above 0.9976. The results for the other samples were similar.

Repeatability, expressed as the relative standard deviation of the analysis of five samples spiked at 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (d.w.), was below 19% ($n = 5$). Reproducibility between days, expressed as the relative standard deviation of five samples spiked at 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (d.w.) and analysed on five different days, was below 24% ($n = 5$). The LOQ, the concentration of the lowest point of the calibration curve, ranged from 50 for amylamine to 450 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (d.w.) for methylamine. The LODs, calculated as we mentioned before, ranged from 10 for

Amylamine to 135 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (d.w.) for methylamine.

Quantitative analysis of primary amines in sewage sludge

The above method was used to determine the ten primary amines in different types of sewage sludge samples collected in four WWTPs and one potable water treatment plant using the standard addition calibration method (Table 4). For instance, Fig. 3 shows the chromatograms of a sewage sludge sample from WWTP B.

Table 4. Concentration ($\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$) (d.w.) of primary amines in the analysis of sewage sludge ($n=3$, RSD < 18%).

Compound	WWTP A	WWTP B	WWTP C	WWTP D	Potable water plant E
Methylamine	n.q.	404	3.86	12.3	7.70
Ethylamine	n.d.	12.7	0.29	5.55	n.q.
Isopropylamine	0.67	26.1	4.17	0.43	0.38
Isobutylamine	1.00	543	0.77	8.50	n.q.
Butylamine	0.17	0.71	0.20	0.56	n.d.
Isoamylamine	n.q.	7.34	n.d.	12.8	n.d.
Amylamine	0.30	0.50	n.d.	0.76	n.d.
Cyclohexylamine	5.35	0.69	n.q.	0.76	n.q.
Heptylamine	n.q.	0.31	n.d.	n.q.	n.d.
2-Phenylethylamine	0.39	1.31	n.d.	14.8	n.q.

n.q.: not quantified

n.d.: not detected

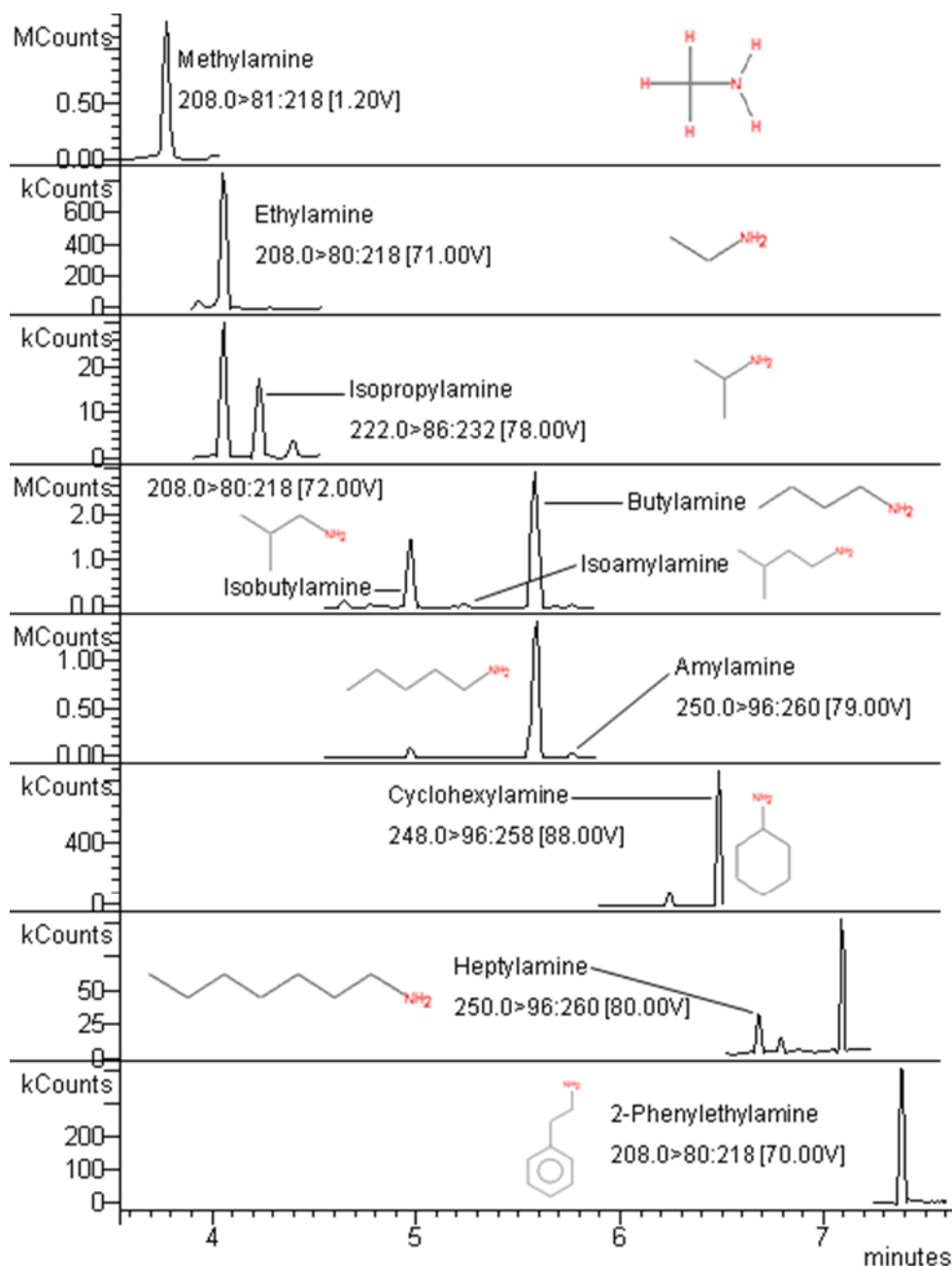


Figure 3. PHWE-derivatization-HS-SPME-GC-MS-MS chromatograms of primary amines of an unspiked industrial sewage sludge (sample B).

In our analyses, most of the aliphatic primary amines were detected in industrial sludge samples (A, B and C). The highest concentrations, corresponding to methylamine and isobutylamine, were 404 and 543 mg·kg⁻¹ (d.w.), respectively, in WWTP B. These results were as expected because the sewage sludge in WWTP B derives from the treatment of wastewater from different origins. The concentrations of amines in WWTP D, which ranged from 0.43 (isopropylamine) to 14.8 mg·kg⁻¹ (d.w.) (2-phenylethylamine), were slightly lower in most cases because D is an urban WWTP. In the potable water plant E we could only quantify methylamine and isopropylamine at concentrations of 7.70 and 0.38 mg·kg⁻¹ (d.w.), respectively.

There is no information in the literature on the determination of these aliphatic primary amines in sewage sludge. Some researchers using a Soxhlet system [7] to determine some of these amines in river sediments, however, found concentrations of between 0.19 and 163.01 ng·kg⁻¹ (d.w.). These values are much lower than ours because of the different origin and type of sample. Other authors [14] also found other types of amines, trialkylamines, at concentrations of between 1.39 and 4.87 mg·kg⁻¹ (d.w.) in sediment samples and between 43.6 and 1430 mg·kg⁻¹ (d.w.) in sewage sludge samples using extraction procedures such as SFE, PLE, Soxhlet and sonication.

CONCLUSIONS

A selective analytical method based on PHWE followed by simultaneous derivatization with PFBAY and HS-SPME coupled to a GC-IT-MS-MS was used to determine ten primary amines in sewage sludge samples at µg·kg⁻¹ (d.w.) levels. The most important parameters involved in the PHWE were evaluated using a central composite design and the optimum conditions were an extraction temperature of 100 °C and 2 cycles of 15 min with water (pH 4). This method is easy to perform, avoids using toxic organic solvents, is environmental friendly and has automated steps. Using MS-MS rather than single MS detection also provides high selectivity for determining and characterising these ten primary amines in highly complex matrixes such as sewage sludge samples from WWTPs.

To test the applicability of this method, several types of sewage wastewater samples were analysed. As matrix effects were observed, standard addition calibration had to be performed. Most of the compounds we studied were detected at concentrations of between 0.17 (butylamine) and 543 mg·kg⁻¹ (d.w.) (isobutylamine). As expected, in most compounds the concentrations of these amines were higher in the sewage sludge of industrial WWTPs, lower in the sewage sludge of the municipal WWTP, and much lower in

the sewage sludge of the potable water plant.

Acknowledgements

The authors wish to thank the personnel of the water treatment plants for their cooperation in all aspects of this study. This study was financially supported by project CTM2008-06847-C02-01/TECNO of the Directorate General for Research of the Spanish Ministry of Science and Technology. A. Llop gratefully acknowledges the financial support of the Department of Innovation, Universities and Enterprise of the Catalan Government, as well as the European Social Fund (2007 FI00026).

REFERENCES

- [1] F. Sacher, S. Lenz, H.J. Brauch, J. Chromatogr. A 764 (1997) 85–93.
- [2] M. Ábalos, J.M. Bayona, F. Ventura, Anal. Chem. 71 (1999) 3531–3537.
- [3] P. Kusch, G. Knupp, M. Hergarten, M. Kozupa, M. Majchrzak, J. Chromatogr. A 1113 (2006) 198–205.
- [4] M. Fu, R.J. Eismin, P. Duan, S. Li, H.I. Kenttämää, Int. J. Mass Spectrom. 282 (2009) 77–84.
- [5] H. Greim, D. Bury, H.J. Klimisch, M. Oeben-Negele, K. Ziegler-Skylakakis, Chemosphere 36 (1998) 271–295.
- [6] S. Meseguer, C. Molins, P. Campins, J. Chromatogr. A 978 (2002) 59–69.
- [7] M. Akyüz, S. Ata, J. Chromatogr. A 1129 (2006) 88–94.
- [8] L. Cai, Y. Zhao, S. Gong, L. Dong, C. Wu, Chromatographia 58 (2003) 615–621.
- [9] L. Pan, J.M. Chong, J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A 773 (1997) 249–260.
- [10] A. Llop, E. Pocurull, F. Borrull, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 575–581.
- [11] H. Kataoka, J. Chromatogr. A 733 (1996) 19–34.
- [12] M.J. Avery, G.A. Junk, Anal. Chem. 57 (1985) 790–792.
- [13] H. Lin, C. Deng, X. Zhang, J. Sep. Sci. 31 (2008) 3225–3230.
- [14] R. Alzaga, C. Maldonado, J.M. Bayona, Int. J. Environ. Anal. Chem. 72 (1998) 99–111.
- [15] V. Fernández-González, E. Concha-Graña, S. Munategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, J. Chromatogr. A 1196–1197 (2008) 65–72.
- [16] R. Rodil, P. Popp, J. Chromatogr. A 1124 (2006) 82–90.
- [17] M.-J. Paik, Y. Choi, K.-R. Kim, Anal. Chim. Acta 560 (2006) 218–226.
- [18] S. Mishra, V. Singh, A. Jain, K.K. Verma, Analyst 126 (2001) 1663–1668.
- [19] C. Molins-Legua, P. Campins-Falcó, Anal. Chim. Acta 546 (2005) 206–220.
- [20] C. Deng, N. Li, L. Wang, X. Zhang, J. Chromatogr. A 1131 (2006) 45–50.
- [21] K.J. Chia, S.D. Huang, J. Chromatogr. A 1103 (2006) 158–161.

- [22] E. Baltussen, F. David, P. Sandra, H.-G. Janseen, C. Cramers, J. High. Resol. Chromatogr. 21 (1998) 645–648.
- [23] K.K. Ngim, S.E. Ebeler, M.E. Lew, D.G. Crosby, J.W. Wong, J. Agric. Food. Chem. 48 (2000) 3311–3316.
- [24] S.T. Chan, M.W.Y. Yao, Y.C. Wong, T. Wong, C.S. Molk, D.W.M. Sin, Eur. Food Res. Technol. 224 (2006) 67–74.
- [25] Y.Y. Zhao, L.S. Cai, Z.Z. Jing, H. Wang, J.X. Yu, H.S. Zhang, J. Chromatogr. A 1021 (2003) 175–181.
- [26] S. Kulkarni, A.M. Shearrow, A. Malik, J. Chromatogr. A 1174 (2007) 50–62.
- [27] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 62 (1990) 2145–2148.
- [28] A. Nieto, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 5619–5625.
- [29] A. Nieto, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull, Curr. Anal. Chem. 4 (2008) 157–167.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013

**3.3.2. Automated on-fiber derivatization with headspace
SPME-GC-MS-MS for the determination of primary amines in
sewage sludge using pressurized hot water extraction**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013



**AUTOMATED ON-FIBER DERIVATIZATION WITH
HEADSPACE SPME-GC-MS-MS FOR THE DETERMINATION
OF PRIMARY AMINES IN SEWAGE SLUDGE USING
PRESSURIZED HOT WATER EXTRACTION**

Anna Llop, Eva Pocurull and Francesc Borrull

Departament de Química Analítica i Química Orgànica. Universitat Rovira i Virgili
Marcel·lí Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain

Abstract

An automated, environmentally friendly, simple, selective, and sensitive method was developed for the determination of ten primary aliphatic amines in sewage sludge at mg/kg dry weight (d.w.). The procedure involves a pressurized hot water extraction (PHWE) of the analytes from the solid matrix, followed by a fully automated on-fiber derivatization with 2,3,4,5-pentafluorobenzaldehyde (PFBAY) and headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and subsequent gas chromatography ion-trap tandem mass spectrometry (GC-IT-MS-MS) analysis. The limits of detection (LODs) of the method were between 0.5 and 45 mg/kg (d.w.) for all compounds except for ethyl-, isopropyl-, and amylamine, whose LODs were 70, 109, and 116 mg/kg (d.w.), respectively. The limits of quantification (LOQs) were between 10 and 350 mg/kg (d.w.). Repeatability and intermediate precision, expressed as RSD(%) ($n = 3$), were lower than 18 and 21%, respectively. The method developed enabled to determine primary aliphatic amines in sludge from various urban and industrial sewage treatment plants as well as from a potable treatment plant. Most of the primary aliphatic amines were found in the sewage sludge samples analyzed corresponding to the maximum concentrations to the samples from the urban plant: for instance, isobutylamine and methylamine were found at 7728 and 12,536 mg/kg (d.w.), respectively. Amylamine was detected only in few samples but always at concentrations lower than its LOQ.

Keywords: GC-MS-MS, on-fiber derivatization, pressurized hot water extraction, primary aliphatic amines, solid-phase microextraction

INTRODUCTION

Aliphatic amines are an important group of compounds derived in nature by the degradation of organic matter such as proteins, amino acids, and other nitrogen-containing compounds. They are also widely used as industrial chemicals, pharmaceuticals, pesticides, polymers, dyestuffs, and corrosion inhibitors [1–5]. Besides creating an unpleasant smell, these compounds are irritants of the skin, mucous membranes, eyes, and respiratory tract. Moreover, they have been considered tumor-inducing agents, as they can react with nitrogen oxides and form nitrosamines, which are potentially carcinogenic substances [2, 6–8]. The determination of these compounds in environmental samples such as river water, wastewater, sediments, and sewage sludge is therefore of great interest. Up to now, little information has been available on the occurrence of aliphatic amines at the range of ng/L–mg/L levels in surface water [7, 9] and in wastewater [2, 10, 11] and there is even less about their presence in sewage sludge [9, 12].

Determining aliphatic amines has traditionally been difficult due to the particular physicochemical properties of these compounds, such as high volatility and polarity, basic character, and high solubility in water [1–2]. The most widely used techniques for determining amines are gas chromatography (GC) and liquid

chromatography (LC); however, a derivatization step prior to the chromatographic analysis is usually required to enhance the detection by MS, UV, or fluorescence. Derivatization with pentafluorobenzoyl chloride or 2,3,4,5-pentafluorobenzaldehyde (PFBAY) followed by GC is often preferred over LC in environmental samples due to its superior selectivity and sensitivity [10, 13–17]. The derivatives formed require further extraction and concentration prior to GC or LC analysis. Several extraction techniques have been used to extract amines from aqueous samples such as liquid–liquid extraction (LLE) [1, 9, 18], solid-phase extraction (SPE) [3, 6, 13, 19], single-drop microextraction (SDME) [16], liquid-phase microextraction (LPME) [15], and solid-phase microextraction (SPME) [2, 7, 10–11, 17, 20–25].

As we have been mentioned, very few studies have been found in the scientific literature for the extraction of aromatic and aliphatic amines, such as trialkylamines, from sediments and sewage sludge samples, which use different extraction techniques, such as Soxhlet [9], sonication, supercritical fluid extraction (SFE) and pressurized liquid extraction (PLE) [26]. Modern technologies, such as SFE and PLE, have been developed to minimize waste solvents and shorten analytical procedures compared with the classical ones. SFE requires a relatively complex system and extraction yields are highly dependent

on the matrix. PLE requires a relatively short extraction time and a small amount of solvent but, in some cases, tedious cleanup procedures of the extracts are needed because the selectivity of the extraction method is low. A good alternative to these techniques is to use pressurized hot water extraction (PHWE) that uses water in the subcritical state (at elevated temperature and under pressure to keep water in liquid state) as solvent for the extraction of organic pollutants from solid matrices such as contaminated soils [27, 28]. PHWE is an environmentally friendly organic solvent-free technique. Aliphatic primary amines are polar compounds that can therefore be easily extracted using water as the extraction solvent by PHWE. However, one disadvantage of PHWE is that the obtained extract is a relatively dilute water solution, and therefore, preconcentration techniques should be used to minimize the dilution of the analytes in the aqueous extract. SPME is a simple extraction technique with several advantages: it uses reduced amount of organic solvents, is efficient, easy to automate, and can be used easily after PHWE to extract and preconcentrate the analytes in a single step.

The combination of SPME and derivatization for aliphatic amines was first reported by Pawliszyn and coworkers [10]. The authors demonstrated that the transformation of the primary amines into less polar derivatives reduced considerably the

limits of detection (LODs) compared with direct SPME. Moreover, the usefulness of performing a simultaneous derivatization using PFBA with a headspace (HS) SPME (with polyacrylate [PA]-coated SPME fibers) for the determination of ten primary amines in wastewaters prior to GC-IT-MS-MS was recently demonstrated [11].

In SPME, derivatization can be carried out in different modes: (i) simultaneously with SPME extraction (adding the reagent directly into the sample) [11], (ii) after the analyte is already adsorbed into the fiber (by immersing the fibre onto a solution of the reagent), or (iii) after coating the fiber with the reagent (and then extracting the analytes). Several articles comparing different derivatization approaches for some groups of compounds have been published [29–33]. For all applications, the results concluded that by using SPME fibre coated with the derivatizing reagent, followed by extraction/derivatization of the analyte, it is possible to achieve more sensitive results; therefore, a synergistic combination of SPME and derivatization is achieved in these works.

The aim of the present study is to develop a method to determine ten primary amines from sludge. The method is based on the extraction of the amines from sludge by PHWE followed by a fully automated on-fiber derivatization and extraction and

analysis by GC-IT-MS-MS. The optimized method was applied to the analysis of sludge from urban and industrial sewage treatment plants and a potable water treatment plant (PWTP).

MATERIALS AND METHODS

Materials and reagents

All the reagents were of analytical grade. Methylamine (MA) (40 wt.% in H₂O), ethylamine (EA) (70 wt.% in H₂O), isopropylamine (IPA), isobutylamine (IBA), n-butylamine (BA), isoamylamine (IAA), amylamine (AA), n-heptylamine (HA), 2-phenylethylamine (PEA), and cyclohexylamine (CA) were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Stock solutions of individual standards were prepared by diluting each compound in acetonitrile at a concentration of 2000 mg/L and stored in darkness at 4 °C. A mix of all compounds in acetonitrile at a concentration of 1 mg/L was prepared weekly. Working solutions were prepared daily by diluting different amounts of the previous solution with ultrapure water.

The derivatization reagent was PFBA and was purchased from Sigma-Aldrich. Acetonitrile was of HPLC grade (SDS, Peypin, France). Sodium hydroxide and hydrochloric acid were obtained from Scharlau Chemie (Barcelona, Spain), and sodium chloride was supplied by

Sigma-Aldrich. Ultrapure water was obtained using a Milli-Q purification system (18.2MOCm) (Millipore, Bedford, MA, USA). Helium and nitrogen were from Carburos Metálicos (Tarragona, Spain). Cellulose filters of 20 mm from Tecknokroma (Barcelona, Spain) and diatomaceous earth (95%) (Sigma-Aldrich) were used for PHWE.

Samples

Sewage sludge samples were collected from industrial wastewater treatment plants (WWTPs) (A–C), an urban WWTP (D), and a PWTP (E), located in the surrounding area of Tarragona. The industrial WWTPs treated different kinds of polluted water coming from different origins. Moreover, all the plants had different treatment processes.

After collection, each sludge sample was frozen, lyophilized using the freeze-dry system (Labconco, Kansas City, MO, USA), and sieved through a 125 µm screen to obtain particles with the same diameter.

PHWE procedure

The extractions were carried out using a Dionex ASE 200 accelerated solvent extractor (Sunnyvale, CA, USA) with 11 mL stainless steel extraction cells. One cellulose filter followed by 1 g of diatomaceous earth was placed at the bottom of each cell, and 1 g of dried sewage sludge sample was mixed with diatomaceous earth until the

mixture was homogeneous. The mixture was introduced into the cell and, according to the optimum conditions [12], extracted with water at pH 4 at 100 °C and 1500 psi for two cycles of 15 min. The other instrumental conditions were as follows: a preheating period of 5 min, the flush volume was set to 60% of the extraction cell volume, and the time of nitrogen purge was 60 s. The resulting extract volumes were ca. 21 mL, which were filled with water to a volume of 25 mL.

Automatic on-fiber derivatization with PFBAY and HS-SPME

The HS-SPME experiments were carried out with a PA SPME fiber (85 mm) (Supelco, Bellefonte, PA, USA) on a CTC Combi-Pal autosampler CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland), which was equipped with a sample tray for 32 vials of 20 mL, an SPME fiber conditioning station, and a temperature-controlled single magnet mixer tray (SMM tray) (Chromtech, Idstein, Germany). CTC Combi-Pal autosampler was controlled and programmed with the Cycle Composer with macro editor software version 2.4.0. Before use, the PA fiber was conditioned at 280 °C under helium flow for 1 h in accordance with the manufacturer's recommendations. Fiber blanks were run to ensure the absence of contaminants or carryover.

The PA fiber was first conditioned for 3 min at 250 °C using the SPME fiber

conditioning station. In total, 10 mL of a solution of PFBAY (1 mg/mL) in a mixture of ultrapure water:acetonitrile (9:1) was transferred to a 20 mL PTFE-capped vial containing a magnetic stirring bar. The vial was preheated in the SMM tray for 1 min at a temperature of 40 °C and under a magnetic agitation rate of 750 rpm. At the end of this period time, the fiber was automatically transported and introduced through the septum and kept in the HS of the vial containing the derivatizing reagent for 20 min with a constant magnetic agitation rate of 750 rpm. Afterward, the fiber was withdrawn into the SPME syringe needle, which was then pulled out of the vial.

Ten milliliter of a sewage sludge aqueous extract adjusted at pH 12 with NaOH 1M was added into another 20 mL HS vial containing 3.6 g of NaCl and a stirring bar. The vial was immediately sealed tightly using a screw cap with a PTFE silicone-faced septum. When the temperature of the heat/stir accessory reached 60 °C, the vial was stabilized there for 0.1 min. The fiber was then introduced through the septum and kept in the HS of the vial for 20 min at 60 °C. During the simultaneous on-fiber derivatization and HS-SPME extraction, the sample was magnetically stirred at 750 rpm. Subsequently, the fiber was withdrawn into the SPME syringe needle, which was then pulled out of the vial and immediately inserted into the GC injection port.

GC-MS

The GC-IT-MS-MS analysis was performed using a Varian 3800 gas chromatograph (Varian Chromatography Systems, Walnut Creek, CA, USA) coupled to an ion trap mass spectrometer Varian 4000 with a waveboard for multiple MS (MS^n) analysis [11, 12]. The system was operated by Workstation v6.9 software. Separation was carried out on a ZB-5 analytical column (5% phenyl-dimethylpolysiloxane, 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 mm film thickness) from Torrance (CA, USA). A fused silica capillary column (3 m x 0.25 mm i.d.) from Supelco was used as a guard column. Helium (purity, 99.999%) was employed as carrier gas and collision gas at a flow rate of 1.0 mL/min. The GC oven temperature was programmed from 60 to 135 °C at 20 °C/min and then until 290 °C at 30 °C/min (held 1.08 min) (total analysis time = 10 min). Splitless mode was used for injection and the injector temperature was kept at 250 °C.

The ion trap mass spectrometer was operated in the electron impact (EI) ionization mode (70 eV) using an internal ionization configuration. Manifold, ion trap, ion source, and transfer line temperatures were maintained at 60, 240, and 280 °C, respectively. For MS-MS analysis, general parameters were as follows: filament/multiplier delay, 3.40 min; filament emission current, 80 mA; and multiplier offset, 1200 V. The MS-MS

process was carried out by collision induced dissociation (CID) with resonant or non-resonant excitation, depending on the compound since the response obtained was adequate and more reproducible. Specific MS-MS conditions and retention times for each target compound are listed in Table 1. The analytes were positively identified by comparison of the relative abundance of the ions in spectra and retention times to those of standards.

RESULTS AND DISCUSSION

On-fiber derivatization and HS-SPME extraction optimization

Taking into account our previous experience in the determination of aliphatic primary amines in sludge, we optimized the on-fiber derivatization with simultaneous HS-SPME extraction in order to fully automate the analysis, with the exception of the previous PHWE. Thus, PHWE and GC tandem MS conditions were taken from a previous method [12] in which a full automation was not accomplished. Several studies have demonstrated that PFBAY as a derivatizing reagent and PA as a coating fiber are a good combination to derivatize and extract primary aliphatic amines from waters matrices [10, 11]. However, to the best of our knowledge, an on-fiber derivatization using PFBAY and PA fiber has never been tested.

Table 1. Specific MS-MS conditions for each primary aliphatic amine.

Compound	Segment	Parent ion (<i>m/z</i>)	Exc. Amp. (V)	Exc. Stg. Lvl. (<i>m/z</i>)	<i>m/z</i> range	Product ions ^a (<i>m/z</i>)
Methylamine	1	208	1.2	80.2	81-218	188, 181 , 158
Ethylamine	2	208	71	80.2	80-218	181 , 161, 158
Isopropylamine	2	222	78	85.6	86-232	181 , 145 , 175
Isobutylamine	3	208	72	80.2	80-218	181 , 161, 158
Butylamine	3	208	72	80.2	80-218	188, 181 , 158
Isoamylamine	3	208	72	80.2	80-218	181 , 158
Amylamine	3	250	79	96.4	96-260	187 , 181
Cyclohexylamine	4	248	88	95.6	96-258	233, 228, 181 , 151
Heptylamine	5	250	80	96.4	96-260	207, 187 , 181
2-Phenylethylamine	6	208	70	80.2	80-218	181 , 158

^a Quantification ions (*m/z*) are shown in bold type. Exc. Amp.: excitation amplitude; Exc. Stg. Lvl.: excitation storage level.

In the on-fiber derivatization with HS-SPME extraction, two steps need to be optimized: the coating of the PA fiber with PFBAY, and HS-SPME extraction with the derivatization of the analytes. Parameters affecting the coating of the PA fiber with PFBAY are PFBAY concentration in the solution, derivatizing solution volume (concentration), direct or HS sampling modality, percentage of acetonitrile in the solution, coating time, coating temperature, and agitation. The parameters that affect the HS-SPME extraction with derivatization of amines in ultrapure water are pH of the sample, salt concentration in the aqueous solution, extraction time,

extraction temperature, and sample agitation.

Initial conditions were selected according to the previous experience [11]. Thus, for the coating of the fiber with PFBAY, its concentration was fixed at 1mg/mL in order to assure complete fiber coating and subsequent reaction with volatilized amines directly on the fiber. Moreover, the initial derivatizing solution volume was 10mL and the coating of the fiber was performed in the HS sampling modality using vials of 20 mL. PFBAY solution was prepared initially at ultrapure water:acetonitrile 1:1. The coating

time and temperature were set at 15 min and 40 °C, respectively, and the agitation was fixed at 750 rpm. For the extraction and derivatization of the analytes, 10 mL of a standard solution of 5 mg/L at pH 12 (NaOH 1 M) and with 360 g/L (saturation) of NaCl was used. HS sampling of amines was selected because this sampling modality is preferred with complex matrixes such as extracts of sewage sludge. The extraction temperature and the extraction time were set at 40 °C and 15 min, respectively. The stirring rate of the aqueous sample was fixed at 750 rpm.

The most relevant parameters to optimize were the coating temperature and time of the PA fiber with the derivatizing reagent, the acetonitrile percentage in the PFBAY solution, and the extraction temperature and time of the HS-SPME of the studied amines.

The coating temperature of the fiber with the PFBAY and the extraction temperature of the amines were optimized simultaneously in order to prevent losses of the PFBAY during the cooling process of the CombiPAL SMM tray oven. To prevent it, the same temperature or a higher temperature in the second step should be used. Then, following combinations of temperatures were

tested: 40 and 40 °C, 60 and 60 °C, 80 and 80 °C, 40 and 60 °C, 40 and 80 °C, and 60 and 80°C of coating and extraction, respectively. The highest chromatographic areas were obtained using the combination of 40 and 60 °C for all the amines (Fig. 1). Thus, this combination was used in further experiments.

As regards the coating time and the extraction time, they were also optimized simultaneously using different combinations: 15 and 15 min, 20 and 20 min, 25 and 15 min, and 15 and 25 min of coating and extraction, respectively. Twenty minutes of coating and 20 min of extraction were selected as the optimal conditions because they gave the highest chromatographic responses for all the compounds except for MA, IPA, and HA, which showed slightly better responses at higher coating times.

In the optimization of the acetonitrile percentage in the PFBAY solution, the percentages of ultrapure water:acetonitrile tested were 1:1, 4:1, and 9:1, respectively. As it was expected, the chromatographic areas increased, whereas the acetonitrile percentage decreased because the derivatizing reagent coated the PA fiber more effectively. Thus, ultrapure water:acetonitrile 9:1 was selected for further experiments.

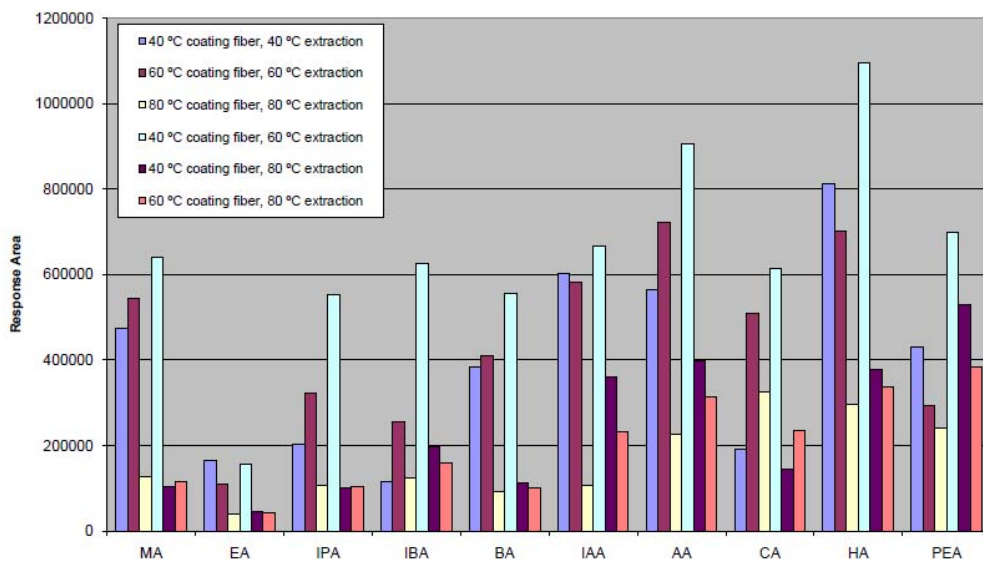


Figure 1. Chromatographic responses versus various combinations of coating and extraction temperatures.

Method validation

In order to validate the PHWE and on-fiber derivatization and HS-SPME extraction followed by GC-IT-MS-MS method developed, a sewage sludge sample from the PWTP E was used. Five samples of this sludge were analyzed under the optimized conditions and peaks corresponding to the studied amines (excepting AA) appeared in the chromatograms. We used two different criteria to calculate the LODs of the compounds depending on the fact that if they appeared or not in the sample. For the compounds that did not appear in the sludge sample, LODs were calculated as the concentration giving a signal-to-noise ratio of 3. If the compounds

appeared in the sample, we calculated the standard deviation of the signal from different samples and then found the concentration that corresponds to three times this deviation [12].

As in other previous studies [11, 12], we found that matrix components affected the behavior of the analytes and had influence in the obtained area. When we compare the calibration curves obtained with standard solutions with those obtained with the extracts of the sludge E in both cases using on-fiber derivatization HS-SPME-GC-IT-MS-MS, we always obtained t_{calc} values higher than $t_{\alpha,n-2}$ values (F -test and t -test $\alpha = 0.05$, $n = 2$). As matrix effects

were observed, calibration was performed by standard addition. Sewage sludge E was spiked with amines in the range from 10 to 10,000 mg/kg dry weight (d.w.). Only HA and PEA showed good linear range within these values, for most of the compounds the first point of the linear range was between 10 and 350 mg/kg (d.w.). Table 2 summarizes validation data. The limits of quantification

(LOQs) were defined for each compound as the lowest concentration level of each calibration curve.

Repeatability and intermediate precision five different days were calculated with an addition of 500 mg/kg (d.w.), and were expressed as the relative standard deviation (%RSD) (Table 2).

Table 2. Retention times, linear ranges, LODs, determination coefficients and repeatability and intermediate precision (%RSD, n=5, 500 µg/kg) ^a.

Compound	Retention Time (min)	Linear range (µg/kg)	LOD (µg/kg)	Determination coefficient	Repeatability (% RSD)	Reproducibility (% RSD)
Methylamine	3.66	75- 10000	19	0.9935	7	10
Ethylamine	4.12	250- 10000	70	0.9972	17	19
Isopropylamine	4.29	350- 10000	109	0.9985	2	6
Isobutylamine	5.04	50- 10000	16	0.9983	13	17
Butylamine	5.31	75- 10000	24	0.9964	17	21
Isoamylamine	5.64	150- 10000	45	0.9996	6	8
Amylamine	5.82	350- 10000	116	0.9997	7	9
Cyclohexylamine	6.52	100- 10000	28	0.9902	9	15
Heptylamine	6.73	10- 10000	0.5	0.9982	3	9
2-Phenylethylamine	7.44	10- 10000	2.4	0.9910	18	21

^a See text for other conditions.

LODs, and LOQs as well, were lower than those reported previously for a semi-automated method with in-water derivatization [12] because the extraction was more selective due to the fiber was coated with the derivatizing reagent. For most of the amines, LODs were between 1.5 and 7 times lower than for the semi-automatic method, except for HA and PEA whose values were 136 and 48 times lower, respectively. On the

other hand, ethylamine, IPA, and AA showed LODs between 2 and 13 times higher than those for the semi-automatic method. Due to the automation of the method developed, precision was also better. As example, intermediate precision was between 6 and 21% for the automatic method and between 15 and 24% for the semiautomatic method. Similar effects were found by Herráez-Hernández et al. [30] when using fibers coated with

a derivatizing reagent for extracting/derivatizing amines from aqueous samples. Scheyer et al. [31] also showed increased responses in pesticides by the use of this procedure compared with the direct derivatization of compounds in water or the extraction of compounds followed by derivatization.

Application to sewage sludge samples

The applicability of the proposed method was tested by analysing sewage sludge samples from industrial (A–C) and urban (D) WWTPs, and from a PWTP (E). Table 3 summarizes the concentration of the ten primary amines found in each type of sewage sludge, following the PHWE-on-fiber derivatization-HS-

SPME-GC-IT-MS-MS developed method. As we can see, most of the compounds were detected in these sewage sludge samples.

In the industrial sewage sludge A, concentrations of the compounds ranged from 75 (PEA) to 1990 mg/kg (d.w.) (CA), and four compounds were not detected; in sewage sludge sample B, compounds ranged from 61 (IBA) to 3358 mg/kg (d.w.) (IAA); and in industrial sewage sludge C, compounds ranged from 334 (HA) to 2737 mg/kg (d.w.) (MA). The results of each type of industrial WWTP were not comparable because the origin of the water to be treated is different and the treatment design of each plant is also different. However, in general terms we can say that the compounds more abundant were MA, IBA, and CA.

Table 3. Concentration ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ (d.w.)) of primary amines in the analysis of sewage sludge ($n=3$, RSD < 23%)^a.

Compound	WWTP A	WWTP B	WWTP C	WWTP D	Potable water plant E
Methylamine	841	1667	2737	12536	102
Ethylamine	-	-	1798	1823	296
Isopropylamine	-	-	717.5	1448	1231
Isobutylamine	646	61	752	7728	79
Butylamine	190	417	335	152	118
Isoamylamine	-	3358	1927	6452	169
Amylamine	-	n.q.	-	n.q.	-
Cyclohexylamine	1990	554	878	1195	306
Heptylamine	157	123	334	143	3829
2-Phenylethylamine	75	1648	540	6476	1811

^a -: <LOD; n.q.: <LOQ.

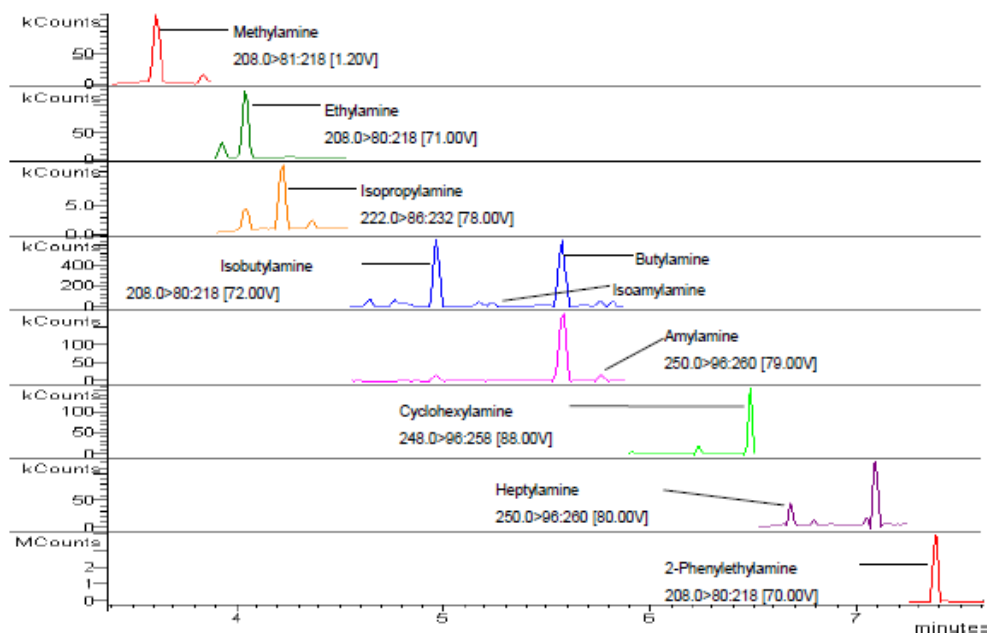


Figure 2. PHWE followed by on-fiber derivatization with HS-SPME-GC-MS-MS chromatograms of primary amines of a spiked urban sewage sludge (sample D).

All amines were present in the urban (D) sludge although AA was under its LOQ. Moreover, concentrations for most of the amines were higher than those obtained for the industrial sludges. Significantly, higher concentrations were obtained for MA, IBA, IAA, and PEA. As an example, Fig. 2 shows the chromatograms obtained for an urban sewage sludge (sample D).

The amine concentrations in the sludge from the PWTPE ranged from 79 (IBA) to 3829 mg/kg (d.w.) (HA) and AA was the only amine not detected. IPA, HA, and PEA were present at the highest concentrations.

CONCLUDING REMARKS

The potential for the on-fiber derivatization with HS-SPME followed by GC-IT-MS-MS has been demonstrated as an effective methodology to determine a group of ten primary amines in sewage sludge samples at mg/kg d.w. levels. Due to the use of the on-fiber derivatization in combination with with HS-SPME technique, where the fiber was coated with the derivatizing reagent, the extraction efficiency of the compounds was substantially improved compared with the direct derivatization of compounds [12]. The most important parameters involved

in the on-fiber derivatization were optimized in order to obtain high extraction efficiencies of the derivatives, and were the following: 10 mL of a solution of PFBAY 1 mg/mL in water:acetonitrile (9:1), time and temperature of exposing the fiber in the reagent of 20 min at 40 °C, time and temperature of extracting the compounds of 20 min at 60 °C, pH of aqueous extract of 12 and concentration of NaCl in the aqueous extract of 360 g/L. The proposed method results in an effective methodology that is fully automated (with the exception of the PHWE), simple to use, selective, sensitive, and environmentally friendly. The method enabled concentrations of primary aliphatic amines to be determined in sludge samples from industrial WWTP, urban WWTP, and a PWTP at concentrations between 61 and 12,536 mg/kg (d.w.).

Acknowledgements

The authors thank the personnel of the various water treatment plants for their cooperation in all aspects of this study. This study was financially supported by the Directorate-General for Research of the Spanish Ministry of Science and Technology; project CTM2008-06847-C02-01/TECNO and 2009 SGR 223. A. Llop gratefully acknowledges the financial support of the Department of Innovation, Universities and Enterprise of the Catalan Government, as well as the European Social Fund (2007 FI00026).

REFERENCES

- [1] Sacher, F., Lenz, S., Brauch, H. J., *J. Chromatogr. A* 1997, 764, 85–93.
- [2] Ábalos, M., Bayona, J. M., Ventura, F., *Anal. Chem.* 1999, 71, 3531–3537.
- [3] Kusch, P., Knupp, G., Hergarten, M., Kozupa, M., Majchrzak, M., *J. Chromatogr. A* 2006, 1113, 198–205.
- [4] Huang, K.-J., Wei, C.-Y., Xie, W.-Z., Liu, Y.-M., Chen, Y.-H., Zhang, J.-F., *Chromatographia* 2009, 70, 747–752.
- [5] Fu, M., Eismin, R. J., Duan, P., Li, S., Kentta'maa, H. I., *Int. J. Mass Spectrom.* 2009, 282, 77–84.
- [6] Meseguer, S., Molins, C., Campins, P., *J. Chromatogr. A* 2002, 978, 59–69.
- [7] Cai, L., Zhao, Y., Gong, S., Dong, L., Wu, C., *Chromatographia* 2003, 58, 615–621.
- [8] Llop, A., Borrull, F., Pocurull, E., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 3692–3700.
- [9] Akyüz, M., Ata, S., *J. Chromatogr. A* 2006, 1129, 88–94.
- [10] Pan, L., Chong, J. M., Pawliszyn, J., *J. Chromatogr. A* 1997, 773, 249–260.
- [11] Llop, A., Pocurull, E., Borrull, F., *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 575–581.
- [12] Llop, A., Borrull, F., Pocurull, E., *Anal. Chim. Acta* 2010, 665, 231–236.
- [13] Mishra, S., Singh, V., Jain, A., Verma, K. K., *Analyst* 2001, 126, 1663–1668.
- [14] Kataoka, H., *J. Chromatogr. A* 1996, 733, 19–34.

- [15] Chia, K. J., Huang, S. D., *J. Chromatogr. A* 2006, 1103, 158–161.
- [16] Deng, C., Li, N., Wang, L., Zhang, X., *J. Chromatogr. A* 2006, 1131, 45–50.
- [17] Lin, H., Deng, C., Zhang, X., *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 3225–3230.
- [18] Paik, M.-J., Choi, Y., Kim, K.-R., *Anal. Chim. Acta* 2006, 560, 218–226.
- [19] Molins-Legua, C., Campins-Falcó, P., *Anal. Chim. Acta* 2005, 546, 206–220.
- [20] Baltussen, E., David, F., Sandra, P., Janseen, H.-G. Cramers, C., *J. High. Resol. Chromatogr.* 1998, 21, 645–648.
- [21] Ngim, K. K., Ebeler, S. E., Lew, M. E., Crosby, D. G., Wong, J. W., *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 3311–3316.
- [22] Chan, S. T., Yao, M. W. Y., Wong, Y. C., Wong, T., Molk, C. S., Sin, D. W. M., *Eur. Food Res. Technol.* 2006, 224, 67–74.
- [23] Zhao, Y. Y., Cai, L. S., Jing, Z. Z., Wang, H., Yu, J. X., Zhang, H. S., *J. Chromatogr. A* 2003, 1021, 175–181.
- [24] Kulkarni, S., Shearrow, A. M., Malik, A., *J. Chromatogr. A* 2007, 1174, 50–62.
- [25] Arthur, C. L., Pawliszyn, J., *Anal. Chem.* 1990, 62, 2145–2148.
- [26] Alzaga, R., Maldonado, C., Bayona, J. M., *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 1998, 72, 99–111.
- [27] Rodil, R., Popp, P., *J. Chromatogr. A* 2006, 1124, 82–90.
- [28] Fernández-González, V., Concha-Graña, E., Munategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D., *J. Chromatogr. A* 2008, 1196–1197, 65–72.
- [29] Pan, L., Pawliszyn, J., *Anal. Chem.* 1997, 69, 196–205.
- [30] Herráez-Hernández, R., Cháfer-Pericás, C., Verdú-Andrés, J., Campíns-Falcó, P., *J. Chromatogr. A* 2006, 1104, 40–46.
- [31] Scheyer, A., Briand, O., Morville, S., Mirabel, P., Millet, M., *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 387, 359–368.
- [32] Nerín, C., Salafranca, J., Aznar, M., Batlle, R., *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 393, 809–833.
- [33] Cháfer-Pericás, C., Herráez-Hernández, R., Campíns-Falcó, P., *Talanta* 2005, 66, 1139–1145.

3.3.3. Pressurised hot water extraction followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of *N*-Nitrosamines in sewage sludge

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013



**PRESSURISED HOT WATER EXTRACTION FOLLOWED BY HEADSPACE
SOLID-PHASE MICROEXTRACTION AND GAS CHROMATOGRAPHY-
TANDEM MASS SPECTROMETRY FOR THE DETERMINATION OF
N-NITROSAMINES IN SEWAGE SLUDGE**

Anna Llop, Francesc Borrull and Eva Pocurull

Departament de Química Analítica i Química Orgànica. Universitat Rovira i Virgili
Marcel·lí Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain

Abstract

A method for the quantitative determination of the nine EPA *N*-nitrosamines in sewage sludge was developed by using pressurised hot water extraction (PHWE) followed by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography coupled to chemical ionization ion trap tandem mass spectrometry (GC-CI-MS-MS).

The pressurised hot water extraction was optimized using a central composite design with regard to operational parameters such as temperature, extraction time and pH of water as extracting solvent. The optimum conditions were: water at pH 7.5 as extracting solvent, temperature of 125 °C and extraction time of 5 minutes. The sewage sludge extract was automatically analyzed by HS-SPME using a divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) fiber and GC-CI-MS-MS.

The limits of detection of all compounds were lower than 0.15 µg/Kg of dry weight (d.w.) of sewage sludge. The repeatability and reproducibility between days (10 µg/Kg d.w.) expressed as relative standard deviation were lower than 16 and 19%, respectively. The method was applied to determine the *N*-nitrosamines in sewage sludge from urban and industrial sewage treatment plants (STPs) and from a potable water treatment plant. Some *N*-nitrosamines were determined in the samples and *N*-nitrosodiethylamine (NDEA) and *N*-nitrosodi-*n*-butylamine (NDBA) showed the highest values (371 and 305 µg/Kg (d.w.), respectively) in sewage from industrial STPs.

Keywords: *N-nitrosamines; sewage sludge; pressurised hot water extraction; solid-phase microextraction; GC-MS-MS; central composite design*

INTRODUCTION

Many *N*-nitrosamines, especially *N*-nitrosodimethylamine (NDMA), are considered probable human carcinogens. They have been found in many food products [1], beer [2], cosmetics [3,4], tobacco smoke [5], soils [6], water from chlorinated swimming pools [7], tap water, wastewater, treated wastewater, groundwater and drinking water [7-9]. Polymers, plasticisers, batteries, rocket fuel (incomplete oxidation of hydrazines), and other industrial products are the main anthropogenic sources of the *N*-nitrosamines [10]. They are usually formed by nitrosation or oxidation reactions of amine precursors [11,12]. However, research in recent years has shown that nitrosamines, particularly NDMA, can be generated in water and wastewater treatment systems by chlorine-based disinfection processes, making them an important group of potentially hazardous disinfection by-products (DBPs) [10,13-15].

Currently, *N*-nitrosodimethylamine (NDMA), *N*-nitrosomethylethylamine (NMEA), *N*-nitrosodiethylamine (NDEA), *N*-nitrosopyrrolidine (NPYR), *N*-nitrosodipropylamine (NDPA) and *N*-nitrosodibutylamine (NDBA), are included in the Unregulated Contaminant Monitoring

Regulation (UCMR 2), listed in the recently proposed Contaminant Candidate List 3 (CCL 3) by the U.S. EPA. This organisation has also established ng/L control levels in drinking water [7,8,16]. Several *N*-nitrosamines have been detected at concentrations between 1 and 2 orders of magnitude higher than their cancer risk levels in the effluents of water and wastewater treatment plants (WWTPs) [13,14,16-19]. The determination of these compounds in environmental samples is therefore of great interest due to the possible reuse of both water and sludge. However, to date, few studies have investigated the occurrence of *N*-nitrosamines in sewage sludge [13].

Several techniques have been used for the analytical determination of *N*-nitrosamines, the most common of which are liquid chromatography (LC) and gas chromatography (GC). LC has been used with UV, fluorescence, mass spectrometry (MS) and tandem mass spectrometry (MS-MS) detection [20-22]. Although LC-MS-MS may also be applied to determine *N*-nitrosamines, the sensitivity for most compounds was lower than that of GC-MS-MS [21,23]. GC is often the preferred choice as it provides good resolution and it is easy to couple with sensitive and selective detectors, such as thermal

energy analysis (TEA), nitrogen-phosphorus, nitrogen chemiluminescence and MS [24-26]. When GC-MS detection is used, the low molecular weight of *N*-nitrosamines makes them susceptible to chemical interferences with electron ionization (EI) [1,18,26], which leads to poor sensitivity and selectivity, because EI is a hard ionization process and produces nondistinctive fragmentation patterns. This can be counteracted by using positive chemical ionization (CI) either with GC-MS or with GC-tandem mass spectrometry (GC-MS-MS), which is a softer ionization process that produces less molecular fragmentation [9,18,27].

Due to the low levels *N*-nitrosamines are present in environmental samples; an extraction/preconcentration technique is necessary in order to determine them. Pressurised hot water extraction (PHWE) is an environmentally friendly organic solvent free technique in which water is used as the extraction solvent at elevated temperature and under pressure to keep water in liquid state. PHWE has been recently used by our group to extract primary aliphatic amines from different sewage sludges [28]. However, PHWE extracts are relatively dilute aqueous solution and a subsequent preconcentration technique such as liquid-liquid extraction (LLE) [29], solid-phase extraction (SPE) [18,27,30,31] and solid-phase microextraction (SPME) [2,9,26] should be used. SPME is a

solvent free technique that is simple to perform and easy to automate, among other advantages.

The aim of this study is to develop a novel and environmentally friendly method to determine the nine EPA *N*-nitrosamines in sewage sludge from various urban and industrial wastewater treatment plants and from a potable water treatment plant. This method is based on pressurised hot water extraction of sewage sludge followed by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography-tandem mass spectrometry detection system using chemical ionization (HS-SPME-GC-CI-MS-MS).

EXPERIMENTAL

Safety considerations

N-nitrosamines are potential or actual carcinogens and must be handled with extreme care inside a fume hood with ventilation. They must not be inhaled or come into contact with the skin, and appropriate personal protective equipment must be used (latex gloves, lab coat, safety glasses).

Reagents and solutions

A standard solution containing 2000 mg/L of the 9 *N*-nitrosamines in methanol was purchased by Sigma-Aldrich (Buchs SG, Switzerland) in the highest purity available (EPA 8270/Appendix IX Nitrosamine Mix

Catalog No. 502138): *N*-nitrosodimethylamine (NDMA), -methylethylamine (NMEA), -diethylamine (NDEA), -*di-n*-propylamine (NDPA), -morpholine (NMOR), -pyrrolidine (NPYR), -piperidine (NPIP), *di-n*-butylamine (NDBA), and *di-n*-phenylamine (NDPhA). Working standard solutions of 10 mg/L were prepared in methanol weekly. All solutions were stored in darkness in the freezer.

Methanol and acetone were purchased from SDS (Peypin, France) and were of gas chromatography (GC) grade. Sodium chloride was supplied by Sigma-Aldrich. Sodium hydroxide and hydrochloric acid were obtained from Scharlau Chemie (Barcelona, Spain). Ultrapure water was obtained using a Milli-Q purification system (18.2 MΩ·cm) (Millipore, Bedford, MA, USA). Helium and nitrogen of 99.995% purity were obtained from Carbueros Metálicos (Tarragona, Spain). Cellulose filters of 20 mm obtained from Tecknokroma (Barcelona, Spain) and diatomaceous earth (95%) from Sigma-Aldrich were used for PHWE.

Sampling and sample pre-treatment

Several types of sewage sludge samples were collected from an urban wastewater treatment plant (A), three industrial wastewater treatment plants (B, C and D) and a potable water treatment plant (E). All these plants are located on the outskirts of Tarragona (Spain). These sludge

samples had different origins and matrix complexities and had also undergone different treatment processes, such as conventional activated sludge (CAS) treatment or membrane bioreactor (MBR) treatment.

The urban WWTP A is a CAS treatment plant that uses reverse osmosis after secondary treatment. It treats water from a population of approximately 140,000 inhabitants. The industrial WWTP B is a CAS treatment plant that treats a mixture of wastewater from three different chemical plants that make products of various types, such as surfactants, vinyl acetate and plastics (isocyanides, polyurethanes and ABS). The industrial WWTP C is an MBR treatment plant that uses ultrafiltration membranes to treat wastewater from any industrial plants. The industrial WWTP D is an MBR treatment plant that uses ultrafiltration membranes to treat wastewater from the distillation of used oil. The potable water plant E is a CAS treatment plant that uses carbon filters in the last process to obtain a high-quality effluent.

We had two types of sludge depending on the WWTPs: digested and activated sludge. The digested sludge samples were taken in WWTP A, B and E, and it is the total sludge collected in the WWTP dehydrated and digested. The activated sludge samples were taken in WWTP C and D, and this sludge come from the

biological reactors of the secondary treatment in the WWTPs. All samples were frozen after collection.

Each frozen sludge sample was lyophilized using the freeze-dry system (Labconco, Kansas City, MO, USA) and sieved through a 125 μm screen.

The spiked sewage sludge was prepared by adding a dilution of the working standard solution in acetone. To optimize the PHWE, 20 μL of the working standard solution were diluted in 100 mL of acetone and adding 25 mL of this solution to 5 g of dry sewage sludge. Subsequently, the solvent was slowly evaporated at room temperature under frequent homogenization.

Pressurized hot water extraction

PHWE extraction was performed on a Dionex (Sunnyvale, CA, USA) ASE 200 instrument. One cellulose filter followed by 1 g of diatomaceous earth was placed at the bottom of each 33 mL stainless steel extraction cells. After loading 5 g of the pretreated sludge previously mixed with diatomaceous earth, the remaining volume in the cell was filled with diatomaceous earth.

Each sample was extracted using Milli-Q water at pH 7.5. The operating conditions were as follows: extraction temperature, 125 $^{\circ}\text{C}$; extraction pressure, 1500 psi; preheating period, 6 min; static extraction, 5 min; number

of cycles, 2; flush volume, 60% of extraction cell volume; final extraction volume, ~ 44 mL; and nitrogen purge, 60 s. The extraction temperature, extraction time and pH of water as extracting solvent were the parameters optimized by a central composite design. For this optimization the experimental design matrix and data analysis were performed using the Statgraphics statistical computer package "Statgraphics Plus 5.1" (Manugistics, Inc., Rockville, MD, USA).

Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME)

The PHWE extract was diluted with water to a final volume of 50 mL. A solution of 10 mL was taken and poured into a 20 mL headspace vial, which contained 3.6 g of sodium chloride and a magnetic stirring bar. We then performed a headspace solid-phase microextraction (HS-SPME), applying our previous method [9] to the aqueous sludge extract.

We used a 50/30 μm divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) fiber purchased from Supelco. Before use, the fiber was thermally conditioned in accordance with the manufacturer's recommendations by inserting it into the GC injector port. The used fibers were cleaned by heating them at 250 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min prior to extraction and a blank test was performed to check for possible carry-over. The entirely automated SPME extractions were

performed by a commercial autosampler CombiPAL (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) mounted on the GC-MS system.

The 20 mL headspace vial containing the PHWE extract was placed in the tray for SPME. When the temperature of the heat/stir accessory reached 45 °C, the vial was automatically transported there and stabilized for 1 min. The fiber was then introduced through the septum and kept in the headspace of the vial for 60 min at 45 °C. During extraction, the sample was magnetically stirred at 750 rpm. The fiber was then withdrawn into the SPME syringe needle, which was then pulled out of the sample vial and immediately inserted into the GC injection port at 250 °C for 18 min (chromatographic time) for the desorption and clean-up of the fiber in order to prevent carryover.

Chromatographic analysis

The compounds were analysed by GC-CI-MS-MS. The chromatographic instrument was a Varian 3800 gas chromatograph (Walnut Creek, CA, USA) connected to a Varian 4000 ion trap mass detector. The GC was equipped with a 1079 programmable temperature vaporizing (PTV) injector, a Merlin high-pressure microseal and a 0.8 mm i.d. insert liner (Varian). A fused silica capillary column (3 m × 0.25 mm i.d.) from Supelco (Bellefonte, PA, USA) was used as a guard column connected to a ZB-5 analytical column (30 m × 0.25

mm i.d.; 0.25 µm film thickness) from Torrance (CA, USA). Helium was used as a carrier and collision gas at a flow rate of 1 mL·min⁻¹. Varian Workstation software was used for instrument control and data processing.

The injector temperature was set at 250 °C and the analyses were done in splitless mode. The column oven was programmed as follows: 40 °C hold for 2.10 min, ramp to 100 °C at 25 °C/min, hold for 4.50 min, and then ramp to 280 °C at 20 °C/min hold for 2 min. All compounds were separated within 18 min. The transfer line, manifold and trap temperatures were 280, 60 and 200 °C, respectively. A filament-multiplier delay of 3 min was established in order to prevent instrument damage. The analytes were ionized by positive chemical ionization using methanol. The CI-MS-MS process was carried out by collision-induced dissociation (CID) using a resonant waveform type. The GC-CI-MS-MS parameters were optimized for each compound in a previous paper [9].

Quality assurance and quality control

In order to confirm the presence of the compounds in the sewage sludge samples, two factors were considered: (1) retention time and (2) relative abundance of the parent ion and products ions in the spectra. For the quantification of the compounds, the area of the product ion most abundant

was used. Spiked sewage sludge samples were also analyzed between the analyses to check the method performance. As sewage samples without the presence of the analytes were not found, areas of those compounds that appear in blanks were subtracted from those obtained in spiked samples. The method was validated with sludge samples from potable water plant E by determining linear ranges, LODs, LOQs, repeatability and reproducibility between days.

RESULTS AND DISCUSSION

PHWE optimization

For the rapid and efficient extraction of the *N*-nitrosamines from the sewage sludge samples using PHWE, several instrumental parameters need to be optimized: temperature, pressure, extraction time, number of cycles, flush volume and purge time; and a suitable pH of water as extraction solvent should be used. As previous studies on the extraction of *N*-nitrosamines from sewage sludge or sediments using PHWE or PLE do not exist, we selected the initial conditions according to previous experience by our research group to extract organic compounds in solid matrices. We tested water as an extraction solvent instead of organic

solvents because makes the extraction more environmentally friendly.

The initial conditions selected were: preheating period of 5 min, pressure of 1500 psi, 2 cycles, purge time of 60 s, flush volume of 60% and 5 g of dry sample. The most critical variables affecting the extraction efficiency in PHWE were the pH of water as the solvent extraction, the extraction time and the extraction temperature [28,32,33]. We chose a central composite design (with $\alpha = 1.67$) in three orthogonal blocks using a surface response to optimize the pH of water as the extraction solvent (from 4 to 13), the extraction temperature (from 50 to 100 °C), and the extraction time (from 5 to 15 min). We used the Statgraphics statistical package to generate the experimental matrix and calculate the standardized main effects of the factors considered. The complete design consisted of 17 randomly performed experiments (values are listed in Table 1). All experiments were conducted by extracting 5 g of a sewage sludge sample of potable water treatment plant spiked at 10 µg/Kg (d.w.) of *N*-nitrosamines. The individual chromatographic peak areas of each compound were recorded as experimental responses for optimizing.

Table 1. Matrix for central composite design.

Assay (Block)	Temperature (°C)	Time (min)	pH of water
1 (1)	50 (-1)	15 (1)	11 (1)
2 (1)	50 (-1)	5 (-1)	4 (-1)
3 (1)	75 (0)	10 (0)	7.5 (0)
4 (1)	100 (1)	15 (1)	4 (-1)
5 (1)	100 (1)	5 (-1)	11 (1)
6 (2)	100 (1)	5 (-1)	4 (-1)
7 (2)	50 (-1)	15 (1)	4 (-1)
8 (2)	100 (1)	15 (1)	11 (1)
9 (2)	75 (0)	10 (0)	7.5 (0)
10 (2)	50 (-1)	5 (-1)	11 (1)
11 (3)	117 (1.67)	10 (0)	7.5 (0)
12 (3)	33 (-1.67)	10 (0)	7.5 (0)
13 (3)	75 (0)	10 (0)	1.6 (-1.67)
14 (3)	75 (0)	18 (1.67)	7.5 (0)
15 (3)	75 (0)	10 (0)	13.4 (1.67)
16 (3)	75 (0)	10 (0)	7.5 (0)
17 (3)	75 (0)	2 (-1.67)	7.5 (0)

Pareto charts were used to identify the most influential factors. The data obtained in each central composite design were evaluated by ANOVA at the 5% significance level. These results are shown in bar chart format, with the effects sorted in rank order. For instance, Figure 1 shows the Pareto chart for the area of NDMA extracted by PHWE followed by HS-SPME and GC-CI-MS-MS. The tendency observed is similar to that in the Pareto chart for the other compounds. In all the cases, the extraction temperature was the most important parameter in the PHWE process. The chromatographic peak areas were largest when the temperature was the highest (100 °C). For the majority of the compounds,

the time was the second most important factor and the areas were largest when the time was at the lowest level (5 min), so we selected 5 min as the optimum extraction time.

The pH of water was the least influential factor and the peak areas of NDMA, NMEA and NDEA were largest when the pH was the lowest (pH 4), but for NDPA, NMOR, NPIP, NDBA and NDPhA, the areas were largest when the pH was the highest (pH 11). These results agree with the fact that we study a group of NAs with different polarities and have different affinity for water. Because pH of water was the least influential factor and because had different behaviour in compounds, we selected as pH of water 7.5 as a compromise.

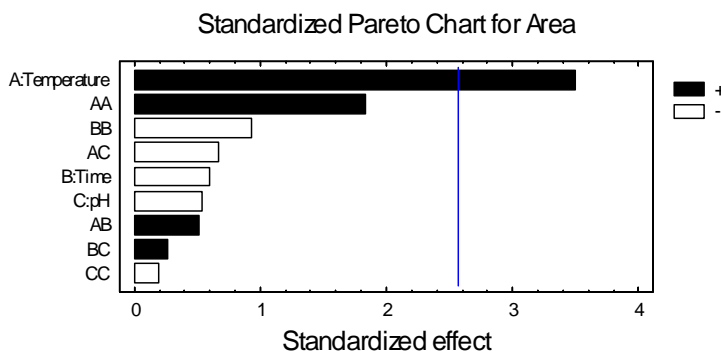


Figure 1. Standardized Pareto chart of the main effects in the central composite design affecting the PHWE of NDMA. The line represents the significant limit.

As we have mentioned, high temperatures (100 °C) improved the extraction of NAs from sludge. Figure 2 shows the response surface graph when the extraction time is plotted against the extraction temperature for a pH of water of 7.5 for NDMA. The largest areas were found for 5 min and 100 °C. In order to confirm whether these were the optimum values, we decided to test other high temperatures (125 and 150 °C) using the last fixed conditions. We have to mention that using 125 and 150 °C as the extraction temperatures, the PLE software program fixed preheating extraction times of 6 and 7 min, respectively. When 150 °C was used, the PHWE extract obtained was much brownish compared to those which were obtained at lower temperature, which indicate the coextraction of additional compounds. As a result, using 150 °C, the chromatographic peak areas of the main NAs were lower. However, by the use of 125 °C

as extraction temperature, the resulting peak areas of the majority of the compounds increased substantially compared with those using 100 °C. For instance, raising the extraction temperature from 100 to 125 °C, the peak areas of NDMA, NMEA, NDEA, NPYR and NDPA increased between 41 to 61%, and peak areas of NDPA, NPIP, NDPhA and NMOR increased, respectively, by 15, 22, 8 and 95%. However, when the extraction temperature was 150 °C, some interfering compounds were observed and in most of cases the peak areas of the compounds decreased. As an example, raising the extraction temperature from 100 to 150 °C, peak areas of NDMA, NDPhA and NDBA decreased from 12 to 23%. For the rest of compounds, when temperature increases from 100 to 150 °C, it was observed a slightly increment of the area compared with those using 125 °C (from 5 to 21 %). Although the other parameters (time

and pH) were also tested using values different to the initial conditions, the extraction did not improve. Therefore, the optimized conditions were an extraction temperature of 125 °C and 5 minutes extraction with water (pH 7.5).

Following the PHWE extraction of the sewage sludge under optimum conditions, we preconcentrated 10 mL of the aqueous extract by HS-SPME with 50/30 µm DVB/CAR/PDMS fiber, and then performed determination with GC-CI-MS-MS [9].

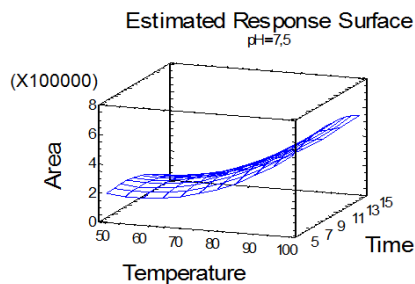


Figure 2. Estimated response surface for NDMA obtained using the central composite design and plotting the extraction time against the extraction temperature in PHWE.

Method validation

The method developed to determine the nine EPA *N*-nitrosamines in sewage sludge was validated by establishing the linear ranges, limits of detection (LODs), limits of quantification (LOQs), repeatabilities and reproducibilities between days.

Sewage sludge from a potable water treatment plant was used as sample matrix to validate the method. Five samples of this sewage sludge were analysed and a small peak of NDBA appeared in the chromatogram. Then,

the averaged peak area of this compound was subtracted from the corresponding peak area of each spiked sample.

The linear range of the method was obtained by analysing the sewage sludge of the potable water treatment plant at concentrations between 100 ng/Kg and 500 µg/Kg of *N*-nitrosamines. All the compounds showed acceptable determination coefficients ($r^2 > 0.994$, 6 data points) and each linear range is shown in Table 2.

Table 2. Method linear ranges, LODs, repeatability and reproducibility between days (% RSD, n=5, 10 µg/Kg) for the analysis of *N*-nitrosamines by PHWE followed by HS-SPME and GC-CI-MS-MS in sewage sludge. See text for other conditions.

Compound	Linear range (µg/Kg)	LOD ^a (µg/Kg)	Repeatability (% RSD)	Reproducibility (% RSD)
NDMA	0.50 – 250	0.12	8	10
NMEA	0.50 – 500	0.10	15	18
NDEA	0.20 – 500	0.05	6	11
NPYR	0.30 – 500	0.07	16	19
NDPA	0.20 – 500	0.05	9	12
NMOR	0.40 – 500	0.08	10	14
NPIP	0.50 – 500	0.15	11	13
NDBA	0.10 – 500	0.03	5	8
NDPhA	0.50 – 500	0.14	12	15

The analytical validation was performed using sewage sludge from a potable water plant.

^aLimits of detection were defined as S/N = 3.

The LODs were defined as the concentration of analytes in the sewage sludge of the potable water treatment plant which caused a peak with a signal-to-noise ratio higher than 3 for the compounds that did not appeared in this sample. For NDBA, the LOD was defined as the concentration that gave a signal average of plus three times the standard deviation of the sample signal. Limits of quantification (LOQs) were defined as the lowest point of the calibration curve. LODs and LOQs ranged from 30 to 150 ng/Kg, and from 100 to 500 ng/Kg, respectively, and they are also shown in Table 2.

The repeatability and reproducibility between days were determined by spiking five replicates of the sewage sludge of the potable treatment plant at 10 µg/Kg, and the results obtained, expressed as %RSD, were lower than 16% for repeatability and 19% for reproducibility.

Method application

The developed method was used to determine the nine EPA *N*-nitrosamines in different types of sewage sludge samples collected in one urban WWTP, three industrial WWTPs and one potable water treatment plant (see Section 2.3). The

PHWE efficiency was tested with these different types of sludge samples and results were comparable

to those obtained with sludge from the potable treatment plant.

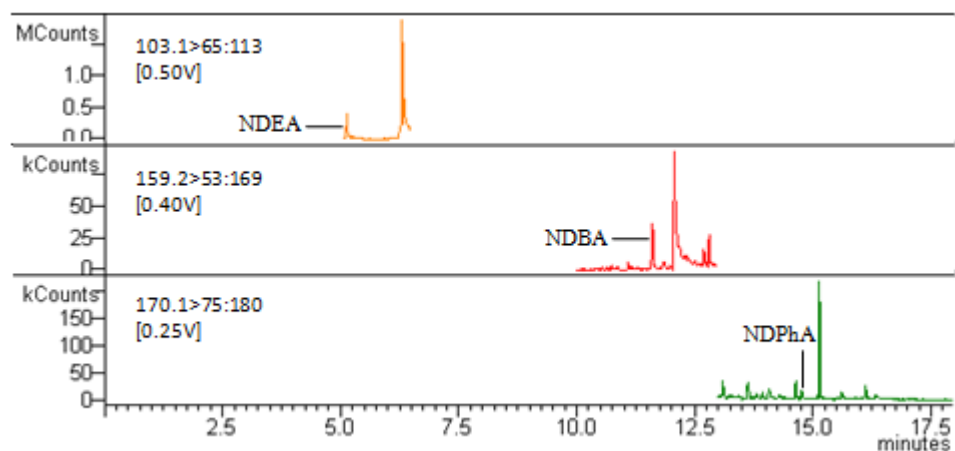


Figure 3. PHWE-HS-SPME-GC-CI-MS-MS chromatograms of *N*-nitrosamines of a sewage sludge from the industrial WWTP C.

For instance, Figure 3 shows the PHWE-HS-SPME-GC-CI-MS-MS chromatograms of sewage sludge from an industrial WWTP C sample. NDEA, NDBA and NDPhA appeared in the chromatograms at concentrations of 371, 0.2 and 26 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, respectively.

Table 3 shows the results of the average concentrations of the *N*-nitrosamines found in each type of sewage sludge sample ($n=3$). NDMA, NMEA, NDPA, NMOR and NPIP did not appear in any of the samples analysed, thus they were excluded from Table 3. These results agree with that we expected, because NDMA and NMEA are the most polar *N*-

nitrosamines and they are more hydrophilic. Samples from industrial WWTPs showed the highest concentration of *N*-nitrosamines, although their presence was not homogeneous. Thus, sludge from WWTP C showed the presence of three *N*-nitrosamines being NDEA the compound that showed the highest concentration (371 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ d.w.) among all samples analyzed, while sludge from WWTP B only showed the presence of NPYR. Sludge from the urban WWTP A and the potable water treatment plant only showed the presence of one nitrosamine, NDBA, at low $\mu\text{g}/\text{Kg}$ levels.

Table 3. Concentration ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) (d.w.) of *N*-nitrosamines in sewage sludge samples ($n=3$, $\text{RSD} < 20\%$).

Compound	WWTP A ^a	WWTP B ^a	WWTP C ^a	WWTP D ^a	Potable Water Treatment Plant
NDEA	-	-	371	52	-
NPYR	-	60	-	-	-
NDBA	2.6	-	0.2	305	31
NDPhA	-	-	26	-	-

⊙ : below limit of detection

^a WWTP A is an urban WWTP; WWTP B, C and D are industrial WWTPs.

Among all *N*-nitrosamines studied, NDBA was the compound that gave more positive results in the samples analyzed and being its highest concentration in the sludge from WWTP D (305 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ d.w.).

It should also be remark that activated sludge (WWTPs C and D) showed the presence of more *N*-nitrosamines and at much higher concentration than digested sludge.

Little information has been reported about the presence of *N*-Nitrosamines in sewage sludge samples. Padhye et al. [13] determined NDMA and NPYR in primary sludge supernatant, in activated sludge and in anaerobic digester mixed liquor samples of three municipal WWTPs and found concentrations ranging from 57 to 994 ng/L. NDEA, NMEA, NDPA and NDBA were not detected. It should be noted that the analysis of those samples was carried out using the sludge filtrates followed by a SPE and GC/MS/MS and not a sludge

extraction technique as we used in the present work.

CONCLUSIONS

This study shows for the first time the determination of the nine EPA *N*-nitrosamines at $\mu\text{g}/\text{Kg}$ levels in sewage sludge samples by the use of PHWE followed by HS-SPME-GC-CI-MS-MS. The method is automated with the exception of the PHWE steps, it is easy to perform and because it avoids the use of toxic organic solvents it is environmentally friendly. This method also provides LODs between 0.03 and 0.15 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, and moreover, the use of CI-MS-MS instead of single CI-MS detection provides high selectivity and sensitivity for the determination of nine *N*-nitrosamines in such highly complex sewage sludge samples from WWTPs.

The most important parameters involved in the PHWE were evaluated using a central composite design and the optimum conditions were an extraction temperature of 125 °C and 5 minutes with water (pH 7.5).

Some of the nine EPA *N*-nitrosamines appeared in the sewage sludge samples analysed at concentrations ranging between 0.2 and 371 µg/Kg. The most detected compound was NDBA, which appeared in all the samples excepting the industrial WWTP B. NDMA, NMEA, NDPA and NMOR were not found in any sample, which could be due to their hydrophilic character.

Acknowledgements

The authors wish to thank the personnel of the various water treatment plants for their cooperation in all aspects of this study. This study was financially supported by the Directorate-General for Research of the Spanish Ministry of Science and Technology; project CTM2008-06847-C02-01/TECNO and by Departament d'Innovació, Universitats i Empreses de la Generalitat de Catalunya; project 2009SGR223. A. Llop gratefully acknowledges the financial support of the Department of Innovation, Universities and Enterprise of the Catalan Government, as well as the European Social Fund (2007 FI00026).

REFERENCES

- [1] S. Ventanas, J. Ruiz, *Talanta* 70 (2006) 1017-1023.
- [2] D. Méndez, G. González, E. Botello, E. Escamilla, J.F.J. Alvarado, *Food Chem.* 107 (2008) 1348-1352.
- [3] R.C. Schothorst, H.H.J. Somers, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 681-685.
- [4] C. Flower, S. Carter, A. Earls, R. Fowler, S. Hewlins, S. Lalljie, M. Lefebvre, J. Mavro, D. Small, N. Volpe, *Int. J. Cosmet. Sci.* 28 (2006) 21-33.
- [5] H.L. Lee, C. Wang, S. Lin, D.P.H. Hsieh, *Talanta* 73 (2007) 76-80.
- [6] X. Pan, B. Zhang, S.B. Cox, T.A. Anderson, G.P. Cobb, J. *Chromatogr. A* 1107 (2006) 2-8.
- [7] S.D. Richardson, *Anal. Chem.* 81 (2009) 4645-4677.
- [8] S.D. Richardson, *Trend Anal. Chem.* 22 (2003) 666-684.
- [9] A. Llop, F. Borrull, E. Pocurull, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 3692-3700.
- [10] US EPA Contaminant Candidate List 3 (CCL 3), as of January 2009b <<http://www.epa.gov/OGWDW/ccl/ccl3.html>>.
- [11] P. Andrzejewski, B. Kasprzyk-Hordern, J. Nawrocki, *Desalination* 176 (2005) 37-45.
- [12] A. Llop, E. Pocurull, F. Borrull, J. *Chromatogr. A* 1217 (2010) 575-581.
- [13] L. Padhye, U. Tezel, W.A. Mitch, S.G. Pavlostathis, C.H. Huang, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 3087-3093.

- [14] W.A. Mitch, J.O. Sharp, R.R. Trussell, R.L. Valentine, L. Alvarez-Cohen, D.L. Sedlak, *Environ. Eng. Sci.* 20 (2003) 389-404.
- [15] Y.Y. Zhao, J.M. Boyd, M. Woodbeck, R.C. Andrews, F. Qin, X.F. Li, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 4857-4862.
- [16] B. Jurado-Sánchez, E. Ballesteros, M. Gallego, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1200-1205.
- [17] US EPA, N-nitrosodimethylamine (CASRN 62-75-9). Integrated Risk Information System (IRIS) as of January 2009a <<http://www.epa.gov/ncea/iris/su bst/0045.html>>.
- [18] C. Planas, O. Palacios, F. Ventura, J. Rivera, J. Caixach, *Talanta* 76 (2008) 906-913.
- [19] D.L. Sedlak, R.A. Deeb, E.L. Hawley, W.A. Mitch, T.D. Durbin, S. Mowbray, S. Carr, *Water Environ. Res.* 77 (2005) 32-39.
- [20] H. Kodamatani, S. Yamazaki, K. Saito, A. Amponsaa-Karikari, N. Kishikawa, N. Kuroda, T. Tomiyasu, Y. Komatsu, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 92-98.
- [21] Y.Y. Zhao, J. Boyd, S.E. Hrudey, X.F. Li, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 7636-7641.
- [22] M. Krauss, J. Hollender, *Anal. Chem.* 80 (2008) 834-842.
- [23] M. Plumlee, M. López-Mesas, A. Heidelberg, K.P. Ishida, M. Reinhard, *Water Research* 42 (2008) 347-355.
- [24] M.W. Byun, H.J. Ahn, J.H. Kim, J.W. Lee, H.S. Yook, S.B. Han, *J. Chromatogr. A* 1054 (2004) 403-407.
- [25] J.E. Grebel, I.H. Suffet, *J. Chromatogr. A* 1175 (2007) 141-144.
- [26] J.E. Grebel, C.C. Young, I.H. Suffet, *J. Chromatogr. A* 1117 (2006) 11-18.
- [27] J.W.A. Charrois, M.W. Arend, K.L. Froese, S.E. Hrudey, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 4835-4841.
- [28] A. Llop, F. Borrull, E. Pocurull, *Anal. Chim. Acta* 665 (2010) 231-236.
- [29] A. Raksit, S. Johri, *J. AOAC Int.* 84 (2001) 1413-1419.
- [30] J.W. Munch, M.V. Bassett, *J. AOAC Int.* 89 (2006) 486-497.
- [31] M. Krauss, P. Longrée, F. Dorusch, C. Ort, J. Hollender, *Water Research* 43 (2009) 4381-4391.
- [32] V. Fernández-González, E. Concha-Graña, S. Munategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, *J. Chromatogr. A* 1196-1197 (2008) 65-72.
- [33] A. Nieto, F. Borrull, R.M. Marcé, E. Pocurull, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5619-5625.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013

3.3.4. Discussió de Resultats

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013

En els dos primers estudis presentats, es va determinar la presència del grup de les 10 amines alifàtiques primàries (ja estudiades anteriorment en diferents mostres aquoses) en llots activats provinents de tres plantes de tractament d'aigües residuals industrials, d'una planta de tractament d'aigües residuals urbanes i d'una planta potabilitzadora d'aigües.

En el primer treball, per tal de determinar aquests compostos en aquests tipus de matrius, es varen desenvolupar, en cadascun dels estudis, mètodes cromatogràfics prou sensibles i que fossin respectuosos amb el medi ambient.

El mètode que es va desenvolupar en cada cas va constar de l'extracció pressuritzada amb aigua en estat subcrític (PHWE) dels compostos dels llots actius seguida de la derivatització de les amines amb pentafluorobenzaldehid (PFBAY) com a reactiu derivatitzant i de la microextracció en fase sòlida en espai de cap (HS-SPME), i separació i detecció dels compostos per GC-MS-MS.

En el primer estudi, els paràmetres més importants de l'extracció PHWE dels llots activats es varen optimitzar mitjançant un disseny experimental, el *central composite design*. Les condicions optimitzades de l'extracció PHWE varen ser: una temperatura d'extracció de 100 °C i 2 cicles de 15 minuts utilitzant aigua a un pH de 4. Seguit de la PHWE optimitzada, l'extracte obtingut (~22 ml) es van diluir a 50 ml. D'aquí es varen agafar 10 ml i es va realitzar la HS-SPME seguit de la GC-MS-MS, tal com s'havia optimitzat ja en el mètode utilitzat per les mostres aquoses. Cal esmentar que el temps total del mètode és d'aproximadament d'una hora i que el mètode és parcialment automàtic i no s'utilitzen solvents orgànics tòxics. En aquest estudi es realitza la derivatització i HS-SPME *in situ*, és a dir, el reactiu derivatitzant pentafluorobenzaldehid (PFBAY) s'addiciona directament a la mostra, i posteriorment s'exposa la fibra de SPME a l'espai de cap del vial que conté la mostra.

Utilitzant aquestes condicions òptimes es va validar el mètode analític utilitzant les mostres de llots activats provinents de la planta potabilitzadora d'aigües per determinar els paràmetres de mèrit del procediment. La repetitivitat i reproductibilitat entre dies, expressada com a % RSD (n=5) varen ser inferiors a 19 i a 24 %, respectivament, i es va arribar a límits de detecció prou baixos: entre 9 i 135 µg/kg.

Analitzant les mostres dels diferents llots activats provinents de les diferents plantes de tractament s'ha trobat que, degut a la complexitat de les mostres, ha estat necessari utilitzar el mètode de les addicions estàndards per a quantificar els compostos, ja que existeixen interferències que influeixen en el procés de derivatització i de la HS-SPME. Per comprovar que realment existia efecte matriu s'ha seguit el criteri de l'estudi de pendents. Aquest ha consistit en la comparació dels pendents de les rectes

de calibratge obtingudes, en primer lloc, a l'utilitzar aigua pura, i en segon lloc, a l'utilitzar l'extracte de la PHWE de la mostra de llot activat provinent de la planta potabilitzadora d'aigües, seguit en ambdós casos per la derivatització in situ amb HS-SPME seguida de GC-MS-MS. Per realitzar aquesta comparació de pendents es va utilitzar el test estadístic F ($\alpha = 0.05$, $n = 2$) i el test estadístic t ($\alpha = 0.05$, $n = 2$) per a cada compost, i es va obtenir que les pendents de les rectes de calibratge no eren comparables, ja que la t_{calc} fou en tots els casos superior a la $t_{\alpha, n-2}$, així doncs, quedava confirmat que existia efecte matriu. Els pendents de les rectes de calibratge de l'extracte de la PHWE foren molt inferiors als corresponents a l'aigua pura, per tant, el mètode de calibratge que es va utilitzar va ser el mètode de les addicions estàndards.

S'ha observat la presència de la majoria de les amines alifàtiques primàries en els diferents llots activats estudiats. En les mostres provinents de les plantes de tractament industrials, aquests compostos s'han trobat als nivells més alts. En concret, les concentracions més altes corresponen a la metilamina i a la isobutilamina, 404 i 543 mg/kg, respectivament. Aquests resultats concorden amb el que esperàvem, ja que corresponen als llots activats provinents del tractament d'aigües residuals industrials on s'empraven productes com els estudiats o bé podien produir-se com efectes de degradació o reaccions paral·leles de diferents orígens. En el cas dels llots activats provinents de la planta de tractament d'aigües residuals urbanes, la concentració de les amines es troba en un interval entre 0.43 (isopropilamina) i 14.8 mg/kg (2-feniletilamina), que és un interval notablement inferior al corresponent a les mostres provinents de les plantes de tractament d'aigües residuals industrials. En la planta potabilitzadora d'aigües només es van determinar dos compostos, a concentracions de 7.70 i 0.38 mg/kg, corresponents a metilamina i isopropilamina, respectivament.

En la recerca bibliogràfica realitzada no s'ha trobat informació de la determinació de les amines alifàtiques primàries estudiades en llots activats. Tanmateix, alguns investigadors han determinat algunes de les amines estudiades en sediments de riu utilitzant un sistema Soxhlet [1] i trobaren concentracions entre 0.19 i 163.01 ng/kg. Com esperàvem, aquests valors són molt més inferiors que els obtinguts en el present estudi, degut al diferent origen i tipus de mostra. Altres autors [2] han trobat altres tipus d'amines, trialkilamines, a concentracions entre 1.39 i 4.87 mg/kg en llots activats utilitzant i comparant diferents procediments d'extracció, com són l'extracció utilitzant fluids supercrítics (SFE), l'extracció amb líquids pressuritzats (PLE), el Soxhlet i la sonicació.

En el segon treball, com s'ha comentat anteriorment, s'ha utilitzat un mètode semblant a aquest primer: extracció PHWE dels llots activats seguit de derivatització i HS-SPME, i GC-MS-MS. A diferència del primer treball, però, aquest utilitza la

derivatització *on fiber* en lloc de la derivatització *in situ*, fet que resulta en una millora en la selectivitat i sensibilitat del mètode, i a més a més, la derivatització i la HS-SPME és completament automàtica.

La diferència entre la derivatització i HS-SPME *in situ*, i la *on fiber* és que en la *in situ* el reactiu derivatitzant pentafluorobenzaldehid (PFBAY) s'ha addicionat directament a la mostra, i posteriorment s'ha exposat la fibra de SPME a l'espai de cap del vial que conté la mostra. En canvi, en la derivatització i HS-SPME *on fiber*, en primer lloc s'impregna la fibra de reactiu derivatitzant PFBAY i a continuació aquesta fibra impregnada s'exposa a l'espai de cap del vial que conté la mostra, per realitzar la derivatització i extracció dels compostos sobre la mateixa fibra. Els grans avantatges d'aquesta modificació són dos: en primer lloc, que es permet fer el procés de forma més automatitzada, i en segon lloc, com diversos estudis han demostrat realitzant la derivatització i HS-SPME *on fiber* utilitzant altres reactius derivatitzants o analits [3,4] en la millora de reproductibilitat i sensibilitat.

En aquest nou mètode s'han optimitzat els paràmetres més influents en la derivatització i HS-SPME *on fiber*, que han estat: la temperatura i el temps d'impregnació de la fibra SPME amb el reactiu derivatitzant, el percentatge d'acetonitril en la solució del reactiu derivatitzant i la temperatura i el temps de l'extracció HS-SPME de les amines estudiades. El percentatge optimitzat d'aigua:acetonitril en la solució de reactiu derivatitzant ha estat de 9:1. La temperatura i temps d'impregnació de la fibra SPME amb el reactiu derivatitzant optimitzats han estat de 40 °C i 20 minuts, i la temperatura i temps d'extracció HS-SPME optimitzats han estat de 60 °C i 20 minuts.

El mètode desenvolupat un cop optimitzat s'ha validat utilitzant les mostres de llots activats provinents de la planta potabilitzadora d'aigües. Com s'havia observat anteriorment en l'anterior estudi en llots activats, diversos components de la matriu van afectar a l'àrea obtinguda, i es va comprovar realitzant tests estadístics (el test *F* i el test *t*, $\alpha = 0.05$, $n = 2$), que era necessari realitzar el mètode de les addicions estàndards per quantificar els compostos.

Es varen determinar els paràmetres de mèrit del mètode. Els límits de detecció obtinguts es trobaren entre 0.5 i 116 µg/kg. Cal destacar que, per la majoria de les amines, aquests nivells són entre 1.5 i 7 vegades més baixos als obtinguts en el treball anterior, exceptuant el cas de l'hexilamina i la 2-feniletilamina, que són 136 i 48 cops més baixos. Això és degut a que la derivatització i extracció es realitza de forma més selectiva, a l'impregnar la fibra amb el reactiu derivatitzant. En contraposició, l'etilamina, la isopropilamina i l'amilamina mostraren límits de detecció entre 2 i 13 vegades més alts que els del mètode anterior.

Degut a que aquest nou mètode és completament automàtic, comparat amb l'anterior, la precisió del mètode també va millorar. La reproductibilitat obtinguda es trobà entre el 6 i el 21%, en canvi, en el mètode semiautomàtic anterior, entre el 15 i el 24%. Aquest resultat concorda amb el que ja havien observat diversos investigadors [3,4] quan utilitzaven fibres impregnades de reactiu derivatitzant per realitzar la derivatització i HS-SPME *on fiber*, en lloc de la derivatització i HS-SPME *in situ*.

Emprant aquest nou mètode per determinar les 10 amines alifàtiques primàries en les diferents mostres de llots activats provinents de les diferents plantes de tractament, s'ha observat que la majoria dels compostos són detectats en aquestes mostres. En els llots activats provinents de plantes de tractament industrial s'han trobat les concentracions més elevades, entre 61 i 3358 mg/kg d'isobutilamina i isoamilamina, respectivament. Els resultats de cada tipus de llot activat no són comparables entre sí degut al diferent origen i diferent tipus de procés de tractament de cada planta. Tanmateix, en termes generals es pot comentar que els compostos més abundants són la metilamina, la isobutilamina i la ciclohexilamina.

En els llots provinents de la planta de tractament urbana es va observar la presència de totes les amines estudiades, excepte la amilamina, en la que els seus nivells es trobaren per sota del seu límit de quantificació. A més a més, les concentracions de la majoria de les amines foren més elevades que les obtingudes pels llots provinents de les plantes industrials. Les concentracions més elevades es trobaren per la metilamina, la isobutilamina, la isoamilamina i la 2-feniletilamina.

Les concentracions d'amines en els llots provinents de la planta potabilitzadora d'aigües es van trobar entre 79 (isobutilamina) i 3829 mg/kg (heptilamina). L'amilamina no va ser detectada en aquest tipus de mostres. En canvi, la isopropilamina, l'heptilamina i la 2-feniletilamina varen ser els compostos trobats a concentracions més elevades.

En el tercer treball d'aquest bloc s'han determinat les 9 EPA *N*-Nitrosamines en diversos tipus de llots activats provinents de les plantes de tractament d'aigües en estudi. El mètode que s'ha desenvolupat ha consistit en l'extracció pressuritzada amb aigua en estat subcrític (PHWE) seguit de la HS-SPME i GC-MS-MS amb ionització química. El mètode és completament automàtic i no utilitza solvents orgànics contaminants, fet pel que és respectuós amb el medi ambient.

L'extracció pressuritzada amb aigua en estat subcrític (PHWE) de les 9 *N*-Nitrosamines dels llots activats es va optimitzar utilitzant el *central composite design* com a disseny experimental, tenint en compte els paràmetres més importants de l'extracció, que han estat: la temperatura d'extracció (125 °C), el temps d'extracció (2 cicles de 5 minuts) i el pH de l'aigua com a solvent d'extracció (pH 7.5).

L'extracte de la PHWE obtingut en aquestes condicions optimitzades (~44 ml) es varen diluir a 50 ml, i d'aquí es van prendre 10 ml per realitzar la HS-SPME seguit de la GC-MS-MS. El procés de la HS-SPME i GC-MS-MS ja va ser optimitzat en l'estudi de les *N*-Nitrosamines en mostres aquoses.

La validació del mètode cromatogràfic es va dur a terme utilitzant les mostres dels llots actius provinents de la planta potabilitzadora d'aigües. Els principals paràmetres de mèrit obtinguts varen ser els següents: límits de detecció baixos, entre 30 i 150 ng/kg, i reproductibilitat igual o inferior a 19% ($n=5$, 10 µg/kg).

Es varen analitzar els diferents llots activats provinents de les diverses plantes de tractament d'aigües, i es va trobar que alguns dels compostos no apareixien en cap de les mostres analitzades: *N*-Nitrosodimetilamina, *N*-Nitrosometiletilamina, *N*-Nitrosodipropilamina, *N*-Nitrosomorfolina i *N*-Nitrosopiperidina. Aquests resultats eren esperats degut a que, per exemple, la *N*-Nitrosodimetilamina i la *N*-Nitrosometiletilamina són les *N*-Nitrosamines més polars i són més hidròfiles.

Els llots activats provinents de les plantes de tractament d'aigües residuals industrials són els que van mostrar els valors de concentració de *N*-Nitrosamines més elevats, tot i que la seva presència no era homogènia. En concret, els compostos que s'obtingueren a una concentració més elevada en aquests tipus de llots varen ser la *N*-Nitrosodietilamina i la *N*-Nitrosodibutilamina, a 371 i 305 µg/kg, respectivament.

En canvi, en els llots provinents de la planta de tractament d'aigües residuals i de la planta potabilitzadora, només s'observà la presència d'un compost, la *N*-Nitrosodibutilamina, a concentracions molt més baixes, de 2.6 i de 31 µg/kg, respectivament.

De totes les *N*-Nitrosamines estudiades, la que va donar més resultats positius en quant a la seva presència en les mostres de llots activats analitzats va ser la *N*-Nitrosodibutilamina.

A la bibliografia hi ha poca informació pel que fa a la determinació d'aquests compostos en llots activats. En concret, Padhye *et al.* [5] van determinar *N*-Nitrosodimetilamina i *N*-Nitrosopiridina en diversos tipus de mostres provinents de tres plantes de tractament d'aigües residuals urbanes: en el líquid sobrenedant dels llots provinents del tractament primari, en llots activats i en licor mixt del digestor anaeròbic, i varen trobar concentracions d'entre 57 i 994 ng/L. En canvi, no varen detectar *N*-Nitrosodietilamina, *N*-Nitrosometiletilamina, *N*-Nitrosodipropilamina i *N*-Nitrosodibutilamina. Cal destacar que l'anàlisi d'aquestes mostres de llots es va realitzar utilitzant el filtrat dels llots per SPE i GC/MS/MS i no es va utilitzar una tècnica d'extracció com a tal, com s'ha dut a terme en el present estudi.

Bibliografia

- [1] M. Akyüz, S. Ata, J. Chromatogr. A 1129 (2006) 88.
- [2] R. Alzaga, C. Maldonado, J.M. Bayona, Int. J. Environ. Anal. Chem. 72 (1998) 99.
- [3] R. Herráez-Hernández, C. Cháfer-Pericás, J. Verdú-Andrés, P. Campíns-Falcó, J. Chromatogr. A 1104 (2006) 40.
- [4] A. Scheyer, O. Briand, S. Morville, P. Mirabel, M. Millet, Anal. Bioanal. Chem. 387 (2007) 359.
- [5] L. Padhye, U. Tezel, W.A. Mitch, S.G. Pavlostathis, C.H. Huang, Environ. Sci. Technol. 43 (2009) 3087.

4. CONCLUSIONS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013

Les conclusions més importants que es deriven de la present Tesi Doctoral són les següents:

1. Els bioreactors de membranes es presenten com una alternativa vàlida als mètodes tradicionals de tractaments d'aigües residuals, presenten eliminacions superiors al 90% en COD, TOC i sòlids en suspensió.
2. Els bioreactors de membrana no són capaços d'eliminar o disminuir la conductivitat de les aigües residuals, recomanant-se tractaments terciaris (osmosi inversa) vers una futura reutilització de la mateixa.
3. L'extracció en fase sòlida seqüencial (SSPE) ha donat bons resultats per a la caracterització dels compostos orgànics que no són eliminats en els processos de tractament d'aigües.
4. Una família de ftalats estudiats ha demostrat que no son eliminats en els tractaments d'aigües, ni emprant els mètodes tradicionals amb microorganismes (CAST) ni tampoc emprant bioreactors de membranes (MBR).
5. El mètode de derivatització amb PFBAY acoblat a un sistema de SPME amb fibra de poliacrilat, i posterior determinació per GC-IT-MS-MS ha demostrat ser molt eficaç per a la determinació d'amines en aigües, obtenint-se límits de quantificació de l'ordre de ng/l.
6. El mètode desenvolupat ha permès identificar i quantificar amines en mostres d'aigua residual, urbana, industrial i en una planta potabilitzadora, podent-se determinar que tot i que algunes són eliminades en el tractament, apareixen totes elles en les aigües emeses per la planta.
7. El sistema d'extracció en fase sòlida en espai de cap acoblat a un GC-CI-MS-MS ha resultat ser un mètode adequat per a la determinació de *N*-Nitrosamines en mostres d'aigua, arribant-se a límits de quantificació de l'ordre de pocs ng/L.
8. El mètode ha permès identificar i quantificar quasi totes les nitrosamines estudiades en mostres d'aigua de plantes de tractament (xarxa, urbanes, industrials i potables), podent-se comprovar que tant sols són parcialment eliminades pels processos de tractament i que per tant són emeses a l'exterior amb els efluent.
9. El sistema d'extracció amb fluids pressuritzats (PLE) emprant aigua com a fluid (PHWE) ens ha permès disposar d'un mètode molt eficaç per a l'extracció

d'amines i *N*-Nitrosamines en mostres de fang de depuradora, sent un mètode menys contaminant per emprar aigua en lloc de solvents orgànics en el procés.

10. El procés d'extracció PHWE optimitzat, acoblat al procés de derivatització (*in situ* o *on fiber*), i acoblat a un sistema d'extracció en espai de cap a SPME i GC-IT-MS-MS permet determinar amines en mostres sòlides a nivells de $\mu\text{g}/\text{Kg}$.
11. Analitzar els fang obtinguts en diferents plantes depuradores (industrials, urbanes i potables) ens ha permès identificar i quantificar la majoria dels compostos estudiats, sobretot en algunes mostres d'origen industrial, on la concentració d'alguns d'aquests compostos és elevada.
12. En el cas de la determinació de nitrosamines en mostres de fang, el mètode permet arribar a quantificar els analits a nivells per sota dels $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

ANNEX I. Llistat de publicacions

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013

Els treballs que han sorgit de la present Tesi Doctoral, inclosos en el capítol 3, que s'han publicat en revistes científiques, són els següents:

- A. Llop, E. Pocurull and F. Borrull. "Evaluation of the removal of pollutants from petrochemical wastewater using a membrane bioreactor treatment plant". *Water, Air and Soil Pollution* 197 (2009) 349-359 (apartat 3.1.1).
- A. Llop, F. Borrull and E. Pocurull. "Comparison of the removal of phthalates and other organic pollutants from industrial wastewaters in membrane bioreactor and conventional activated sludge treatment plants". *Water, Science & Technology* 60(9) (2009) 2425-2437 (apartat 3.1.2).
- A. Llop, E. Pocurull and F. Borrull. "Automated determination of aliphatic primary amines in wastewater by simultaneous derivatization and headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A* 1217 (2010) 575-581 (apartat 3.2.1).
- A. Llop, F. Borrull and E. Pocurull. "Fully automated determination of N-Nitrosamines in environmental waters by headspace solid-phase microextraction followed by GC-MS-MS". *Journal of Separation Science* 33 (2010) 3692-3700 (apartat 3.2.2).
- A. Llop, F. Borrull and E. Pocurull. "Pressurised hot water extraction followed by simultaneous derivatization and headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of aliphatic primary amines in sewage sludge". *Analytica Chimica Acta* 665 (2010) 231-236 (apartat 3.3.1).
- A. Llop, E. Pocurull and F. Borrull. "Automated on-fiber derivatization with headspace SPME GC-MS-MS for the determination of primary amines in sewage sludge using pressurised hot water extraction". *Journal of Separation Science* 34 (2011) 1531-1537 (apartat 3.3.2).
- A. Llop, F. Borrull and E. Pocurull. "Pressurised hot water extraction followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of N-Nitrosamines in sewage sludge". *Talanta* 88 (2012) 284-289 (apartat 3.3.3).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PROCESSOS DE TRACTAMENT D'AIGÜES. DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS NITROGETATS
Anna Llop Piñol
Dipòsit Legal: T.1293-2013